

Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah dalam Modifikasi Pengencer Tris dengan Trehalosa dan Rafinosa

(THE QUALITY OF *ETAWAH* CROSSBREED BUCK LIQUID SEMEN IN MODIFIED TRIS DILUENTS WITH TREHALOSE AND RAFFINOSE)

Oriza Savitri Ariantie^{1*}, Tuty Laswardi Yusuf²,
Dondin Sajuthi³, Raden Iis Arifiantini²

¹Mahasiswa Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana,

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, ³Bagian Penyakit Dalam,
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

*Email : oriza_ariantie@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas suplementasi trehalosa dan rafinosa dalam pengencer Tris kuning telur dan Tris soya dalam mengoptimalkan kualitas semen cair kambing Peranakan Etawah (PE). Semen dikoleksi dari tiga ekor kambing PE jantan dewasa menggunakan vagina buatan. Semen dievaluasi dan dibagi dalam enam bagian. Kemudian diencerkan dengan menggunakan pengencer Tris kuning telur (TKT) dan Tris soya (TS) dengan suplementasi 50 mM trehalosa dan rafinosa. Semen cair disimpan dalam lemari es (5°C). Evaluasi motilitas spermatozoa, spermatozoa hidup dan membran plasma utuh (MPU) dilakukan setiap 12 jam hingga motilitas mencapai 50%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas progresif spermatozoa dalam pengencer TKT dengan suplementasi trehalosa dan rafinosa dapat bertahan sampai 50% selama 72-84 jam, lebih baik dibandingkan dengan pengencer TS yang bertahan selama 48-60 jam ($P < 0,05$). Pengencer terbaik ditunjukkan oleh TKT dengan suplementasi trehalosa (52,82±3,21%) bertahan sampai 84 jam dibandingkan dengan suplementasi rafinosa (52,78±4,41%) dan kontrol (51,78±4,86%) sampai 72 jam. Sementara itu dalam pengencer TS yang disuplementasi dengan rafinosa (52,78±4,41%) bertahan sampai 60 jam dibandingkan dengan trehalosa (53,33±3,54%) dan kontrol (51,11±4,86%) sampai 48 jam. Pada semua pengencer spermatozoa hidup lebih tinggi 6-9% daripada persentase motilitas spermatozoa, sedangkan persentase MPU nilainya hampir sama dengan persentase motilitas spermatozoa. Dapat disimpulkan bahwa untuk preservasi semen cair kambing PE pengencer terbaik adalah TKT dengan suplementasi trehalosa, dan dalam pengencer TS lebih baik disuplementasi dengan rafinosa.

Kata-kata kunci : kambing peranakan etawah, semen cair, Tris kuning telur, Tris soya, trehalosa, rafinosa.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the efficacy of trehalose and raffinose supplementation in Tris egg yolk (TEY) and Tris soya (TS) diluents in optimizing the quality of Etawah Crossbreed liquid semen. Semen were collected from three sexually mature bucks using artificial vagina. Semen were then evaluated and divided into six aliquot tubes. Each of them was diluted in TEY and TS supplemented with 50 mM trehalose or raffinose, respectively. The liquid semen were then stored in refrigerator (5°C). The motility, viability and plasma membrane integrity (PMI) of the spermatozoa were evaluated every 12 hours until sperm motility remained up to 50%. The results showed that sperm motility in TEY supplemented with trehalose or raffinose remained up to 50% for 72-84 hours, compared to in TS which was for 48-60 hours ($P < 0,05$). The best diluent was demonstrated by TEY supplemented with trehalose where the sperm motility was 52,82±3,21% up to 84 h compared to raffinose supplementation (52,78±4,41%) and control (51,78±4,86%) which was up to 72 hours, respectively. Meanwhile, the spermatozoa motility in TS diluent supplemented with raffinose was 52,78±4,41% for up to 60 hours compared to supplemented with trehalose (53,33±3,54%) and control (51,11±4,86%) which was up to 48 hours. In all diluents, the viability of spermatozoa was 6-9% higher than the percentage of sperm motility, whilst the percentage of PMI was similar to the percentage of sperm motility. In conclusion, TEY supplemented with trehalose was the best diluents for preservation of Etawah Crossbreed buck liquid semen, and when using TS diluent it is recommended to add raffinose rather than trehalose.

