

Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Kambing Peranakan Ettawa yang Dipreservasi dengan Pengencer Tris dan Bberbagai Konsentrasi Maltosa

Viability of Ettawa Corossbreed Goat Epididymal Spermatozo Preserved with Tris Extender and Various Maltose Concentrations

Muhammad Rizal¹, Dwi Sulistiowati¹, Abrani Sulaiman¹, Herdis², Insun Sangadji³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Jenderal Achmad Yani Km. 36, Banjarbaru 70714, Banjarmasin.

²Pusat Teknologi Produksi Pertanian, badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, LAPTIAB, Gedung 612 Kawasan Puspitek Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314

³Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena, Poka, Ambon 97233
 Email: cang65@yahoo.com

Abstract

Cauda epididymal spermatozoa could be used as an alternative source of gamete in the application of various reproductive technologies, since the spermatozoa is motile and has ability for fertilizing the oocyte. The objective of this research was to examine the effectivity of maltose in maintaining viability of ettawa crossbreed goat epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C. Five testis with epididymides of ettawa crossbreed goat were obtained from slaughterhouse. Epididymal spermatozoa was collected by the combination of slicing, flushing and tissues pressure of cauda epididymides with physiological saline (0.9% NaCl). Collected-spermatozoa was divided in equal volume into three tubes and diluted with Tris extender containing 20% egg yolk (control), Tris extender + 0.3 g maltose/100 ml (M0.3), and Tris extender + 0.6 g maltose/100 ml (M0.6), respectively. Diluted-spermatozoa was stored in refrigerator at 3–5°C. Quality of diluted-spermatozoa including percentages of motile spermatozoa (MS) and live spermatozoa (LS) were evaluated every day during storage at 3–5°C for four days. Data were analyzed using completely randomized design with three treatments and five replicates. Means were compared significant difference test at 0.05 significant level. Results of this study showed that mean spermatozoa concentration, percentage of MS, percentage of LS, and percentage of abnormal spermatozoa of ettawa crossbreed goat fresh epididymal spermatozoa were 3,220 million cell/ml, 70%, 81%, and 4.3%, respectively. At day-5 of storage, percentages of MS and LS for M0.3 (38 and 60.4%) and M0.6 (38 and 57.2%) were significantly ($P < 0.05$) higher than control (32 and 55.4%). In conclusion, addition of 0.3 and 0.6% maltose in Tris extender could be maintained viability of ettawa crossbreed goat epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C for three days.

Key words: Maltose, preservation, epididymal spermatozoa, ettawa crossbreed goat.

Abstrak

Spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif sumber gamet dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi, karena spermatozoa tersebut telah motil dan memiliki kemampuan membuahi oosit. Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas penambahan laktosa dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis kambing peranakan ettawa (PE) yang dipreservasi pada suhu 3–5°C. Sebanyak lima buah testis beserta epididimis kambing PE diperoleh dari rumah potong hewan (RPH). Spermatozoa epididimis dikoleksi dengan metode kombinasi *slicing*, *flushing*, dan penekanan cauda epididimis dengan larutan NaCl fisiologis (0,9% NaCl). Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer Tris yang mengandung 20% kuning telur (kontrol), pengencer Tris + 0,3 g matosa/100 ml (L0,3), dan pengencer Tris + 0,6 g maltosa/100 ml (L0,6). Spermatozoa yang telah diencerkan disimpan di dalam lemari es pada suhu 3–5°C. Kualitas spermatozoa

meliputi persentase spermatozoa motil (SM) dan spermatozoa hidup (SH) dievaluasi setiap hari selama empat hari. Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa, persentase SM, persentase SH, dan persentase spermatozoa abnormal spermatozoa segar epididimis kambing PE adalah masing-masing 3.220 juta sel/ml, 70%, 81%, dan 4,3%. Pada hari kelima penyimpanan persentase spermatozoa motil dan hidup perlakuan M0,3 (38 dan 60,4%) dan M0,6 (38 dan 57,2%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (32 dan 55,4%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan maltosa sebanyak 0,3 atau 0,6% ke dalam pengencer Tris dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis kambing PE selama tiga hari pada penyimpanan suhu 3–5°C.

