

Karakteristik *Frozen-thawed* Spermatozoa Domba Garut yang Dikriopreservasi dalam Pengencer yang Mendapat Imbuhan *Orvus ES Paste*

(THE CHARACTERISTIC OF FROZEN-THAWED GARUT RAM SPERMATOZOA CRYOPRESERVED IN EXTENDER SUPPLEMENTED WITH ORVUS ES PASTE)

Andhani Widya Hartanti¹, Ni Wayan Kurniani Karja²

¹Program Sarjana Kedokteran Hewan, ²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jln. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, E-mail: karjanwk13@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik *frozen-thawed* spermatozoa domba garut yang dikriopreservasi dalam pengencer dengan imbuhan *Orvus ES Paste* (OEP) sebagai surfaktan. Semen domba dikoleksi dan dievaluasi. Semen domba kemudian dikriopreservasi dalam pengencer dengan imbuhan OEP pada konsentrasi berbeda, yaitu 0% (OEP-0); 0,5% (OEP-0,25); 1% (OEP-0,5); 1,5% (OEP-0,75); 2% (OEP-1), dan selanjutnya dikriopreservasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semen yang dikriopreservasi dalam pengencer yang mendapat imbuhan OEP memiliki motilitas ($35,00 \pm 7,07$; $42,5 \pm 9,57$; $42,50 \pm 6,45$; $37,5 \pm 2,89$, berturut turut untuk OEP-0,25, OEP-0,5, OEP-0,75 dan OEP-1 vs $21,25 \pm 8,54$ untuk OEP-0), viabilitas ($45,75 \pm 6,80$; $55,43 \pm 14,60$; $53,48 \pm 7,40$; $46,32 \pm 6,62$, berturut turut untuk OEP-0,25, OEP-0,5, OEP-0,75 dan OEP-1 vs $29,05 \pm 10,42$ untuk OEP-0), dan membran plasma utuh (MPU) ($94,90 \pm 1,61$; $96,84 \pm 1,25$; $97,71 \pm 1,14$; $95,92 \pm 0,73$, berturut turut untuk OEP-0,25, OEP-0,5, OEP-0,75 dan OEP-1 vs $74,77 \pm 17,79$ untuk OEP-0) secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa OEP ($P < 0,05$). Tidak ada perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada karakteristik spermatozoa di antara kelompok semen yang dikriopreservasi dengan pengencer yang ditambah OEP. Berdasarkan data yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa penambahan OEP pada pengencer semen domba dapat melindungi kualitas spermatozoa domba setelah dikriopreservasi.

Kata-kata kunci: OEP, *frozen-thawed*, surfaktan, spermatozoa, domba

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the characteristics of frozen-thawed Garut ram semen when cryopreserved in extender supplemented with *Orvus Es Paste* (OEP) as surfactant. Ram semen were collected and evaluated, then cryopreserved in extender supplemented with OEP at different concentrations: OEP-0 (without OEP); OEP-0.25%; OEP-0.50%; OEP-0.75%; and OEP-1.00%. The characteristics observed were motility, viability, and Intact Plasma Membrane (IPM). The results showed that semen which were cryopreserved and supplemented with OEP had a higher motility, viability, and IPM, respectively compared to those without OEP. No significant differences in the characteristics were observed within the different OEP concentrations. It can be concluded that supplementation of OEP in the extender could protect the quality of cryopreserved ram spermatozoa.

Key words: *Orvus Es Paste*, frozen-thawed, surfactant, spermatozoa, goat.

PENDAHULUAN

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan semen dalam bentuk beku sehingga semen dapat disimpan dalam jangka waktu cukup lama, mudah ditransportasikan, serta memungkinkan penyimpanan sumber genom dari hewan yang punah (Bailey *et al.*, 2000). Efektivitas dari teknologi ini berkurang karena adanya kerusakan pada spermatozoa akibat pembekuan serta *thawing*. Hal tersebut menyebabkan kemampuan fertilisasi spermatozoa dari semen beku lebih rendah daripada spermatozoa semen segar.

