Optimalisasi Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) melalui Penambahan Maltosa ke dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur

Optimization of Garut Ram Liquid Semen Quality by Addition of Maltose into the Egg Yolk Tris Extender

Herdis[1], M. R. Toelihere[2], I. Supriatna[2], B. Purwantara[2] dan RTS. Adikara[3]

[1]Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Gd. BPPT II Lt. 16,
Jln. M.H. Thamrin 8 Jakarta 10340. Tlp. 021-3169587 Fax. 021-3169566
[2] Program Studi Biologi Reproduksi Sekolah Pascasarjana Insti tut Perrtanian Bogor.
[3] Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

Abstract

The Research was done to observe influence of addition of maltosa to liquid semen quality which kept at refrigerator temperature. Semen was collected once a week using artificial vagina from six mature Garut rams. The result on the 4 th day evaluation, addition of maltosa with dose 1,2 g/100 ml into the egg yolk tris extender indicated that percentages of progressive motile sperm, percentages of viable sperm, percentages of plasma membrane and acrosomal intact (55,83 ± 3,76%; 67,67 ± 1,63%; 59,83 ± 1,94% and 62,83 ± 3,49%) were significantly higher difference ($p<0,05$) than control (46,67 ± 4,08%; 60,00 ± 3,35%; 53,17 ± 1,17% and 52,67 ± 2,07%) respectively . In conclusion, the addition of maltosa with dose 1,2 g/100 ml is optimal dose to improve the quality of liquid semen of Garut rams. Maltosa can be used as the source of energi by Garut ram sperm in maintaining motility, viability, plasma membrane and acrosomal integrity.

Key words: semen cair, domba Garut, maltosa, pengencer

Pendahuluan

Melihat pemilikan lahan petani peternak yang semakin sempit sekitar kurang dari 0,25 ha, maka perlu dicari jenis ternak dan metode beternak yang cocok dikembangkan, mempunyai produktifitas tinggi, perputarannya cepat serta mudah dalam manajemen pemeliharaan. Domba merupakan ternak yang memenuhi kriteria tersebut. Domba Garut mempunyai prospek untuk dikembangkan karena keunggulannya antara lain pertumbuhan yang baik sehingga ukuran tubuhnya relatif lebih besar. Domba Garut jantan biasa digunakan sebagai domba laga yang berperan dalam industri pariwisata sehingga mempunyai nilai ekonomis yang lebih tinggi.

Menurut Bradford dan Inounu (1996), Adiati *et al.* (2001) dan Hastono *et al.* (2001) domba Garut memiliki keunggulan cepat dewasa kelamin, tidak mengenal musim kawin dan mempunyai sifat dapat melahirkan anak kembar dua ekor atau lebih. Menurut Qomariyah *et al.* (2001) domba Garut jantan memiliki postur yang gagah dan tanduk yang khas dengan ukuran yang besar, kokoh, kuat dan melingkar.

Dalam pengembangbiakan domba Garut masalah utama yang menjadi kendala adalah terbatasnya pejantan unggul. Pejantan domba Garut unggul populasinya sangat sedikit dan harganya relatif mahal karena biasa digunakan untuk kontes domba laga. Salah satu usaha guna mengatasi masalah tersebut adalah menerapkan teknologi reproduksi inseminasi buatan (IB). Melalui teknologi IB, potensi domba pejantan unggul dapat dioptimalkan karena semen yang diperoleh dari pejantan unggul dapat diolah sehingga lebih banyak jumlah domba betina yang dapat dikawinkan.

Pada proses pengolahan semen, pemilihan jenis pengencer semen yang optimal sangat berpengaruh terhadap kualitas semen yang dihasilkan. Pada domba Garut media pengencer semen yang digunakan masih terus dikembangkan. Sebagai bahan pengencer semen, Tris *hidroxymethil aminomethan* ($C_4H_{11}NO_3$) telah banyak digunakan sebagai komponen dasar pengencer semen pada sapi, babi, dan domba (Rizal *et al.*, 2002; Aisen *et al.*, 2002; El-Alamy *et al.*, 2001; Maxwell and Salamon, 1993).