Key words : etawah crossbreed, liquid semen, tris egg yolk, tris soya, trehalose, raffinose

PENDAHULUAN

Salah satu upaya perbaikan mutu genetik ternak kambing di Indonesia dapat dilakukan melalui pemanfaatan teknologi inseminasi buatan (IB). Namun, teknologi IB pada ternak kambing masih kurang diaplikasikan secara luas. Hal ini terkait berbagai kendala, di antaranya ketepatan waktu dan teknik inseminasi, serta kualitas semen yang dihasilkan. Kualitas semen ditentukan oleh berbagai faktor antara lain teknik preservasi, komposisi pengencer, serta jenis dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan. Saat ini semen kambing telah diproduksi oleh beberapa balai inseminasi buatan dengan menggunakan pengencer Tris kuning telur (TKT).

Rendahnya kualitas semen kambing diduga akibat keberadaan enzim *phospholipase A* yang disebut juga *egg yolk coagulating enzyme* yang ada di dalam *bulbourethral gland secretion* (BUS) yang terkandung dalam plasma semen kambing (Paulenz *et al.*, 2005). Enzim ini dapat menghidrolisis fosfolipid kuning telur menjadi *lysophospholipid* seperti *lysolecithin* yang toksik sifatnya pada spermatozoa dan dapat menyebabkan reaksi akrosom dini sehingga spermatozoa lebih cepat rusak. Sementara itu kuning telur dan susu mengandung fosfolipid dan lesitin dalam pengencer yang sangat dibutuhkan karena melindungi spermatozoa dari *cold shock* pada saat pendinginan ataupun pembekuan (Amirat *et al.*, 2004). Untuk itu kuning telur lazim ditambahkan ke dalam pengencer, dan kuning telur kerap dibandingkan dengan *soya* yang diperkirakan dapat menyamai fungsi kuning telur.

Kuning telur merupakan produk unggas yang jika tercampur agen penyakit dapat menularkan bibit penyakit sehingga memengaruhi kualitas spermatozoa. Oleh karena itu dicari alternatif pengganti kuning telur, yakni lesitin yang berasal dari tumbuhan antara lain berupa *soya* lesitin. Upaya penggunaan fosfolipid dari bahan tanaman telah dilakukan, dan tahun 2000an oleh perusahaan komersial yang bergerak dibidang IB memperkenalkan penggunaan lesitin yang berasal dari kedelai sebagai pengencer (Aires *et al.*, 2003). Produk tersebut telah dijual di pasaran dengan beberapa merek seperti Biociphos (IMV, L'Aigle, France) dan Andromed (Minitub, Germany). Kedua produk ini mengandung ekstrak kacang kedelai sebagai pengganti kuning telur pada saat preservasi.

Pengencer semen yang tidak mengandung kuning telur dan susu, membuat pengencer tersebut terhindar dari isu adanya bahaya biologis dan bakteri yang dapat memengaruhi kualitas semen. Pengencer tersebut meskipun diperuntukkan bagi ternak sapi, namun tidak menutup kemungkinan untuk diaplikasikan dalam preservasi semen kambing. Informasi mengenai pengencer yang mengandung ekstrak kacang kedelai untuk preservasi semen kambing belum banyak dilaporkan.

Fruktosa dan glukosa merupakan karbohidrat monosakarida yang umum ditambahkan pada pengencer semen berbagai ternak. Karbohidrat dapat berfungsi sebagai sumber energi seperti glukosa dan fruktosa, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Souhoka *et al.*, 2009). Trehalosa (disakarida) terdiri dari dua molekul glukosa, sedangkan rafinosa (trisakarida) terdiri dari masing-masing satu molekul glukosa, fruktosa, dan galaktosa. Trehalosa dan rafinosa dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama.

