

SUPPLEMENTATION EFFECTS of ONION EXTRACT (*Allium cepa* L) IN DILUENTS TO ETAWAH CROSSBREED GOAT SPERMATOZOA MEMBRANE INTEGRITY DURING FROZEN STORAGE

Suyadi¹, Sri Wahjuningsih¹ dan Suwoko Anggi Saputra²

¹Lecturer at Animal Husbandry Faculty Brawijaya University

²Undergraduate student at Animal Husbandry Faculty Brawijaya University

Veteran street, Malang, Indonesia 65145, e-mail: suyadi@ub.ac.id

ABSTRACT

This research aims was to determine the supplementation effect of the red onion (*Allium cepa* L) to membrane cell integrity spermatozoa on Etawa Crossbreed (PE) goat frozen semen. Red onion bought from a traditional market in Malang. Red onion extraction was red onion peel removed, blended, pressed, centrifuged 2 times with 1500rpm for 10 minute, separated red onion fluid from its residue, and than the extract being inactivated in temperate 56°C for 45 minute. Methods used in this research was completely randomized design with a pattern of nested. Each treatment has 16 repetition which observed at equilibration and post thawing. The variables measured include the macroscopic test (color, pH, volume) and microscopic test (sperm concentration, sperm motility, percentage of live spermatozoa and sperm cell membrane integrity). During the freezing process, membrane integrity damaged by cold shock and free radicals that damage the membrane lipid bilayer. This research showed that the addition of 2% red onion extract was the best concentration in maintaining the sperm cell's membrane integrity. The result showed that the membrane integrity could be saved until 73.29 ± 1.31 . The conclusion was the onion extract in AndroMed® diluent could maintain cell membrane integrity of spermatozoa from free radicals, reactive oxigenspecies (ROS) during frozen storage.

Keywords: Spermatozoa, ROS, Onion Extract, Semen Quality

EFEK SUPLEMENTASI EKSTRAK BAWANG MERAH (*Allium cepa* L) DALAM PENGENCER TERHADAP INTEGRITAS MEMBRAN SEL SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN ETAWAH (PE) SELAMA PENYIMPANAN BEKU

Suwoko Anggi Saputra¹ Suyadi² dan Sri Wahjuningsih²

1) Mahasiswa Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

2) Dosen Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya

Jl. Veteran, Malang, Indonesia 65145, e-mail: wokoanggris@gmail.com

ABSTRACT

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penambahan bawang merah (*Allium cepa* L) terhadap integritas membrane sel spermatozoa pada semen beku kambing peranakan etawa (PE). Bawang merah di peroleh dari pasar lokal di daerah malang. Ekstrak bawang merah (EBM) dibuat dengan prosedur bawang merah dikupas, dibersihkan,

dihaluskan, diperas, disentrifugasi 2 kali, dipisahkan dari endapannya, kemudian dinaktivasi dengan suhu 56°C selama 45 menit. Pengencer dibuat dari AndroMed yang ditambah aquabides 1:4, kemudian ditambahkan EBM dengan konsentrasi 0,1,2,dan 3%. Metode penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola tersarang. Pada masing – masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 16 kali serta dilakukan pengamatan 2 kali pada waktu ekuilibrasi dan waktu post *thawing*. Variabel yang diamati meliputi uji makroskopik (warna, pH, volume) dan uji mikroskopik (konsentrasi spermatozoa, motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup dan integritas membran sel spermatozoa). Selama proses pembekuan integritas membran mengalami kerusakan akibat cold shock dan radikal bebas ROS yang merusak membran lipid bilayer. Hasil dari pengamatan menunjukkan bahwa penambahan 2% EBM merupakan konsentrasi yang terbaik dalam mempertahankan integritas membran sel spermatozoa kambing PE. Hasil yang didapatkan adalah integritas membran dapat dipertahankan hingga $73,29 \pm 1,31\%$. Kesimpulan EBM dalam pengencer AndroMed[®] dapat mempertahankan integritas membran sel spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas *reactive oxigenspecies* (ROS)selama penyimpanan beku.