Ketika suhu lingkungan menurun dengan drastis, air yang terkandung dalam spermatozoa maupun medium akan membentuk kristal es (Martinez dan Wallgren, 2011). Lemma, (2011) dan Holt, (2000) menyatakan bahwa adanya kristal es di dalam maupun luar spermatozoa menyebabkan kerusakan struktur terutama pada membran plasma dan mitokondria. Selain itu, pembekuan juga menyebabkan perubahan integritas membran spermatozoa akibat perubahan komponen penyusunnya (Lemma, 2011).

Penambahan krioprotektan belum cukup untuk mencegah penurunan kualitas *frozen-thawed* spermatozoa. Ketika krioprotektan ditambahkan ke dalam bahan pengencer, kerusakan tetap terjadi walaupun spermatozoa masih bertahan hidup. Menurut Lemma, (2011), kristal es menambah konsentrasi zat terlarut seperti gula, garam dan protein. Adanya peningkatan konsentrasi zat terlarut mengubah gradien konsentrasi. Konsentrasi dalam medium lebih tinggi daripada konsentrasi di dalam spermatozoa. Kecepatan pembekuan air dalam spermatozoa lebih lambat daripada air dalam medium. Air lebih mudah untuk keluar dari spermatozoa menuju medium. Martinez dan Wallgren, (2011) menyatakan penambahan krioprotektan menyebabkan konsentrasi air ekstraseluler lebih tinggi, sehingga air intraseluler dalam spermatozoa tertarik keluar menuju medium. Hal tersebut menyebabkan spermatozoa mengalami dehidrasi selama proses pembekuan.

Berbagai macam bahan ditambahkan ke dalam bahan pengencer untuk meminimalkan kerusakan spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing*, seperti gliserol 5% (Rizal *et al.*, 2003), kuning telur-trehalosa 0,2% (Herdis, 2005), dan β -Karoten (Rizal, 2005). Selain bahan-bahan tersebut, surfaktan

merupakan bahan yang dapat ditambahkan ke dalam bahan pengencer. Salah satu surfaktan yang ditambahkan pada semen hewan adalah *Orvus ES Paste* (OEP). *Sodium lauryl (dodecyl) sulphate* (SDS) merupakan bahan aktif dari Equex STM Paste (Hori *et al.*, 2006; Tsutsui *et al.*, 2011).

Surfaktan digunakan dalam berbagai bahan pengencer untuk berbagai jenis hewan, yaitu anjing (Rota *et al.*, 1997; Somi *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2006), rubah (Xin-Hong *et al.*, 2004), kambing (El kon *et al.*, 2010; Anakul *et al.*, 2011), babi (Fraser *et al.*, 2007; Bolarin *et al.*, 2009; De Mercado *et al.*, 2010; Zahan *et al.*, 2010), kucing (Mizutani *et al.*, 2010; Tsusui *et al.*, 2011), kuda (Jimenez *et al.*, 1987). Penelitian-penelitian tersebut menyatakan bahwa penambahan surfaktan (OEP atau *Equex STM Paste*) mampu mempertahankan integritas membran plasma terutama pada tudung akrosoma serta meningkatkan motilitas dan daya hidup dari *frozen-thawed* spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik *frozen-thawed* spermatozoa domba yang dikriopreservasi dalam pengencer yang ditambah dengan OEP pada berbagai konsentrasi (0-2%).

METODE PENELITIAN

Semen dikoleksi dari domba garut jantan yang sudah mencapai dewasa kelamin (kisaran umur 1-2 tahun). Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi pemeriksaan terhadap volume, tingkat keasaman (pH), konsistensi, warna, dan bau. Evaluasi mikroskopis yang dilakukan adalah motilitas (individu), penghitungan konsentrasi, penghitungan viabilitas, morfologi, dan gerakan massa dari spermatozoa.

