KEBERHASILAN PENGGUNAAN TIGA PENGENCER DALAM DUA JENIS KEMASAN PADA PROSES PEMBEKUAN SEMEN SAPI *FRISIEN HOLSTEIN*

RI. ARIFIANTINI DAN TL. YUSUF
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

RINGKASAN

Motilitas sperma (% SM) dan sperma hidup (% SH) setelah pascathawing digunakan sebagai kriteria penilaian keberhasilan penggunaan tiga macam pengencer dalam dua kemasan yang berbeda. Lima belas ejakulat dari tiga ekor sapi FH diencerkan dengan tiga macam pengencer, yaitu tris kuning telur (TKT), *home made* triladyl (HMT) dan androMed, yang mengandung lesitin kacang kedelai (KK), masing-masing dikemas dalam minitub 0.3 ml and straw Cassou 0.25 ml. Sampel diekuilibrasi selama empat jam pada temperatur 5^{o}C kemudian dibekukan dalam uap nitrogen cair selama 10 menit.

Hasil pascathawing menunjukkan % SM dan % SH pada pengencer KK (56,28; 74,22) lebih tinggi ($P<0.05$) jika dibandingkan dengan HMT (47,60; 65,93) dan TKT (48,74; 69,63). Tidak ada perbedaan kualitas pada teknik pengemasan dengan SM dan SH masing-masing 52,16; 69,4% (minitub) dan 49,59; 70,44% (Cassou). Persentase SH pada KK minitub (72,76±10,83) dan KK Cassou (75,67±8,1) menunjukkan hasil yang sama lebih baik jika dibandingkan dengan kombinasi lainnya. Persentase SM pada KK minitub (57,9±7,81) lebih tinggi jika dibandingkan dengan KK Cassou atau kombinasi lainnya.
Kata kunci : Semen beku, sapi, tris, androMed, dan triladyl

SUMMARY

Motility and the percentage of live sperm in thawed frozen semen was used acriterion to evaluate methods of three types of semen cryopreservation. Fifteen ejaculates from three Frisien Holstein (FH) were diluted in three extenders, namely TEY (Tris egg yolk), home made triladyl (HMT) and AndroMed containing soya lecithin (KK). Each semen sample was packed using two techniques (0.3 ml minitub and 0.25 ml Cassou straw). The samples were equilibrated (5^{o}C) for four hour and frozen in the vapor of liquid nitrogen for 10 minutes.

The percentages of post thawed e motility and life sperm were 56.28 and 74.22 for KK which were greater than HMT (47.60; 65.93) and TEY (48.74; 69.63) ($P<0.05$). There were no significant different in the percentages of the progressive motile and life sperm freezing in 0.3 ml (52.16; 69.4) or 0.25 ml (49.59; 70.44). The percentages of life sperm at KK minitub (72.76±10.83) and KK Cassou (75.67±8.1) were greater than any other combination. The percentages of progressive motile sperm in KK minitub (57.9±7.81) were greater than KK Cassou or any other combination.
Keyword : Frozen semen , bull, tris, androMed and triladyl

PENDAHULUAN

Pemanfaatan semen beku mulai berkembang setelah ditemukannya gliserol oleh Polge pada tahun 1949 (Royere *et al.,* 1996) dengan kemasan yang digunakan pertama kali berbentuk pellet. Kemasan semen lain yang berkembang selanjutnya adalah ampul, mini (0,25 ml) dan medium (0,5 ml) straw, minitub (0,25 dan 0,3 ml), *macrotub* (5 ml) serta kemasan plitplat (5ml) yang digunakan pada semen beku babi. Kemasan yang sekarang populer dan digunakan secara universal adalah kemasan straw 0,25 dan 0,5 ml Cassou (IMV, Prancis) dan minitub 0,25; 0,3 dan 0,5 ml (Minitub, Jerman). Di Indonesia saat ini terdapat dua balai inseminasi buatan (BIB) nasional dan beberapa balai inseminasi buatan daerah (BIBD), yang menggunakan dua kemasan straw, yaitu ministraw dan minitub.

Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat *thawing* (Aboagla dan Terada, 2004a). Karena itu, bahan pengencer semen beku harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik, dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing*. Sumber nutrisi yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat terutama fruktosa yang paling mudah dimetabolisasi oleh spermatozoa (Toelihere, 1993). *Buffer* berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dan juga berfungsi menetralisir asam laktat yang dihasilkan dari sisa metabolisme spermatozoa. *Buffer* yang umum digunakan adalah tris (*hydroxymethyl*) aminomethan yang mempunyai kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsentrasi yang tinggi (Steinbach dan Foote, 1967). Bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan adalah kuning telur atau kacang kedelai (Aboagla dan Terada, 2004b), yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28^{o}C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibrasi (5^{o}C).

Saat ini secara meluas telah dan digunakan bahan pengencer yang mengandung *buffer* seperti tris *(hydroxymethyl)* aminomethan yang secara universal digunakan untuk semen beku sapi (Davis *et al.,* 1963; Anzar dan Graham., 1995); semen kambing (Suwarso, 1999); semen domba (Hahn, 1972; Maxwell dan Salamon, 1993); semen anjing (Yildiz *et al.,* 2000) dan semen ayam

(Sexton, 1978; Abdillah, 1999). Selain pengencer semen yang dapat dibuat berdasarkan resep, terdapat berbagai pengencer kemasan yang telah beredar dan dapat diperoleh di pasaran seperti Biochiphos dan Bioexcel (IMV, Perancis) juga triladyl, biladyl dan pengencer AndroMed (Minitub Jerman) yang menggunakan lesitin dari kacang kedelai (KK).

Tujuan Penelitian ini adalah 1). untuk membandingkan bahan pengencer tris kuning telur (resep dari FKH-IPB), triladyl (*home made*) dan pengencer KK (lesitin kacang kedelai) terhadap kualitas semen beku sapi FH, 2) membandingkan kemasan minitub 0.3 mL dan ministraw 0.25 mL terhadap kualitas semen beku sapi FH, serta 3) membandingkan kombinasi antara pengencer dan kemasan semen beku pada sapi FH.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dimulai dari bulan Pebruari sampai Agustus 2004.

Materi Penelitian

Hewan Percobaan

Hewan yang dipergunakan sebagai sumber semen adalah tiga ekor sapi FH (*Frisien Holstein*) jantan dewasa kelamin, ditempatkan dalam kandang individu. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput segar dan konsentrat serta air minum diberikan *ad libitum*.

Metode Penelitian

1. Persiapan Bahan Pengencer

Bahan pengencer dibuat pada hari penampungan dengan komposisi seperti pada Tabel 1.

2. Penampungan dan Evaluasi Semen

Penampungan semen dilakukan dua kali dalam satu minggu pada pagi hari sebanyak dua ejakulat menggunakan vagina buatan. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Tabel 1 Komposisi bahan pengencer semen beku yang digunakan

Komponen	**TKT**	**HMT**	**KK**
Tris *(hydroxymethyl)* aminomethan (g)[1)]	3.87	2.42	
Asam sitrat (g) [1)]	2.17	1.48	
Fruktosa (g) [1)]	1.56	1	
Kuning telur (ml)[2)]	20	20	
Andromed konsentrat (ml)[3)]	-	-	20
Gliserol (ml) [1)]	6.4	6.4	
Penisilin (IU) [4)]	500.000	500.000	
Streptomisin (mg) [4)]	50	50	
Aquabidest *ad* (ml)	100	100	100

1)Merck; 2) telur ayam ras; 3) Minitub Jerman ; 4) Meiji
TKT= Tris kuning telur; HMT= *home made triladyl*; KK= pengencer lesitin kacang kedelai

Evaluasi secara makroskopis meliputi pemeriksan volume (ml), warna, pH (*pH special indicator paper*; Merck, skala 6,5-10) dan konsistensi.

Penilaian mikroskopis meliputi: gerakan massa; diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen segar ke gelas obyek yang bersih dan hangat lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Kriteria penilaian : +++ (3); gerakan massa yang paling baik yang ditandai dengan gelombang besar, gelap bergerak cepat, dan berpindah-pindah tempat; ++(2), gerakan massa yang baik ditandai dengan gelombang besar, tipis, jarang, dan bergerak lambat; + (1) gerakan massa yang kurang baik ditandai dengan gelombang tipis dan jarang.