Gula baik monosakarida, disakarida maupun polisakarida dapat berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa dan dapat digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler yang berperan dalam melindungi spermatozoa selama proses pembekuan (Rizal *et al.*, 2003). Menurut Yildiz *et al.* (2000) fungsi gula dalam larutan pengencer adalah sebagai sumber energi bagi spermatozoa selama inkubasi, mempertahankan tekanan osmosis larutan pengencer dan bertindak sebagai krioprotektan pada proses pembuatan semen beku. Maltosa sebagai gula disakarida diharapkan dapat mempertahankan kualitas dan kuantitas spermatozoa yang diencerkan dalam pengencer semen cair Tris-kuning telur.

Melihat besarnya potensi domba Garut serta besarnya peranan pengencer pada proses pengolahan semen, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan maltosa ke dalam pengencer semen tris kuning telur terhadap kualitas semen cair domba Garut yang disimpan pada suhu sekitar 5^{o}C. Hasil penelitian diharapkan bermanfaat dalam membantu mengembangkan populasi dan potensi domba Garut sebagai plasma nutfah domba Indonesia.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Lapang Teknologi Budidaya Peternakan Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Budidaya Pertanian Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) dan Peternakan domba Garut Lesan Putra Bogor.

Hewan Percobaan dan Bahan Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan terdiri dari enam ekor domba Garut jantan unggul sebagai sumber penghasil semen. Domba Garut jantan berumur sekitar 4 tahun dengan berat badan antara 70 kg sampai 90 kg. Domba Garut jantan dikandangkan dalam kandang individu. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput segar sekitar 7 – 9 kg per ekor per hari, sedangkan konsentrat diberikan sekitar 0,7 kg per ekor per hari.

Bahan yang digunakan terdiri dari semen domba Garut, pengencer semen Tris-kuning telur dengan komposisi pengencer: 2,42 g Tris (*hydroxymethyl*) aminomethan (Merck, Germany, cat. K27219882003), 1,28 g asam sitrat monohidrat (Merck, Germany, cat. K22939944632), 2,16 g D(-) fruktosa (Merck, Germany, cat. K27917123038), 100.000 IU penisilin-G (Meiji, Japan, cat. APG 0598 J) 50 mg streptomisin sulfat (Meiji, Japan, cat. SSL 1095 A), ad 100 ml akuabidestilata (Supracointra, Indonesia). Bahan lain yang digunakan adalah kuning telur ayam ras, NaCl (Merck, Germany, cat. 3.9K19690004) fisiologis, NaCl 3%, larutan hipoosmotik, formaldehida (Merck, Germany, cat. K25421403828), eosin B (Merck, Germany, cat. 509 K5003834), negrosin (Merck, Germany), KY jelly (Johnson and Johnson, Indonesia) dan alkohol.

Peralatan yang digunakan pada percobaan adalah timbangan mikro, tabung reaksi, rak tempat tabung, termometer, gelas piala, gelas erlenmeyer, pipet tetes, gelas ukur, vagina buatan, mikroskop cahaya, gelas objek, gelas penutup, haemositometer, pH meter, bunsen, *waterbath*, lemari es dll.

Pengambilan Semen dan Perlakuan

Semen ditampung sekali seminggu dengan menggunakan vagina buatan yang bertemperatur 40 sampai 42°C. Semen segar yang diperoleh kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna dan kekentalan. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerakan masa, konsentrasi, morfologi spermatozoa, persentase motilitas, persentase hidup, persentase membran plasma utuh dan persentase tudung akrosom utuh.

Setelah dievaluasi, semen segar dibagi menjadi tiga bagian sesuai dengan perlakuan yang diberikan yakni: 1) 80% pengencer tris + 20% kuning telur sebagai kontrol (M_0); 2) 80% pengencer tris + 20% kuning telur + maltosa 0,6 g/ 100 ml pengencer ($M_{0,6}$); dan 3) 80% pengencer tris + 20% kuning telur + maltosa 1,2 g/ 100 ml pengencer ($M_{1,2}$).