Kata kunci: Spermatozoa, ROS, Ekstrak Bawang Merah, Kualitas semen.

PENDAHULUAN

Kambing PE atau sering disebut dengan kambing PE merupakan kambing yang dipelihara dengan tujuan untuk menghasilkan susu dan daging atau disebut dwiguna. Pejantan kambing etawah dapat dijadikan kambing pedaging hal ini disebabkan karena pertumbuhan bobot badan dan kualitas karkas yang lumayan baik. Tetapi populasi kambing ini masih sedikit. Achlis, Anwar, Hidanah, Srianto (2013) menyatakan bahwa populasi kambing PE di Indonesia kini baru mencapai 3,9 juta ekor atau 30% dari jumlah ternak kambing nasional yang mencapai 13 juta ekor.

Melihat potensi tersebut maka pengembangan usaha peternakan kambing PE ini mulai diperhatikan oleh pemerintah. Salah satu upaya yang dilakukan untuk menunjang pengembangan kambing PE salah satunya melalui program Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi Buatan merupakan teknologi reproduksi ternak yang dapat diterima secara luas oleh seluruh lapisan masyarakat karena biayanya yang murah dan

sangat efektif untuk menyebarkan bibit unggul (Winarto dan Isnaini, 2008).

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB adalah kualitas semen,kondisi betina, deteksi estrus dan ketrampilan inseminator. Aplikasi IB dapat menggunakan semen cair (*fresh semen*) maupun semen beku (*frozen semen*). Semen beku lebih efisien penggunaannya karena semen beku dapat disimpan untuk jangka waktu yang lama. Masalah yang dihadapi adalah fertilitas semen beku masih rendah. Spermatozoa kambing dapat mempertahankan motilitas setelah pembekuan sampai *thawing* sekitar 40-60 %, namun hanya sekitar 10 - 30 % yang tidak mengalami kerusakan biologik

Kualitas semen beku yang rendah juga disebabkan adanya radikal bebas. Reaksi peroksidasi yang dapat merusak komponen struktural membran terutama pada bagian akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler.

Pengencer AndroMed[®] merupakan pengencer yang digunakan karena mengandung komposisi yang memenuhi syarat untuk digunakan sebagai pengencer. Pengencer AndroMed[®] mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan gliseril phosphoryl cloin (GPC). Fruktosa sebagai substrat energi utama yang terkandung dalam bahan pengencer dasar AndroMed[®] dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan. Tetapi spermatozoa yang diencerkan dengan AndroMed[®], ROS masih berkembang hal ini disebabkan tidak terdapatnya antioksidan dalam pengencer AndroMed[®].

Reaksi berantai pada radikal bebas dapat diputus oleh antioksidan. Pemutusan jaringan berantai ini dapat terjadi, hal ini dikarenakan antioksidan menyumbangkan elektro bebasnya ke dalam ikatan radikal bebas. Sehingga susunan kimiawi radikal bebas dapat berubah. Radikal bebas akan mengakibatkan terjadinya proses peroksidasi lipid. Salah satu tumbuhan yang mengandung antioksidan adalah bawang merah.

Bawang merah (*Allium cepa L*) merupakan tanaman yang sangat mudah didapatkan serta dapat tumbuh di manapun. Bawang merah umumnya digunakan sebagai bumbu masak dan juga untuk pengobatan karena memiliki banyak khasiat. Menurut Putri, Pudjadi, dan Kartikawati,(2010) Bawang merah mengandung zat-zat non gizi (fitokimia). Senyawa fitokimia yang terdapat dalam bawang merah yaitu allisin, alliin, allil propel disulfid, fitosterol, flavonol, flavonoid, kaempfenol, quersetin, quersetin glikosida, pektin, saponin,dll.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pembekuan Semen kambing PE dengan pemberian Ekstrak Bawang Merah (EBM) dalam pengencer AndroMed[®] terhadap integritas membran sel spermatozoa kambing PE.