Persentase sperma motil (% SM) dievaluasi secara subjektif kuantitatif yang dilakukan dengan meneteskan sedikit semen di atas gelas objek yang bersih dan hangat, kemudian ditambahkan 4-5 tetes NaCl fisiologis, dihomogenkan dan diambil satu tetes pada objek gelas yang lain dan ditutup dengan gelas penutup. Jumlah spermatozoa diusahakan setiap lapang pandang hanya 10-20 sel dan dihitung dari 10 lapang pandang yang berbeda. Penilaian dilakukan mulai dari 0% tidak ada SM yang bergerak progresif sampai 100% bergerak progresif seluruhnya dengan kisaran penilaian 5% (Sorenson, 1979). Pemeriksaan persentase sperma hidup (% SH) dan sperma abnormal (% SAN) menggunakan preparat differensial (Barth dan Oko, 1989) dengan pewarnaan eosin nigrosin. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *hemocytometer* pada kamar hitung *Neubauer*, yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali pada lima kotak yang mewakili empat bagian sisi dan satu di tengah (Parrish, 2003).

3. Pengenceran dan pengemasan Semen

Semen yang berkualitas tinggi dibagi tiga bagian dan masing-masing dilarutkan dengan pengencer TKT, HMT dan KK dengan dosis pengenceran 25 juta/0.25 ml (straw Cassou) dan 25 juta/ 0.3 ml (minitub). Pengenceran dilakukan satu tahap pada temperatur ruang. Semen dilarutkan dengan bahan pengencer secara perlahan-lahan tetes demi tetes. Semen yang telah dilarutkan untuk masing-masing pengencer dikemas dalam straw 0.25 ml dan minitub 0.3 ml.

4. Ekuilibrasi, pembekuan, dan *thawing*

Ekuilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menyesuaikan diri sebelun dilakukan pembekuan. Itu dilakukan dengan cara menempatkan straw pada temperatur 5^{o}C selama empat jam. Setelah ekuilibrasi, ditentukan proses pembekuan, dengan cara meletakkan straw pada uap nitrogen (N_2) cair, menggunakan boks styrofoam yang berukuran panjang x lebar x tinggi masing-masing 60 x 40 x 30 cm, selama 10 menit. Setelah beku, straw dan minitub disimpan dalam kontainer N_2 cair (-196^{o}C).

Untuk mengetahui keberhasilan pembekuan semen, semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dengan air hangat bersuhu 37^{o}C selama 30 detik. Semen yang telah cair diteteskan pada gelas objek yang telah dihangatkan dan ditutup dengan gelas penutup.

5.Analisis Data

Peubah yang diamati adalah % SM dan % SH pada tahap semen segar, pascaekuilibrasi dan pascathawing. Data yang diperoleh dari hasil evaluasi pasca thawing dianalisis dengan sidik ragam Rancangan Acak Lengkap (RAL), pola faktorial 3 x 2 sebanyak lima ulangan (Steel dan Torrie 1993) Jika ada perbedaan antarperlakuan, analisis dilanjutkan dengan uji Duncan (α=0,05).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Hasil pemeriksaan makroskopis menunjukkan volume semen sebanyak 6,5 ± 1,4 ml, berwarna krem, konsistensi sedang, dengan derajat keasaman (pH) 6,52 ± 0,0. Lebih lanjut, secara mikroskopis diamati gerakan massa 2,80 ± 0,70 ; SM

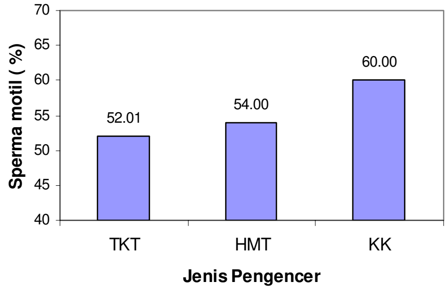
74,66 ± 3,35.% ; SH 89,32 ± 1,10%; spermatozoa yang abnormal (% SAN) adalah 5,40 ± 8,06% dengan konsentrasi spermatozoa 1093,66 ± 13,27 juta/ml. Hasil pengujian secara makroskopis maupun mikroskopis masih dalam kisaran semen sapi yang normal (menurut Hafez dan Hafez, 2000), sehingga dapat digunakan untuk pengolahan semen lebih lanjut.

