

Peningkatan Kualitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang yang Dikriopreservasi dengan Beberapa Konsentrasi Sukrosa

(THE QUALITY ENHANCEMENT OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA OF SPOTTED BUFFALO CRYOPRESERVING WITH VARIOUS SUCROSE CONCENTRATIONS)

Muhammad Rizal^{1*}, Herdis², Yulnawati³, Hera Maheshwari⁴

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuh ena, Kampus Poka, Ambon 97233 16680 E-mail: icang65@yahoo.com

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi,

Gedung II BPPT Lt. 16, Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340

³Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI),

Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, 16911

⁴Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor.

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang selama proses pembekuan (kriopreservasi). Bahan pengencer yang digunakan adalah AndroMed[®] sebagai kontrol (AM) serta kombinasi AndroMed[®] dengan 0,2% (S0,2) dan 0,4% sukrosa (S0,4). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing* dalam bahan pengencer AM (41%), nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan dengan S0,2 (46%) dan S0,4 (46%). Demikian pula halnya dengan persentase hidup spermatozoa setelah *thawing* dalam bahan pengencer AM, S0,2, dan S0,4 secara berturut-turut adalah 52,2; 59,8 dan 60,8% ($P < 0,05$). Sementara itu, tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) pada persentase membran plasma utuh (MPU) setelah *thawing* dalam ketiga bahan pengencer. Persentase MPU setelah *thawing* perlakuan AM, S0,2, dan S0,4 adalah masing-masing 68; 68,8 dan 66,8%. Dapat disimpulkan bahwa penambahan sukrosa sebagai krioprotektan eksternal ke dalam bahan pengencer AndroMed[®] dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing*.

Kata Kunci: spermatozoa epididimis, pembekuan, sukrosa, kerbau belang.

ABSTRACT

The objective of this study was to improve the quality of spotted buffalo epididymal spermatozoa during the cryopreservation process. The diluters were Andromed[®] as control (AM) and the combination of AndroMed[®] with 0.2% sucrose (S0.2) and AndroMed[®] with 0.4% sucrose (S0.4). The result showed that the percentage of motility after thawing in AM (41%) was significantly ($P < 0.05$) lower than S0.2 (46%) and S0.4 (46%). The same thing was happened with the percentage of live spermatozoa after thawing. The percentage of live spermatozoa after thawing in AM, S0.2, and S0.4 were 52, 59.8, and 60.8% ($P < 0.05$), respectively. However, there was no significantly difference ($P > 0.05$) in the percentage of membrane integrity between the three extenders. The percentage of membrane integrity after thawing in AM, S0.2, and S0.4 were 68, 68.8, and 66.8%, respectively. In conclusion, the addition of sucrose as external cryoprotectant in to basic extender could increase the quality of spotted buffalo epididymal spermatozoa after thawing.

Key Words: epididymal spermatozoa, cryopreservation, sucrose, spotted buffalo.

PENDAHULUAN

Sebagai bagian dari keanekaragaman hayati asli Indonesia, kerbau belang (*Bubalus bubalis*) merupakan hewan yang sangat penting dalam kehidupan sosial masyarakat Tana Toraja, Sulawesi Selatan. Kerbau belang biasa digunakan oleh masyarakat untuk upacara adat, terutama pada acara pemakaman (*rambu*

solo). Kepercayaan masyarakat setempat menyatakan bahwa makin banyak kerbau belang yang dipotong pada upacara pemakaman sebagai penghormatan terakhir akan makin mudah jalan arwah orang yang dimakamkan tersebut menuju surga. Keadaan tersebut menyebabkan harga seekor kerbau belang jantan yang akan digunakan sebagai persembahan mencapai ratusan juta rupiah,

bergantung pada pola atau tipe belangnya, ukuran/bobot badan serta tipe tanduknya.

