

## Penentuan Waktu Ekuilibrasi pada Pembekuan Semen Kuda Menggunakan Bahan Pengencer Susu Skim

(Determination of Equilibration Time of Stallion' Semen Freezing with Extender Skim Milk)

Raden Iis Arifiantini\*, Iman Supriatna dan Samsurizal

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

**ABSTRACT:** The objectives of this experiment were to determine the best equilibration time with extender skim milk in order to maintain the quality of frozen stallion semen. The semen was collected from three 5-8 years old stallions using artificial vagina. The semen characteristics and quality were evaluated macro- and microscopically and extended with skim milk extender (1:1). The semen was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Supernatant was removed and the pellet was re-extended with skim milk extender with 5% glycerol. The extended semen then packed in mini straw (0.5 mL), equilibrated at 5°C for 1 hr (E<sub>1</sub>), 2 hrs (E<sub>2</sub>) and 3 hrs (E<sub>3</sub>), frozen in the liquid nitrogen (N<sub>2</sub>) vapor for 15 minutes and then stored in liquid N<sub>2</sub> container for 24 hrs. The straw than thawed at 37°C for 30 seconds. The percentages of sperm motility and viability were observed. The result of this research showed that there were no significant differences between equilibration at 1, 2 and 3 hrs on the percentages of sperm motility with the average of post thawed motility was 23.60 ± 7.10%. The equilibration time affected the sperm viability (P<0.05) in all stallions, with the percentages of viable sperm between 38.10 % and 46.50%.

**Key Words:** Equilibration, frozen semen, stallion

### Pendahuluan

Waktu ekuilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya pada saat pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah. Waktu ekuilibrasi didefinisikan sebagai waktu yang dibutuhkan oleh krioprotektan untuk mencapai keseimbangan pada kedua sisi membran plasma (Bearden *et al.*, 2004). Pada saat ekuilibrasi spermatozoa akan beradaptasi dengan pengencernya, sehingga dapat menurunkan persentase mortalitas (kematian) spermatozoa pada saat pembekuan. Menurut Kacker dan Panwar (1996), ekuilibrasi bertujuan melindungi spermatozoa dari kematian yang disebabkan oleh penurunan tekanan osmotik yang mengganggu keutuhan membran spermatozoa akibat pembekuan.

Waktu ekuilibrasi pada semen berbagai ternak berbeda-beda. Menurut Bearden *et al.* (2004) pada pembekuan semen domba, waktu ekuilibrasi pada

suhu 5°C terbaik adalah 2 jam dan 4 jam pada rusa. Pada semen sapi *Friesian Holstein* (FH) (Arifiantini *et al.*, 2005) juga melakukan ekuilibrasi selama 4 jam dengan suhu 5°C. Han *et al.* (2005) membandingkan waktu ekuilibrasi pada pembekuan semen itik dengan waktu 10 dan 60 menit, ternyata ekuilibrasi selama 10 menit menunjukkan kualitas semen setelah *thawing* lebih baik dibandingkan 60 menit. Pada pembekuan semen kambing Peranakan Etawah (PE) ekuilibrasi selama 4 jam pada suhu 3-5°C lebih baik dibandingkan dengan 1, 2 ataupun 3 jam (Raya, 2000). Untuk semen kuda, Arruda *et al.* (2002) melakukan ekuilibrasi pada suhu 5°C selama 2 jam dengan krioprotektan gliserol dan etilen glikol 5%, sedangkan Medeiros *et al.* (2002) dengan waktu ekuilibrasi selama 1 jam pada suhu yang sama. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu ekuilibrasi terbaik (1, 2 dan 3 jam) pada pembekuan semen kuda menggunakan pengencer susu skim.

### Metode Penelitian

Semen yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tiga ekor kuda jantan yang sudah mencapai *sexual maturity* (antara 5 dan 8 tahun), terdiri atas: satu ekor generasi empat (G4)

\* Penulis Korespondensi e-mail: iis\_arifiantini@telkom.net

Thoroughbred (*Spirit of Jatim; SJ*), satu ekor American Pinto (*Sony Boy; SB*) dan satu ekor Warmblood (*Prince Couperos; PC*) dalam kondisi sehat dan terseleksi melalui pengujian *daily sperm output* (produksi spermatozoa harian) dan satu ekor kuda betina sebagai pemancing, seluruhnya milik Athena Stable Depok.