Kata kunci: maltosa, preservasi, spermatozoa epididimis, kambing PE.

Pendahuluan

Kambing peranakan ettawa (PE) merupakan salah satu jenis kambing penghasil susu yang cukup penting di daerah tropik khususnya Indonesia. Kambing tersebut merupakan hasil persilangan antara kambing ettawa yang berasal dari India dan kambing lokal Indonesia. Disamping sebagai ternak penghasil susu, pejantan kambing PE juga dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan potensi produksi susu kambing-kambing lokal Indonesia lainnya melalui persilangan dengan teknologi reproduksi, seperti inseminasi buatan (IB). Diharapkan dengan persilangan tersebut akan dihasilkan kambing-kambing yang mampu memproduksi susu dan daging cukup tinggi (*dual purpose*).

Penerapan teknologi IB dapat memanfaatkan spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis, selain semen hasil ejakulasi yang ditampung dengan vagina buatan. Cauda epididimis merupakan tempat penyimpanan spermatozoa sebelum diejakulasikan. Spermatozoa yang terdapat pada cauda epididimis merupakan spermatozoa yang sudah matang dan dapat membuahi oosit, karena telah mengalami proses pematangan pada bagian caput dan corpus (Hafez, 2000). Menurut Rizal (2005), upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis dalam bentuk semen cair atau semen beku untuk keperluan aplikasi berbagai teknologi

reproduksi, menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang memiliki kualitas genetik unggul tetapi tidak dapat ditampung semennya. Selanjutnya dinyatakan bahwa metode ini juga menjadi alternatif dalam upaya penyelamatan plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak serta hewan-hewan langka dan buas.

Menurut White (1993) dalam proses preservasi semen pada suhu rendah (umumnya pada suhu 3–5°C dan -196°C) kerusakan spermatozoa akan terjadi akibat adanya pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel dan berakibat kematian spermatozoa. Untuk meminimalkan kerusakan sel akibat pengaruh buruk suhu rendah, maka upaya yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan zat tertentu ke dalam pengencer semen (Kayser *et al.*, 1992). Zat tersebut dikenal sebagai senyawa krioprotektan seperti gliserol (krioprotektan intraseluler) dan beberapa jenis gula (krioprotektan ekstraseluler) (Supriatna dan Pasaribu, 1992) yang dapat digunakan dalam proses kriopreservasi dan preservasi semen pada suhu 3–5°C. Di samping berperan sebagai senyawa krioprotektan, gula juga dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai substrat sumber energi.

Peranan penting gula dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses preservasi dan kriopreservasi semen berbagai jenis hewan dan

ternak telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dengan hasil yang baik. Beberapa jenis gula yang sering dimanfaatkan adalah: glukosa pada semen beku domba (Molinia *et al.*, 1993) dan semen beku babi (De los reyes *et al.*, 2000); rafinosa pada semen beku kambing pe (Suwarso, 1999); trehalosa pada semen beku domba pampinta (Aisen *et al.*, 2000, 2002), dan semen beku domba garut (Herdis *et al.*, 2005); sukrosa dan trehalosa pada semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997); laktosa pada semen beku kambing (Singh *et al.*, 1995), semen beku domba garut (Rizal, 2005), dan semen cair domba garut (Rizal, 2006); maltosa pada semen beku domba garut (Herdis *et al.*, 2005), serta dextrosa, trehalosa, rafinosa, dan sukrosa pada semen beku domba garut (Rizal, 2006).

Pada penelitian ini dilakukan penambahan maltosa ke dalam pengencer tris untuk mempreservasi spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis kambing Pe pada suhu 3–5°C. penambahan maltosa diharapkan akan meminimalkan kerusakan spermatozoa selama preservasi, sehingga daya tahan hidupnya dapat diperpanjang.

