

**KAJIAN PERBEDAAN MORFOMETRI SPERMATOZOA MUSANG LUWAK
(*Paradoxurus Hermaphroditus*) TANPA PEWARNAAN DAN MENGGUNAKAN
PEWARNAAN MALACHITE GREEN**

*Study on the Differences of Musang Luwak Spermatozoa Morphometry (*Paradoxurus Hermaphroditus*) Without Coloring And Using Malachite Green Stinging*

**Hanun Putri Nuraida^{1*}, Ade Miftakhul Aziz¹, Diana Santi¹, Ragil Angga Prastiya drh.,
M.Si²**

¹Mahasiswa Kedokteran Hewan FKH Universitas Airlangga, Surabaya

²Dosen Departemen Reproduksi FKH Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: hanun.putri.nuraida-2017@fkh.unair.ac.id

Abstrak

Musang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) merupakan satwa endemik Indonesia yang perlu dilestarikan populasinya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kualitas spermatozoa musang luwak jantan dengan melihat morfometri spermatozoa sebagai upaya meningkatkan perkembangbiakan musang. Sembilan ekor musang luwak jantan kami gunakan dalam penelitian ini berumur satu tahun atau lebih dan sudah pernah mengawini betina. Pengambilan semen (spermatozoa) menggunakan teknik swab after mating. Perlakuan dalam penelitian ini yaitu T1 (spermatozoa musang yang tidak diberi pewarnaan), T2 (spermatozoa musang luwak yang diberi pewarnaan malachite green). Hasil data menggunakan uji t independent. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada beberapa pengukuran yang memiliki nilai tidak signifikan $P > 0.05$ yaitu head length, perimeter, area, ellipticity, roughness, regularity, dan sperm length. Pengukuran yang memiliki nilai signifikan $P < 0.05$ dan $P > 0.01$ yaitu elongation, sedangkan nilai sangat signifikan $P < 0.01$ yaitu head width.

Kata kunci: Pewarnaan Malachite Green, Morfometri, Musang Luwak, Spermatozoa

Abstract

The civet civet (*Paradoxurus hermaphroditus*) is an endemic species of Indonesia whose population needs to be preserved. This study aims to examine the quality of male civet civet spermatozoa by looking at spermatozoa morphometry as an effort to increase civet breeding. The nine male civets we used in this study were one year old or more and had married females. The collection of semen (spermatozoa) uses the swab technique after mating. The treatments in this study were T1 (ferret spermatozoa that were not stained), T2 (civet civet spermatozoa stained with malachite green). The results of the data used the independent t test. The results showed that there were several measurements that had an insignificant value of $P > 0.05$, namely head length, perimeter, area, ellipticity, roughness, regularity, and overall length. Measurements that have a significant value of $P < 0.05$ and $P > 0.01$ are elongation, while a very significant value of $P < 0.01$ is the width of the head.

Keywords: Malachite green stain, Morphometry, Asian Palm Civet, Spermatozoa

1. PENDAHULUAN

Musang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) merupakan satwa endemik Indonesia yang perlu dilestarikan populasinya. Musang adalah hewan

berbulu yang hidup di alam liar dan termasuk jenis mamalia liar, namun belakangan ini musang menjadi hewan yang digemari oleh komunitas pecinta satwa liar atau pecinta musang itu sendiri.

Pemilik musang sering kali mengembangbiakkan hewan tersebut untuk dijual kembali, atau untuk peliharaan sendiri. Jenis musang yang sering dimanfaatkan di Indonesia untuk memproduksi kopi luwak adalah musang luwak (Savitri *et al.*, 2014).

Musang luwak termasuk hewan nokturnal atau aktif di malam hari dalam mencari makanannya dan merupakan hewan omnivora dengan tubuh kecil yang disebut viverridae (Savitri *et al.*, 2014). Musang luwak memiliki keuntungan bagi para petani kopi di Indonesia oleh sebab itu banyak sekali perburuan terhadap musang luwak. Hal ini perlu adanya tindakan konservasi dan pelestarian yaitu dengan cara penangkaran agar tidak mengakibatkan penurunan jumlah populasi. Penangkaran bertujuan untuk mempertahankan kemurnian dan mengembangbiakkan satwa liar dan tumbuhan alam supaya populasinya bertambah (Thohari *et al.*, 2011). Sukses tidaknya kegiatan penangkaran dilihat dari salah satu faktor yaitu berhasilnya satwa liar tersebut berkembang biak atau dapat menghasilkan keturunan.