Pada penelitian ini dicoba suplementasi trehalosa dan rafinosa pada pengencer Tris kuning telur dan Tris *soya* sebagai upaya mengoptimalkan kualitas semen cair kambing peranakan etawah (PE), sehingga diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan jika semen cair tersebut diinseminasikan pada kambing betina. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas pengencer Tris kuning telur dan Tris *soya* dengan suplementasi trehalosa dan rafinosa untuk mengoptimalkan kualitas semen cair kambing PE. Hasil penelitian ini diharapkan menghasilkan pengencer nabati (*soya*) dengan suplementasi trehalosa maupun rafinosa dalam mempertahankan kualitas semen cair kambing PE.

METODE PENELITIAN

Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan untuk penelitian ini diperlakukan sesuai dengan etika penelitian. Hewan yang dipergunakan sebagai sumber semen adalah tiga ekor kambing PE jantan dewasa berumur 2,0-3,5 tahun dengan bobot badan 40-50 kg. Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang individu yang

dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput gajah segar sebanyak 20% per kg bobot badan dan konsentrat 2% per kg bobot badan. Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari, serta air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Pejantan kambing yang digunakan adalah memiliki kualitas semen yang baik, dengan kriteria: motilitas lebih dari 70%, konsentrasi spermatozoa lebih dari $2,5 \cdot 10^9$ dan abnormalitas tidak lebih dari 10%.

Persiapan Media Pengencer

Pengencer Tris kuning telur dan Tris *soya* menggunakan pengencer dasar tris buffer. Buffer tris terdiri atas 2,98 g Tris (*hydroxymethyl*)-*aminomethane*, 1,65 g asam sitrat monohidrat dan 2 g D-fruktosa dilarutkan dalam 100 mL *milli-Q water*. Pengencer Tris *soya* (TS) mengandung 2,5% sari kedelai (*Melilea*), sedangkan pengencer Tris kuning telur (TKT) mengandung 20% kuning telur. Kedua pengencer tersebut disentrifugasi, supernatannya diambil dan digunakan sebagai pengencer. Pengencer TKT dan TS masing-masing dibagi tiga, TKT dan TS (kontrol) serta dua lainnya masing-masing disuplementasi dengan 50 mM trehalosa atau rafinosa (Tabel 1).

Koleksi dan Evaluasi Semen

Semen dikoleksi dari tiga ekor kambing Peranakan Etawah (PE) jantan dewasa menggunakan vagina buatan, satu minggu sekali masing-masing terdiri dari dua ejakulat. Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis mencakup volume, warna, konsistensi, dan derajat keasamaan (pH). Volume semen diukur dengan menggunakan pipet ukur, pH semen diukur menggunakan indikator pH, konsistensi semen dibedakan antara kental dan sedang, dan warna dibedakan menjadi krem dan putih susu. Evaluasi secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, konsentrasi, spermatozoa hidup, membran plasma utuh (MPU) dan morfologi spermatozoa. Gerakan massa spermatozoa dibedakan berdasarkan kecepatan berpindahnya gerakan massa spermatozoa dengan klasifikasi sangat baik (+++) dan baik (++) . Persentase motilitas spermatozoa adalah persentase gerakan progresif individu dengan kriteria sangat baik ($\geq 90\%$), baik (70-85%) dan sedang (<60-70%). Persentase motilitas spermatozoa dievaluasi dengan menambahkan NaCl fisiologi dan dinilai berdasarkan estimasi dari lima lapang pandang. Konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa per mL dihitung dengan menggunakan kamar hitung

Tabel 1. Komposisi bahan pengencer semen cair kambing Peranakan Etawah (PE)

