

Kualitas Sperma Beku Sapi Bali dalam Pengencer Air Kelapa Modifikasi dengan Berbagai Aras Dimethyl Sulfoxide

(FROZEN SPERM QUALITY OF BALI BULLS
IN MODIFIED COCONUT WATER EXTENDER WITH
DIFFERENT DIMETHYL SULFOXIDE CONCENTRATION)

Thomas Mata Hine, Kirenius Uly,
Wilminentje Marlene Nalley, Heri Armadianto

Laboratorium Biologi Reproduksi dan Kesehatan Ternak,
Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana;
Jl. Adisucipto, Penfui Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia (85361)
Email : thomasmatahine@staf.undana.ac.id; hp: 085219296248

ABSTRAK

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) merupakan salah satu jenis krioprotektan yang memiliki berat molekul rendah sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel pada saat kriopreservasi. Penelitian bertujuan untuk mengeksplorasi konsentrasi optimal DMSO dalam pengencer air kelapa modifikasi (AKm) untuk mempertahankan kualitas sperma beku sapi bali. Semen ditampung dari dua ekor sapi bali jantan berumur empat tahun dengan menggunakan vagina buatan. Semen yang berkualitas baik diencerkan dengan pengencer AKm (air kelapa muda + kuning telur 20% + ekstrak daun kelor 7,5%) dan disuplementasi dengan DMSO pada aras 3, 5, atau 7%. Semen diisi ke dalam *ministraw* 0,25 ml, dan diekubirasi di dalam lemari pendingin bersuhu 5°C selama empat jam, dibekukan di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit dan selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Kualitas sperma *post-thawing* diukur 24 jam kemudian dengan menempatkan *straw* semen beku ke dalam air bersuhu 37°C selama 30 detik. Data dianalisis dengan *analysis of variance* dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil pengamatan *post-thawing* menunjukkan bahwa sperma sapi bali yang dikriopreservasi pada DMSO 3% menghasilkan motilitas dan viabilitas (36% dan 44,15%) lebih tinggi ($p < 0,05$) daripada DMSO 5% yaitu 18 dan 23,65%, dan DMSO 7% yaitu 7 dan 12,62%. *Recovery rate* sperma yang dikriopreservasi pada DMSO 3% juga lebih tinggi ($p < 0,05$) dari pada DMSO 5 dan 7%, secara berturut-turut yaitu 45,65; 23,06; dan 8,86%. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa konsentrasi DMSO dalam pengencer AKm yang optimal untuk mempertahankan kualitas sperma beku sapi bali adalah 3%.

Kata kunci: *dimethyl sulfoxide*; air kelapa modifikasi; sperma beku; sapi bali

ABSTRACT

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) is one type of cryoprotectant which has a low molecular weight so that it is easier to enter cells when cryopreservation. The purpose of this study was to explore the optimal concentration of DMSO in modified coconut water (mCW) extender that were able to maintain frozen sperm quality of bali bulls. Semen was collected from two four-year old bali bulls by artificial vagina. Good quality semen diluted with mCW (young coconut water + 20% egg yolk + 7.5 % moringa leaf extract) and supplemented by 3, 5, or 7% DMSO. Semen was filled into 0.25 ml ministraw, and was incubated in a refrigerator at 5°C for four hours, frozen on the surface of liquid nitrogen for 10 minutes and then dipped into liquid nitrogen. The quality of post thawing sperm was measured 24 hours later by placing the ministraw of frozen semen into water at 37°C for 30 seconds. Data were analyzed by analysis of variance and continued with Duncan test. Post-thawing observations showed that bali bulls sperm cryopreserved at 3% DMSO yielded higher motility and viability ($p < 0.05$) i.e. 36 and 44.15%, than DMSO 5% i.e. 18 and 23.65%, and DMSO 7% i.e. 7 and 12.62%. The recovery rate of sperm cryopreserved at 3% DMSO was also higher

($p < 0.05$) than DMSO 5 and 7%, successively 45.65, 23.06, and 8.86%. The results of this study concluded that the optimal concentration of DMSO in mCW diluent to maintain frozen sperm quality of Bali bulls was 3%.