MATERI DAN METODE

Materi dan Bahan Penelitian

1. Semen segar Kambing PE , umur 2 tahun, bobot badan 60 kg dalam keadaan sehat. Pakan yang diberikan adalah kosentrat 3Kg dan hijauan 8 Kg (rumput gajah) setiap hari, dan air minum diberikan secara adlibitum. motilitas individu 70% dan motilitas massa (+++). Semen kambing ditampung 2 kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan.
2. Bahan pengencer yang digunakan adalah *AndroMed[®]* (minitube *made in germany* Ref.: 13503/0200) yang ditambah aquabides(IKA No. Reg : D.2018020-IV) dengan perbandingan 1:4. Bahan ekstrak merupakan bawang merah lokal yang diperoleh dari pasar Merjosari Malang.
3. Bahan pendukung yang digunakan berupa eosin-negrosin (BBIB Singosari), NaCl 3% (Merck KGaA reg.no K31519804 249),

Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola tersarang. Perlakuan utama adalah kadar EBM 0%, 1%, 2%, 3% dalam pengencer AndroMed[®] 100%, 99%, 98%, 97%.

Perlakuan tersarang adalah lama penyimpanan minimal 24 jam pada saat ekuilibrasi sampai post *thawing* pada suhu beku 196°C . Semua perlakuan diulang sebanyak 16 kali.

Tahapan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Bawang Merah

Bawang merah sebanyak 100 gram dikupas dan dicuci, dihaluskan dengan blender dan disaring dengan kain saring. Ekstrak bawang merah dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm dan dipisahkan dari residu di lakukan dua kali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Selanjutnya ekstrak bawang merah dilakukan inaktifasi dalam oven bersuhu 56°C selama 30 menit dan disimpan pada suhu dingin dalam refrigerator (Caridi dkk., 2007).

2. Pembuatan larutan pengencer AndroMed[®] diencerkan dengan aquabides dengan perbandingan 1:4. Pengenceran dilakukan dengan cara aquabides dipipet sebanyak 80 ml, kemudian diletakkan di tabung reaksi. Aquabides ditambahkan secara langsung ke dalam tabung reaksi yang telah berisi AndroMed[®] sebanyak 20 ml. AndroMed[®] yang telah ditambahkan aquabides dihomogen. Pengencer yang sudah homogen disimpan dalam refrigerator pada suhu $4-5^{\circ}\text{C}$ sampai digunakan pada penelitian. Sebelum digunakan pengencer AndroMed[®] ditambah ekstrak bawang merah yang sebelumnya telah dibuat dengan kadar 0, 1, 2, dan 3%.

3. Pembuatan larutan HOST

Larutan HOST dibuat dengan cara ditimbang 0,31 g :Na-sitrat. H_2O ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan 0,5659 g :d-fruktosa. Kedua bahan tersebut dihomogenkan dengan 50 ml aquabides dan disimpan pada suhu $4-5^{\circ}\text{C}$.

4. Penampungan semen, dua kali seminggu dengan metode vagina buatan.

5. Pemeriksaan semen segar meliputi makroskopis (warna, bau, kekentalan, pH dan volume) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran)

6. Semen diencerkan dengan larutan pengencer kemudian dimasukkan ke dalam straw.

7. Semen diekuilibrasi pada suhu $4-5^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam

8. Pengamatan integritas membran sel spermatozoa setelah ekuilibrasi.

9. Pra pembekuan semen diupkan pada nitrogen cair dengan suhu -110°C selama 9 menit

10. Pembekuan semen dilakukan dengan memasukan semen kedalam nitrogen cair yang bersuhu -196°C selama minimal 24 jam (Feradis, 2010).

11. Semen dithawing pada air dengan suhu $37-38^{\circ}\text{C}$ selama 15 detik (Achlis dkk., 2010)

12. Pengamatan integritas membran sel spermatozoa setelah *post thawing*.

Analisa Data

Data yang di peroleh dari pengamatan kualitas semen dianalisa menggunakan analisis ragam dengan nilai taraf F 0,05. Jika hasil analisa ragam lebih kecil atau

sama dengan nilai taraf F 0,05, maka akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD), menggunakan software SPSS 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar.