Proses berkembangbiak sangat berhubungan dengan kesehatan reproduksi musang luwak jantan maupun betina. Kesehatan atau fertilitas musang luwak jantan dapat diketahui melalui pengujian kualitas spermatozoa. Penentuan kualitas spermatozoa diperlukan analisis morfologi terhadap bentuk normal dan keabnormalitasan spermatozoa. Meningkatkan populasi dapat dilakukan dengan teknologi reproduksi, teknologi reproduksi yang bisa digunakan untuk hewan – hewan liar pada pengambilan

semen sering menggunakan elektroejakulator (Arifiantini *et al.*, 2005).

Penggunaan elektroejakulator sebaiknya dihindari karena terdapat kerugian yang didapat yaitu konsentrasi sel spermatozoa rendah, menimbulkan penurunan kualitas spermatozoa pada pemakaian yang terlalu sering, kadang ejakulasi tidak disertai ereksi sehingga semen yang diperoleh sering tercampur kotoran yang berasal dari preputium (Hardijanto *et al.*, 2010). Selain itu, dapat merusak testis dan harga pembelian alat elektroejakulator sangatlah mahal. Oleh karena itu, perlu adanya teknologi reproduksi untuk pengujian kualitas spermatozoa dan teknologi yang tidak menyakiti hewan, ramah lingkungan, dan ramah hewan tetapi bisa mengecek kualitas spermatozoanya. (Palmer., 2005). Cara yang akan dicoba dalam penelitian ini dengan cara swab vagina musang luwak betina after melting dengan tujuan untuk melihat ukuran morfometri spermatozoa musang luwak.

Penelitian terhadap kualitas spermatozoa musang luwak dengan analisis morfometri menggunakan pewarnaan khusus sangat penting untuk diketahui dan dilaksanakan supaya dapat meningkatkan kualitas kesehatan reproduksi musang luwak jantan serta meningkatkan populasi musang luwak agar tidak punah. Hal ini dapat dijadikan dan dikembangkan sebagai khazanah keilmuan mengenai morfometri spermatozoa musang luwak jantan nantinya sebelum adanya teknologi-teknologi reproduksi yang semakin berkembang seperti inseminasi buatan, kloning, transfer embrio (Wajuningsih *et all.*, 2019). Spermatozoa terdiri atas kepala, leher dan ekor yang berbeda – beda setiap spesiesnya.

Ukuran – ukuran yang meliputi pengukuran kepala, leher dan ekor disebut dengan morfometri spermatozoa. Proses pengukuran morfometri spermatozoa dibutuhkan pewarnaan khusus untuk mewarnai sel spermatozoa agar lebih mudah untuk diamati dan diukur (Gage and Freckleton, 2003).

Morfometri spermatozoa mengukur ukuran struktur spermatozoa dari kepala, leher dan ekor masing – masing hewan, dan berbeda pada setiap spesiesnya. Pemeriksaan morfometri pada umumnya sel spermatozoanya dalam keadaan mati dan diberi pewarna khusus sperma agar dapat membedakan strukturnya dengan mudah (Susilowati *et al.*, 2010). *Malachite green* adalah reagen pewarna yang dapat digunakan untuk mendeteksi spermatozoa. Penggunaan malachite green memberikan efek khas dengan warna hijau yang mana memperjelas bagian spermatozoa di bagian ekornya (Ricardo *et al.*, 2014). Oleh karena itu pemeriksaan morfometri spermatozoa musang luwak dengan menggunakan pewarnaan malachite green dapat terdeteksi secara efektif (Ricardo *et al.*, 2014).

2. MATERI DAN METODE

Pengambilan semen musang luwak dilakukan di kabupaten Banyuwangi. Pengukuran morfometri dan pewarnaan spermatozoa musang luwak dilaksanakan di laboratorium instrument Fakultas Kedokteran Hewan PSDKU Universitas Airlangga di Banyuwangi. Pengambilan semen musang luwak dilakukan pada bulan September sampai Oktober 2020. Pengukuran serta analisis data dilakukan pada bulan November 2020.