Komposisi	Pengencer Tris kuning telur			Pengencer Tris <i>soya</i>		
	Kontrol	Trehalosa	Rafinosa	Kontrol	Trehalosa	Rafinosa
Tris buffer (mL)	8	8	8			
Kuning telur (mL)	2	2	2			
Sari kedelai (<i>soya</i>) (g)				0,25	0,25	0,25
Trehalosa (g)		0,17			0,17	
Rafinosa (g)			0,29			0,29
Total (g/mL)				10	10	10
Total (mL/mL)	10	10	10			
Antibiotik						
Penisilin (IU/mL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Streptomisin (mg/mL)	1	1	1	1	1	1
Osmolaritas (mOsm/kg)	273	302	309	307	345	349
pH	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40

neubauer, hasilnya dikalikan 10^6 jumlah dari lima kamar hitung. Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan menggunakan zat warna eosin nigrosin. Spermatozoa yang hidup berwarna transparan dan yang mati berwarna merah pada bagian kepala. Persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dievaluasi dengan *hyposmotic swelling test* (HOS-test). Membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar dan membran yang tidak utuh ditandai dengan ekor yang lurus dan persentase abnormalitas spermatozoa dievaluasi dengan pewarnaan *carbol-fuchsin*. Penilaian dilakukan terhadap abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Persentase spermatozoa hidup, membran plasma utuh (MPU) dan abnormalitas spermatozoa dihitung minimal 200 sel berdasarkan perhitungan 10 lapang pandang (Arifiantini *et al.*, 2005).

Preservasi Semen Cair

Syarat kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsistensi kental, berwarna krem, motilitas spermatozoa lebih dari 70%, konsentrasi spermatozoa lebih dari $2,5 \cdot 10^9$ dan abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 10%. Semen segar dari ejakulat 1 dan 2 digabung menjadi satu dan dibagi menjadi enam bagian dan diencerkan masing-masing dengan pengencer yang berbeda (Tabel 1). Semen yang telah diencerkan dikemas dalam tabung dan disimpan dalam lemari es (5°C). Kualitas semen yang diuji adalah motilitas, persentase hidup dan membran plasma utuh dari spermatozoa, setiap 12 jam sampai motilitas spermatozoa 50%. Volume pengencer dihitung dengan dosis IB, dosis IB yang digunakan sesuai dengan dosis IB pada kambing yaitu $50 \cdot 10^6$ spermatozoa per 0,2 mL. Cara menentukan jumlah pengencer dilakukan dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Jumlah pengencer (mL)} = \frac{V \times M \times K}{50 \times 10^6} \times 0,2$$

Dalam hal ini : V = volume semen; M = motilitas spermatozoa; dan K = konsentrasi spermatozoa.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial. Setiap perlakuan terdiri dari tiga ulangan.

Faktor pertama adalah jenis pengencer, yakni: Tris kuning telur, Tris kuning telur trehalosa, Tris kuning telur rafinosa, Tris *soya*, Tris *soya* trehalosa dan Tris *soya* rafinosa. Faktor kedua adalah waktu pengamatan, yakni: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 dan 84 jam. Data penelitian dianalisis menggunakan sidik ragam/*analysis of variance* (Anova), jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1995). Data diolah menggunakan program SPSS versi 15.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Semen segar dari ketiga kambing PE jantan yang digunakan dalam penelitian mempunyai kualitas baik, secara makroskopis semen berwarna krem dengan konsistensi kental. Kekentalan dan warna menginterpretasikan bahwa konsentrasi spermatozoa tinggi. Hasil tersebut didapatkan dari pemeriksaan mikroskopis bahwa konsentrasi spermatozoa adalah $3,53 \pm 774,07 \times 10^9$ spermatozoa/mL. Hasil tersebut cenderung sama dibandingkan dengan laporan Dorado *et al.*, (2009) sebesar $3,69 \pm 80 \times 10^9$ spermatozoa/mL dan lebih tinggi dibandingkan dengan laporan Bezerra *et al.*, (2011) yakni $2,40 \pm 200 \times 10^9$ spermatozoa/mL.

Demikian pula hasil pemeriksaan yang didapatkan dari motilitas spermatozoa yaitu $77,78 \pm 2,64\%$, persentase spermatozoa hidup $85,37 \pm 4,63\%$ dan persentase membran plasma utuh $78,43 \pm 3,88\%$ (Tabel 2). Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa yang didapat lebih rendah dibandingkan dengan laporan Dorado *et al.*, (2010) yakni $94,06 \pm 0,71\%$. Meskipun demikian hasil tersebut masih memenuhi syarat untuk pengolahan semen selanjutnya. Dinyatakan oleh Ax *et al.*, (2000) bahwa persentase progresif motilitas spermatozoa normal agar dapat diolah lebih lanjut berkisar antara 70-90%. Hasil pemeriksaan spermatozoa hidup yang diidentifikasi dengan warna transparan pada bagian kepala spermatozoa didapatkan $85,37 \pm 4,63\%$, hasil tersebut relatif sama dengan laporan Tambing *et al.*, (2001) yakni $82,54\%$. Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dari pada spermatozoa motil karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semuanya motil progresif (Kostaman dan Utama, 2006).