Hasil evaluasi semen segar ini digunakan sebagai penentu apakah semen dapat untuk dip roses lebih lanjut dan perbandingan saat terjadi perubahan setelah semen dilakukan penyimpanan. Evaluasi semen segar meliputi pemeriksaan makroskopis yaitu pengukuran volume, derajat keasaman (pH), warna dan konsistensi. Serta evaluasi semen secara mikroskopis yang dilakukan dengan pemeriksaan menggunakan mikroskop yang berupa motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas dan abnormalitas. Rataan dan standart deviasi hasil evaluasi semen segar kambing PE yang dilakukan sebanyak 4 kali penampungan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan kualitas semen segar kambing PE

Variabel	Rataan ± standart deviasi
Volume (ml/ejakulasi)	1,2±0,18
Konsistensi	Kental
Ph	7
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Motilitas massa	3+
Motilitas individu (%)	80
Viabilitas (%)	95,53±2,75
Abnormalitas (%)	1,32±0,471
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	3830±93.452
Integritas membran (%)	90,805±0,846

Sumber : Data primer 2014

Kualitas semen segar di atas memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut sebagai semen beku (Susilawati 2011).

Beberapa hal yang dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa, antara lain faktor individu, pakan, lingkungan, teknik dan frekuensi koleksi semen serta kondisi media pengencer, diantaranya pH dan tekanan osmotik (Arifantini dkk., 2005).

Integritas membran sel spermatozoa

Membran plasma merupakan perlindungan pertama spermatozoa terhadap pengaruh seminal plasma ataupun pengencer. Terjadinya perubahan struktur pengencer atau seminal plasma dapat mempengaruhi integritas membran spermatozoa selama penyimpanan. Perubahan struktur ini disebabkan adanya ROS yang terbentuk selama proses penyimpanan. Uji yang dilakukan untuk mengetahui presentase integritas membran adalah menggunakan metode uji HOST (*hyposmotic swelling test*)

Metode HOST ini sudah terbukti merupakan suatu metode yang baik untuk mengevaluasi integritas membran sel spermatozoa hewan domestik (Fonseca *et al*, 2005) seperti kuda, babi, dan sapi (Lodhi *et al*, 2008) hal tersebut dapat dilihat dengan mengamati terjadinya perubahan pada ekor spermatozoa. pada spermatozoa yang hidup atau mempunyai membran plasma yang baik maka media HOST yang dipaparkan akan mengaktifkan biokimia aktif yang terdapat pada membran untuk menyeimbangkan cairan di dalam dan di luar sel spermatozoa sehingga larutan hypo-osmotik dapat masuk ke dalam spermatozoa, media HOST menyebabkan perluasan sel membran ekor spermatozoa sehingga menggembung dan puncaknya

memaksa flagellum untuk menggulung. Susilowati, (2003) mengatakan membran plasma yang utuh ditandai dengan pemutaran ekor, karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Sebaliknya spermatozoa dengan membran plasma yang rusak atau permeabilitasnya meningkat, larutan hypoosmotik dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus (Mafruchati, 1997).

Membran plasma yang rusak akan berpengaruh terhadap motilitas, sehingga fertilitas akan terganggu. Kerusakan membran dapat diakibatkan oleh adanya peroksidasi lipid selama penyimpanan akibat proses metabolisme spermatozoa.

Peroksidasi lipid yang terjadi pada spermatozoa menyebabkan terjadinya kerusakan membran plasma spermatozoa, sehingga terjadi gangguan keseimbangan tekanan osmose didalam dan diluar sel (Hartono, 2008).