Kualitas Semen Pada Berbagai Tahapan Pengolahan

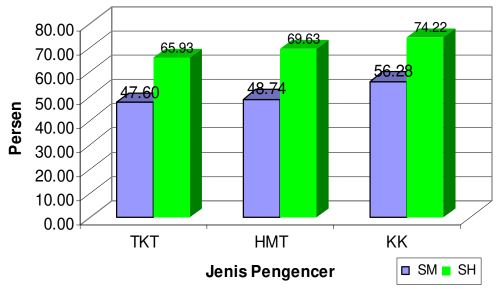
Untuk memudahkan evaluasi keberhasilan serta mengetahui penurunan kualitas setiap tahapan maka pada penelitian ini, dilakukan evaluasi % SM pada pascapengenceran, pascaekuilibrasi serta pascathawing. Tanpa memperhatikan jenis pengencer serta kemasan semen beku yang digunakan, penurunan % SM pada penelitian ini dari pascapengenceran (72,25±3,7%) ke pascathawing (67,5±4,6%) sebesar 4,75%. Dari pascaekuilibrasi (67,5±4,6%) ke pascathawing (50,84±9,14), penurunannya adalah sebesar 16,66% dengan total penurunan % SM dari pascapengenceran ke pascathawing sebesar 21,41%. Penurunan SM sebesar 20,41% ini termasuk kecil, karena pada ternak lain penurunannya berkisar 10-40% (Parrish's 2003), bahkan bisa mencapai 50% (Sorenson, 1979). Penurunan %SM pada pembekuan semen domba adalah 27,42% (Herdis, 2005), kambing 27,16% (Suwarso, 1999) dan 33,05% (Tambing, 2004).

Pengaruh Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku

Pengaruh bahan pengencer, tanpa memperhatikan tahapan proses pengolahan serta kemasan yang digunakan, pengencer KK menunjukkan SM (60±9,41 %) lebih tinggi ($P<0,05$) jika dibandingkan dengan pengencer TKT (54±11,57 %) dan HMT (52,01±11,87 %) (Gambar 1). Demikian juga dengan kualitas pascathawing ternyata pengencer KK menunjukkan SM (56,28±2,29 %) dan SH (74,22±2,05 %) yang lebih tinggi ($P<0,05$) jika dibandingkan dengan pengencer TKT (47,60±1,12 % & 65,93±2,65 %) dan HMT (48,74±4,28 % & 69,63±2,49 %) (Gambar 2).



Gambar 1. Rataan pengaruh bahan pengencer terhadap persentase sperma motil tanpa melihat tahapan pengolahan semen



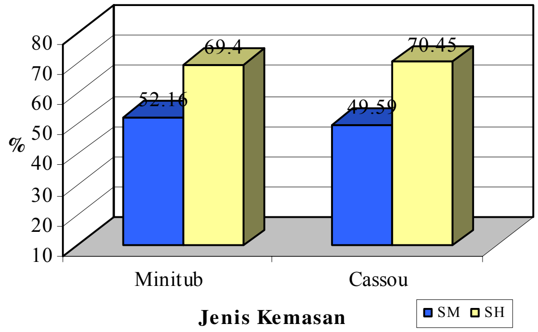
Gambar 2. Pengaruh bahan pengencer terhadap kualitas semen beku pascathawing

Pada kambing PE, SM pascathawing menggunakan pengencer tris adalah antara 50,39-51,56% (Suwarso, 1999) dan pada kambing Saanen 48,67–51,58% (Tambing, 2004). Pada semen beku domba Garut pascathawing, SM tertinggi 53,33% (Rizal 2005) dan 54,17% (Herdis 2005), sedangkan pada domba St Croix dapat mencapai 60% (Feradis, 1999). Pengencer yang mengandung KK pada penelitian ini menunjukkan % SM tertinggi. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Arifiantini *dkk*. (2004) dengan keberhasilan % SM pascathawing sebesar 50,20±7,07. Hal ini diduga karena pengencer KK mengandung lesitin kacang kedelai, dengan kandungan *high density lipoprotein* (HDL) yang rendah dan tidak seperti yang terkandung pada kuning telur, yang dapat menghambat respirasi dan motilitas spermatozoa (Moussa *et al.,* 2002).

Perbedaan ini bisa juga disebabkan oleh bahan pengencer KK yang mengandung lesitin kacang kedelai yang diperkirakan lebih mampu melindungi sperma dari pengaruh buruk pembekuan daripada kuning telur. Selain mengandung lecitin kacang kedelai, pengencer KK diduga mengandung komponen dan komposisi bahan yang lebih sesuai untuk semen beku sapi.