Keywords: dimethyl sulfoxide; modified coconut water; frozen sperm; Bali bulls

PENDAHULUAN

Kriopreservasi merupakan proses pembekuan dan penyimpanan sel pada suhu yang menyebabkan semua proses metabolisme terhenti. Proses kriopreservasi semen melibatkan penggunaan krioprotektan di dalam larutan pengencer untuk melindungi sperma dari kerusakan akibat proses pembekuan dan *thawing*. Konsentrasi dan jenis krioprotektan, serta interaksinya dengan larutan pengencer semen memengaruhi daya hidup sperma *post-thawing*. Pada konsentrasi yang tinggi, krioprotektan bersifat toksik bagi sel sperma, selain itu dapat menyebabkan kondisi larutan ekstraseluler berada dalam keadaan hipertonis. Dalam kondisi yang demikian, air dengan cepat ke luar sel sehingga sel mengkerut. Pengkerutan sel yang berlebihan dapat menyebabkan kematian sel. Di sisi lain, konsentrasi krioprotektan yang terlalu rendah menghasilkan daya krioprotektif terhadap sel yang tidak optimal (Prien dan Iacovides, 2016). Dengan demikian, sangatlah penting untuk mengeksplorasi konsentrasi krioprotektan yang optimal pada setiap jenis pengencer.

Salah satu jenis krioprotektan yang telah umum digunakan dalam preservasi dan kriopreservasi sperma adalah *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Junaedi *et al.* (2016) menambahkan DMSO dalam pengencer ringer laktat-kuning telur untuk membekukan semen ayam kampung. Becerra *et al.* (2017) menggunakan DMSO sebagai suplemen pada pengencer tris untuk preservasi sperma kerbau yang disimpan pada suhu 5°C; sedangkan Sadeghi *et al.* (2013) menggunakan DMSO untuk kriopreservasi sperma ikan beluga. Senyawa DMSO juga digunakan oleh Sikarwar *et al.* (2015) untuk kriopreservasi semen kambing dengan larutan tris-asam sitrat-fruktose sebagai pengencer dasar. Informasi yang diperoleh dari beberapa penelitian tersebut mengungkapkan bahwa pada konsentrasi yang tepat, DMSO memberikan efek yang positif ketika digunakan untuk preservasi semen cair maupun kriopreservasi semen beku.

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan DMSO sebagai krioprotektan

dalam pengencer air kelapa modifikasi (AKm) yang tersusun atas air kelapa muda, kuning telur dan ekstrak daun kelor. Air kelapa muda mengandung karbohidrat (Hine *et al.*, 2014) yang dapat digunakan sebagai energi oleh sperma, sedangkan kuning telur berfungsi sebagai sumber lesitin dan lipoprotein yang berperan dalam melindungi sperma dari efek pendinginan (Rajabi-Toustani *et al.*, 2014). Daun kelor mengandung saponin, fenolik dan flavonoid (Rajanandh *et al.*, 2012), carotenoids, tocopherols (Sánchez-Machado *et al.*, 2006), dan ascorbic acid (Smolin dan Grosvenor, 2007), yang berperan sebagai antioksidan yang dapat menangkal pengaruh negatif dari radikal bebas yang diproduksi selama proses preservasi dan kriopreservasi sperma.

Penggunaan DMSO dalam pengencer AKm belum pernah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi konsentrasi optimal DMSO dalam pengencer AKm untuk mempertahankan kualitas sperma beku sapi Bali.

METODE PENELITIAN

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah semen yang ditampung dari dua ekor sapi Bali jantan berumur empat tahun, milik Yayasan Williams dan Laura, di Kabupaten Kupang, Propinsi Nusa Tenggara Timur.

Pembuatan Pengencer AKm

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat pengencer semen adalah air kelapa, kuning telur dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*). Air kelapa diperoleh dari buah kelapa yang masih muda, yang disedot dengan spuit steril berukuran 10 mL dan dituangkan ke dalam gelas ukur. Kuning telur diambil dari telur ayam ras yang masih baru, yang sebelumnya telah dipisahkan dengan putih telur, menggunakan kertas saring, dan membran vitelinyanya telah dipecahkan dengan menggunakan ujung pinset.