Tabel 2. Rataan nilai karakteristik semen segar kambing peranakan etawah (PE)

	Karakteristik semen	Rataan
Makroskopis	Volume (mL)	1,14±0,14
	Warna	Krem
	pH	6,73±0,23
	Konsistensi	Kental
Mikroskopis	Gerakan massa	+++
	Gerakan individu	
	Motilitas (%)	77,78±2,64
	Skor individu	4,78±0,44
	Spermatozoa hidup (%)	85,37±4,63
	Konsentrasi spermatozoa (10 ⁹ /mL)	3,53±774,07
	Abnormalitas spermatozoa (%)	6,40±2,36
	Membran plasma utuh (%)	78,43±3,88

Keterangan : +++ (baik) = terlihat gelombang cepat dan banyak.

Kualitas spermatozoa juga dapat diukur dengan mengetahui keutuhan membran plasma. Hasil pemeriksaan membran plasma utuh (MPU) yang didapatkan 78,43±3,88%, hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan laporan Tambing *et al.* (2003) yaitu 82,40±5,08%. Secara fisiologi terdapat hubungan antara membran plasma utuh dengan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Apabila terjadi kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan hilangnya enzim-enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sehingga tidak dihasilkan energi sehingga motilitas menjadi rendah, serta daya hidup juga rendah (Rizal *et al.*, 2003). Beberapa hal yang dapat memengaruhi perbedaan kualitas spermatozoa secara keseluruhan antara lain faktor individu, pakan, lingkungan, teknik dan frekuensi koleksi semen, serta kondisi media pengencer di antaranya pH dan tekanan osmotik.

Ditinjau dari morfologi, abnormalitas spermatozoa hasil penelitian yang didapat adalah 6,40±2,36%, abnormalitas yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan laporan Dorado *et al.*, (2010) yaitu 13,30±1,05%. Ax *et al.*, (2000) melaporkan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 10%. Pengukuran abnormalitas spermatozoa penting dilakukan sebab abnormalitas yang tinggi dapat mengganggu fertilitas jantan secara umum, hal tersebut diungkapkan oleh Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa dapat memengaruhi fertilitas jika jumlahnya melebihi 20% dari total spermatozoa.

Abnormalitas yang didapat adalah abnormalitas primer dengan rata-rata 0,94±0,47%

dan abnormalitas sekunder 5,46±2,05%. Beberapa abnormalitas primer yang terlihat pada penelitian adalah *double head*, *detached head*, *abaxial*, *microcephalus*, *macrocephalus*, *narrow* dan *pear shaped*. Abnormalitas sekunder yang terlihat adalah *teratoid forms*, *bowed midpiece*, *coiled principal piece*, *proximal droplet*, *bent principal piece*, *pseudodroplet* dan *distal droplet*.

Abnormalitas primer merupakan ketidaknormalan morfologi spermatozoa yang terjadi ketika spermatozoa masih di dalam tubuli seminiferi (spermatogenesis). Kelompok abnormalitas ini lebih berbahaya karena sebagian bersifat genetik sebagai contoh *knobbed acrosome defect* yang dapat menurunkan fertilitas sehingga memengaruhi keberhasilan inseminasi buatan. Semen dengan persentase abnormalitas cukup tinggi cenderung memiliki fertilitas yang rendah karena berkaitan dengan kemampuan mengawali fertilisasi. Abnormalitas sekunder merupakan morfologi spermatozoa tidak normal yang terjadi selama spermatozoa melewati saluran reproduksi.