Sebagai bentuk kepedulian terhadap kelestarian sumber daya hayati asli Indonesia, upaya penyelamatan kerbau belang dari kepunahan dirasa sangat perlu untuk segera dilakukan. Penurunan populasi kerbau belang setiap tahunnya terjadi akibat tingginya jumlah pematangan untuk upacara adat serta rendahnya angka kelahiran kerbau belang. Hal tersebut terjadi karena pola perkembangbiakan kerbau belang yang terbatas akibat sistem pemeliharaannya yang sangat dilindungi oleh pemiliknya. Seekor kerbau belang jantan sangat dibatasi untuk melakukan aktivitas reproduksi oleh pemiliknya akibat adanya kepercayaan masyarakat setempat bahwa kerbau jantan yang telah melakukan aktivitas reproduksi akan menjadi liar sehingga sulit dikendalikan. Oleh karena itu, para pemilik dan peternak kerbau belang biasanya memelihara ternaknya secara terpisah dalam kandang khusus agar tidak terjadi aktivitas reproduksi.

Perlu dilakukan tindakan nyata untuk mencegah kepunahan kerbau belang. Secara umum, teknologi reproduksi dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan. Salah satunya adalah dengan memanfaatkan epididimis kerbau belang yang sudah dipotong sebagai sumber spermatozoa, sehingga materi genetiknya dapat terselamatkan. Apabila kualitas spermatozoa yang bersumber dari epididimis tersebut baik dan layak, maka selanjutnya dapat diproses menjadi semen beku agar dapat dipergunakan dalam jangka waktu panjang melalui program inseminasi buatan (IB). Pada beberapa spesies lainnya, upaya penyelamatan material genetik dari epididimis ini telah banyak dilakukan dan hasilnya cukup menjanjikan, di antaranya pada monyet (Tollner *et al.*, 1990; Sankai *et al.*, 1994; Feradis *et al.*, 2001), domba (Graham, 1994; Rizal, 2006), sapi (Graham, 1994), kucing (Axner *et al.*, 1998; Tsutsui *et al.*, 2003; Yulnawati dan Setiadi, 2005), (Kikuchi *et al.*, 1998), badak (Lubbe *et al.*, 1999), beruang (Anel *et al.*, 1999), kuda (Squires *et al.*, 2000), llama dan alpaca (Bravo *et al.*, 2000), rusa (Garde *et al.*, 2000; Soler *et al.*, 2003), anjing (Hori *et al.*, 2004), dan kerbau Afrika (Herold *et al.*, 2004; Herold *et al.*, 2006).

Secara fisiologis, spermatozoa yang berasal dari epididimis memang sedikit berbeda dengan spermatozoa yang berasal dari ejakulat. Menurut Hafez dan Hafez (2000), spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis memiliki daya fertilitas hampir sama dengan spermatozoa ejakulat. Oleh karena itu, upaya

pemilihan bahan pengencer sebagai media penyimpanan yang tepat perlu dilakukan agar dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah pencairan kembali (*thawing*).

Salah satu upaya yang mungkin dilakukan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis selama proses kriopreservasi (pembekuan) adalah dengan menambahkan gula (karbohidrat) ke dalam larutan pengencer. Gula berfungsi sebagai substrat bagi sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler, sehingga dapat melindungi dan menunjang kehidupan spermatozoa selama proses pengolahan. Gula telah terbukti mampu memperbaiki kualitas semen beku (spermatozoa ejakulat), seperti sukrosa pada semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997), trehalosa dan EDTA pada semen beku domba Pampinta (Aisen *et al.*, 2000; 2002), serta dextrosa, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa pada semen domba Garut (Rizal *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini dicoba penambahan beberapa konsentrasi sukrosa ke dalam pengencer komersial AndroMed[®] sebagai upaya mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang selama proses kriopreservasi. Perbaikan kualitas spermatozoa setelah *thawing* diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan jika spermatozoa tersebut dimanfaatkan dalam berbagai teknologi reproduksi, seperti IB.

METODE PENELITIAN

Penyiapan Spermatozoa Epididimis

Epididimis beserta testis kerbau belang diperoleh dari hasil pematangan hewan pada saat upacara pemakaman keluarga di Desa Pangli, Kecamatan Rantepao, Kabupaten Tana Toraja, Sulawesi Selatan. Epididimis dipisahkan dari testis dan dibilas dengan larutan NaCl fisiologis (0,9% NaCl). Selanjutnya spermatozoa dari bagian cauda epididimis dikoleksi dengan kombinasi teknik *slicing*, pembilasan, dan penekanan pada setiap jaringan cauda (Rizal, 2006) menggunakan larutan pengencer semen komersial AndroMed[®]. Spermatozoa segar hasil koleksi dievaluasi kualitasnya meliputi persentase motilitas, persentase spermatozoa hidup, konsentrasi, dan persentase membran plasma utuh (MPU).

