

***Fetal Bovine Serum* dalam Pengencer Tris Mempertahankan Kehidupan dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Semen Beku Domba Garut**

(*FETAL BOVINE SERUM IN TRIS EXTENDER MAINTAINING SPERMATOZOA VIABILITY
AND PLASMA MEMBRANE INTEGRITY OF GARUT RAM FROZEN SEMEN*)

Muhammad Rizal^{1*}, Herdis², Insun Sangadji³

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat,
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km 36 Banjarbaru 70714 Kotak Pos 1028 Telp/Fax 0511-4772254.

*Penulis untuk korespondensi, email: icang65@yahoo.com

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung II BPPT Lt. 16, Jl. M.H. Thamrin No. 8,
Jakarta Pusat 10340

³Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena,
Kampus Poka, Ambon 97233

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas *fetal bovine serum* (FBS) terhadap kualitas semen beku domba garut. Semen dikoleksi dari satu ekor domba garut dewasa kelamin dengan vagina buatan. Semen segar dievaluasi dan dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer Tris yang mengandung 20% kuning telur (TKT-20), TKT-20 + 8% FBS (FBS-8), TKT-20 + 10% FBS (FBS-10), dan TKT-20 + 12% FBS (FBS-12). Semen dikemas di dalam *straw* mini (0,25 mL) dengan konsentrasi 100 juta spermatozoa motil. Semen diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama 3 jam, kemudian dibekukan dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair. Kualitas spermatozoa meliputi: persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan membran plasma utuh (MPU) dievaluasi setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*. Rancangan acak lengkap digunakan dalam penelitian ini, dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase spermatozoa motil setelah *thawing* pada kontrol (44%) tidak berbeda nyata dengan FBS-8 (46%), FBS-10 (48%), dan FBS-12 (47%). Persentase spermatozoa hidup dan MPU setelah *thawing* pada FBS-8 (69 dan 58,2%), FBS-10 (72,4 dan 61,2%), dan FBS-12 (72,2 dan 64,4%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (64,8 dan 52,8%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan FBS ke dalam pengencer Tris mampu mempertahankan daya hidup dan keutuhan membran plasma sel spermatozoa semen beku domba garut.

Kata kunci: *fetal bovine serum* (FBS), semen beku, domba garut.

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effectiveness of fetal bovine serum (FBS) against the quality of garut ram frozen semen. Semen was collected from one mature garut ram using artificial vagina. Fresh semen were evaluated then divided into four tubes at equal volume and each tube were diluted with Tris extender containing 20% egg yolk (TEY-20, as control); TEY-20 + 8% FBS (FBS-8); TEY-20 + 10% FBS (FBS-10); and TEY-20 + 12% FBS (FBS-12), respectively. Semen at the concentration of 100×10^6 motile spermatozoa was loaded in 0.25 ml mini straw. Semen was equilibrated at 5°C for three hours, then freeze and stored in liquid nitrogen container. The quality of the spermatozoa including percentages of motile and live spermatozoa, intact plasma membrane (IPM) were evaluated following diluting, equilibrating and thawing process. A Complete Randomized design using four treatments and five replicates were used in the study. The results showed that there was no significant difference ($p < 0.05$) in percentage of motile spermatozoa following thawing between the control (44.0%) and FBS-8 (46.0%), FBS-10 (48.0%), and FBS-12 (47.0%), respectively. The percentage of live spermatozoa and IPM were significantly higher ($p < 0.05$) in the FBS-8 (69.0% and 58.2%); FBS-10 (72.4% and 61.2%); FBS-12 (72.2% and 64.4%) compared to the control (64.8% and 52.8%), respectively. In conclusion, the addition of FBS into Tris extender was able to maintain the viability and integrity of plasma membrane of garut ram frozen semen.

Key words: fetal bovine serum (FBS), frozen semen, garut ram.

PENDAHULUAN

Domba garut merupakan salah satu plasma nutfah hewan ternak yang dimiliki Indonesia dengan beberapa keunggulan dibandingkan dengan jenis domba lokal yang lain. Umumnya domba garut memiliki bobot badan yang lebih berat dibandingkan dengan jenis domba lokal Indonesia yang lain. Bobot badan domba garut betina dewasa rata-ratanya 30–50 kg dan jantan dewasa 60–80 kg, bahkan dapat mencapai lebih dari 100 kg. Induk domba garut juga termasuk jenis domba tropik yang prolif, karena dapat melahirkan 1–5 ekor anak per kelahiran. Di kalangan masyarakat Sunda, domba garut juga memiliki nilai sosial dan budaya tersendiri, yang menyebabkan domba garut jantan bernilai jual tinggi (Rizal dan Herdis, 2008).