Kualitas Semen Cair

Secara umum motilitas spermatozoa lebih lama bertahan dalam pengencer Tris kuning telur dibandingkan dengan Tris soya. Spermatozoa dapat bertahan sampai 50% selama 72-84 jam dalam pengencer Tris kuning telur, sedangkan pengencer Tris soya hanya bertahan selama 48-60 jam baik dengan suplementasi rafinosa maupun trehalosa ($P < 0,05$). Hal ini karena pada suhu rendah (5°C) spermatozoa mengalami kerusakan akibat

terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), dan lesitin pada Tris kuning telur lebih mampu menjaga spermatozoa akibat *cold shock* daripada lesitin yang terkandung di dalam ekstrak kacang kedelai. Kandungan *low density lipoprotein* (LDL) komposisinya 79% lipid dan 21% protein. Komponen lipid utama berupa kolestrol (Botham dan Mayes, 2009) yang ada di dalam Tris kuning telur, serta struktur lipoprotein pada Tris kuning telur mirip dengan struktur membran plasma sehingga LDL yang ada didalam Tris kuning telur dapat melindungi membran sel spermatozoa. Hal tersebut membuat Tris kuning telur lebih mampu menjaga stabilitas membran plasma dibandingkan dengan Tris *soya* dengan komposisi utamanya yang berupa protein, sehingga kerusakan spermatozoa dapat diminimalisasi dengan baik. Meskipun demikian, hal ini membuktikan bahwa pengencer Tris *soya* memberikan harapan untuk dapat digunakan sebagai pengencer berbasis lesitin nabati untuk semen cair kambing.

Suplementasi trehalosa dapat memperbaiki daya tahan spermatozoa dalam pengencer Tris kuning telur ($52,82 \pm 3,21\%$) sampai 84 jam dibandingkan dengan rafinosa dengan persentase yang hampir sama ($52,78 \pm 4,41\%$) bertahan sampai 72 jam. Sebaliknya pada pengencer Tris *soya*, suplementasi rafinosa memperpanjang daya tahan spermatozoa, yaitu $52,78 \pm 4,41\%$ sampai 60 jam lebih lama dibandingkan dengan trehalosa ($53,33 \pm 3,54\%$) sampai 48 jam (Tabel 3). Hal ini karena dengan ditamhkannya trehalosa ke dalam Tris kuning telur menjadikan kombinasi perlakuan tersebut lebih optimal dalam mempertahankan stabilitas membran plasma sel. Trehalosa adalah

salah satu sakarida yang memiliki struktur yang paling stabil dan berperan dalam menstabilkan membran sel (Higashiyama, 2002) sehingga bersama-sama Tris kuning telur menunjukkan kemampuan yang optimal dalam melindungi sel. Dijelaskan lebih lanjut bahwa trehalosa merupakan gula nonpereduksi dan berfungsi sebagai antioksidan sehingga Tris kuning telur yang disuplementasikan dengan trehalosa tidak mudah teroksidasi dan membran sel spermatozoa tidak mudah rusak. Trehalosa adalah gula yang tidak toksik dan bersifat krioprotektan dengan cara menggantikan atau berasosiasi dengan *bound water*, dan trehalosa dapat melindungi membran sel dengan cara mengikat air ke protein dan ke ujung polar dari fosfolipid pada membran sel lebih kuat dibandingkan dengan *bound water* tanpa tambahan trehalosa (*bound water* saja) (Best, 2011).

Menurut Viswanath dan Shannon (2000) krioprotektan golongan karbohidrat memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat senyawa karbohidrat tersebut membantu meningkatkan stabilitas membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas. Aisen *et al.*, (2000) menyatakan golongan karbohidrat disakarida berperan menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel yang langsung berhubungan dengan pengencer. Selanjutnya dinyatakan pula bahwa disakarida dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama proses penyimpanan, dan menurunkan interaksi van der Waals di antara rantai karbon.