Bahan pengencer dasar yang digunakan untuk sentrifugasi adalah susu skim glukosa, dengan komposisi sebagai berikut: susu skim 2,4 g dan glukosa 4,0 g (Kenney *et al.*, 1975) dalam akuades *ad* 100 ml, dipanaskan pada suhu 92-95°C selama 10 menit, didinginkan kemudian ditambah antibiotika streptomisin 100 mg dan penisilin 100.000 IU. Pengencer untuk semen beku adalah bahan pengencer dasar ditambah gliserol 5 %.

Penampungan semen kuda dilakukan dua kali dalam satu minggu menggunakan vagina buatan tipe *Nishikawa* dengan tabung penampung modifikasi tipe *Missouri* (Arifiantini *et al.*, 2006). Semen segar yang diperoleh dievaluasi terhadap volume, warna, konsistensi dan derajat keasaman (pH). Secara mikroskopis dievaluasi persentase spermatozoa motil, viabilitas, konsentrasi dan morfologi spermatozoa. Motilitas spermatozoa dinilai dengan mikroskop cahaya listrik (Olympus CH20) dengan pembesaran 400 x secara subjektif kuantitatif (Mickelsen *et al.*, 1993). Viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin nigrosin (MacPherson, 2001). Konsentrasi spermatozoa ( $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) menggunakan *Neubauer chamber* dengan pengenceran 100 kali dalam NaCl 3 %, dan morfologi spermatozoa (normalitas) dilakukan dengan pewarnaan Williams.

Semen yang mempunyai persentase motilitas >65% dengan konsentrasi  $>200 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  dengan morfologi spermatozoa normal >70%, diencerkan dengan susu skim (1:1). Disentrifugasi (Hettlich, EBA 3S Tuttlingen) dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet (spermatozoa) diencerkan kembali dengan pengencer susu skim yang mengandung gliserol 5 % dengan konsentrasi spermatozoa  $200 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ . Semen tersebut kemudian dikemas ke dalam straw 0.5 mL. Diekuilibrasikan pada suhu 4-5°C masing-masing selama 1 jam ( $E_1$ ), 2 jam ( $E_2$ ) dan 3 jam ( $E_3$ ). Kemudian dibekukan pada uap  $\text{N}_2$  cair (suhu  $\pm -150^\circ\text{C}$ ) selama 10 menit, disimpan dalam kontainer  $\text{N}_2$  cair (suhu  $-196^\circ\text{C}$ ). Keberhasilan pembekuan dievaluasi 24 jam kemudian. Semen beku di-*thawing* pada suhu 37°C selama 30 detik dengan menggunakan *water bath* (Chenier *et al.*,

1998). Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa. Persentase spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan yang disebut *recovery rate* (RR) dihitung dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa setelah pembekuan dengan motilitas semen segar dikalikan 100% (Han *et al.*, 2005).

$$\text{RR} = \frac{\text{Persentase spermatozoa motil setelah thawing}}{\text{Persentase spermatozoa motil semen segar}} \times 100 \%$$

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK) dan untuk masing-masing pejantan diulang sebanyak empat kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variansi dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Steel dan Torrie, 1995).

## Hasil dan Pembahasan

### Kualitas Semen Segar

Hasil dari evaluasi semen yang telah dilakukan menunjukkan kualitas yang cukup baik. Volume semen segar sebesar  $27,70 \pm 9,80 \text{ mL}$ , berwarna putih keruh dengan konsistensi encer dan pH  $7,10 \pm 0,10$ . Secara mikroskopis persentase spermatozoa motil progresif adalah  $67,1 \pm 7,20\%$ , viabilitas  $78,80 \pm 3,30\%$ , spermatozoa normal  $73,60 \pm 4,90\%$  dengan konsentrasi  $222,90 \pm 17,30 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ . Secara individu dari ketiga kuda jantan yang digunakan SJ menunjukkan kualitas semen cair yang paling rendah dibandingkan dengan PC dan SB (Tabel 1).