Sampel yang digunakan adalah spermatozoa musang luwak yang sudah berumur satu tahun atau sudah dewasa kelamin dan sudah pernah mengawini betina berjumlah 9 ekor dimana setiap perkawinan dibuat dua preparat ulas yang diberi pewarnaan malachite green dan tanpa pewarnaan. Masing – masing pewarnaan diambil sejumlah 10 sel spermatozoa untuk dilakukan pengukuran morfometri. Analisis data dilakukan dengan menggunakan IBM SPSS Statistics 20 yang akan membahas signifikansi perbedaan nyata maupun tidak nyata spermatozoa musang luwak.

Semen didapat dari swab vagina musang luwak betina post malting. Swab dilakukan dengan menggunakan cotton bud yang telah diberi gel pelumas, setelah semen sudah berhasil didapat dengan swab maka masukanlah kedalam tube vial yang berisi NaCl fisiologis dan goyangkan cotton bud agar spermatozoa larut. Kemudian buatlah preparat ulas dan bari perlakuan dengan pewarnaan malachite green dan tanpa pewarnaan.

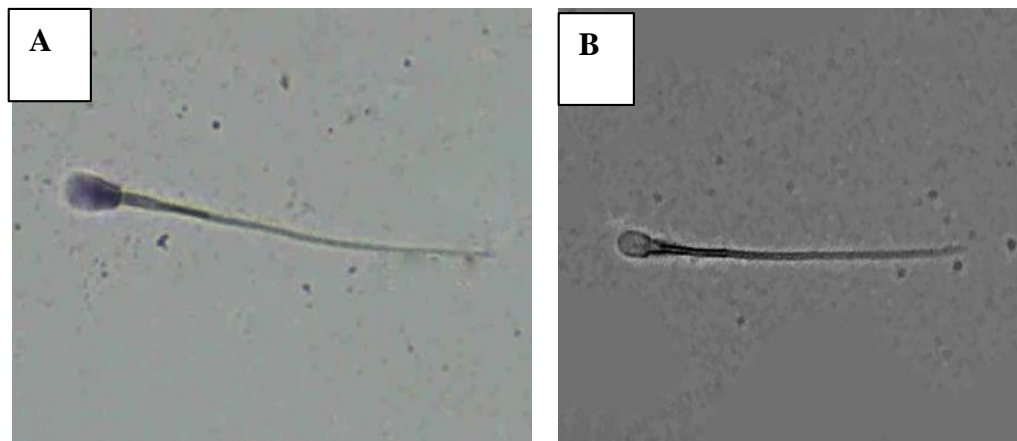
Semen yang sudah terulas di objek glass difiksasi dengan alkohol 70% biarkan kering lalu cuci dengan air kran, teteskan pewarnaan malachite green 1% selama 3 menit lalu cuci dengan air kran kemudian teteskan eosin yellowish 10% selama 1 menit dan cuci dengan air kran lalu keringkan. Setelah itu lakukan pengukuran morfometri spermatozoa dibawah mikroskop trinokuler dengan perbesaran 400x. Parameter morfometri spermatozoa yang diamati yaitu panjang kepala, lebar kepala, luas, keliling, ellipticity, elongation, roughness, regularity, panjang ekor dan panjang keseluruhan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian mengenai morfometri spermatozoa musang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) menggunakan pewarnaan malachite green dan tanpa pewarnaan sebanyak 9 musang jantan. Setiap musang luwak melakukan perkawinan untuk diambil spermatozoanya yang kemudian dibuat preparat ulas, satu perkawinan dibuat 2 preparat ulas tanpa pewarnaan dan menggunakan pewarnaan malachite green. Setiap preparat ulas baik itu yang tidak diwarnai dan yang diberi pewarnaan dilakukan pengukuran 10 spermatozoa dengan mengukur panjang kepala, lebar kepala, area, perimeter,

ellipticity, elongation, roughness, regularity, panjang ekor, dan panjang keseluruhan.

Pengamatan pada setiap preparat ulas yang tidak terwarnai dan yang diberi warna malachite green di bawah mikroskop trinokuler Nikon eclipse E200, hasil pengamatan pada preparat malachite green perbesaran 400x terlihat bagian kepala berwarna biru ekor berwarna hijau kebiruan dengan latar belakang yang tidak terwarnai. Sedangkan hasil pengamatan pada preparat yang tidak terwarnai perbesaran 400x bagian kepala sampai ekor tampak transparan (**Gambar 1**)



Gambar 1. A). Morfometri dengan pewarnaan malachite green, B). Morfometri tanpa pewarnaan.