Tabel 3. Pengaruh pengencer Tris kuning telur dan Tris soya dengan suplementasi trehalosa dan rafinosa terhadap persentase motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup dan persentase membran plasma utuh (MPU)

Perlakuan	Lama penyimpanan (jam)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	
Tris kuning telur	Kontrol	76,67±2,50 ^{aM}	72,22±2,64 ^{aN}	70,00±2,50 ^{aP}	65,56±3,00 ^{aP}	61,67±3,54 ^{aQ}	57,78±3,63 ^{aR}	51,11±4,86 ^{aS}	47,54±4,11 ^{aS}
	Trehalosa	77,22±2,64 ^{aM}	75,56±3,00 ^{aMN}	73,33±2,50 ^{aN}	68,89±3,33 ^{aP}	66,11±2,20 ^{aP}	62,22±2,64 ^{aQ}	57,78±3,63 ^{aR}	52,82±3,21 ^{aS}
	Rafinosa	77,22±2,64 ^{aM}	73,89±2,20 ^{aMN}	71,11±3,33 ^{aN}	66,67±2,50 ^{aP}	63,89±3,33 ^{aP}	58,89±4,17 ^{aQ}	52,78±4,41 ^{aR}	49,57±4,35 ^{aR}
	Kontrol	76,11±2,20 ^{aM}	66,11±3,33 ^{aN}	61,67±3,54 ^{aP}	56,11±4,86 ^{aQ}	51,11±4,86 ^{aR}	45,00±3,54 ^{aS}	37,78±5,65 ^{aT}	33,54±3,48 ^{aT}
	Trehalosa	77,22±2,64 ^{aM}	67,78±2,64 ^{aN}	63,33±3,54 ^{aP}	58,89±3,33 ^{aQ}	53,33±3,54 ^{aR}	48,33±3,54 ^{aS}	41,11±4,86 ^{aT}	37,49±3,41 ^{aV}
	Rafinosa	76,67±2,50 ^{aM}	70,56±3,00 ^{aEN}	66,11±3,33 ^{aEP}	62,78±2,64 ^{IP}	57,22±3,63 ^{EQ}	52,78±4,41 ^{ER}	46,11±5,46 ^{ES}	41,73±3,56 ^{ES}
Tris kuning telur	Kontrol	84,67±4,20 ^{aM}	79,09±2,85 ^{aN}	75,63±3,56 ^{aNP}	71,52±3,12 ^{aPQ}	67,22±3,68 ^{aQR}	63,04±4,24 ^{aRS}	57,86±5,98 ^{aS}	53,63±4,86 ^{aT}
	Trehalosa	85,27±4,49 ^{aM}	80,78±2,65 ^{aMN}	78,69±2,58 ^{aN}	75,22±3,23 ^{aP}	71,68±2,15 ^{aPQ}	69,17±3,35 ^{aQ}	64,32±3,63 ^{aR}	59,38±3,77 ^{aS}
	Rafinosa	85,14±4,36 ^{aM}	80,35±2,58 ^{aMN}	76,04±3,23 ^{aEN}	71,60±2,84 ^{aP}	69,29±4,71 ^{aPQ}	66,20±5,07 ^{aQ}	60,50±5,51 ^{aR}	55,62±4,78 ^{aS}
	Kontrol	84,86±4,23 ^{aM}	71,47±4,10 ^{aN}	67,94±3,66 ^{aNP}	64,11±4,01 ^{aPQ}	59,42±5,23 ^{aQ}	53,20±6,02 ^{aR}	45,11±6,40 ^{aS}	40,23±4,69 ^{aS}
	Trehalosa	84,82±4,14 ^{aM}	73,89±4,59 ^{aN}	70,44±4,62 ^{IP}	66,03±3,07 ^{aP}	61,82±3,64 ^{aQ}	55,41±4,51 ^{aR}	46,50±5,44 ^{aS}	43,27±3,75 ^{aS}
	Rafinosa	84,94±4,31 ^{aM}	78,13±4,03 ^{aN}	72,63±3,50 ^{aIN}	68,72±3,16 ^{aP}	65,26±3,02 ^{aQ}	60,23±4,02 ^{aR}	53,57±6,42 ^{aS}	48,40±4,54 ^{aS}
Tris kuning telur	Kontrol	77,73±3,44 ^{aM}	75,35±3,15 ^{aM}	71,42±2,22 ^{aN}	65,94±3,53 ^{aP}	62,19±3,71 ^{aPQ}	59,06±3,74 ^{aQ}	53,53±4,12 ^{aR}	48,33±3,31 ^{aS}
	Trehalosa	78,05±3,72 ^{aM}	75,70±2,55 ^{aN}	72,72±2,15 ^{aN}	68,79±2,47 ^{aP}	66,09±1,78 ^{aQ}	63,06±2,18 ^{aQ}	59,09±2,92 ^{aR}	53,55±3,06 ^{aS}
	Rafinosa	78,33±3,83 ^{aM}	76,06±2,70 ^{aN}	72,35±2,21 ^{aP}	67,78±3,40 ^{aQ}	65,19±3,66 ^{aQR}	60,76±4,76 ^{aR}	54,33±5,31 ^{aS}	49,97±3,53 ^{aS}
	Kontrol	78,04±3,45 ^{aM}	69,10±2,07 ^{aN}	65,02±2,08 ^{aNP}	60,89±3,57 ^{aP}	53,59±3,92 ^{aQ}	49,21±5,07 ^{aR}	40,55±6,22 ^{aS}	34,68±5,41 ^{aT}
	Trehalosa	78,09±3,86 ^{aM}	70,91±3,46 ^{aN}	65,32±3,69 ^{aNP}	60,45±2,94 ^{aPQ}	55,25±4,44 ^{aQ}	49,29±4,05 ^{aR}	41,95±4,54 ^{aS}	38,45±3,78 ^{aS}
	Rafinosa	78,17±3,91 ^{aM}	72,96±3,85 ^{aEN}	68,81±2,52 ^{IP}	63,93±2,82 ^{IPQ}	59,18±4,17 ^{aQ}	53,59±4,07 ^{aR}	47,72±5,99 ^{aS}	40,26±5,31 ^{aT}