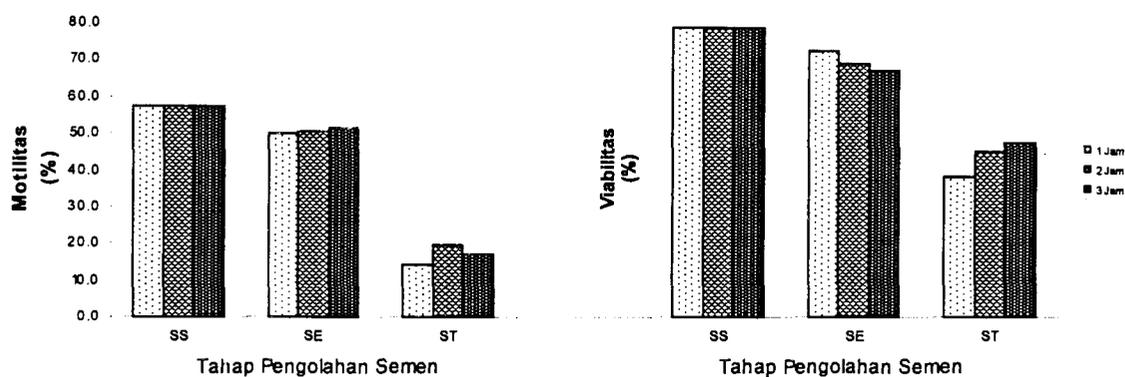
Karakteristik semen segar tersebut secara keseluruhan masih dalam kisaran normal untuk kuda (Brinsko *et al.*, 2000; Quintero-Moreno *et al.*, 2003). Tingginya standar deviasi menunjukkan besarnya variasi volume semen dari ketiga pejantan yang berbeda bangsa. Menurut Dowsett dan Knott (1996) bangsa dan umur kuda mempengaruhi karakteristik semen yang dihasilkan.

### Pengaruh Lama Ekuilibrasasi terhadap Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa setelah Thawing

Waktu ekuilibrasasi yang optimum dalam pembekuan semen pada berbagai ternak bervariasi. Pada pembekuan semen kuda hasil penelitian ini, lama ekuilibrasasi berbeda pengaruhnya untuk tiap individu. Pada jantan SJ, perlakuan  $E_1$ ,  $E_2$  dan  $E_3$  tidak menunjukkan perbedaan motilitas setelah

Tabel 1. Karakteristik semen cair kuda

Evaluasi	Nama kuda		
<b>Makroskopis</b>	<i>Spirit of Jatim</i>	<i>Sony Boy</i>	<i>Prince Couperous</i>
Volume (mL)	25,0 ± 6,10	22,50 ± 2,50	36,25 ± 11,40
Warna	putih keruh	putih keruh	putih keruh
pH	7,10 ± 0,10	7,10 ± 0,10	6,95 ± 0,20
Konsistensi	encer	encer	encer
<b>Mikroskopis</b>			
Motilitas spermatozoa (%)	57,50 ± 2,50	71,30 ± 2,20	72,50 ± 2,50
Viabilitas spermatozoa (%)	78,90 ± 2,00	77,70 ± 3,30	79,80 ± 4,00
Normalitas spermatozoa (%)	71,80 ± 3,50	75,30 ± 2,40	76,10 ± 1,40
Konsentrasi (x10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	207,00 ± 12,80	227,30 ± 15,90	234,50 ± 8,60



Gambar 1. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada berbagai tahapan pengolahan semen untuk Spirit of Jatim (SS = semen segar; SE = setelah ekuilibrasi; ST = setelah thawing)