Ekstrak daun kelor dibuat dari tepung daun kelor kering yang dicampur dengan aquabides (1 g tepung daun kelor: 20 mL aquabides). Setelah disaring diperoleh ekstrak daun kelor yang siap untuk digunakan. Pembuatan pengencer AKm yaitu mencampur air kelapa dengan kuning telur dan ekstrak daun kelor dengan perbandingan 72,5:20:7,5 dan selanjutnya ditambahkan penisilin 1000 IU dan streptomisin 1 mg mL⁻¹ pengencer. Setelah tercampur secara merata ditambahkan DMSO dengan konsentrasi 3%, 5%, atau 7%, dan disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 5°C.

Penampungan, Evaluasi dan Pengenceran Semen

Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Semen dievaluasi secara makroskopis terhadap volume, warna, konsistensi, dan pH, sedangkan evaluasi secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, viabilitas, konsentrasi, dan abnormalitas sperma (Komariah *et al.*, 2013). Semen yang layak digunakan untuk penelitian yaitu konsentrasi di atas 500x10⁶ mL⁻¹, motilitas di atas 70% dan abnormalitas sperma di bawah 20% (Hine *et al.*, 2014). Semen dibagi ke dalam tiga tabung sesuai dengan jumlah perlakuan. Semen pada tabung pertama diencerkan dengan pengencer AKm + DMSO 3%, tabung kedua dengan pengencer AKm + DMSO 5%, dan tabung ketiga dengan pengencer AKm + DMSO 7%. Dosis pengenceran adalah 30 x 10⁶ sperma motil per 0,25 mL pengencer.

Pembekuan dan Thawing Semen

Semen diisi ke dalam minitrav 0,25 mL, dan diekuilibrasikan di dalam lemari pendingin bersuhu 5°C selama empat jam, dibekukan pada 4 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit (Mallik *et al.*, 2015) dan selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Kualitas sperma *post-thawing* diukur 24 jam kemudian dengan menempatkan *straw* semen beku ke dalam air bersuhu 37°C selama 30 detik. Variabel yang diukur adalah motilitas progresif sperma, viabilitas sperma, dan *recovery rate*.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Data diekspresikan sebagai rata-rata

± simpangan baku dan dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan Uji Duncan. Analisis menggunakan *software* SPSS 20.0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas, *recovery rate* dan viabilitas sperma sapi bali sebelum dan setelah pembekuan dengan menggunakan berbagai konsentrasi DMSO ditampilkan pada Tabel 1. Tidak terdapat perbedaan motilitas maupun viabilitas sperma ($p>0,05$) antara berbagai konsentrasi DMSO baik setelah pengenceran maupun pascaekuilibrasikan. Hal ini mengindikasikan bahwa DMSO hanya efektif untuk memberikan perlindungan terhadap sperma dalam kondisi beku. Sel sperma yang berada dalam kondisi tidak beku memiliki kandungan air intraseluler yang cukup tinggi, dan dengan demikian DMSO tidak akan bisa masuk dengan leluasa ke dalam sel. Selain itu, fakta ini memberikan gambaran bahwa dalam kondisi sel yang tidak beku DMSO tidak berperan sebagai pelindung.

Kisaran motilitas dan viabilitas sperma pada setiap konsentrasi DMSO pascape-ngenceran dan ekuilibrasikan masih cukup tinggi yaitu di atas 75%. Tingginya motilitas dan viabilitas sperma tersebut memberi indikasi bahwa sperma mampu beradaptasi dengan baik terhadap pengencer AKm. Dibandingkan dengan motilitas dan viabilitas sperma pada semen segar yaitu masing-masing 82,00 dan 88,37% berarti besaran penurunan motilitas pascape-ngenceran dan pascaekuilibrasikan hanya berkisar antara 3,00 hingga 3,67%; sedangkan untuk penurunan viabilitas berkisar antara 5,32 hingga 5,54%. Besaran penurunan motilitas dan viabilitas sperma tersebut tergolong cukup rendah, dan hal ini mengindikasikan bahwa pengencer AKm mampu menyediakan kondisi yang kondusif untuk kelanjutan hidup sperma. Motilitas dan viabilitas sperma pasca *thawing* tertinggi dihasilkan oleh pengencer AKm yang disuplementasi dengan DMSO 3%, berbeda nyata ($p<0,05$) dengan DMSO 5% dan 7% (Tabel 1). Hal ini memberikan gambaran bahwa kadar DMSO dalam pengencer AKm yang optimal untuk kriopreservasi sperma sapi bali adalah 3%. Peningkatan konsentrasi DMSO (5% atau