Materi dan Metode

Testis beserta epididimis kambing PE sebanyak lima buah (sebagai jumlah ulangan) diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) tradisional di Martapura, Kabupaten Banjar. Testis beserta epididimis dikumpulkan pada saat pemotongan kambing sekitar jam 07.00 pagi, kemudian segera ditranspor ke Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Jurusan Peternakan, Universitas Lambung Mangkurat. Epididimis dipisahkan dari testis dan dibilas dengan larutan NaCl fisiologis

(0,9% NaCl) hingga bersih dari kotoran. Spermatozoa dikoleksi dari cauda epididimis dengan kombinasi teknik Slicing, pembilasan, dan penekanan (bilas-tekan) (Rizal 2005). Cauda epididimis diiris beberapa kali, sehingga semua jaringan cauda epididimis terbuka. Kemudian dibilas-tekan menggunakan larutan NaCl fisiologis hingga mencapai volume 2,5 ml.

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dengan volume yang sama. Spermatozoa diencerkan dengan pengencer sesuai perlakuan, yakni: 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur (kontrol), 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur + 0,3 g maltosa per 100 ml pengencer (M0,3), dan 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur + 0,6 g maltosa per 100 ml pengencer (M0,6). Komposisi pengencer dasar Tris terdiri atas: 2,42 g Tris(hidroksimetil)aminometan, 1,28 g asam sitrat, dan 2,16 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml, kemudian ditambahkan penisilin 1.000 IU dan streptomisin sebanyak 1.000 µg per mililiter pengencer. Spermatozoa diencerkan hingga mencapai konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per mililiter. Selanjutnya tabung reaksi ditutup rapat, dimasukkan ke gelas piala yang berisi air bersih, dan dipreservasi di dalam lemari es (refrigerator) yang bersuhu sekitar 3–5°C. Contoh masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya setiap hari selama 5 hari.

Kualitas spermatozoa dievaluasi pada tahap setelah koleksi (spermatozoa segar) serta setelah pengenceran dan preservasi. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi pada tahap spermatozoa segar adalah konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa abnormal. Evaluasi

terhadap spermatozoa yang telah diencerkan dan dipreservasi meliputi: persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup.

Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Evaluasi secara subyektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 hingga 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan pewarnaan eosin-nigrosin (Felipe-Perez *et al.*, 2008). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

Hasil dan Pembahasan

Konsentrasi spermatozoa yang didapat setelah penambahan larutan NaCl fisiologis hingga mencapai volume 2,5 ml pada penelitian ini adalah rata-rata 3.220 juta sel/ml (Tabel 1). Konsentrasi spermatozoa kambing PE pada semen hasil ejakulasi adalah rata-rata 2.940 juta sel/ml (Tambing *et al.*, 2001), rata-rata 2.806 juta sel/ml (Yusuf *et al.*, 2005), 3.140 – 3.770 juta sel/ml (Qisthon dan Suharyati, 2007), rata-rata 3.340 juta sel/ml (Winarto dan Isnaini, 2008), dan rata-rata 4.148 juta sel/ml (Souhoka *et al.*, 2009). Argawal *et al.* (1992). melaporkan, bahwa konsentrasi spermatozoa

kambing Jamnapari dan Barbari masing-masing rata-rata 3.860 juta dan 4.020 juta sel/ml. Menurut Evans dan Maxwell (1987), konsentrasi spermatozoa kambing yang normal berkisar antara 2.500 juta dan 5.000 juta sel/ml.

Persentase motilitas spermatozoa cauda epididimis yang didapatkan pada penelitian ini adalah rata-rata 70%. Persentase motilitas spermatozoa hasil ejakulasi pada kambing PE adalah rata-rata 78,13% (Suwarso, 1999), 72,79% (Tambing *et al.*, 2001), rata-rata 77,5% (Yusuf *et al.*, 2005), 74,61 – 83,73% (Qisthon dan Suharyati, 2007), rata-rata 79% (Winarto dan Isnaini, 2008), dan rata-rata 70% (Souhoka *et al.*, 2009).