Bahan pengencer yang dipakai adalah Niwa-Sasaki *freezing medium* (NSF) (Kikuchi *et al.*, 1999). Niwa-Sasaki *freezing medium*-1 (NSF-1) terdiri dari kuning telur (20%), laktosa (8,8%), ampicillin (20 mg/mL) yang dilarutkan dalam aquades. Niwa-Sasaki *freezing medium* 2 (NSF-2) terdiri dari NSF1 yang ditambah dengan gliserol (6%) dan OEP (Nova Chemical sales, Scituate Inc., MA, USA) (0%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%).

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah karakteristik *post-thawing* spermatozoa

dari setiap kelompok perlakuan yang meliputi persentase motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh (MPU). Pemeriksaan MPU dilakukan dengan metode *hyposmotic swelling (HOS) test*. Semen domba dicampur dengan larutan HOS (1:8), dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama lima menit. Evaluasi dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan spermatozoa yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Semen dibagi ke dalam lima kelompok dan diencerkan dengan NSF-1, kemudian diekuilibrasikan pada suhu 4°C. Setelah ekuilibrasikan, semen ditambahkan NSF-2 dengan konsentrasi OEP yang berbeda (0%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, dan 1%). Perbandingan volume NSF-1 dan NSF-2 yang ditambahkan ke dalam semen adalah 1:1, sehingga konsentrasi akhir gliserol adalah 3%. Penambahan NSF-2 dilakukan secara bertahap. Setengah bagian NSF-2 ditambahkan ke dalam semen dan sisanya ditambahkan lima menit kemudian.

Semen dimasukkan ke dalam *straw* dan diekuilibrasikan pada uap nitrogen cair pada suhu -110°C selama 20 menit, kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair. *Thawing* dilakukan pada air dengan suhu 37°C selama 30 detik. Masing-masing kelompok semen dievaluasi terhadap motilitas, viabilitas, dan MPU.

Setelah dilakukan lima kali pengulangan, data hasil evaluasi semen domba diolah menggunakan program IBM SPSS Statistics 20. Pengujian yang dipakai adalah sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan semen segar domba pada penelitian ini memiliki kualitas yang baik disajikan pada Tabel 1. Roca *et al.*, (2006) menyatakan bahwa semen yang berkualitas memiliki konsentrasi tinggi, persentase motilitas tinggi, dan morfologi normal merupakan pilihan yang tepat untuk diproses menjadi semen beku.

Spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini berasal dari ejakulat sehingga jumlah spermatozoa abnormal sedikit, yaitu sekitar 0,02% (Tabel 1). Axnér *et al.*, (2004) menyatakan morfologi normal spermatozoa tidak berhubungan dengan kerusakan

Tabel 1 Kualitas semen segar domba garut

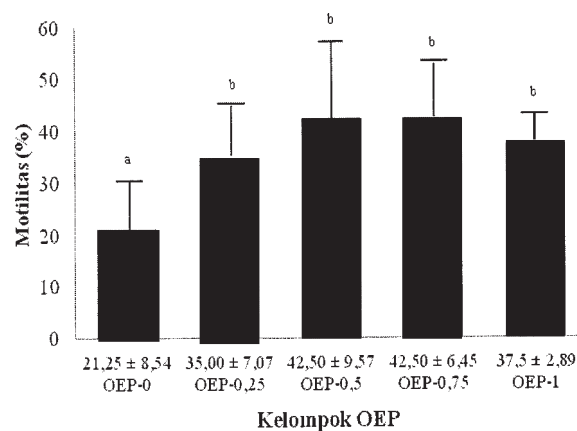
Parameter	Ukuran
Konsentrasi (juta/mL)	2865,33±588
Motilitas (%)	81,25±4,79
Viabilitas (%)	88,58±4,79
MPU (%)	97,18±0,92
Abnormalitas (%)	0,02±0,02

Keterangan: MPU = Membran Plasma Utuh

membran akrosoma maupun membran plasma akibat efek kriopreservasi.