Pengaruh Kemasan Terhadap Kualitas Semen Beku

Kemasan yang digunakan untuk semen beku mempengaruhi proses penyebaran temperatur pada saat pembekuan. Ketebalan plastik, diameter serta panjang straw yang digunakan akan berngaruh terhadap kualitas semen beku yang dihasilkan. Pada penelitian ini, tidak diamati perbedaan kualitas (% SH dan % SM), dari straw yang digunakan. Straw minitub menunjukkan SH (69.4%) dan SM (52.16%) hampir sama dengan straw Cassou SH (70.44%) dan SM (49.59%) (Gambar 3). Kedua kemasan tersebut meskipun mempunyai perbedaan dalam ukuran panjang dan diameter, perbedaan tersebut tidak mempengaruhi proses pembekuan dan pada saat *thawing*.



Gambar 3. Pengaruh kemasan terhadap kualitas semen beku pascathawing (SM= sperma motil; SH= sperma hidup)

Pengaruh Interaksi Bahan Pengencer Dengan Kemasan Terhadap Kualitas Semen Beku

Interaksi antara bahan pengencer dan kemasan yang digunakan, pengencer KK yang dikemas pada straw minitub (72.76±10.83) dan Cassou (75.67±8.1) menunjukkan % SH yang terbaik dari pengencer lain yang dikemas pada straw minitub maupun Cassou. Namun, % SM pada pengencer KK yang dikemas pada straw minitub (57.9±7.81) lebih tinggi daripada pengencer KK yang dikemas dalam straw Cassou (54.66±6.77) ataupun pada pengencer lain pada kedua kemasan (Tabel 2).

Dari berbagai hasil penelitian ini, terlihat bahwa bahan pengencer merupakan faktor yang lebih berpengaruh jika dibandingkan dengan kemasan semen dan hal ini ditunjukkan dalam Gambar 2 dan 3. Pengencer yang digunakan mempengaruhi kualitas semen beku dan itu tergantung pada komposisi bahan yang terdapat di dalamnya. Pengencer TKT dan HMT menunjukkan kualitas yang hampir sama, hal ini disebabkan karena komposisinya hampir sama, yaitu dalam hal *buffer*, nutrisi (fruktosa), dan kuning telur sebagai bahan anti *cold shock* serta gliserol yang digunakan. Namun, pengencer KK merupakan pengencer paten sehingga selain kandungan lesitin dari kacang kedelai, bahan lain yang dikandung di dalamnya tidak diketahui secara pasti. Dengan hasil pembekuan yang diperoleh kemungkinan komposisi KK lebih sesuai dan mampu memberikan efek perlindungan yang lebih baik pada proses pembekuan ini jika dibandingkan dengan pengencer lainnya.

Tabel 2. Pengaruh interaksi kemasan dengan pengencer terhadap kualitas semen beku sapi FH

Jenis Pengencer	Kemasan			
	Minitub		Cassou	
	% SH	% SM	% SH	% SM
TKT	64.05 ± 12.38[c]	46.81 ± 8.57[d]	67.8 ± 10.17[bc]	48.39 ± 8.95[cd]
HMT	71.39 ± 7.93[ab]	51.77 ± 4.90[bc]	67.86 ± 8.6[bc]	45.71 ± 11.84[d]
KK	72.76 ± 10.83[a]	57.9 ± 7.81[a]	75.67 ± 8.1[a]	54.66 ± 6.77[ab]

Keterangan : Huruf yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan beda nyata (P< 0.05). TKT= Tris kuning telur; HMT= *home made triladyl*; KK= pengencer kacang kedelai; %SH = persentase sperma hidup; %SM = persentase sperma motil

Faktor kemasan meskipun menunjukkan perbedaan, tetapi tidak secara nyata mempengaruhi kualitas semen mengingat jenis kemasan yang digunakan sama-sama terbuat dari plastik. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Suwarso (1999) yang menggunakan straw minitub dan Cassou untuk pembekuan semen kambing PE. Jika menggunakan kemasan lain seperti pellet atau ampul, kemungkinan perbedaan hasilnya akan terlihat.