Tabel 1. Motilitas dan viabilitas sperma sapi bali (%) pada berbagai aras *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO)

Motilitas	DMSO3	DMSO5	DMSO7
Pasca pengenceran	79,00±5,48 ^a	79,00±5,48 ^a	79,00±5,48 ^a
Pasca Equilibrasi	79,00±5,48 ^a	78,00±6,71 ^a	78,00±6,71 ^a
<i>Post-thawing</i>	36,00±4,18 ^a	18,00±5,70 ^b	7,00±2,74 ^c
<i>Recovery Rate</i>	45,65±5,34 ^a	23,06±8,00 ^b	8,86±3,43 ^c
Viabilitas			
Pasca pengenceran	82,83±5,65 ^a	83,20±4,62 ^a	83,12±4,68 ^a
Pasca Equilibrasi	82,82±4,79 ^a	82,83±5,65 ^a	82,83±5,65 ^a
<i>Post-thawing</i>	44,15±6,68 ^a	23,65±5,46 ^b	12,62±3,20 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan. DMS3=DMSO 3%, DMS5=DMSO 5%, DMS7=DMSO 7%

7%) dalam pengencer AKm menyebabkan penurunan motilitas, viabilitas dan *recovery rate*. Kadar DMSO yang terlalu tinggi dapat bersifat toksik bagi sperma, sehingga menyebabkan kematian sperma (Ock dan Rho, 2011; Shuwang dan Woods, 2004; Bersenev, 2014). Mekanisme sitotoksitas DMSO belum diketahui secara pasti. Namun, dalam konsentrasi tinggi, DMSO dapat memodifikasi fluiditas membran sel, menginduksi diferensiasi sel, perubahan mikrotubul, pembentukan kompleks logam, dan penurunan ekspresi mRNA kolagen (Zeng *et al.*, 2010). Han *et al.* (2005) mengemukakan bahwa konsentrasi krioprotektan pada semen beku tidak boleh terlalu tinggi karena dapat menyebabkan cairan sperma dalam sel mengalami dehidrasi berat; sebaliknya, konsentrasi krioprotektan yang terlalu rendah menyebabkan pengeluaran cairan dari dalam sel mengalami keterlambatan sehingga pembekuan semen tidak sempurna.

Secara umum terlihat bahwa motilitas dan viabilitas sperma *pascathawing* mengalami penurunan yang sangat drastis, dengan besaran penurunan motilitas sekitar 61,67% dan viabilitas 61,56%. Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya stres osmotik pada sperma akibat penambahan atau penyingkiran krioprotektan selama pembekuan dan *thawing* (Oldenhof *et al.*, 2013).

Selain itu, selama proses pembekuan terjadi pembentukan es ekstraseluler yang menyebabkan peningkatan konsentrasi solut dalam fraksi air ekstraseluler yang belum membeku, dan dengan demikian

sperma terpapar pada kondisi hipertonis. Hal ini menyebabkan pergerakan air dari dalam sel ke luar sel dalam upaya untuk menjaga keseimbangan konsentrasi solut intraseluler dan ekstraseluler, yang berdampak pada pengerutan sel. Selama *thawing*, proses sebaliknya terjadi, dan sperma terpapar pada kondisi hipotonis (Mazur, 1984). Penggembungan sperma akibat masuknya air ke dalam sel pada kondisi stres hipotonis memiliki daya rusak yang lebih tinggi daripada pengerutan sel akibat stres hipertonis, karena dalam kondisi stres hipotonis terjadi peningkatan jumlah *reactive oxygen species* atau ROS (Ortega *et al.*, 2010; Druart *et al.*, 2009).