Morfometri spermatozoa musang luwak menggunakan pewarnaan malachite

green dan tanpa pewarnaan dapat dilihat pada Tabel dibawah ini :

Tabel 1. Morfometri spermatozoa musang luwak

Parameter	Pewarnaan MG	Tanpa pewarnaan	P value
Head :			
Sperm Length (μm)	8.83 \pm 0.51	8.88 \pm 0.57	0.273
Sperm Width (μm)	4.30 \pm 0.32	4.65 \pm 0.42	0.008
Perimeter (μm)	20.62 \pm 1.08	21.24 \pm 1.27	0.199
Area (μm^2)	29.30 \pm 3.84	32.51 \pm 4.51	0.108
Ellipticity (μm)	2.06 \pm 0.15	1.92 \pm 0.18	0.119
Elongation (μm)	0.34 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04	0.031
Roughness (μm)	0.87 \pm 0.07	0.90 \pm 0.07	0.872
Regularity (μm)	1.01 \pm 0.07	1.00 \pm 0.07	0.521
Tail Length (μm)	60.89 \pm 2.97	61.69 \pm 1.89	0.072
Sperm Length (μm)	69.72 \pm 3.03	70.57 \pm 1.90	0.087

Keterangan : Uji analisis menggunakan t independent dengan hasil perbedaan nyata jika P value <0.05. Perbedaan yang sangat nyata jika P value <0.01.

Berdasarkan analisis uji t independent pada **Tabel 1** menunjukkan bahwa terdapat pengukuran yang memiliki nilai tidak signifikan ($P>0.05$) yaitu morfometri head length spermatozoa, perimeter, area, ellipticity, roughness, regularity, serta sperm length. Dimana head length spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 8.83 \pm 0.51 tanpa pewarnaan 8.88 \pm 0.57, perimeter spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 20.62 \pm 1.08 tanpa pewarnaan 21.24 \pm 1.27, area spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 29.30 \pm 3.84 tanpa pewarnaan 32.51 \pm 4.51, ellipticity spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 2.06 \pm 0.15 tanpa pewarnaan 1.92 \pm 0.18, roughness dengan pewarnaan malachite green 0.87 \pm 0.07 tanpa pewarnaan 0.90 \pm 0.07, regularity

spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 1.01 \pm 0.07 tanpa pewarnaan 1.00 \pm 0.07, dan sperma length dengan pewarnaan malachite green 69.72 \pm 3.03 tanpa pewarnaan 70.57 \pm 1.90.

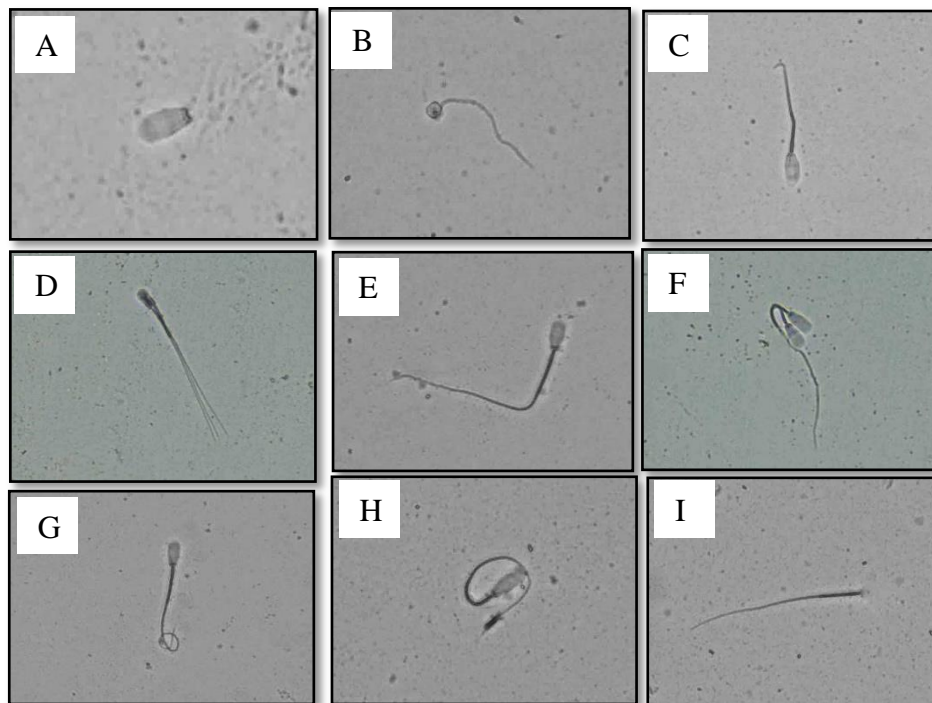
Pada pengamatan penelitian ini juga terdapat pengukuran yang memiliki nilai signifikansi ($P<0.05$ dan $P>0.01$) yaitu morfometri spermatozoa elongation dengan nilai yang diberi pewarnaan malachite green 0.34 \pm 0.03 dan tanpa pewarnaan 0.31 \pm 0.04. Sedangkan head width spermatozoa dengan pewarnaan malachite green 4.30 \pm 0.32 dan tanpa pewarnaan 4.65 \pm 0.42 menunjukkan nilai yang sangat signifikan ($P<0.01$).