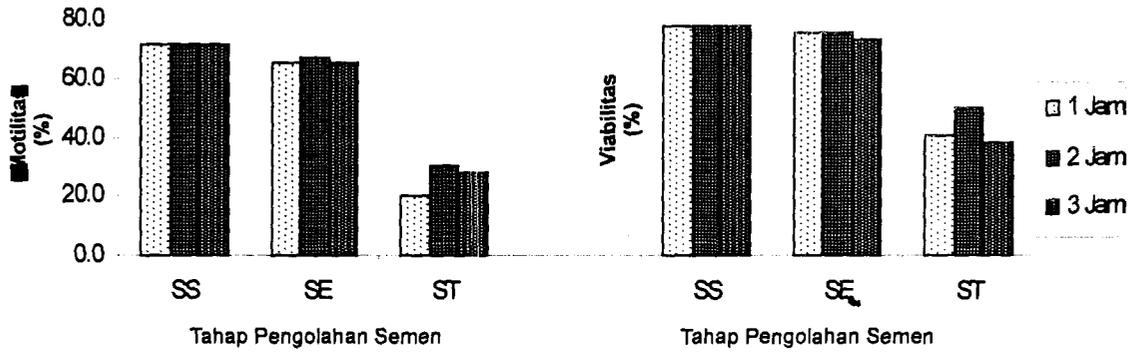
thawing dengan motilitas rata-rata 17,30% ( $P > 0,05$ ), sedangkan viabilitas spermatozoa setelah thawing pada jantan SJ, ternyata E<sub>3</sub> (47,80%) menunjukkan persentase yang lebih tinggi dibanding E<sub>2</sub> (45,30%), dan E<sub>1</sub> (38,40%) (Gambar 1).

Pada kuda SB dan PC, persentase spermatozoa motil setelah thawing masing-masing (30,00%; 28,90%) dan 3 jam (28,30% ; 30,60%) lebih tinggi dibandingkan E<sub>1</sub> (20,60%; 23,30%) ( $P < 0,05$ ). Persentase viabilitas spermatozoa setelah thawing pada PC tertinggi pada E<sub>3</sub> (50,00%) diikuti oleh E<sub>2</sub> (44,60%), sedangkan E<sub>1</sub> menunjukkan nilai yang lebih rendah yaitu 37,30%. Untuk kuda SB, E<sub>2</sub> menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa 49,70%, lebih tinggi dibandingkan E<sub>1</sub> (40,10%) dan E<sub>3</sub> (38,40%) (Gambar 2 dan 3).

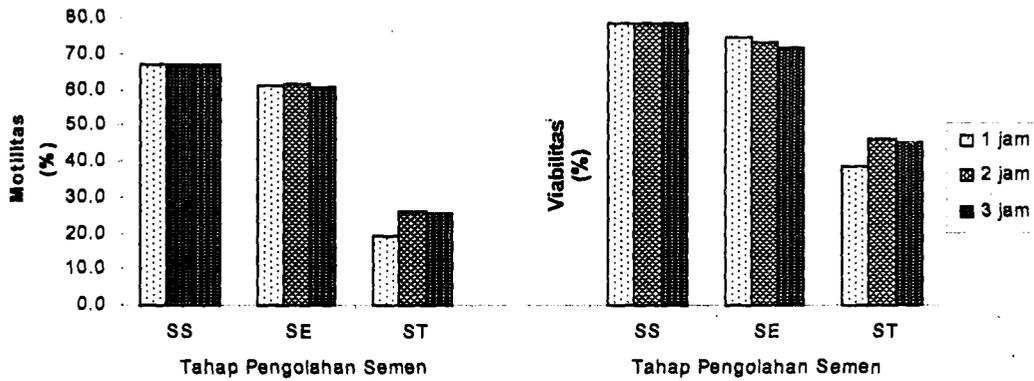
Secara keseluruhan lama ekuilibrasi ini tidak mempengaruhi persentase motilitas setelah thawing dari ketiga kuda yang digunakan ( $P > 0,05$ ) dengan persentase motilitas setelah thawing  $23,60 \pm 7,10\%$  (Gambar 4). Lama ekuilibrasi mempengaruhi persentase viabilitas spermatozoa baik secara individu atau secara keseluruhan. Waktu ekuilibrasi selama 2 dan 3 jam menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa lebih baik dibandingkan dengan 1 jam.

Penurunan kualitas dari semen segar ke setelah ekuilibrasi masih rendah, untuk motilitas spermatozoa turun antara 4,40% dan 7,50%, sedangkan untuk viabilitas spermatozoa turun antara 1,80% - 11,10%. Dari setelah ekuilibrasi ke setelah thawing penurunan kualitas terjadi cukup tinggi yaitu berkisar antara 30,70% dan 45,60% untuk motilitas spermatozoa dan 18,80% - 38,20% untuk viabilitas spermatozoa. Sehingga total penurunan kualitas yang terjadi mulai semen segar ke setelah thawing antara 37,50% dan 50,60% untuk motilitas spermatozoa dan 28,60% - 42,50% untuk viabilitas spermatozoa (Tabel 2).