Dalam upaya meningkatkan populasi dan perbaikan genetik domba garut, aplikasi teknologi reproduksi merupakan salah satu alternatif. Teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi yang tepat diterapkan untuk maksud tersebut karena sesuai dengan keadaan objektif peternakan rakyat yang umumnya masih dikelola dengan sistem tradisional (Rizal dan Herdis, 2008). Pengolahan semen (terutama pembekuan atau kriopreservasi semen) merupakan suatu teknologi yang terintegrasi dengan teknologi IB.

Keberhasilan program IB bergantung pada berbagai faktor seperti kualitas semen yang digunakan. Umumnya kualitas semen akan mengalami penurunan dalam proses kriopreservasi, karena selama proses tersebut spermatozoa mendapat perlakuan suhu rendah yang sangat ekstrim. Untuk mencegah kerusakan spermatozoa yang berlebihan selama proses kriopreservasi, berbagai upaya dapat dilakukan, misal dengan menambahkan beberapa jenis senyawa ke dalam pengencer semen (Aisen *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000; Viswanath dan Shannon, 2000; Yildiz *et al.*, 2000; Aisen *et al.*, 2002). Salah satu komponen yang dapat dimanfaatkan untuk maksud tersebut adalah *fetal bovine serum* (FBS).

Penambahan FBS ke dalam pengencer semen dengan tujuan untuk mempertahankan kualitas semen dalam proses kriopreservasi dapat dipahami, karena di dalam FBS terkandung berbagai makromolekul penting seperti protein yang berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat perlakuan suhu yang ekstrim selama kriopreservasi dan *thawing* semen beku. Pemanfaatan FBS dalam

proses kriopreservasi semen telah dilaporkan dengan hasil yang baik dalam proses *sexing* dan kriopreservasi semen sapi bali (Susilawati *et al.*, 1999) serta kriopreservasi semen sapi (Reyes-Moreno *et al.*, 2000), semen ikan *Sakhalin taimen* (Kusuda *et al.*, 2005), dan semen belut eropa (Garzon *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini dilakukan penambahan beberapa konsentrasi FBS di dalam pengencer Tris dengan tujuan untuk mempertahankan kualitas semen domba garut selama proses kriopreservasi dan *thawing* semen beku.

METODE PENELITIAN

Penampungan dan Pengolahan Semen

Semen satu ekor domba garut dewasa yang berumur sekitar empat tahun ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu minggu. Penampungan semen dilakukan sebanyak lima kali sebagai jumlah ulangan.

Semen segar domba garut yang telah ditampung segera dievaluasi untuk mengetahui kualitasnya. Semen yang memenuhi syarat kualitas (spermatozoa motil $\geq 70\%$, gerakan massa ++ atau +++, konsentrasi spermatozoa ≥ 2.000 juta/mL, spermatozoa abnormal $< 15\%$), dan persentase membran plasma utuh $\geq 60\%$ (Revell dan Mrode, 1994) dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dengan volume yang sama.

Semen pada masing-masing tabung reaksi diencerkan sesuai dengan perlakuan, yakni: pengencer Tris sebagai kontrol, pengencer Tris + 8% FBS (FBS-8), pengencer Tris + 10% FBS (FBS-10), dan pengencer Tris + 12% FBS (FBS-12), hingga mencapai konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per 0,25 mL. Pengencer dasar Tris terdiri atas: 2,42 g Tris (hidoksimetil) aminometana, 1,28 g asam sitrat, dan 2,16 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata steril hingga mencapai volume 100 mL, kemudian ditambahkan penisilin 1.000 IU/mL dan streptomisin 1.000 $\mu\text{g/mL}$ pengencer (Herdis, 2005). Komposisi pengencer Tris adalah 75% pengencer dasar Tris ditambah 20% kuning telur ayam ras dan 5% gliserol.

Semen yang telah diencerkan dievaluasi kualitasnya, kemudian dikemas dalam *straw* mini (0,25 mL) dengan konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per *straw*. Selanjutnya semen yang telah dikemas tersebut diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu 5°C selama tiga jam. Setelah ekuilibrasikan, setiap sampel semen masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya.

Pembekuan semen dilakukan dengan cara meletakkan *straw* 10 cm di atas permukaan nitrogen cair di dalam *styrofoam* yang ditutup rapat (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit. Selanjutnya *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair. Setelah disimpan selama tujuh hari, setiap sampel *straw* masing-masing perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. Semen beku dicairkan kembali dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

Peubah Kualitas Semen yang Dievaluasi

Peubah kualitas spermatozoa yang diamati adalah: persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (MPU) masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrisasi, dan *thawing*.