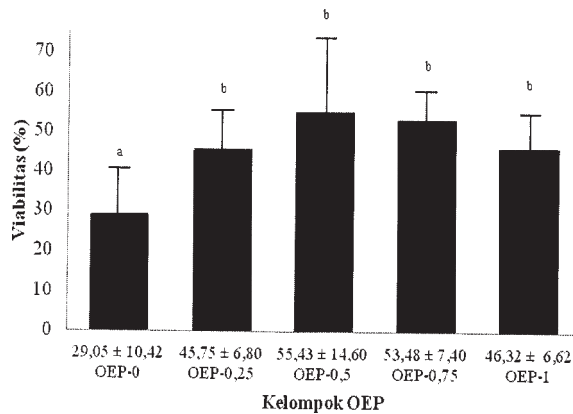
Secara umum, prosedur pembekuan dan *thawing* menurunkan kualitas semen domba secara signifikan, disajikan pada Gambar 1, 2, dan 3. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Holt, (2000); Rizal, (2005); dan Lemma, (2011); proses pembekuan dan *thawing* menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga terjadi penurunan kualitas *post-thawing*.

Motilitas *post-thawing* pada kelompok OEP lebih tinggi daripada kelompok tanpa OEP (P<0,05), walaupun motilitas antar kelompok OEP tidak berbeda nyata (P>0,05). Kelompok OEP-0,5 dan OEP-0,75 memiliki motilitas yang



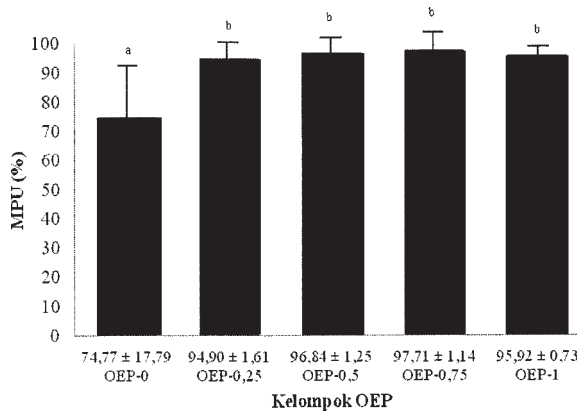
Gambar 1. Motilitas spermatozoa domba garut yang dikriopreservasi dalam pengencer dengan imbuhan *Orvus ES Paste* (OEP) pada konsentrasi yang berbeda

Keterangan: Huruf superscript (^{a,b}) menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) di antara semua kelompok perlakuan. OEP = *Orvus ES Paste* (OEP-0 = konsentrasi OEP 0%; OEP-0,25 = konsentrasi OEP 0,25%; OEP-0,5 = konsentrasi OEP 0,5%; OEP-0,75 = konsentrasi OEP 0,75%; OEP-1 = konsentrasi OEP 1%.)



Gambar 2. Viabilitas spermatozoa domba garut yang dikriopreservasi dalam pengencer dengan imbuhan *Orvus ES Paste* (OEP) pada konsentrasi yang berbeda

Keterangan: Huruf superscript (a,b) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) di antara semua kelompok perlakuan. OEP = *Orvus ES Paste* (OEP-0 = konsentrasi OEP 0%; OEP-0,25 = konsentrasi OEP 0,25%; OEP-0,5 = konsentrasi OEP 0,5%; OEP-0,75 = konsentrasi OEP 0,75%; OEP-1 = konsentrasi OEP 1%.)