Abnormalitas spermatozoa musang luwak

Hasil dari pengamatan spermatozoa musang luwak dibawah mikroskop

trinokuler perbesaran 400x terhadap 90 spermatozoa yang diwarnai dan 90 spermatozoa tanpa pewarnaan terdapat beberapa abnormalitas yang tidak diukur. Abnormalitas primer dan sekunder

spermatozoa musang luwak akan saya simpulkan di hasil penelitian ini, dimana beberapa akan saya jabarkan dibawah ini (**Gambar 2**).



Gambar 2. A). *Detached dead*, B). *Round head*, C). *Ekor patah*, D). *three tailed*, E). *Broken tail*, F). *double head dan double neck*, G). *Coiled tail*, H). *Dag defect*, I). *Headless*.

Pentingnya peran morfometri spermatozoa dibuktikan dengan semakin banyaknya publikasi yang mendeskripsikan penelitian yang dilakukan pada berbagai spesies (Czubaszek *et al.*, 2019). Karakteristik ukuran spermatozoa atau disebut dengan morfometri spermatozoa mulai dari bagian kepala dan ekor mempunyai ukuran yang berbeda pada masing – masing spesies hewan tetapi saat ini masih jarang dilaporkan (Natalia *et al.*, 2016). Karakteristik morfometri spermatozoa berkaitan dengan penilaian dalam evaluasi kualitas sperma dan fertilitas pejantan (Maroto-Morales *et al.*, 2016). Bentuk dan ukuran kepala sampai ekor spermatozoa dianggap normal jika termasuk dalam klasifikasi untuk spesies

tertentu (Czubaszek *et al.*, 2019). Menurut Maroto-Morales *et al.*, 2016 sebagian besar penelitian studi dasar morfometri spermatozoa selama ini hanya berfokus pada kepala spermatozoa sedangkan dimensi flagel spermatozoa sangat penting pada fungsi sebagai modulator spermatozoa, oleh karena itu tidak boleh mengabaikan peran flagel.

Morfometri spermatozoa penting sebagai parameter untuk memprediksi fertilitas pejantan. Spermatozoa yang kecenderungan mempunyai ukuran kepala yang normal, ukuran leher yang normal dan flagel yang panjang lebih cepat untuk sampai ke ovum dalam proses fertilisasi (Czubaszek *et al.*, 2019). Baik mamalia atau khusus karnivor kecil diagnosis fertilitas penting untuk mengoptimalkan

kemampuan reproduksi secara natural sehingga konsepsi atau kebuntingan lebih banyak terjadi (Rodriguez *et al.*, 2001). Parameter morfometri harus diuji bersamaan dengan parameter yang lain seperti motilitas dan konsentrasi spermatozoa sehingga menjadi faktor yang signifikan terhadap kualitas reproduksi (Maree *et al.*, 2010).

Penelitian mengenai morfometri spermatozoa dengan berbagai macam teknik pewarnaan bisa menggambarkan morfologi normal spermatozoa dengan ketepatan yang cukup tinggi (Iguer-Auada *et al.*, 2001). Akurasi morfologi spermatozoa berdasarkan pewarnaan sangat tergantung pada cara preparasi slide sampel, fiksasi, dan cara pemilihan jenis pewarnaan itu sendiri, kenyataannya comparative riset dengan berbagai macam pewarnaan dengan sampel spermatozoa yang sama menunjukkan perbedaan morfometrik walau tidak signifikan (Andraszek *et al.*, 2018). Perbedaan teknik pewarnaan dapat menunjukkan perbedaan ketajaman dan kejelasan bagian kepala midpiece dan ekor dari spermatozoa (Menkveld *et al.*, 2011).