Persentase spermatozoa motil: persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup: persentase spermatozoa yang hidup. Sedikitnya 200 spermatozoa dievaluasi dengan pewarnaan 2% eosin menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x (Toelihere, 1981). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna bening, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah.

Persentase MPU: persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh. Dievaluasi dengan metode *hypoosmotic swelling* (HOS) *test* (Jeyendran *et al.*, 1984). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 1,35 g fruktosa + 0,73 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 mL larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 mL semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi dengan bantuan 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.

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan (kontrol, FBS-8, FBS-10, dan FBS-12) dan setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa kuantitas dan kualitas semen segar domba garut memenuhi syarat untuk diolah menjadi semen cair atau semen beku. Rataan persentase spermatozoa motil adalah 75%, konsentrasi spermatozoa 3.652 juta/mL, persentase spermatozoa abnormal 6,2%, dan persentase MPU 87,5% (Tabel 1).

Rataan volume semen yang diperoleh sebanyak 1,1 mL. Hasil yang diperoleh lebih banyak daripada volume semen domba garut yang dilaporkan oleh peneliti lain, yakni rata-rata 0,76 mL (Inounu, 2001) dan 0,82 mL (Herdis *et al.*, 2005). Pada jenis domba yang lain, dilaporkan bahwa volume semen segar adalah 1,05 mL pada domba *suffolk*, 1,09 mL pada domba *dorset horn*, dan 1,14 mL pada domba *texel* (Boland *et al.*, 1985), 0,9–1,2 mL pada domba (Langford *et al.*, 1989), dan sebanyak 1,1 mL pada domba *konya merino* (Kaya *et al.*, 2002).

Derajat keasaman semen yang diperoleh sebesar 7. Rataan derajat keasaman semen domba garut sebesar 7,07 (Rizal *et al.*, 2003) dan 6,89 (Herdis *et al.*, 2005).

Hasil penelitian didapatkan warna, konsistensi, gerakan massa, dan konsentrasi spermatozoa masing-masing adalah krem,

Tabel 1. Karakteristik semen segar domba garut

Peubah	Ukuran
Volume (mL)	1,10 ± 0,38
Warna	Krem
Derajat keasaman (pH)	7,00 ± 0,11
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi spermatozoa (juta/mL)	3.652,0 ± 503,8
Spermatozoa motil (%)	75,00 ± 0,00
Spermatozoa hidup (%)	87,50 ± 3,45
Spermatozoa abnormal (%)	6,20 ± 1,17
Membran plasma utuh (%)	87,83 ± 1,17

kental, +++, dan 3.652 juta/mL. Inounu *et al.*, (2001), Rizal *et al.*, (2003), dan Herdis *et al.*, (2005) melaporkan bahwa warna semen segar domba garut adalah krem, konsistensi kental, gerakan massa +++, dan konsentrasi spermatozoa 950–4.368 juta/mL. Konsentrasi spermatozoa semen domba konya merino adalah 3.800 juta/mL (Kaya *et al.*, 2002).

Rataan persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup yang diperoleh adalah masing-masing 75% dan 87,5%. Persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup semen domba garut rataannya adalah masing-masing 58,08% (10–80%) dan 64,32% (19–95%) (Inounu *et al.*, 2001), 76,67% dan 87,33% (Rizal *et al.*, 2003) serta 74,17% dan 86,6% (Herdis *et al.*, 2005).

Persentase spermatozoa abnormal yang diperoleh adalah 6,2%. Rizal *et al.*, (2003) dan Herdis *et al.* (2005) melaporkan rata-rata persentase spermatozoa abnormal domba garut adalah masing-masing 5,47% dan 2,67%. Rataan persentase spermatozoa abnormal domba konya merino adalah 4,8% (Kaya *et al.*, 2002).

Hasil penelitian didapatkan persentase MPU sebanyak 87,83%. Hal ini menunjukkan bahwa semen segar tersebut memenuhi syarat untuk diolah dan dimanfaatkan dalam program IB, karena menurut Revell dan Mrode (1994) persentase MPU semen segar yang kurang dari 60% dikategorikan sebagai semen yang infertil. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa rata-rata persentase MPU domba garut adalah 87,73% (Rizal *et al.*, 2003) dan 85% (Herdis *et al.*, 2005).