Persentase hidup spermatozoa cauda epididimis kambing PE pada penelitian ini rata-rata 81%. Hasil beberapa penelitian dilaporkan bahwa persentase hidup spermatozoa semen hasil ejakulasi pada kambing PE adalah rata-rata 83,43% (Tambing *et al.*, 2001), rata-rata 83,95% (Yusuf *et al.*, 2005), 82,17 – 88,34% (Qisthon dan Suharyati, 2007), rata-rata 90,75% (Winarto dan Isnaini, 2008), rata-rata 83,89% (Souhoka *et al.*, 2009), dan rata-rata 80% (Bintara, 2011).

Persentase spermatozoa abnormal yang diperoleh dalam penelitian ini rata-rata 4,3%. Pada spermatozoa semen hasil ejakulasi dilaporkan, bahwa persentase abnormal spermatozoa kambing PE adalah rata-rata 4,59% (Yusuf *et al.*, 2005), 2,46 – 2,84% (Qisthon dan Suharyati, 2007), rata-rata 15,78% (Winarto dan Isnaini, 2008), rata-rata 7,12% (Souhoka *et al.*, 2009) dan rata-rata 8,2% (Bintara, 2011).

Berdasarkan pada seluruh data kualitas spermatozoa segar dapat dikatakan bahwa spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis kambing Pe pada penelitian ini memenuhi syarat

untuk diproses menjadi semen cair atau semen beku, karena memiliki kualitas yang sama dengan semen hasil ejakulasi. Semen segar hasil ejakulasi yang memenuhi syarat untuk diolah menjadi semen cair atau semen beku dan digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil $\geq 70\%$, persentase spermatozoa abnormal $<15\%$ (Akhter *et al.*, 2007; andrabi *et al.*, 2008) dan persentase mpu $>60\%$ (revell dan mrode, 1994). menurut bearden dan fuquay (1997), angka morfologi abnormal spermatozoa sebesar 8–10% tidak memberikan pengaruh yang cukup berarti bagi fertilitas, namun jika abnormalitas lebih dari 25% pada suatu ejakulat, maka penurunan fertilitas tidak dapat diantisipasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan maltosa ke dalam pengencer Tris mampu mempertahankan persentase spermatozoa

motil dan hidup spermatozoa epididimis kambing PE. Pada hari kelima penyimpanan persentase spermatozoa motil dan hidup perlakuan M0,3 (38 dan 60,4%) dan M0,6 (38 dan 57,2%) nyata ($P<0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (32 dan 55,4%) (Tabel 2). Hal ini menunjukkan, bahwa maltosa berperan menunjang kehidupan spermatozoa selama preservasi, yakni sebagai substrat sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler. Maltosa sebagai salah satu karbohidrat golongan monosakarida dapat dimetabolisir oleh spermatozoa melalui glikolisis dan/atau siklus Krebs untuk menghasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP) (Lehninger, 1994). Adenosin trifosfat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan, sehingga dapat tetap motil dan sekaligus untuk mempertahankan daya hidupnya.

Tabel 1. Kuantitas dan kualitas spermatozoa segar

Variabel	Kuantitas dan kualitas spermatozoa segar (rerata \pm SD)
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	3.220 \pm 727,50
Spermatozoa motil (%)	70 \pm 0,00
Spermatozoa hidup (%)	81 \pm 1,22
Spermatozoa abnormal (%)	4,3 \pm 1,15

Keterangan: Konsentrasi spermatozoa setelah ditambahkan NaCl fisiologis hingga mencapai volume 2,5 ml.