Selain itu, proses pembekuan juga dapat menyebabkan kerusakan membran plasma sperma. Selama pembekuan, sel mengalami kekurangan cairan dan terjadi perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler. Hal tersebut dapat menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, selubung lipoprotein pecah dan membran sel mengalami kerusakan. Menurut Gilmore *et al.* (1998), sperma sangat sensitif terhadap perubahan osmolaritas larutan sekelilingnya. Jika osmolaritas larutan tidak toleran, sperma kehilangan motilitasnya.

Pembekuan menyebabkan terbentuknya kristal-kristal es intraseluler. Kristal es tersebut mendesak membran sel ke segala arah, sehingga selaput membrannya pecah dan substansi kimia sel sperma keluar. Rusaknya membran plasma sperma mengakibatkan terganggunya proses fisiologis dan metabolisme sehingga sperma mengalami kematian (Zhu dan Liu 2000). Pembentukan es ekstraseluler menyebabkan peningkatan tekanan osmotik melintasi

membran sel. Ketika kristal es terbentuk, semua zat terlarut dikeluarkan dari kisi es dan terkonsentrasi di media ekstraseluler. Sel dengan membran yang kurang permeabel akan pecah dengan meningkatnya tekanan osmotik terutama pada sel yang tidak dapat mengalami dehidrasi dengan cepat. Proses dehidrasi selama pembekuan seperti pedang bermata dua. Pada kondisi jumlah air intraseluler berkurang akan mengurangi kemungkinan pembentukan es intraseluler. Sebaliknya dehidrasi dan paparan konsentrasi elektrolit yang terlalu tinggi juga menyebabkan kerusakan pada membran sel yang tidak dapat diperbaiki (Mazur *et al.*, 2004). Ketika sel-sel dibekukan sangat lambat, dehidrasi dan penyusutan sel yang berlebihan menyebabkan kematian sel. Dehidrasi yang berlebihan dapat dicegah dengan menggunakan krioprotektan baik krioprotektan ekstraseluler maupun intraseluler. Krioprotektan ekstraseluler tidak dapat melewati membran sel dan karenanya tetap berada di luar sel, sehingga meningkatkan osmolalitas larutan ekstraseluler yang memfasilitasi dehidrasi sel sebelum pembekuan dan mencegah pembentukan es intraseluler.

Prinsip kerja DMSO dalam pembekuan semen yaitu molekul-molekul DMSO yang kecil masuk ke dalam sel sperma untuk mengganti air dalam sel sperma (Notman *et al.*, 2007; Gurtovenko dan Anwar, 2007). Kristal-kristal es yang terbentuk di dalam medium pengencer pada waktu pembekuan dapat dicegah dengan penggunaan konsentrasi DMSO yang tepat (Gerzilov, 2010, Keeley *et al.*, 2012). Hal yang sama juga dikemukakan oleh Valerdi *et al.* (2009), bahwa proses kerja DMSO dalam pengencer semen yaitu menggantikan air di dalam sel sehingga pada saat pembekuan tidak terbentuk kristal es yang berbahaya.

Konsentrasi optimal DMSO sangat bervariasi tergantung pada tipe sel yang dikriopreservasi, jenis pengencer, suhu dan waktu paparan. Konsentrasi DMSO yang optimal untuk preservasi *mesenchymal stem cells* adalah 5% (Ock dan Rho, 2011), pada *HepG2 cells* adalah 20% (Nagahara *et al.*, 2016). Peningkatan konsentrasi DMSO dari 5% ke 30%, lama paparan dari 10 ke 30 menit, dan suhu paparan dari 4°C ke 37°C menyebabkan penurunan viabilitas

sel fibroblas kulit (Wang *et al.*, 2007). Peningkatan konsentrasi DMSO dari 7,5% ke 10% menyebabkan penurunan potensi klonogenik sel-sel darah tepi (Mitrus *et al.*, 2013). Sel fibroblas hamster yang terpapar selama satu jam pada DMSO 10%, pada suhu 37°C menyebabkan undulasi pada membran sel tanpa disertai penggembungan, sedangkan pada konsentrasi 20-30% menyebabkan penggembungan sel dan terjadi disosiasi membran plasma dengan sitoskeleton (de Me´norval *et al.*, 2012). Elmoazzen *et al.* (2007) menunjukkan bahwa sel kondrosit yang dipapar ke DMSO konsentrasi tinggi memiliki viabilitas yang rendah.