Pengaruh Perlakuan terhadap Kualitas Semen Beku

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan FBS ke dalam pengencer Tris memberikan pengaruh yang baik terhadap kualitas spermatozoa domba garut setelah *thawing* (Tabel 2). Hal ini dapat menjelaskan bahwa FBS mengandung beberapa komponen nutrisi seperti protein (komponen terbanyak), hemoglobin, glukosa, insulin, kortisol, hormon paratiroid, dan prostaglandin E (Garzon *et al.*, 2008). Komponen FBS seperti protein dan glukosa berperan dalam melindungi spermatozoa dari kerusakan yang berlebihan selama proses pendinginan, pembekuan, dan *thawing*. Reyes-Moreno *et al.*, (2000) melaporkan bahwa penambahan *bovine serum albumin* (BSA) dan FBS ke dalam pengencer semen mampu meningkatkan daya hidup spermatozoa sapi setelah *thawing*. Penambahan BSA ke dalam pengencer semen nyata meningkatkan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, akrosom utuh, dan menurunkan persentase spermatozoa abnormal pada semen domba *awassi* setelah preservasi pada suhu 5°C selama 120 jam (Azawi dan Hussein, 2011). Hal berlawanan dilaporkan oleh Ganan *et al.*, (2009) bahwa penambahan FBS ke dalam media F-10 atau *tissue culture medium* 199 (TCM-199) menurunkan motilitas spermatozoa *Iberian lynx* setelah diinkubasi lebih dari tiga jam.

Tabel 2. Rataan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU spermatozoa domba garut setelah pengenceran, ekuilibrasi, dan *thawing*

Peubah	Perlakuan	Tahap pengolahan semen		
		Setelah pengenceran	Setelah ekuilibrasi	Setelah <i>thawing</i>
Spermatozoa motil (%)	Kontrol	70,00 ± 0,00 ^a	66,00 ± 2,24 ^a	44,00 ± 4,18 ^a
	FBS-8	70,00 ± 0,00 ^a	67,00 ± 2,74 ^a	46,00 ± 2,24 ^a
	FBS-10	70,00 ± 0,00 ^a	68,00 ± 2,74 ^a	48,00 ± 2,74 ^a
	FBS-12	70,00 ± 0,00 ^a	69,00 ± 2,24 ^a	47,00 ± 2,74 ^a
Spermatozoa hidup (%)	Kontrol	82,80 ± 2,17 ^a	74,60 ± 2,30 ^a	64,80 ± 2,68 ^a
	FBS-8	83,40 ± 0,89 ^a	78,20 ± 3,42 ^a	69,00 ± 4,00 ^b
	FBS-10	83,40 ± 0,55 ^a	78,20 ± 1,64 ^a	72,40 ± 2,70 ^b
	FBS-12	82,80 ± 2,17 ^a	75,00 ± 1,83 ^a	72,20 ± 1,10 ^b
MPU (%)	Kontrol	74,80 ± 2,77 ^a	68,75 ± 3,30 ^a	52,80 ± 4,21 ^a
	FBS-8	74,80 ± 2,17 ^a	67,80 ± 1,92 ^a	58,20 ± 2,49 ^b
	FBS-10	75,40 ± 2,41 ^a	66,40 ± 3,13 ^a	61,20 ± 1,48 ^{bc}
	FBS-12	74,40 ± 1,82 ^a	66,00 ± 3,87 ^a	64,40 ± 3,29 ^c

^{a,b,c} Superskrip dalam kolom yang sama masing-masing peubah menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) FBS-8 = fetal bovine serum 8%, FBS-10 = fetal bovine serum 10%, FBS-12 = fetal bovine serum 12% MPU = membran plasma utuh.

Fetal bovine serum mengandung beberapa komponen senyawa kimia seperti protein dan glukosa yang berperan penting dalam menunjang kehidupan sel. Protein dan glukosa merupakan makromolekul yang berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan yang berlebihan selama dalam proses pengolahan semen. Dalam proses kriopreservasi semen, protein dan glukosa (selain sebagai substrat sumber energi) berperan sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, yang berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan selama proses pendinginan, pembekuan, dan *thawing* semen. Penambahan glukosa di dalam pengencer Tris dapat meningkatkan kualitas semen beku domba (Molinia *et al.*, 1993) dan semen beku babi (De los Reyes, 2000). Di dalam serum terdapat beberapa unsur nutrisi seperti protein yang diperlukan oleh sel untuk menunjang kehidupannya (Carolan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997). Menurut Penaranda *et al.*, (2009) dan Koh *et al.*, (2010) FBS berperan sebagai senyawa krioprotektan, sehingga mampu melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan yang berlebihan selama proses kriopreservasi semen.