Tabel 2. Persentase spermatozoa motil cauda epididimis kambing PE yang dipreservasi pada suhu 3–5°C

Perlakuan	Spermatozoa motil cauda epididimis (%) pada preservasi hari ke–				
	1	2	3	4	5
Kontrol	70,00 \pm 0,00	51,00 \pm 4,18	45,00 \pm 3,54	40,00 \pm 0,00	32,00 \pm 2,74 ^b
M0,3	70,00 \pm 0,00	55,00 \pm 5,00	51,00 \pm 2,24	43,00 \pm 2,74	38,00 \pm 2,74 ^a
M0,6	70,00 \pm 0,00	55,00 \pm 5,00	51,00 \pm 6,52	43,00 \pm 2,74	38,00 \pm 2,74 ^a

Keterangan : ^{a,b} Superskrip dalam kolom yang sama masing-masing variabel kualitas, menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$). Kontrol = Pengencer Tris, M0,3 = Pengencer Tris + 0,3% maltosa, M0,6 = Pengencer Tris + 0,6% maltosa.

Tabel 3. Persentase spermatozoa hidup cauda epididimis kambing PE yang dipreservasi pada suhu 3–5°C

Perlakuan	Spermatozoa hidup cauda epididimis (%) pada preservasi hari ke				
	1	2	3	4	5
Kontrol	81,00±1,22	75,60±2,70	68,40±3,78	63,20±2,68	55,40±2,30 ^b
M0,3	81,00±1,22	77,00±1,79	70,80±3,32	63,60±4,34	60,40±3,78 ^a
M0,6	81,00±1,22	78,80±2,65	72,00±0,84	66,40±2,30	57,20±2,86 ^{ab}

Keterangan : ^{a,b} Superskrip dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05) Kontrol = Pengencer Tris, M0,3 = Pengencer Tris + 0,3% maltosa M0,6 = Pengencer Tris + 0,6% maltosa.

Maltosa juga berperan sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari proses kerusakan akibat pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu rendah (3–5°C). Menurut White (1993), pengaruh kejutan dingin berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C. Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein pada membran plasma menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran plasma rusak, yang menyebabkan ion-ion seperti ion kalsium bebas masuk ke sel. Oleh karena itu, preservasi spermatozoa pada suhu yang mendekati 0°C diperlukan zat pelindung di dalam pengencer, seperti fosfolipid kuning telur dan krioprotektan, serta proses pendinginan harus dilakukan secara bertahap (Kayser *et al.*, 1992). Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), karbohidrat merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler, dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap motilitas (daya gerak) dan daya hidup spermatozoa. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa atp hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan

berlangsung dengan baik hanya jika membran plasma sel tetap dalam keadaan utuh. Hal ini, karena menurut Lehninger (1994), membran plasma sel berperan dalam mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Hasil penelitian menunjukkan, bahwa spermatozoa epididimis kambing Pe dapat dipreservasi selama tiga hari pada suhu 3–5°C, dan masih memenuhi syarat kualitas untuk digunakan dalam program IB. Hal ini karena setelah preservasi selama tiga hari, spermatozoa masih memiliki persentase spermatozoa motil sebesar 40% untuk perlakuan kontrol serta masing-masing 43% untuk perlakuan M0,3 dan M0,6. berdasarkan pada standar nasional indonesia (SNI 4869.1:2008), semen yang memenuhi syarat kualitas digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan maltosa sebanyak 0,3 atau 0,6% ke dalam pengencer Tris dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis kambing PE selama tiga hari penyimpanan pada suhu 3–5°C dan layak digunakan dalam program IB.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pengelola Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat atas izin pemanfaatan laboratorium beserta seluruh peralatan yang dibutuhkan, sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