Kriopreservasi Spermatozoa dengan Berbagai Pengencer

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dengan volume yang sama dan disentrifugasi dengan kece-

patan 3000 rpm selama 20 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sedimen yang mengandung spermatozoa diencerkan kembali dengan berbagai pengencer sesuai perlakuan. Volume pengencer yang digunakan disesuaikan dengan konsentrasi yang telah dihitung sebelumnya. Spermatozoa pada tabung rekasi pertama diencerkan dengan pengencer 80% AndroMed[®] + 20% akuabidestilata (kontrol atau AM). Spermatozoa pada tabung rekasi kedua diencerkan dengan pengencer 80% AndroMed[®] + 20% akuabidestilata + 0,2% sukrosa (S0,2). Spermatozoa pada tabung rekasi ketiga diencerkan dengan pengencer 80% AndroMed[®] + 20% akuabidestilata + 0,4% sukrosa (S0,4).

Spermatozoa epididimis yang telah diencerkan dikemas di dalam *straw* mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 200 juta spermatozoa motil per *straw* dan kemudian diekuilibrasikan di dalam lemari es bersuhu 5°C selama 3 jam. Pembekuan spermatozoa epididimis diawali dengan meletakkan *straw* yang telah diekuilibrasikan 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit di dalam *styrofoam* yang ditutup rapat. Selanjutnya *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu -196°C) dan disimpan di dalam kontainer. Setelah disimpan, masing-masing sampel spermatozoa epididimis beku dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing* dilakukan dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37°C selama 30 detik.

Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas spermatozoa epididimis seperti tingkat motilitas (%), jumlah spermatozoa hidup (%), dan jumlah spermatozoa (%) dengan membran plasma yang utuh (MPU) pada tahapan pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*. Persentase spermatozoa yang motil ditentukan dengan menghitung jumlah persentase spermatozoa yang bergerak secara progresif (bergerak ke depan) pada delapan lapang pandang mikroskop cahaya pembesaran 400x (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup ditentukan dengan menghitung persentase spermatozoa yang hidup setelah pewarnaan dengan 2% eosin (Toelihere, 1981). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Persentase MPU spermatozoa ditentukan dengan menghitung persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) atau *hypoosmotic swelling* (HOS) *test* (Revell dan Mrode, 1994). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan ke dalam 20 µl semen, dicampur hingga homogen kemudian, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek dan dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (*Analysis of Variance* /ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penambahan sukrosa ke dalam pengencer AndroMed[®] memberikan pengaruh yang baik terhadap persentase spermatozoa motil dan hidup spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing* (Tabel 1). Hal tersebut dapat dijadikan sebagai indikator bahwa sukrosa sebagai salah satu jenis gula, efektif dalam melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan, pembekuan, dan *thawing* sehingga dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang.

Keberhasilan kriopreservasi spermatozoa epididimis kerbau telah dilaporkan oleh Herold *et al.* (2004; 2006) menggunakan pengencer komersial Triladyl[™] dan AndroMed[®] pada kerbau Afrika. Akan tetapi, pada penelitian tersebut spermatozoa kerbau terlebih dahulu ditambahkan plasma semen sapi sebelum dikriopreservasi. Menurut Graham (1994) plasma semen memegang peranan penting karena di dalamnya terkandung berbagai macam senyawa yang menunjang kehidupan spermatozoa.

Tabel 1. Rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU spermatozoa epididimis kerbau belang setelah pengenceran, ekuilibrasi dan *thawing*

Peubah	Perlakuan	Tahap pengolahan semen		
		Setelah pengenceran	Setelah ekuilibrasi	Setelah <i>thawing</i>
Spermatozoa motil (%)	AM	65,00 ± 0,00 ^a	50,00 ± 0,00 ^a	41,00 ± 2,00 ^a
	S0,2	65,00 ± 0,00 ^a	53,33 ± 4,71 ^a	46,00 ± 2,00 ^b
	S0,4	65,00 ± 0,00 ^a	55,00 ± 4,08 ^a	46,00 ± 2,00 ^b
Spermatozoa hidup (%)	AM	76,00 ± 2,83 ^a	70,33 ± 0,47 ^a	52,20 ± 2,48 ^a
	S0,2	78,33 ± 0,94 ^a	73,00 ± 1,63 ^{ab}	59,80 ± 1,94 ^b
	S0,4	77,67 ± 1,70 ^a	73,33 ± 1,25 ^b	60,80 ± 2,48 ^b
MPU (%)	AM	78,67 ± 0,47 ^a	72,00 ± 0,82 ^a	68,00 ± 1,10 ^a
	S0,2	80,67 ± 2,05 ^a	73,00 ± 1,63 ^a	68,80 ± 3,12 ^a
	S0,4	78,67 ± 0,47 ^a	72,33 ± 0,94 ^a	66,80 ± 1,94 ^a