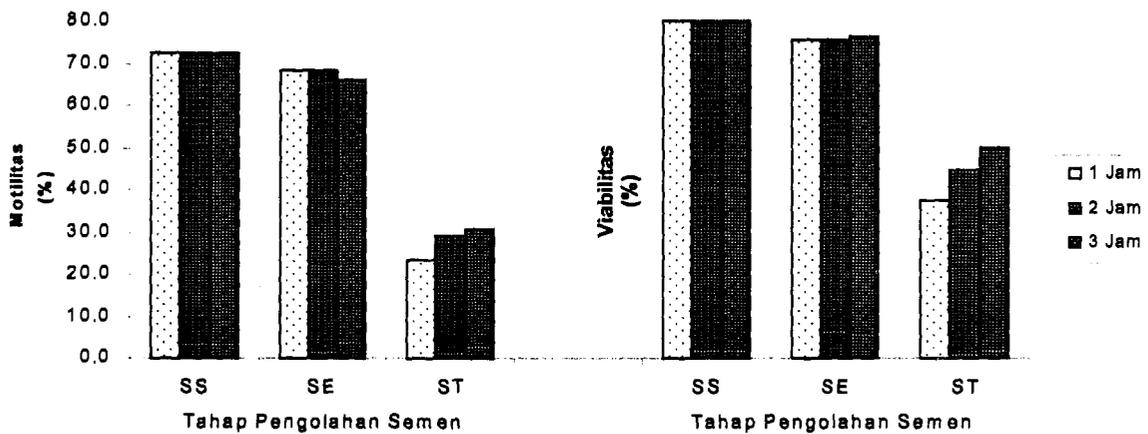
Keberhasilan pembekuan semen tidak hanya dinilai dari persentase motilitas setelah thawing, hal ini disebabkan oleh motilitas semen segar yang berbeda pada ketiga kuda yang digunakan. Persentase spermatozoa yang dapat pulih kembali setelah pembekuan disebut dengan *recovery rate* (RR) yang memberikan gambaran keberhasilan dari proses pembekuan itu sendiri. Tanpa melihat lama ekuilibrasi yang dilakukan, secara keseluruhan ternyata PC mempunyai nilai RR tertinggi yaitu 38,10% diikuti oleh SB 36,90% dan SJ sebesar 29,60% (Gambar 5).



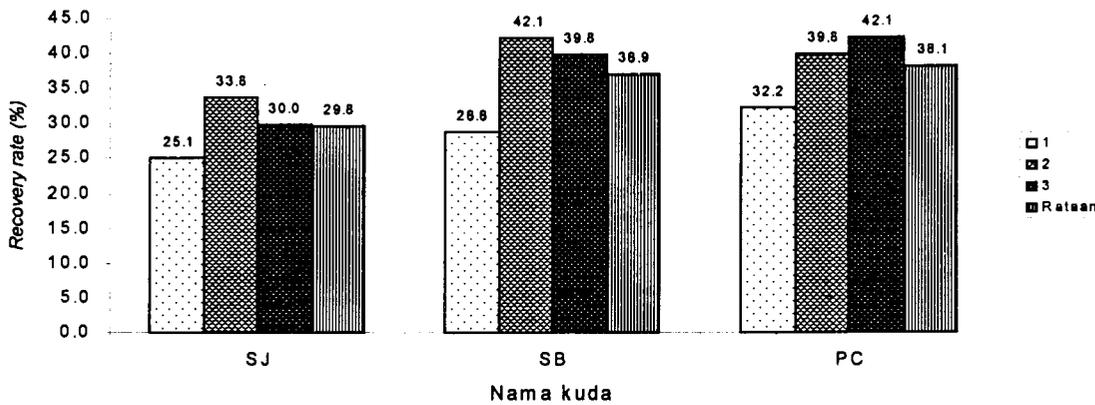
Gambar 2. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada berbagai tahapan pengolahan semen untuk Sony boy (SS=semen segar; SE= Setelah ekuilibrasi; ST = Setelah thawing)



Gambar 3. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada berbagai tahapan pengolahan semen untuk Prince couperos (SS = semen segar; SE = setelah ekuilibrasi; ST = setelah thawing)



Gambar 4. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada berbagai tahapan pengolahan semen untuk seluruh kuda jantan (SS = semen segar; SE = setelah ekuilibrasi; ST = setelah thawing).