IV. KESIMPULAN

1. Penurunan motilitas sperma dari pascapengenceran ke pascaekuilibrasi sebesar 4,75%; pascaekuilibrasi ke pascathawing sebesar 16,66%; dengan total penurunan pascapengenceran ke pascathawing sebesar 21,41%
2. Pengencer KK menunjukkan hasil yang paling baik dalam mempertahankan kualitas semen beku.
3. Tidak ada pengaruh kemasan semen yang digunakan terhadap kualitas semen beku.
4. Pengencer KK dengan kemasan Minitub dan Cassou merupakan kombinasi yang paling baik dalam mempertahankan % SH.
5. Pengencer KK yang dikemas dalam Minitub menunjukkan % SM terbaik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Tim Hibah Penelitian SP4, yang mendanai penelitian ini, Unit Rehabilitasi Reproduksi dan Rumah Sakit Hewan

Bogor atas fasilitas hewan jantan yang digunakan, dan kepada Drs. Bondan Achmadi serta Vira AMD atas bantuannya selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Abdillah. 1999. Pengaruh beberapa pengencer semen, lama penyimpanan semen dan waktu inseminasi terhadap fertilitas spermatozoa ayam buras. Tesis Program Pascasarjana IPB Bogor.

Aboagla EM-E, Terada T. 2004a. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology** 62:1160-1172

______________________. 2004b. Effects of supplementation of trehalosa extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. Theriogenology 62: 809-818

Anzar M, Graham EF. 1995. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. **Theriogenology** 45 : 513-520.

Arifiantini I, TL Yusuf dan N Graha. 2005. Longivitas dan *Recovery Rate* Pasca *Thawing* Semen Beku Sapi *Fresian Holstein* menggunakan Bahan Pengencer yang berbeda. **Buletin Peternakan** 28(3)

Barth AD, Oko RJ. 1989. Abnormal Morfology of Bovine Spermatozoa. Iowa. Iowa State University Press. USA

Davis IS, Bratton RW, Foote RH. 1963. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25 and -85^{o}C in tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol. **J. Dairy Sci**., 46:333

Feradis. 1995. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. [disertasi]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Hahn G. 1972. Contribution to The freezing-preservation of goat-buck and ram semen. World Rev. Anim. Prod. 8:80.

Hafez B, Hafez ESE. 2000. Reproductive Cycles dalam Reproduction in Farm Animals. 7thEd. Hafez ESE (Editor). Philadelphia : Lippincot Williams & Wilkins

Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Tekhnologi Laserpunktur Pada Domba Garut (Ovis aries). [disertasi]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Maxwell WMC, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. **Reprod. Fertil. Dev**.5: 29-46

Moussa M, Martinez V, Trimeche A, Tanturier D, Anton M. 2002. Low Density Lipoprotein extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** 57: 1591-1762

Parrish J. 2003. Techniques in Domestic Animal Reproduction - Evaluation and Freezing of Semen http://www.wisc.edu/ansci_repro/ (25 juli 2003)

Rizal M. 2005. Fertilitas Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan. [disertasi]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Royere D, Barthelemy C, Hamanah S, Lansac J. 1996. Cryopreservation of spermatozoa : a 1966 review. Human Reproduction Update vol 2, No. 6 pp 553-559

Salamon S, Visser D. 1972. Fertility of Ram Spermatozoa Frozen in a Tris Based Diluent. Aust. J. Biol. Sci., 26: 513-516

Salisbury GW, Van Denmark NL. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Djanuar R (Terjemahan). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Sexton TJ. 1978. A new poultry semen extender; Effect of storage condition on fertilizing capacity of chicken semen stored at 5^{o}C. **J. Poultry. Sci.** 57:258- 289.

Sorenson Jr AM. 1979. Laboratory Manual for Animal Reproduction. 4^{ed} American Press. Boston. USA

Suwarso. 1999. Peranan Rafinosa Dalam Pengencer Tris-Sitrat Kuning Telur Terhadap Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. [Tesis]. Bogor: Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.

Steinbach J, Foote RH. 1967. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen or liquid spermatozoa. **J. Dairy Sci.** 50:205.

Steel RGD, Torrie JH. 1993. Prinsip dan prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan Sumantri B. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Tambing SN. 2004. Optimalisasi Pengembangan Pengencer Semen Beku Kambing Saanen [disertasi]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Penerbit Angkasa.

Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology** 54: 579-585.