Notasi huruf ke arah kolom yang sama hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

Gula sukrosa termasuk ke dalam golongan disakarida yang terdiri atas dua unit monosakarida, yaitu α -glukosa dan fruktosa yang terhubung melalui ikatan glikosida. Sukrosa dalam hal ini berfungsi sebagai substrat sumber energi dan sekaligus sebagai krioprotektan ekstraseluler. Sebagai substrat sumber energi, sukrosa akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa ATP yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam pergerakan (motilitas). Sementara sebagai krioprotektan ekstraseluler, sukrosa akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan secara mekanik yang mungkin terjadi saat proses kriopreservasi semen. Menurut Salamon dan Maxwell (2000) gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (*glass*) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik.

Perbaikan membran plasma sel akan memberikan dampak positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hal ini karena motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa adenosin trifosfat (ATP) hasil metabolisme. Metabolisme dapat berlangsung dengan baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Pada membran plasma sel terdapat banyak makromolekul seperti protein, lipoprotein, glikoprotein, dan lain-lain yang dapat berfungsi sebagai enzim, reseptor, saluran, atau pembawa (*carrier*) (Subowo, 1995). Makromolekul-makromolekul ini yang memfasilitasi lalu lintas masuk dan keluar dari sel seluruh

substrat dan elektrolit tersebut. Substrat dan elektrolit harus difasilitasi karena tidak dapat menembus secara difusi bebas membran plasma sel spermatozoa yang bersifat semi-permeabel.

Gula diketahui dapat menjadikan membran plasma sel lebih stabil selama proses kriopreservasi (Strauses *et al.*, 1986; Anchordoguy *et al.*, 1987; Bakas dan Disalvo, 1991). Gula juga memegang peranan penting dalam menurunkan kandungan garam larutan pengencer, sehingga dapat mengurangi efek solusi (*solution effect*). Ini menyebabkan gula dapat mencegah kerusakan terhadap sel akibat meningkatnya kadar garam selama proses pembekuan (Nicollajsen dan Hvidt, 1994).

Pemanfaatan berbagai jenis gula sebagai salah satu senyawa alternatif dalam upaya memperbaiki kualitas semen beku telah dilaporkan pada beberapa jenis hewan dan ternak. Hasil penelitian yang menggunakan berbagai jenis gula lain pada kualitas spermatozoa berbagai jenis hewan dan ternak menunjukkan hal yang serupa yang diperoleh pada penelitian ini. Penambahan sukrosa ke dalam pengencer nyata meningkatkan motilitas spermatozoa sapi (Woelders *et al.*, 1997); glukosa pada semen beku domba (Molinia *et al.*, 1993) dan semen beku babi (de los Reyes, 2000); rafinosa pada semen beku mencit (Storey *et al.*, 1998) dan semen beku kambing peranakan Etawah (Suwarso, 1999); trehalosa pada semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997), semen beku mencit (Storey *et al.*, 1998), semen beku domba Pampinta (Aisen *et al.*, 2000), dan semen beku anjing (Yildiz *et al.*, 2000). Penambahan gula di dalam pengencer Tris berupa laktosa (Rizal *et al.*, 2003) dan maltosa (Herdis, 2005) nyata

meningkatkan kualitas semen beku domba Garut.