Dalam proses kriopreservasi semen, spermatozoa memperoleh perlakuan yang berat terutama pada tahap pendinginan, pembekuan dan *thawing*, yang sangat rentan menimbulkan kerusakan pada sel spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peranan FBS dalam melindungi spermatozoa selama proses kriopreservasi nyata terlihat pada variabel persentase MPU dan spermatozoa hidup setelah tahap *thawing*. Perbaikan membran plasma sel akan memberikan dampak positif terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa. Hal ini karena daya hidup dan 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 keluar masuk semua substrat dan elektrolit pada sel 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*) (Lehninger, 1995). Makromolekul-makromolekul inilah yang berfungsi memfasilitasi lalu lintas keluar masuk seluruh substrat dan elektrolit pada sel. Substrat dan elektrolit harus difasilitasi karena tidak dapat

menembus secara difusi bebas membran plasma sel spermatozoa yang bersifat semipermeabel.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan FBS ke dalam pengencer Tris mampu mempertahankan daya hidup dan keutuhan membran plasma sel spermatozoa semen beku domba garut.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian disarankan bahwa salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas semen beku domba garut adalah dengan cara menambahkan FBS ke dalam pengencer semen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta serta pimpinan dan seluruh karyawan peternakan domba garut Lesan Putra, PT. Sarbi Moerhani Lestari, Ciomas, Bogor atas bantuan dana, ternak percobaan dan sarana pendukung lainnya sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik dan lancar.

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.
- Azawi OI, Hussein EK. 2011. Study on the effect of adding BSA to semen dilution on the viability of Awassi ram preserved at 5°C. *J Advanced Veterinary Research* 1:115-118.
- Boland MP, Al-Kamali AA, Crosby TF, Haynes NB, Howles CM, Kelleher DL, Gordon I. 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido, and plasma hormone concentrations in ram. *Anim Reprod Sci* 9:241-252.

- 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. In Proceeding 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Volume 2. Hlm 161.
- Carolan C, Lonergan P, Langendonck AV, Mermillond P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43:1115-1128.
- Ganan N, Gonzalez R, Garde JJ, Martinez F, Vargaz A, Gomendio M, Roldan ERS. 2009. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod Fertil Develop* 21:848-859.
- Garzon DL, Penaranda DS, Perez L, Marco-Jimenez F, Espert X, Muller T, Jover M, Asturiano JF. 2008. Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. *Reprod Domest Anim* 43:99-105
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Herdis, Rizal M, Boediono A, Arifiantini RI, Saili T, Aku AS, Yulnawati. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J Pengembangan Peternakan Tropis* 30:229-236.
- Inounu I, Hidajati N, Jarmani SN, Priyanto D, Hastono, Setiadi B, Subandriyo. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba persilangan. Di dalam Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Hlm 64-73.
- Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219-228.
- Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in ram. *Small Rum Res* 44:153-158
- Koh IC, Yokoi K, Tsuji M, Tsuchihachi Y, Ohta H. 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology* 61:263-267.
- Kusuda S, Koide N, Kawamura H, Teranishi T, Nakajima JI, Yamaha E, Arai K, Ohta H. 2005. Cryopreservation diluents for spermatozoa of Sakhalin taimen *Hucho perryi*. *Fisheries Sci* 71:293-298.
- Langford GA, Shrestha JNB, Marcus GJ. 1989. Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. *Anim Reprod Sci* 19:19-27
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62:113-141.
- Lehninger AL. 1994. Dasar-dasar Biokimia Jilid 1. Alih bahasa: Thenawijaya M. Jakarta: Erlangga. Hlm 358-367.
- Molinia FC, Evans G, Guintana-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.
- Penaranda DS, Perez L, Gallego V, Jover M, Asturiano JF. 2009. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology* 59:119-126.
- 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.
- Reyes-Moreno C, Gagnon A, Sullivan R, Sirard MA. 2000. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl* 21:876-886.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36:77-86.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Karakteristik penampilan reproduksi pejantan domba garut. *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 8:134-140.

- Rizal M, Herdis. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Jakarta: Rineka Cipta. Hlm 1-6.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. Hlm 168-174.
- Susilawati T, Sumitro SB, Hardjopranjoto S, Djati MS, Ciptadi G. 1999. Kaji banding antara pengencer Tris dengan TCM-199 dalam upaya pembekuan semen sapi hasil penyaringan sephadex G-200. *Media Veteriner* 6:9-13.
- Toelihere MR. 1981. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Angkasa. Hlm 55-56.
- Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-53.
- Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD. 1997. The effect of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre and post cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M-199 media. *Anim Reprod Sci* 48:37-45.
- 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.