Senyawa DMSO dengan konsentrasi dan suhu paparan yang tidak tepat dapat menyebabkan protein *unfolding* (Arakawa *et al.*, 2007) dan peningkatan fluiditas membran sel (Gurtovenko *et al.*, 2007). Konsentrasi DMSO yang tinggi dapat menghancurkan struktur membran *bilayer* (Wang *et al.*, 2007), apoptosis pada sel limfoma (Liu *et al.*, 2001) dan osteoklas (Lemieux *et al.*, 2011); sedangkan pada konsentrasi rendah dapat mencegah apoptosis pada sel hepatosit tikus (Banic *et al.*, 2011). Kadar DMSO yang tidak tepat juga dapat menghambat respirasi mitokondria dan peningkatan kalsium sistolik (Ivanov, 2001). Peningkatan kalsium intraseluler dapat menyebabkan apoptosis (Mattson dan Chan, 2003).

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa dengan menggunakan AKm sebagai pengencer dasar, dibutuhkan suplementasi DMSO berkonsentrasi rendah untuk menghasilkan kualitas sperma beku sapi bali yang tinggi. Konsentrasi DMSO dalam pengencer AKm yang optimal untuk meningkatkan kualitas sperma beku sapi bali adalah 3%.

SIMPULAN

Penambahan DMSO 3% dalam pengencer AKm menghasilkan kualitas sperma beku yang lebih tinggi daripada DMSO 5 atau 7%, namun tidak memenuhi standar untuk inseminasi buatan.

SARAN

Perlu dilakukan studi lanjutan dengan menggunakan aras DMSO yang lebih rendah dalam pengencer AKM, serta keberhasilan kebuntingan pada ternak sapi pascainseminasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan salah satu luaran dari hibah penelitian Strategis Nasional Institusi tahun 2017-2018 yang dibiayai oleh Kementerian Ristekdikti. Penulis menyampaikan terimakasih atas pendanaan pelaksanaan penelitian dimaksud.

DAFTAR PUSTAKA

- Arakawa T, Kita Y, Timasheff SN. 2007. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys Chem* 131: 62-70.
- Banic B, Nipic D, Suput D, Milisav I. 2011. DMSO modulates the pathway of apoptosis triggering. *Cell Mol Biol Lett* 16: 328-341.
- Becerra VAB, Neves BP, Brito MF, Auler PA, de Almeida J, Henry M. 2017. Effect of dimethyl sulfoxide on buffalo sperm motility refrigerated at 5°C. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte* 41(1): 351.
- Bersenev A. 2014. Concentration of DMSO in clinical cryopreserved cell products. *Cell Product, Clinical Lab*.
- de Me' norval MA, Mir LM, Fernandez ML, Reigada R. 2012. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: A comparative study of experiments in silico and with cells. *PLoS One* 7: e41733.
- Druart X, Gatti JL, Huet S, Dacheux JL, Humblot P. 2009. Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction* 137: 205-213.
- Elmoazzen HY, Poovadan A, Law GK, Elliott JA, McGann LE, Jomha NM. 2007. Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage. *Cell Tissue Bank* 8: 125-133.
- Gerzilov V. 2010. Influence of various cryoprotectants on the sperm mobility of Muscovy semen before and after cryopreservation. *Agric Sci Technol* 2: 57-60.
- Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JL. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 58: 28-36.
- Gurtovenko AA, Anwar J. 2007. Modulating the structure and properties of cell membranes: The molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B* 6(111): 10453-10460.
- Han XF, Niu ZY, Liu FZ, Yang CS. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science* 4(4): 197-201.
- Hine TM, Burhanuddin, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *Jurnal Veteriner* 15(2): 263-273.
- Ivanov IT. 2001. Rapid method for comparing the cytotoxicity of organic solvents and their ability to destabilize proteins of the erythrocyte membrane. *Pharmazie* 56: 808-809.
- Junaedi, Arifiantini RI, Sumantri C, Gunawan A. 2016. Penggunaan dimethyl sulfoxide sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam kampung. *J Veteriner* 17(2): 300-308.
- Keeley T, Mcgreevy PD, O'Brien JK. 2012. Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Theriogenology* 78: 315-325.
- Komariah, Arifiantini I, Nugraha FW. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan* 37(3): 143-147.
- Lemieux JM, Wu G, Morgan JA, Kacena MA. 2011. DMSO regulates osteoclast development in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47: 260-267.