Setelah diencerkan secara merata, masing-masing perlakuan di simpan dalam lemari es yang bersuhu sekitar 5°C. Guna mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kualitas semen cair dilakukan evaluasi kualitas semen setiap hari selama empat hari pengamatan. Parameter yang diukur untuk setiap tahap evaluasi terdiri atas persentase motilitas, persentase hidup, persentase membran plasma utuh dan persentase tudung akrosom utuh spermatozoa.

Evaluasi persentase membran plasma utuh (% MPU) dilakukan dengan menggunakan metode Uji hipoosmotis atau *Hypo Osmotic Swelling* (HOS) *test*. Pengujian dilakukan dengan cara mencampur 0,1 ml semen dengan 9,9 ml medium hipoosmotik. Medium hipoosmotik dibuat dengan melarutkan 0.179 NaCl ke dalam aquabidestilata menjadi 100 ml larutan. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi dalam *waterbath* bersuhu 37^{0}C selama 30 menit. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Penilaian dilakukan dengan sistem skor 0% sampai 100%.

Persentase tudung akrosom utuh (% TAU) dievaluasi dengan melihat kondisi tudung akrosom. Semen dicampur dengan NaCl fisiologis ditambah formalin 1% yang berfungsi untuk mematikan dan menfiksasi spermatozoa. Evaluasi dilakukan dengan sistem skor 0% sampai 100%.

Persentase motilitas (%M) adalah persentase spermatozoa yang bergerak kedepan, dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran objektif 40 kali. Evaluasi dilakukan dengan menggunakan sistem skor. Skor 0% (tidak ada yang bergerak) sampai 100% (seluruh spermatozoa bergerak kedepan).

Persentase hidup (%H) adalah persentase spermatozoa yang hidup, dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran objektif 40 kali. Evaluasi menggunakan zat pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak berwarna sedangkan yang mati berwarna merah. Evalusi menggunakan sistem skor 0% sampai 100%.

Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan hádala Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan dan enam kali ulangan, data yang diperoleh diuji dengan analisis sidik ragam (Anova). Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Segar

Kualitas semen segar sangat menentukan layak tidaknya semen tersebut untuk dilakukan proses pengolahan. Guna bisa diolah lebih lanjut semen segar harus mempunyai persentase motil progresif minimal 65%, konsentrasi spermatozoa minimal 700 juta spermatozoa/ml dan abnormalitas kurang dari 20% (Toelihere, 1993). Menurut Ax *et al*. (2000), spermatozoa dengan abnormalitas lebih dari 20 % tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Tabel 1 menunjukkan kualitas semen segar domba Garut yang diperoleh pada penelitian ini.

Penelitian menunjukkan bahwa volume semen domba Garut rata-rata sebesar 1,11 ± 0,44 ml. Hasil ini sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa volume semen domba rata-rata berkisar antara 0,8 - 1,2 ml. Menurut Qomariyah *et al*. (2001) volume semen domba Garut per ejakulat sebesar 1,075 ± 0,139 ml. Perbedaan volume ini terjadi karena adanya perbedaan umur, ukuran tubuh, perubahan kesehatan reproduksi dan frekuensi penampungan.

Warna semen yang ditampung adalah putih susu atau krem. Hasil ini sesuai dengan pendapat Ax *et al.* (2000) dan penelitian Qomariyah *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa warna semen domba adalah putih susu atau krem. Konsistensi semen domba Garut yang diperoleh sesuai dengan penelitian Hastono *et al*. (2001) pada tiga jenis domba persilangan Garut yaitu kental.