Morfometri spermatozoa yang normal diukur bagian utama yaitu bagian kepala, leher dan ekor spermatozoa. Kepala spermatozoa berbentuk menyerupai payung yang memiliki kemampuan menembus membran ovum untuk proses fertilisasi (Saroeng *et al.*, 2013). Pentingnya mengukur kepala spermatozoa mulai dari panjang, lebar, luas dan keliling karena kepala sperma mengandung nukleus yang dipenuhi dengan DNA, jika DNA sperma rusak maka proses perkembangan gamet akan gagal (Hashim *et al.*, 2016). Menurut Hashim *et al.*, 2016 bagian leher

spermatozoa mengandung mitokondria yang akan menghasilkan energi untuk pergerakan spermatozoa, leher spermatozoa yang tidak normal akan menghambat pergerakan spermatozoa itu sendiri. Selain parameter morfometri dasar kepala spermatozoa, panjang leher dan panjang ekor spermatozoa, penelitian ini juga mengevaluasi empat indeks bentuk yaitu parameter kepala spermatozoa menurut klasifikasi Tygerberg antara lain elongation, ellipticity, roughness, regularity.

Hasil pengukuran morfometri spermatozoa musang luwak yaitu pada pemberian pewarna malachite green head length $8.83 \pm 0.51 \mu\text{m}$, head width $4.30 \pm 0.32 \mu\text{m}$, perimeter $20.62 \pm 1.08 \mu\text{m}$, area $20.62 \pm 1.08 \mu\text{m}^2$, ellipticity $2.06 \pm 0.15 \mu\text{m}$, roughness $0.87 \pm 0.07 \mu\text{m}$, regularity $1.01 \pm 0.07 \mu\text{m}$, tail length $60.89 \pm 2.97 \mu\text{m}$, sperm length $69.72 \pm 3.03 \mu\text{m}$ sedangkan tanpa pewarnaan head length $8.88 \pm 0.57 \mu\text{m}$, head width $4.65 \pm 0.42 \mu\text{m}$, perimeter $21.24 \pm 1.27 \mu\text{m}$, area $32.51 \pm 4.51 \mu\text{m}^2$, ellipticity $1.92 \pm 0.18 \mu\text{m}$, roughness $0.90 \pm 0.07 \mu\text{m}$, regularity $1.00 \pm 0.07 \mu\text{m}$, tail length $61.69 \pm 1.89 \mu\text{m}$, sperm length $70.57 \pm 1.90 \mu\text{m}$ (**Tabel 1**). Hasil ini tidak sama jauh dengan morfometri spermatozoa normal kucing domestik atau karnivora kecil (Barbosa *et al.*, 2019). Menurut penelitian sebelumnya menyatakan bahwa musang luwak termasuk spesies karnivora kecil (Ross *et al.*, 2016). Parameter elongation spermatozoa musang luwak pada hasil penelitian yang diberi pewarnaan malachite green dan tanpa pewarnaan masing – masing $0.34 \pm 0.03 \mu\text{m}$ dan $0.31 \pm 0.04 \mu\text{m}$ menunjukkan berbeda jauh pada penelitian Barbosa *et al.*, 2019 yaitu $21.3 \pm 0.12 \mu\text{m}$.

4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa morfometri spermatozoa musang luwak tidak sama jauh dengan morfometri spermatozoa karnivora kecil kecuali pada parameter elongation memiliki angka yang berbeda jauh. Morfometri spermatozoa musang luwak yang diukur memiliki nilai tidak signifikan $P > 0.05$ yaitu head length, perimeter, area, ellipticity, roughness, regularity, dan sperm length. Pengukuran yang memiliki nilai signifikan $P < 0.05$ dan $P > 0.01$ yaitu elongation, sedangkan nilai sangat signifikan $P < 0.01$ yaitu head width. Morfometri spermatozoa musang Abnormalitas primer ditemukan yaitu *double head*, *double neck*, *round head*, *three tailed*, sedangkan abnormalitas sekunder yang ditemukan antara lain *headless*, *detached head*, ekor patah,, *broken tail*, *coiled tail* dan *dag defect*.