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh bahwa spermatozoa epididimis kerbau belang yang telah dibekukan baik pada perlakuan kontrol maupun dengan penambahan sukrosa memenuhi syarat dimanfaatkan dalam program IB atau produksi embrio *in vitro*, karena memiliki persentase spermatozoa motil setelah *thawing* di atas 40%. Standar Nasional Indonesia (SNI) mensyaratkan bahwa semen yang memenuhi syarat digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa spermatozoa epididimis kerbau belang yang telah dipotong dapat dimanfaatkan dalam program IB dan produksi embrio *in vitro*, baik dalam keadaan segar maupun setelah dibekukan. Penambahan sukrosa dengan konsentrasi 0,2 dan 0,4% sebagai krioprotektan ekstraseluler ke dalam pengencer AndroMed® dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja, Keluarga dr. Yulius dan Bapak Slamet Sumitro yang telah membantu dalam penyediaan peralatan laboratorium serta pengadaan dan pengambilan sampel epididimis kerbau belang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS., Carpenter JF, and Crowe JH. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- Anel L, Martinez F, Alvarez M., Anel E., Boixo JC, Kaabi M, De Paz P, Chamorro C, and Herraes P. 1999. Post-mortem spermatozoa recovery and freezing in a cantabric brown bear (*Ursus arctos*): A preliminary report. *Theriogenology* 51:277. [Abstr].
- Axner E, Sormholst B, Linde-Forsberg C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electro-ejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50:973-979.
- Bakas, LS., and Disalvo EA. 1991. Effects of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28:347-353.
- Bravo PW, Alarcon V, and Bondurant RH. 2000. Epididymal spermatozoa characteristics and its use on artificial insemination of llamas and alpacas. *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstracts Volume 2, p.92.
- de los Reyes M, Saenz L, Lapiere L, Crosby J, Barros C. 2000. *In vitro* evaluation of boar spermatozoa frozen with permeable and non permeable cryoprotectant. *Proceeding of 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Volume 2, p.161.
- Feradis AH, Pawitri D, Suatha IK, Amin MR, Yusuf TL, Sajuthi D, Budiarsa IN, Hayes ES. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 30:100-106.
- Garde J, Anel E, Garcia-Diaz A, Boixo JC, Soler A, De Paz P, Lopez-Saer A, Guerra C, Anel L. 2000. Evaluation of two glycerol concentrations in freezing of electroejaculated and epididymal spermatozoa from iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Volume 2, p.142.
- Graham JK. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during cryopreservation process. *Theriogenology* 46:1151-1162.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Herdis. 2005. *Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laser-punktur pada Domba Garut (Ovis aries)*. 2005. (Disertasi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Herold FC, Aurich JE, Gerber D. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed® and Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61:715-724.
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D.. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology* 66:1123-1130.
- Hori T, Ichikawa M, Kawakami E, Tsutsui T. 2004. Artificial insemination with frozen epididymal sperm beagle dogs. *J Vet Med Sci* 66:37-41.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50:615-623.
- Lubbe K, Smith RL, Bartels P, Godke RA. 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different diluents. *Theriogenology* 51:288. Abstract.
- Molinia FC, Evans G, Quintana-Casares PI, Maxwell WMC. 1993. Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 36:113-122.
- Nicollajsen H, Hvidt A. 1994. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. *Cryobiology* 31:199-205.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22:278-283.
- Revell SG, Mrode RA 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36:77-86.
- Rizal M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal cauda epididimis domba Garut. *J Sain Vet* 24:49-57.
- Rizal M, Herdis, Boediono A., Aku AS, Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 11:123-130.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Kriopreservasi semen domba garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *MKH* 19:79-83.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
- Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, Cho F, Yoshikawa Y. 1994. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 101:273-278.
- Soler AJ, Perez-Gusman MD, Garde JJ. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *J Exp Zoo*. 295A:188-199.
- Squires EL, Gomez-Cuetara C, Graham JK. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstracts Volume 2, p.166.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Storey BT, Noiles EE, Thompson KA. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryo-biology* 37:46-58.
- Strauses G, Schurtenberger P, Huser H. 1986. The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: Stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochem Biophys Acta* 858:169-180.
- Subowo. 1995. *Biologi Sel*. Bandung: Angkasa.
- Suwarso. 1999. Peranan Rafinosa dalam Pengencer Tris-Sitrat-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere MR. 1981. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Tollner TL, van de Voort CA, Overstreet JW, Drobnis EZ. 1990. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 90:347-352.
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci* 65:397-399.
- Woelders H, Matthij A, Engel B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35:93-105.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54:579-585.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *J Med Vet*. 21:100-104.