Konsentrasi semen domba Garut yang ditampung adalah 3.242 ± 535 juta sel/ml. Hasil ini sedikit diatas pendapat Garner dan Hafez (2000), yang mengatakan bahwa kosentrasi semen domba adalah 2.000-3.000 juta sel/ml dan 2.000 juta sel/ml (Bearden dan Fuquay,1997). Hasil yang hampir sama juga diperoleh Qomariyah *et al.* (2001) pada domba Garut yang berumur 1 - 1,5 tahun, yaitu 3.245 ± 34,96 juta spermatozoa per ml.

Tabel 1. Kualitas Semen Segar Domba Garut

Karakteristik Semen	Rata – rata
Volume per ejakulat (ml)	1,11 ± 0,44
Warna	Krem
Konsistensi	Kental
pH	6,98 ± 0,13
Gerakan Massa	3,00 ± 0,00
Konsentrasi (jt spermatozoa/ml)	3.242 ± 535
Persentase Motilitas (%)	72,50 ± 2,74
Persentase Hidup (%)	84,50 ± 2,51
Persentase Abnormal (%)	2,50 ± 0,84
Persentase Tudung Akrosom Utuh (%)	86,00 ± 2,00
Persentase Membran Plasma Utuh (%)	83,80 ± 2,22

Penelitian menunjukkan persentase motilitas spermatozoa domba Garut sebesar 72,50 ± 2,74%. Hasil ini sesuai dengan penelitian Garner dan Hafez (2000) yang menyimpulkan semen segar domba mempunyai rata-rata sekitar 60 - 80%.

Persentase hidup spermatozoa domba Garut hasil penelitian adalah 84,50 ± 2,51%. Hasil yang diperoleh tidak berbeda dengan hasil penelitian Feradis (1999) pada domba St croix (89,33%) namun lebih tinggi daripada yang diperoleh Adiati *et al.* (2001) sebesar 69,24 ± 11,34 % pada domba persilangan St. croix dan Garut. Perbedaan ini terjadi karena adanya perbedaan individu, umur, dan kondisi reproduksi domba yang digunakan selama penelitian.

Pengaruh Perlakuan terhadap Kualitas Semen

Penelitian menunjukkan pada semua parameter kualitas semen yang diamati terjadi penurunan kualitas semen yang nyata ($p<0,05$) dari tahap semen segar ke tahap setelah empat hari penyimpan. Keadaan ini menunjukkan bahwa selama proses pengolahan dan penyimpanan terjadi perubaan fisik dan biokimia dari spermatozoa yang digunakan. Menurut Maxwell dan Watson (1996) pada proses pengolahan semen, masalah yang sering timbul biasanya rusaknya membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya peroksidasi lipida. Rusaknya membran plasma akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa dan akhirnya dapat berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa.

Motilitas atau daya gerak spermatozoa biasanya digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Motilitas pada spermatozoa dapat terjadi karena pada fibril-fibril mikro bagian luar pada ekor spermatozoa terdapat suatu protein yang disebut *dynein*. Protein tersebut memiliki fungsi sebagai enzim ATP-ase, yang mampu merubah ATP hasil metabolisme menjadi AMP dan dua ion Pi anorganik. Ion Pi anorganik ini memiliki energi yang tinggi sehingga menimbulkan kontraksi pada fibril-fibril mikro dan menghasilkan gerakan berpilin pada spermatozoa (Rizal *et al.*, 2003).

Penelitian menunjukkan pada hari pertama pengamatan perlakuan penambahan maltosa tidak berpengaruh ($p>0{,}05$) terhadap motilitas spermatozoa. Pada hari ke dua pengamatan, perlakuan penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer menghasilkan motilitas terbaik (67,50 ± 2,74 %) nyata lebih tinggi ($p<0{,}05$) dibandingkan perlakuan kontrol (62,50 ± 2,74) namun tidak berbeda dibandingkan perlakuan penambahan maltosa 0,6 g/100 ml pengencer.