Daftar Pustaka

- Aisen, E.G., Alvarez, H.L., Venturino, A. and Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Aisen, E.G., Medina, V.H. and Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- Akhter, S., Sajjad, M., Andrabi, S.M.H., Ullah, N. and Qayyum, M. (2007). Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. *J. Vet.* 27: 13-16.
- Andrabi, S.M.H., Ansari, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A. and Akhter, S. (2008). Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 427-433.
- Agrawal, K.P., Sinha, N.K. and Goel, A.K. 1992. Reproduction behaviour in Indian goats. Research on Goats Indian Experience. Central Institute for Research on Goat, Makhdoom-Mathura, India. Pp: 82-93.
- Bearden, H.J. and Fuquay, J.W. (1997). Applied animal reproduction 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle. New Jersey.
- De Los Reyes, M., Saenz, L., Lapiere, L., Crosby, J. and Barros, C. (2000) In vitro evaluation of boar spermatozoa frozen with permeable and non-permeable cryoprotectant. Proceeding of 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Stockholm, 2-6 July
2000. Stockholm, Sweden. *Abstracts Vol. 2.* p. 161.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Pty Limited. Collingwood. Victoria
- Felipe-Perez, Y.E., Juarez-Mosqueda, M.L., Hernandez-Gonzalez, E.O. and Valencia, J.J. (2008). Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Vet Bras.* 2: 123-130.
- Hafez, E.Z.E. (2000). Anatomy of male reproduction. In: Reproduction in farm animals 7th ed. Hafez, E.Z.E. and Hafez, B (Editors). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins. Pp: 3-12.
- Herdiz, Rizal, M., Boediono, A., Arifiantini, R., Saili, T., Aku, A.S. dan Yulnawati. (2005). Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J. Pengembangan Peternakan Tropis* 30: 229-236.
- Kayser, J.p., Amann, R.p., Shidefer, R.k., Squires, E.l., Jasko, D.j. and Pickett, B.w. (1992). Effects of linier cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 30: 601-614.
- Lehninger, A.L. (1994) Dasar-dasar Biokimia. Jilid 2. Alih bahasa: M. Thenawijaya. Jakarta: Erlangga.
- Molinia, F.C., Evans, G., Guintana-Casares, P.I. and Maxwell, W.M.C. (1993). Effect of monosaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosomes integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reproduct. Sci.* 36: 113-122.
- Qisthon, A. dan Suharyati, S. (2007). Pengaruh penggunaan naungan terhadap kualitas semen kambing peranakan ettawa. *Anim. Product.* 9: 73-78.
- Rasul, Z., Ahmad, N. and Anzar, M. (2001). Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* 22: 278-283.

- Revell, S.G. and Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- Rizal, M. (2005). Fertilitas spermatozoa ejakulat dan epididimis domba Garut hasil kriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer tris dengan berbagai krioprotektan dan antioksidan. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rizal, M. (2006). Pengaruh penambahan laktosa di dalam pengencer tris terhadap kualitas semen cair domba Garut. *J. Pengembangan Peternakan Tropis.* 31: 224-231.
- Singh, M.P., Sinha, A.K. and Singh, B.K. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43:1047-1053.
- Souhoka, D.F., Matatula, M.J., Mesang-Nalley, W.M. dan Rizal, M. (2009). Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing peranakan etawah yang dipreservasi dengan plasma semen domba priangan. *J. Vet.* 10: 135-142.
- Steel, R.G.D. dan Torrie, J.H. (1993). Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Bogor.
- Supriatna, I. dan Pasaribu, F.H. (1992). In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suwarso. (1999). Peranan rafinosa dalam pengencer tris-sitrat-kuning telur terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Tambing, S.N., Toelihere, M.R., Yusuf, T.L. dan Utama, I.K. (2001). Kualitas semen beku kambing peranakan etawah setelah ekuilibrisasi. *Hayati.* 8: 70-75.
- Toelihere, M.R. (1993). Inseminasi buatan pada ternak. Bandung: Angkasa.
- White, I.G. (1993). Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. *Rev. Reproduct. Fertil. and Develop.* 5:639-658.
- Winarto, A. dan Isnaini, N. (2008). Pengaruh tingkat pengenceran terhadap kualitas spermatozoa kambing PE setelah penyimpanan pada suhu kamar. *Jurnal Ternak Tropika.* 9: 72-80.
- Woelders, H., Matthij, A. and Engel, B. (1997). Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiol.* 35: 93-105.
- Yusuf, T.L., Arifiantini, R.I. dan Rahmiwati, N. (2005). Daya tahan hidup semen cair kambing peranakan etawah dalam pengencer kuning telur dengan kemasan dan konsentrasi spermatozoa yang berbeda. *J. Pengembangan Peternakan Tropis.* 30: 217-223.