Toelihere (1993) menyatakan bahwa selama pendinginan dan pembekuan semen terjadi penurunan kualitas semen sebagai akibat kerusakan membran, sehingga spermatozoa mudah mengalami cold shock dan peroksidasi lipid sel membran Selanjutnya

Hasil penelitian presentase integritas membran semen kambing PE dalam pengencer AndroMed[®] yang ditambahkan EBM yang dibekukan kemudian *dithawing* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Presentase integritas membran sel spermatozoa kambing PE dalam pengencer *AndroMed*[®] dengan penambahan EBM selama penyimpanan suhu beku/-196⁰ (rata-rata ± SD)

Konsentrasi EBM	Rataan integritas membran sel selama penyimpanan(%) ± Standart devisiasi	
	ekuilibrase	<i>Post thawing</i>
<i>AndroMed</i> [®]	75,40±1,43	66.27±1,46
<i>Andromed</i> [®] + 1% EBM	72,75±1,48	68.31±1,29
<i>AndroMed</i> [®] + 2% EBM	77,29±1,41	73.29±1,31
<i>AndroMed</i> [®] + 3% EBM	73,33±1,64	66.47±1,97

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan bahwa tingkat penambahan EBM memberikan perbedaan nyata (P<0,05) terhadap integritas membran sel spermatozoa Kambing PE.

Ekstrak Bawang Merah sebanyak 2% memberikan perbedaan yang signifikan (P<0,05) terhadap perlakuan lainnya terhadap integritas membran spermatozoa pada saat ekuilibrase yaitu 77,29±1,41 dan setelah *dithawing* yaitu 73.29±1,31 penurunan yang lebih rendah jika dibanding dengan tanpa ditambah dengan EBM hasil di atas lebih besar dari hasil iswandi (2014) yaitu 8,91±0,68%.

Dan sebanding dengan penelitian Ariantie dkk. (2013), yaitu 77,01±3,18% dan 81,45±4,45% (Tambing dkk., 2000). hal ini dikarenakan penambahan antioksidan yang memberikan pengaruh yang nyata dalam mempertahankan integritas membran. Setiadi, Suprayogi dan Yulnawati (2006) yang menyatakan bahwa anti oksidan dapat mencegah peroksidasi asam lemak tak jenuh di

dalam dan di dinding sel, sehingga dapat menghindari kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap integritas membran dan fertilitas spermatozoa. Antioksidan merupakan senyawa nukleofilik atau yang mempunyai kemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas. (Pesh dan Hoffman, 2007). EBM mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa dengan mencegah terjadinya proses peroksidasi lipid membrane spermatozoa. Bawang merah (*Allium cepa* L.) mempunyai kandungan quercetin tertinggi. Quercetin merupakan flavonoid alami dan dikenal sebagai antioksidan untuk mengatasi radikal bebas (Lachman, et al, 2003).

Dasrul, Rasmaidar, Harris (2012) menyatakan bahwa persentase MPU (membran plasma utuh) spermatozoa yang ditemukan anti oksidan memberikan pengaruh terhadap persentase MPU spermatozoa menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Keutuhan membran plasma terdapat hubungan dengan pemeriksaan motilitas serta daya hidup spermatozoa. Membran plasma yang rusak akan berpengaruh terhadap motilitas, sehingga fertilitas akan terganggu. Park dan Graham (1992) bahwa kerusakan spermatozoa umumnya terjadi karena dehidrasi seluler atau terbentuknya kristal es intra seluler pada saat penurunan suhu dari 15 °C ke 4 °C serta rusaknya membrane sel spermatozoa karena radikal bebas, sehingga terjadi kehilangan potensi motilitas progresif dan integritas membran yang berakibat pada menurunnya waktu kapasitas pada saluran reproduksi betina

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Penambahan EBM dapat mempertahankan integritas membran sel spermatozoa kambing PE

Saran

1. Disarankan untuk melakukan penambahan EBM 2% dalam pengencer AndroMed[®] guna mempertahankan kualitas semen beku kambing PE
2. Perlu dilakukan uji fertilitas in vivo dengan melakukan IB menggunakan semen beku yang telah disuplementasi EBM pada pengencer AndroMed[®].