Gambar 3. Integritas membran plasma spermatozoa domba garut yang dikriopreservasi dalam pengencer dengan imbuhan *Orvus ES Paste* (OEP) pada konsentrasi yang berbeda

Keterangan: Huruf superscript (a,b) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) diantara semua kelompok perlakuan. OEP = *Orvus ES Paste* (OEP-0 = konsentrasi OEP 0%; OEP-0,25 = konsentrasi OEP 0,25%; OEP-0,5 = konsentrasi OEP 0,5%; OEP-0,75 = konsentrasi OEP 0,75%; OEP-1 = konsentrasi OEP 1%.)

cenderung meningkat, sedangkan motilitas kelompok OEP-1 cenderung lebih rendah. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Tsustui *et al.*, (2000) bahwa konsentrasi akhir 0,5-1,0% dari OEP mampu mempertahankan motilitas spermatozoa anjing *post-thawing*. El-Kon *et al.*, (2010) juga melaporkan bahwa penambahan 0,2% SDS sebagai bahan aktif OEP memberikan pengaruh berupa peningkatan motilitas progresif dari spermatozoa kambing, sedangkan pada kucing, motilitas spermatozoa *frozen-thawed* memiliki nilai yang lebih tinggi pada kelompok yang ditambahkan 0,5% *Equex STM Paste* (surfaktan sejenis OEP) dibandingkan kelompok tanpa penambahan zat tersebut (Zambelli *et al.*, 2010).

Viabilitas *post-thawing* kelompok OEP lebih baik daripada kelompok tanpa OEP ($P < 0,05$), sedangkan motilitas antar kelompok OEP tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Kelompok OEP-0,5 memiliki motilitas yang cenderung meningkat, sedangkan motilitas kelompok OEP-0,75 dan OEP-1 cenderung menurun. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Pena dan Linde-Forsberg, (2000), Somi *et al.*, (2006) serta Ponglowhapan dan Chatdarong, (2008) bahwa penambahan 0,5% *Equex STM Paste* mampu mempertahankan viabilitas *post-thawing* spermatozoa anjing. Hori *et al.*, (2006) juga menyatakan bahwa viabilitas spermatozoa anjing *post-thawing* lebih baik pada kelompok yang diberikan 2 mg/mL SLS.

Kualitas MPU *post-thawing* pada kelompok OEP lebih tinggi daripada kelompok tanpa OEP ($P < 0,05$), walaupun MPU antar kelompok dengan penambahan OEP tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Kelompok OEP-0,5 dan OEP-0,75 memiliki MPU yang cenderung meningkat, sedangkan MPU cenderung menurun pada kelompok OEP-1. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Xin-Hong *et al.*, (2004), Fraser *et al.*, (2007) dan Zambelli *et al.*, (2010) bahwa penambahan 0,5-1,0% OEP maupun *Equex ES Paste* memberikan pengaruh positif terhadap integritas membran plasma bila dibandingkan kelompok tanpa OEP maupun *Equex STM Paste*. Rota *et al.*, (1997) serta Ponglowhapan dan Chatdarong, (2008) juga melaporkan bahwa penambahan 0,5% *Equex STM Paste* pada semen anjing mampu menjaga integritas membran plasma setelah *thawing*.

Surfaktan tidak bekerja langsung pada membran plasma spermatozoa, tetapi surfaktan memodifikasi partikel kuning telur dengan melarutkan komponen lipid kuning telur yang

dapat melindungi membran plasma (Holt, 2000). Tsutsui *et al.*, (2000) juga menyatakan bahwa efek proteksi SDS (komponen utama OEP) sebagai surfaktan adalah untuk melarutkan dan menambah dispersi lipoprotein kuning telur serta memperkuat ikatan antara kuning telur dan membran plasma spermatozoa. Kuning telur yang awalnya tidak larut secara penuh dapat terdispersi secara lebih baik dan mampu melindungi membran plasma spermatozoa. Hal ini sebelumnya dibuktikan oleh Pursel *et al.*, (1978) yang membandingkan kelompok OEP yang ditambahkan dan tanpa kuning telur. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa OEP memberikan pengaruh positif terhadap morfologi tudung akrosoma serta motilitas pada kelompok OEP kuning telur, akan tetapi tidak memberikan pengaruh apapun pada kelompok OEP tanpa kuning telur.