Tingginya persentase motilitas pada perlakuan maltosa dibandingkan kontrol disebabkan karena maltosa sebagai gula disakarida dapat berfungsi sebagai sumber energi. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosin triphosphat* (ATP) hasil metabolisme. Menurut Salisbury dan Vandemark (1985) maltosa sebagai disakarida dapat digunakan sebagai bahan baku untuk menghasilkan energi melalui glikolisis disamping monosakarida (glukosa, fruktosa dan mannosa). Pada umumnya, sebelum masuk ke dalam proses glikolisis, disakarida dihidrolisis dahulu oleh enzim *disakaridase*. Enzim yang memecah maltosa adalah *maltase* (*a-glukosidase*) dan menghasilkan dua molekul glukosa (Martoharsono, 1993). Menurut Toelihere (1993), spermatozoa akan lebih mudah menggunakan glukosa dalam metabolismenya dibandingkan dengan sumber energi lain yang terdapat dalam plasma semen, yaitu fruktosa.

Disamping oleh enzim maltase, maltosa dapat dihidrolisis (dipecah) oleh asam menjadi dua molekul glukosa (Lehningger, 1992 dan Poedjiadi, 1994). Asam yang memecah maltosa dalam pengencer semen cair diduga adalah asam laktat yang terbentuk sebagai hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa. Tabel 2 menunjukkan secara lengkap kualitas semen cair domba Garut pada perlakuan penambahan maltosa.

Pada hari ke empat pengamatan, penelitian menunjukkan pada semua parameter kualitas semen yang dievaluasi perlakuan penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer menghasilkan kualitas semen paling baik berbeda nyata ($P<0{,}05$) dibandingkan perlakuan kontrol. Keadaan ini menunjukkan bahwa perlakuan penambahan maltosa memberikan pengaruh yang positip terhadap kualitas semen cair domba Garut yang dihasilkan.

Tabel 2. Rata-Rata Kualitas Semen Cair Domba Garut pada Perlakuan Penambahan Maltosa

Parameter	Perlakuan	Hari Pengamatan			
		Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4
Motilitas (%)	M_0	72,50 ± 2,74	62,50 ± 2,74 ^{ab}	53,33 ± 2,58 ^{ab}	46,67 ± 4,08 ^{ab}
	$M_{0,6}$	72,50 ± 2,74	65,00 ± 0,00 ^{bc}	56,67 ± 2,58 ^{b}	50,83 ± 3,76 ^{b}
	$M_{1,2}$	72,50 ± 2,74	67,50 ± 2,74 ^{c}	62,50 ± 2,74 ^{c}	55,83 ± 3,76 ^{c}
Hidup (%)	M_0	81,00 ± 2,00	73,33 ± 3,23	64,33 ± 3,83 ^{ab}	60,00 ± 3,35 ^{a}
	$M_{0,6}$	81,67 ± 1,67	73,83 ± 2,23	70,00 ± 3,16 ^{cd}	64,83 ± 2,86 ^{bc}
	$M_{1,2}$	81,67 ± 1,21	73,33 ± 2,07	70,83 ± 2,04 ^{d}	67,67 ± 1,63 ^{c}
TAU (%)	M_0	83,17 ± 2,23	75,17 ± 2,23	66,83 ± 2,40 ^{b}	53,17 ± 1,17 ^{a}
	$M_{0,6}$	84,00 ± 1,90	76,67 ± 2,50	66,17 ± 3,06 ^{ab}	61,00 ± 4,10 ^{b}
	$M_{1,2}$	83,83 ± 2,64	77,67 ± 2,73	66,83 ± 1,72 ^{b}	59,83 ± 1,94 ^{b}
MPU (%)	M_0	81,67 ± 1,03	74,00 ± 4,20	67,00 ± 2,97 ^{ab}	52,67 ± 2,07 ^{b}
	$M_{0,6}$	83,17 ± 1,47	74,50 ± 2,51	72,33 ± 2,25 ^{c}	52,17 ± 3,06 ^{ab}
	$M_{1,2}$	81,83 ± 1,17	73,83 ± 3,92	70,83 ± 3,54 ^{bc}	62,83 ± 3,49 ^{c}

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % (beda nyata terkecil).