DAFTAR PUSTAKA

- Achlis, R., H. Anwar, S. Hidanah dan P. Srianto. 2013. The Quality of Etawa Goat-Breed's Frozen Semen in Various Types of Diluent, *Veterine*, 6 (1): 69-74.
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf dan N.Graha. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Friesian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. *Buletin Peternakan. Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor*. 29 (2)
- Caridi, D., V. C. Trenerry, S. Rochfort, S. Duong, D. Laughler dan R. Jones. 2007. Profiling and Quantifying Quercetin Glucosides in Onion (*Allium cepa* L.) Varieties Using Capillary Zone Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry* 105: 691-699.

- Dasrul, Rasmaidar, A. Harris.2013. Efektivitas Penambahan Vitamin E (alfa-Tokoferol) dalam Medium Pencucian Sperma dengan Sentrifugasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman. *Agripet*.12(2): 7-14
- Fonseca, J.F., C.A.A. Torres, V.V. Maffilli, A.M. Borges, A.D.F. Santos, M.T. Rodrigues and R.F.M. Oliviera. 2005. Hypoosmotic Swelling Test In Fresh Goat Spermatozoa. *Anim. Reprod*. 2(2): 139-144.
- Hammerstedt, R.H. 1993. Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation A review of the Effect on Design of Storage Preservation System. *Reprod Fert*. 5: 675-765.
- Hartono, M. 2008. Optimalisasi Penambahan Vitamin E Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Untuk Mempertahankan Kualitas Semen Kambing Boer. *J.Indon.Trop.Anim.Agric*. 33 (1): 11-19.
- Iswandi. 2014. Pengaruh Lama Simpan Semen Kambing Peranakan Etawah dalam Pengencer Ringer's Dektros dengan Ekstrak Bawang Merah (*Allium cepa*) pada Penyimpanan Suhu Kamar. Skripsi. Jurusan Produksi Ternak. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Lachman, J., D. Pronek, A. Hejtimankova, J. Dudjak, V. Pivec and K. Faitofa. 2003. Total polyphenol and Main flavonoid Antioxidants in Different Onion (*Allium cepa* L.) varieties *HORT. SCI. (PRAGUE)*. 30 (4): 142-147.
- Lodhi, L.A., M. Zubais, Z.I. Qureshi, I. Ahmad and H. Jamil. 2008. Correlation Between Hypoosmotic Swelling Test An Various Conventional Semen Evaluation Parameters In Fresh Nili-Ravi Buffalo and Sahiwal Cow Bull Semen. *Pakistan vet.j.*, 28(4):186-188
- Mafruchati, M. Luqman, M.E. Harjani, N. Widjiati and B. Poernomo. 1997. Pemeriksaan Membran Spermatozoa Pada Semen Beku Domba Setelah Diencerkan. Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 1-6
- Parks, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.
- Pesh, S and B. Hoffman. 2007. Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine. *J.Reprod. Endocrinol*. 4: 101-105.
- Putri, R.H., Pudjadi dan H. Kartikawati. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Bawang Merah (*Allium Ascalonicum*) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol HDL Serum Tikus Wistar Dengan Hiperglikemia. Artikel Penelitian. program pendidikan

- S-1 Kedokteran Umum FK
UNDIP. 1-15
- Setiadi, M.A., A. Suprayogi dan
Yulnawati. 2006. Viabilitas dan
Integritas Membrane Plasma
Spermatozoa Epididymis Anjing
Selama Penyimpanan pada
Pengencer yang Berbeda. *Media
Kedokteran Hewan* 22(2): 118 –
123
- Susilawati, T. 2003. Penentuan dan
Pengaturan Jenis Kelamin.
Fakultas Peternakan. Universitas
Brawijaya. Malang
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. UB
Press. Universitas Brawijaya.
Malang
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan
pada Ternak. Cetakan 3. Penerbit
Angkasa. Bandung. 77-89.
- Winarto, A dan N. Isnaini. 2008.
Pengaruh Tingkat Pengencer
terhadap Kualitas Spermatozoa
Kambing PE Setelah
Penyimpanan pada Suhu Kamar.
J. Ternak Tropika. 9 (2): 72-80.