Gambar 5. Recovery rate semen beku kuda dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda

Tabel 2. Penurunan kualitas semen pada berbagai tahap pengolahan semen dengan lama ekuilibrasi yang berbeda

Nama kuda	Waktu Ekuilibrasi	Penurunan (%)					
		SS-SE		SE-ST		SS-ST	
		M	V	M	V	M	V
<i>Spirit of Jatim</i>	1	7,50	6,20	35,60	35,30	43,10	41,50
	2	6,80	10,10	30,70	24,50	37,50	34,60
	3	4,90	11,10	35,10	18,80	40,00	29,90
	Rataan	6,40	9,10	33,80	26,20	40,20	35,30
<i>Sony Boy</i>	1	6,30	1,80	44,40	35,60	50,60	37,40
	2	5,00	2,60	36,90	26,00	41,90	28,60
	3	6,30	4,70	36,90	34,90	43,10	39,60
	Rataan	5,80	3,00	39,40	32,20	45,20	35,20
<i>Prince Couperous</i>	1	4,40	4,40	45,60	38,20	50,00	42,50
	2	4,40	4,40	38,80	29,60	43,10	34,00
	3	6,30	3,30	35,60	25,60	41,90	28,90
	Rataan	5,00	4,00	40,00	31,10	45,00	35,10
<b>Rataan ke tiga kuda</b>		<b>5,80</b>	<b>5,50</b>	<b>37,50</b>	<b>29,70</b>	<b>43,30</b>	<b>35,20</b>

SS-SE (semen segar ke setelah ekuilibrasi), SE-ST (setelah ekuilibrasi ke setelah *thawing*), SS-ST (semen segar ke setelah *thawing*), M: motilitas, V, viabilitas spermatozoa

Berdasarkan persentase spermatozoa motil yang dihasilkan setelah *thawing* dan dibandingkan kualitas semen segar, ternyata nilai RR tertinggi sebesar 42,10% terdapat pada PC (E<sub>3</sub>) dan SB (E<sub>2</sub>), sedangkan nilai RR paling rendah adalah pada SJ (25,10%) dengan waktu ekuilibrasi selama 1 jam.

Waktu ekuilibrasi pada semen berbagai ternak berbeda-beda. Pada pembekuan semen domba ekuilibrasi sebaiknya dilakukan selama 2 jam sedangkan pada semen rusa ekuilibrasi selama 4 jam memberikan hasil yang cukup baik (Bearden *et al.*, 2004). Pada semen sapi *FH* ekuilibrasi biasanya dilakukan selama 4 jam dengan suhu 5°C. (Arifiantini *et al.*, 2005).

Menurut Raya (2000), ekuilibrasi semen kambing PE pada suhu 3-5°C selama 4 jam lebih baik dibandingkan dengan 1, 2 ataupun 3 jam. Han *et al.* (2005) membandingkan lama ekuilibrasi pada pembekuan semen itik yaitu 10 dan 60 menit, ternyata ekuilibrasi selama 10 menit menunjukkan kualitas semen setelah *thawing* lebih baik dibandingkan dengan 60 menit Untuk semen kuda ekuilibrasi dapat dilakukan selama 1 jam pada suhu 5°C (Medeiros *et al.*, 2002) ataupun 2 jam (Arruda, *et al.*, 2002).

Penurunan kualitas semen setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing* dalam proses pembekuan semen dimulai saat penambahan krioprotektan, perubahan

volume sel pada saat pembekuan diikuti peregangan dan pengkerutan membran plasma sebagai respon terhadap larutan hiperosmotik (Devireddy *et al.*, 2002) ataupun 2 jam Arruda *et al.* (2002).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, terlihat bahwa penurunan kualitas semen setelah ekuilibrisasi tidak terlalu besar. Tetapi penurunan sangat besar terjadi setelah *thawing*. Penurunan motilitas spermatozoa dari semen segar sampai setelah *thawing* pada penelitian ini berkisar antara 37,50% dan 50,60%. Penurunan ini sangat besar, karena menurut Kavak *et al.* (2003) pada kuda jenis Tori dan Estonian penurunan motilitas dari semen segar ke setelah *thawing* hanya berkisar antara 24,4 dan 25,20%, demikian juga pada kuda jenis *warmblood* penurunan motilitasnya sekitar 26% (Aurich *et al.*, 1996)

Penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah *thawing* ini bervariasi antar individu, hal ini berhubungan dengan permeabilitas dari membran plasma spermatozoa dan efek toksik gliserol yang ditambahkan (Chenier *et al.*, 1998). Menurut White (1993) kerusakan yang terjadi selama proses pembekuan dan *thawing* karena terbentuknya peroksidasi lipid sehingga akan menurunkan daya hidup spermatozoa. Peroksidasi lipid diawali dengan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) sebagai produk samping dari metabolisme spermatozoa. *Reactive oxygen species* tersebut akan menyerang substrat yang terdekat yaitu ikatan rangkap rantai asam lemak tidak jenuh yang terdapat pada bagian *midpiece*. Pengaruhnya secara langsung masih dalam penelitian tetapi kelihatannya berhubungan dengan proses kapasitasasi sehingga spermatozoa kehilangan fertilitasnya (Gadella *et al.*, 2002).

Spermatozoa kuda sangat mudah terkena *cold shock*. Rentannya spermatozoa kuda ini disebabkan oleh perbedaan komposisi *phospholipid* yang terdapat pada membran plasmanya. Pada spermatozoa kuda kandungan asam lemak tak jenuh arakidonat (20:4) sangat tinggi yaitu 18,20% (Chow *et al.*, 1986) sedangkan pada spermatozoa sapi dan domba hanya 3,5 dan 4,50-5% (White, 1993). Selain itu perbandingan kandungan antara asam dokosapentaenoat (DPA; 22:5) dan dokosaheksaenoat (DHA; 22:6) pada *phosphatidylcholine* dan *phosphatidyletholamin* jumlahnya terbalik (Gadella *et al.*, 2001). Pada spermatozoa sapi dan domba kandungan DPA sangat sedikit, sedangkan pada kuda 17,20%, sebaliknya kandungan DHA pada spermatozoa sapi dan domba sangat tinggi yaitu

61,30 dan 61,40% (White, 1993) tetapi pada spermatozoa kuda hanya 7,60% (Chow *et al.*, 1986).

Penambahan gliserol sebagai krioprotektan ke dalam bahan pengencer pada waktu ekuilibrisasi membutuhkan waktu yang optimum. Pemaparan gliserol yang terlalu lama atau terlalu singkat sebelum dibekukan akan merusak spermatozoa. Ekuilibrisasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak gliserol dengan spermatozoa yang berlebihan sehingga gliserol akan bersifat toksik terhadap sel spermatozoa (sitotoksik). Gliserol akan menarik air secara berlebihan dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan sel spermatozoa (Best, 2006).

Pada waktu ekuilibrisasi gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrisasi yang lebih lama kemungkinan gliserol dapat bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas maupun viabilitas dari spermatozoa (Toelihere, 1993).

Dengan waktu ekuilibrisasi yang singkat efek sitotoksik gliserol dapat diminimalkan, sehingga penurunan kualitas juga dapat ditekan. Han (2005) menyatakan bahwa efek toksik krioprotektan berhubungan dengan konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan dan waktu pemaparan krioprotektan dengan semen sebelum dibekukan. Namun hal tersebut menyebabkan berkurangnya kesempatan gliserol untuk penetrasi secara sempurna ke dalam sel spermatozoa, sehingga terjadi kerusakan spermatozoa karena terbentuknya kristal es intraseluler.

## Kesimpulan

Ekuilibrisasi selama 1, 2 dan 3 jam tidak menunjukkan perbedaan motilitas spermatozoa setelah *thawing* pada ketiga kuda yang digunakan. Ekuilibrisasi selama 2 dan 3 jam menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa lebih baik pada ketiga kuda yang digunakan. Penurunan persentase motilitas tertinggi terdapat pada Sony Boy dengan waktu ekuilibrisasi selama 1 jam dan terendah pada Spirit of Jatim selama 2 jam. Penurunan persentase viabilitas spermatozoa tertinggi pada Prince Couperous dengan lama E<sub>1</sub> dan terendah pada Sony Boy dengan ekuilibrisasi selama 2 jam. *Recovery rate* terbaik terdapat pada kuda Sony Boy dan Prince Couperous.