- Liu J, Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K. 2001. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. *Int Immunopharmacol* 1: 63-74.
- Malik A, Laily M, Zakir MI. 2015. Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 4(1): 22-25.
- Mattson MP, Chan SL. 2003. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 1041-1043.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: C125-C142.
- Mazur P, Fuller BJ, Lane N, Benson EE. 2004. Principles of cryobiology, Life in the Frozen State. Pp. 2-65. FLCRC Press. Boca Raton.
- Mitrus I, Smagur A, Giebel S, Gliwinska J, Prokop, Glowala-Kosinska M, Chwieduk A, Sadus-Wojciechowska M, Tukiendorf A, Holowiecki J. 2013. A faster reconstitution of hematopoiesis after autologous transplantation of hematopoietic cells cryopreserved in 7.5% dimethyl sulfoxide if compared to 10% dimethyl sulfoxide containing medium. *Cryobiology* 67: 327-331.
- Nagahara Y, Sekine H, Otaki M, Hayashi M², Murase N. 2016. Use of high concentrations of dimethyl sulfoxide for cryopreservation of HepG2 cells adhered to glass and polydimethylsiloxane matrices. *Cryobiology* 72(1): 53-59.
- Notman R, den Otter WK, Noro MG, Briels WJ, Anwar J. 2007. The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics. *Biophys J* 93(6): 2056-2068.
- Ock SA, Rho GJ. 2011. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplant* 20(8): 1231-1239.
- Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, Wolkers WF, Sieme H. 2013. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. *Biol Reprod* 88(3): 68: 1-11
- Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Salazar Sandoval C, Macías Garcya B, Rodríguez Martýnez H, Tapia JA, Pena FJ. 2010. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 74: 458–465.
- Prien S, Iacovides S. 2016. Cryoprotectants & cryopreservation of equine semen: a review of industry cryoprotectants and the effects of cryopreservation on equine semen membranes. *J Dairy Vet Anim Res* 3(1): 1-7.
- Rajabi-Toustani R, Roostaei-Ali Mehr M, Motamedi-Mojdehi R. 2014. Effect of different levels of egg yolk on ram sperm coating and preserving at 5°C. *IJVR* 15(2): 168-171.
- Rajanandh M, Satishkumar M, Elango K, Suresh B. 2012. *Moringa oleifera Lam. A Herbal Medicine for Hyperlipidemia: A pre-clinical Report*. Department of Pharmacology, JSS University. India.
- Sadeghi A, Imanpoor MR, Shalvei F, Nouri HA. 2013. Effect of different concentrations of dmso and dilution rates on viability of beluga (*Huso huso*) post-thawed sperm. *Global Veterinaria* 11(1): 71-75.
- Sánchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Rios Vasquez NJ. 2006. High performance liquid chromatography method to measure a- and g-tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *M. oleifera*. *J Chromatogr A* 1105(1-2): 111-114.
- Shuwang He, Woods C. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryo-preservation: Induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiol* 48: 254-262.
- Sikarwar AKS, Ramachandran N, Ranjan R, Gangwar C, Agrawal JK. 2015. Effect of different levels of glycerol and DMSO on freezability of buck semen. *Livestock Research International* 3(3): 71-73.

- Smolin LA, Grosvenor MB. 2007. *Nutrition Science and Applications*. 4th edition, John Wiley & Sons, Inc., New York. Pp. 123-125.
- Valerdi MR, Eftekhari P, Yazdi, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 26: 347- 354.
- Wang X, Hua TC, Sun DW, Liu B, Yang G, Cao Y. 2007. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology* 55: 60-65.
- Zeng X, Zhao C, Wang H, Li S, Deng Y, Li Z. 2010. Dimethyl sulfoxide decrease type-I and -III collagen synthesis in human hepatic stellate cells and human foreskin fibroblasts. *Advanced Science Letters* 3: 496-499.
- Zhu WJ, Liu XG. 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian J Andrology* 2: 135-138.