Mekanisme kerja dari surfaktan dalam melindungi tudung akrosoma belum diketahui secara pasti, akan tetapi beberapa penelitian telah membuktikan bahwa penambahan surfaktan ke dalam bahan pengencer mampu melindungi tudung akrosoma spermatozoa *post-thawing*. Menurut Axner *et al.*, (2004), Zambelli *et al.*, (2010), dan Anakkul *et al.*, (2011), integritas tudung akrosoma paling tinggi pada kelompok dengan *Equex STM Paste* dibandingkan kelompok tanpa surfaktan tersebut. Rota *et al.*, (1997) menyatakan bahwa penambahan OEP pada semen anjing terbukti efektif untuk melindungi tudung akrosoma. Hasil penelitian Pursel *et al.*, (1978) menunjukkan bahwa konsentrasi 1,0-1,5% OEP pada semen babi adalah konsentrasi optimal untuk melindungi membran plasma, sedangkan konsentrasi 0,5-1,0% mampu untuk mempertahankan motilitas tertinggi setelah *thawing*. Xin-Hong *et al.*, (2004) menyatakan bahwa konsentrasi optimal OEP untuk kriopreservasi semen rubah adalah 1% guna menjaga tudung akrosoma, motilitas dan integritas membran plasma. Hori *et al.*, (2006) menyatakan bahwa 0,75% OEP maupun 2 mg/mL SLS efektif untuk melindungi tudung akrosoma spermatozoa anjing. Hasil penelitian Mizutani *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa penambahan 1% OEP pada semen kucing mampu memberikan persentase keutuhan tudung akrosoma tertinggi di antara kelompok penambahan OEP (0-4%) setelah *thawing*.

Pada penelitian ini, spermatozoa pada kelompok OEP-1 secara umum memiliki

motilitas, viabilitas, serta MPU yang cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok OEP lainnya. Hasil penelitian Pursel *et al.*, (1987) menunjukkan bahwa penambahan SDS mampu memberikan pengaruh positif terhadap membran plasma, akan tetapi viabilitas spermatozoa mengalami penurunan. Hal ini disebabkan SDS memiliki efek toksik bagi spermatozoa. Axner *et al.*, (2004) juga menyatakan bahwa *Equex STM Paste* memiliki pengaruh negatif pada membran plasma dan viabilitas spermatozoa karena toksisitasnya, akan tetapi setelah semen dideposisikan di dalam uterus, spermatozoa segera meninggalkan bahan pengencer sehingga toksisitas surfaktan tidak memengaruhi proses fertilisasi. Menurut Julian *et al.*, (2006), ketika SDS ditambahkan ke dalam bahan pengencer dalam konsentrasi tinggi dalam larutan, terjadi peningkatan molekul SDS bebas yang akan berikatan langsung dengan membran plasma spermatozoa sehingga terjadi penurunan kualitas *post-thawing*. Konsentrasi dari penambahan suatu surfaktan yang tepat dibutuhkan untuk memperoleh kualitas *frozen-thawed* spermatozoa yang baik.