## Daftar Pustaka

- Arifiantini, I., T.L. Yusuf dan N. Graha, 2005. Longivitas dan *recovery rate* pasca *thawing* semen beku sapi *Fresian Holstein* menggunakan bahan pengencer yang berbeda. *Buletin Peternakan* 29(2): 53-61.
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf dan B. Purwantara, 2006. Daya tahan spermatozoa kuda hasil sentrifugasi dengan kadar plasma semen yang berbeda menggunakan pengencer skim. *Animal Production* 8(3): 160-167.
- Arruda, S.P., B.A. Ball, C.G. Gravance, A.R. Garcia and I.K.M. Liu, 2002. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 58: 253-256.
- Aurich, J.E., A. Kühne, H. Hoppe and C. Aurich, 1996. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46: 791-797.
- Bearden, H.J., J.W. Furguay and S.T. Willard, 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6<sup>th</sup> ed., Pearson Education, New Jersey.
- Brinsko, S.P., G.S. Van Wagner, J.K. Graham and E.L. Quires, 2000. Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 111-120 (*Supplement*).
- Best, B., 2006. Viability, Cryoprotectant Toxicity and Chilling Injury in Cryonics. [www.benbest.com/resources/cryopreservation.pdf](http://www.benbest.com/resources/cryopreservation.pdf). [29 September 2006].
- Chenier, T., K. Merckies, S. Leibo, C. Plante and W. Johnson, 1998. Evaluation of cryoprotective agents for use in the criopreservation of equine spermatozoa. *Proceeding of American Association Equine Practitioners Vol 4*. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Chow, P.Y.W., I.G. White and B.W. Pickett, 1986. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal Reproduction Science* 11: 207-213.
- Devireddy, R.V., D.J. Swanlund, T. Olin, W. Vincente, M.H.T. Troedsson, J.C. Bischof and K.P. Roberts, 2002. Cryopreservation of equine sperm: Optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biology of Reproduction* 66: 222-231.
- Dowsett, K.F. and L.M. Knott, 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46: 379-412.
- Gadella, B.M., R. Rathi, J.F.H.M. Brouwers, T.A.E. Stout and B. Colenbrander, 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 68: 249-265.
- Gadella, B.M., R. Rathi, M.M. Bevers, J.F.H.M. Brouwers, D. Neild and B. Colenbrander, 2002. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. *Proceedings of the Second Meeting of the European Equine Gamete Group (EEGG)*. 26<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> September 2001. Loosdrecht R & W Publications.
- Han, X.F, Z. Y. Niu, F.Z. Liu and C.S. Yang, 2005. Effect of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *Poultry Science* 4: 197-201.
- Kacker, R.N., and B.S. Panwar, 1996. *Textbook of Equine Husbandry*. 1<sup>st</sup> ed., Vikas Publishing House, London.
- Kavak, A., A. Johansson, N. Lundeheim, H. Rodriguez-Martinez., M. Aidnik and S. Einarsson, 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tory and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 76: 205-216
- Kenney, R.M., R.V. Bergman, W.L. Cooper and G.W. Morse, 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proceeding of American Association Equine Practitioners*: 327-336.
- Medeiros, A.S.L., G.M. Gomes, M.T. Carmo, F.O. Papa, and M.A. Alvarenga, 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58: 273-276.
- Mickelsen, W.D. M.A. Memon, P.B. Anderson and D.A. Freeman, 1993. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology* 39: 553-560.
- MacPherson, M.L., 2001. How to evaluate semen in the field. *Proceeding of American Association Equine Practitioners*: 412-416.

Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie, 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. B Sumantri (penerjemah). Terjemahan dari: *Principles and Procedures of Statistics*. Gramedia, Jakarta.

Toelihere, M.R., 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.

White, I.G., 1993. Lipids and calcium uptake of relation to cold shock and preservation. *Reproduction, Fertility and Development* 5(6): 639-658.