DAFTAR PUSTAKA

- Andraszsek K, Banaszewska D, Biesiada-Drzazga B. The use of two staining methods for identification of spermatozoon structure in roosters. *Poult Sci*. 2018; n97(7):2575-2581.
- Arifiantini, I., Yusuf, T. L., dan Graha, N. (2005). Longivitas dan recovery rate pasca thawing semen beku sapi Fresian Holstein menggunakan bahan pengencer yang berbeda. *Buletin Peternakan*, 29(2), 53-61.
- Arios, R., Tomuka, D., & Kristanto, E. (2014). Efektivitas Deteksi Spermatozoa Menggunakan Pewarnaan Malachite Green. *Jurnal E-CliniC (eCl), Manado*.
- Czubaszek, M., Andraszsek, K., Banaszewska, D., & Walczak-Jędrzejowska, R. (2019). Pengaruh teknik pewarnaan terhadap parameter morfologi dan morfometri sperma babi hutan. *Plos satu*, 14 (3), e0214243.
- Gage, MJ, dan Freckleton, RP (2003). Ukuran testis relatif dan morfometri sperma lintas mamalia: tidak ada bukti untuk hubungan antara kompetisi sperma dan panjang sperma. *Prosiding Royal Society of London. Seri B: Ilmu Biologi*, 270 (1515), 625-632.
- Hardijanto, S. S., Hernawati, T., Sardjito, T., dan Suprayogi, T. W. (2010). *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal, 40.
- Hashim, N., Osman, K., Ibrahim, S. F., Harun, R., & Mohamed, R. P. (2016). Kesan Psikostres terhadap Kerosakan DNA dan Ketaknormalan Titisan Sitoplasma Sperma Manusia. *Sains Malaysiana*, 45(12), 1931-1938.
- Iguer-Ouda M, Verstegen JP. Validation of the Sperm Quality Analyzer (SQA) for dog sperm analysis *Theriogenology*. 2001; 55: 1143-1158.
- Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, Van der Horst G. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod*. 2010;25: 1369-1382.
- Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, MR, Soler, AJ, & Garde, JJ (2016). Status terkini dan potensi analisis sperma

- morfometri. *Jurnal andrologi Asia*, 18 (6), 863.
- Menkveld R, Holleboom CAG, Rhemre JPT. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl.* 2011;13: 59-68.
- Natalia, F., Sardjito, T., Adikara, R. T. S., Utama, S., Warsito, S. H., & Srianto, P. kajian morfometri spermatozoa terejakulasi sugar glider (*Petaurus breviceps papuanus*) morphometric analysis of sugar glider (*Petaurus breviceps papuanus*).
- Novelina, S., Putra, S. M., dan Setijanto, H. (2014). Tinjauan makroskopik organ reproduksi jantan musang luak (*Paradoxurus hermaphroditus*). *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 2(1), 26-30.
- Palmer, C. W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 64(3), 469-479.
- Rodriguez I, Sanz J, Perez C, Felipe M, Dorado J, Hidalgo M fertilidad in vivo del espermacongelado-descongelado. I Jornadas de Investigation, Cordoba, Spain; 2001. Pp.317-321
- Saroeng, M. A., & Razali, R. (2013). Struktur Morfologi Gonad Jantan Geloina erosa Pada Berbagai Ukuran Cangkang di Kawasan Ekosistem Mangrove Sungai Reuleng Leupung Kabupaten Aceh Besar. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 7(2).
- Susilowati, S. Hardijanto., T.W. Suprayogi., T. Sardjito., dan T. Hernawati. (2010). Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 11- 24, 29-30.
- Thohari M, Masyud M, Takandjandji M. (2011). Teknis Penangkaran Rusa Timor (*Cervus timorensis*) untuk Stok Perburuan. Makalah yang disampaikan pada Seminar Sehari Prospek Penangkaran Rusa Timor (*Cervus timorensis*) sebagai Stok Perburuan. IPB International Convention Center, 14 April 2011.
- Wajuningsih, S., Susilawati, T., Ihsan, M.N., Busono, W., Isnaini, N., et al. (2019). Teknologi reproduksi ternak. Universitas Brawijaya Press.
- De Sousa Barbosa, B., Rodrigues Silva, H. V., Evaristo de Almeida Tabosa, B., Gothardo Pereira Nunes, T., de Magalhães, F. F., et al.. (2019). Morphological and morphometric characterization of domestic cat epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(12), 1630-1636.
- Ross, J., Hearn, A. J., Macdonald, D. W., Alfred, R., Cheyne, S. M., et al. (2016). Predicted distribution of the Malay civet *Viverra zangalunga* (Mammalia: Carnivora: Viverridae) on Borneo. *Raffles Bulletin of Zoology*.