Menurut Aisen *et al.* (2002), metabolisme spermatozoa dapat berlangsung dengan baik dalam larutan pengencer yang mengandung gula yang sudah dipecah. Kualitas semen cair yang tinggi pada perlakuan penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer menunjukkan bahwa spermatozoa domba Garut dapat memanfaatkan maltosa sebagai sumber makanan dan bahan baku dalam proses metabolisme sehingga dapat mempertahankan kualitas semen cair yang dihasilkan. Hasil yang diperoleh sesuai dengan pendapat Yildiz *et al*. (2000) yang menyatakan kombinasi monosakarida dan disakarida dengan konsentrasi yang sesuai dapat memberikan perlindungan yang lebih baik dibandingkan penggunaan monosakarida atau disakarida secara tersendiri. Dalam penelitian yang dilakukan monosakarida yang digunakan adalah fruktosa sedangkan disakarida yang digunakan adalah maltosa.

Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan: 1) Penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer dalam pengencer semen cair Tris-kuning telur 20% menghasilkan kualitas semen domba Garut lebih baik dibandingkan kontrol; 2) Maltosa dapat digunakan sebagai sumber energi oleh spermatozoa untuk mempertahankan motilitas, daya hidup, keutuhan membran plasma dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa domba Garut.

Daftar Pustaka

Adiati, U, Subandriyo, B Tiesnamurti dan S Aminah. 2001. Karakteristik semen segar tiga genotipe domba persilangan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Balai Penelitian Ternak. pp. 113-117.

Aisen EG, VH Mediana and A Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. Theriogenology. 57 : 1801-1808.

Ax RL, M Dally, BA Didion, RW Lenz, CC Love, DD Varner, B Hafez and ME Bellin. 2000. Semen Evaluation. In : Hafez B, ESE Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7thEd. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp : 365-389.

Bearden HJ and Fuquay JW. 1997. Applied Animal Reproduction. 4th Ed. New Jersey : Prentice Hall, Upper Saddle. pp. 133-177.

Bradford , G.E. and I. Inounu. 1996. Prolific breeds of Indonesian. *In*: Fahmy, M. H. (Eds) Prolific Sheep. CAB. International, Oxan. I.K. 137-145.

El-Alamy M A. and R.H. Foote. 2001. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. Animal Reproduction Science 65 : 245-254.

Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program IB Domba *St. Croix*. [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor. pp. 42.

Garner DL and ESE Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In : Hafez B, ESE Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7thEd. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp : 96-109.

Hastono, I. Inounu dan N. Hidayati. 2001. Karakteristik semen dan tingkat libido domba persilangan. Prosiding Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner. Balai Penelitian Ternak, Bogor. pp. 106-112.

Qomariyah, S. Mihardja dan R. Idi. 2001. Pengaruh kombinasi telur dengan air kelapa terhadap daya tahan dan abnormalitas spermatozoa domba Priangan pada penyimpanan 5^0C. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Bioteknologi LIPI, Bogor. pp. 172-177.

Lehningger AL. 1992. Dasar-Dasar Biokimia. Jilid I. (Terjemahan Maggy Thenawijaya). Erlangga, Jakarta.

Martoharsono S. 1993. Biokimia Jilid II. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Maxwell WMC and Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen : a Review. Reprod, Fertil. Dev. 5, 1993, 601 - 612.

Maxwell WMC and Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Repro. Sci. 42:55-65.

Poedjiadi A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Rizal, M., M.R. Toelihere, .T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2003. Kriopreservasi Semen Domba Garut dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang berbeda. Media Kedokteran Hewan. 19 (2): 79-83.

Rizal M, MR Toelihere, TL Yusuf, B Purwantara dan P Situmorang. 2002. Kualitas semen beku domba Garut dalam berbagai dosis gliserol. *JITV*. 7(3) : 194-199.

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

Steel, R.G.D. dan J.. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.

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