SIMPULAN

Disimpulkan bahwa penambahan OEP pada pengencer semen domba dapat melindungi kualitas spermatozoa domba setelah dikriopreservasi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh OEP terhadap integritas tudung akrosoma spermatozoa setelah dibekukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Unit Reproduksi dan Rehabilitasi, Bagian Kebidanan dan Reproduksi, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB yang telah memberikan fasilitas selama penelitian ini dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anakkul N, Suwimonteerabutr J, Singlor J, Phutikanit N, Tharasanit T, Techakumphu M. 2011. Effect of Equex STM Paste on the quality and motility characteristics of post thawed cryopreserved goat semen. *Thai J Vet Med* 41(3): 345-351.
- Axnér E, Hermansson, Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM Paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epidymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 84: 179-191.
- Bailey JL, Bilodeau J, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging capacitating phenomenon. *J Androl* 21(1): 1-7.
- Bolarin A, Hernandez M, Vazquez JM, Rodriguez-Martinez E, Martinez EA, Roca J. 2009. Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of artificially inseminated weaned sows in the Mediteranean region. *J Anim Sci* 87: 3967-3975.
- De Mercado E, Rodriguez A, Gomez E, Sanz E. 2010. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci* 118(1): 54-61.
- El-Kon II, Sallam AA, Ashmawy TM, Heleil B. 2010. Effect of sodium dodecyl sulphate (SDS) on the viability and fertility of damascous goat spermatozoa. *Glob Vet* 4(6): 576-581.
- Fraser L, Strzezek R, Strzezek J. 2007. Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions. *Polish J Vet Sci*, 10(3): 131-135.
- Herdis. 2005. Optimasi kualitas semen beku Domba Garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J Indon Trop Anim Agric* 30(4).
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage semen. *J Anim Sci* 62:3-22.
- Hori T, Kaseki H, Fukuhara Y, Oba H, Mizutani T, Kawakami E, Tsutsui T. 2006. Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa. *J Vet Med Sci* 68(10): 1125-1128.
- Jimenez CF. 1987. Effects of Equex STM and equilibration time on pre-freeze dan post-thaw motility of equine epididymial spermatozoa. *Theriogenology* 28: 773-782.
- Julian SM, Adolfo TD, Antonio PP, Jesus D, Amelia GB, Antonio LS. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving spanish ibex (*Copra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 66: 1219-1226.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Nagai T, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. 1999. Reproduction in pigs using frozen-thawed spermatozoa from epididymis stored at 4 °C. *J Reprod Dev* 45: 345-350.
- Lemma A. 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. Di dalam: Manafi M. Editor. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Croatia (R): Intech.
- Martinez HR, Wallgren M. 2011. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet Med Int*, doi: 10.4061/2011/396181.
- Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, Shimizu N, Oba H, Hori T, Tsutsui T. 2010. Usefulness of addition of Orvus ES Paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. *J Vet Med Sci* 72(1): 23-27.
- Pena A, Linde-Forsberg C. 2000. Effects of Equex, one step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859-875.
- Pena AI, Lugalde LL, Barrio M, Herradon PG, Quintela LA. 2003. Effects of Equex from different source on post thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1725-1739.
- Ponglowhapan S, Chatdarong K. 2008. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epidymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 68: 666-672.
- Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. 1978. Effect of Orvus ES Paste on akrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci* 47: 198-202.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Quality of garut ram frozen semen in various glycerol concentrations. *JITV* 7(3): 194-199.

- Rizal M. 2005. Efek berbagai konsentrasi β -karoten terhadap kualitas semen beku domba garut. *Anim Product* 7(1) : 6-13.
- Roca J, Hernandez M, Cavajal G, Vazquez JM, Martinez EA. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84: 2692-2699.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. 1997. Effect of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology* 47: 1093-1101.
- Somi SS, Kluger S, Knapp E, Kein D, Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66: 173-182.
- Tsutsui T, Masayoshi H, Tatsuya H, Tetsuya I, Eiichi K. 2000. Effects of Orvus ES Paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *J Vet Med Sci* 62(5): 533-535.
- Tsutsui T, Mizutani T, Matsubara Y, Toyonaga M, Oba H, Hori T. 2011. Surgical intrauterine insemination with cat semen cryopreserved with Orvus ES Paste or sodium lauryl sulfate. *J Vet Med Sci* 73(2): 259-262
- Xin-Hong L, Xiao-Lian G, Xing-Huai Z, Shu-Wen Z, Xiu-Guo H. 2004. Effect of different concentrations of Orvus ES Paste (OEP) and egg-yolk on quality of frozen-thawed spermatozoa in the blue fox *Alopex lagopus*. *Current Zoology* 50(4) : 583-592.
- Zambelli D, Iacono E, Raccagni R, Merlo B. 2010. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 73: 886-892.
- Zahan M, Miclea V, Ghiuru F, Roman I, Rusu A, Miclea I, Mihailescu M. 2010. The influence of freezing on some rare breeds boar semen cryopreservation. *J Anim Sci Biotechnol* 67 : 1-2.