Keterangan : Huruf vokal (a, e, i) berbeda yang mengikuti angka pada kolom yang sama dan huruf konsonan (M, N, P, Q, R, S, T, V) berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Tabel 4. Selisih perbedaan persentase spermatozoa hidup dan membran plasma utuh (MPU) dengan motilitas spermatozoa hingga 50%

Perlakuan	Tris kuning telur			Tris <i>soya</i>			Rataan		Selisih rataan
	Kontrol	Trehalosa	Rafinosa	Kontrol	Trehalosa	Rafinosa	Tris kuning telur	Tris <i>soya</i>	
Motilitas spermatozoa dan spermatozoa hidup (%)									
SM	51,11	52,82	52,78	51,11	53,33	52,78	52,23	52,41	
SH	57,86	59,38	60,50	59,42	61,82	60,23	59,24	60,49	
Selisih (%)	6,75	6,56	7,72	8,31	8,49	7,45	7,01	8,08	6-9
Motilitas spermatozoa dan membran plasma utuh (%)									
SM	51,11	52,82	52,78	51,11	53,33	52,78	52,23	52,41	
MPU	53,53	53,55	54,33	53,59	55,25	53,59	53,80	54,14	
Selisih (%)	2,42	0,73	1,55	2,48	1,92	0,81	1,57	1,73	1-3

Keterangan : SM (spermatozoa motil); SH (spermatozoa hidup); MPU (membran plasma utuh).

Dalam pengencer Tris *soya*, suplementasi rafinosa memperpanjang lama penyimpanan spermatozoa dibandingkan dengan trehalosa. Hal ini karena kandungan rafinosa dalam Tris *soya* yang digunakan lebih banyak mengandung sumber karbohidrat. Rafinosa terdiri dari tiga sakarida yang mempunyai peranan penting pada penyesuaian pengaruh tekanan osmotik. Aktivitas dan sumber energi sakarida dengan bobot molekul yang tinggi sangat baik untuk gerakan spermatozoa. Sebagai sumber aktivitas rafinosa yang terdiri dari D-galaktosa, D-glukosa, dan D-Fruktosa juga berfungsi menstabilkan kualitas spermatozoa terhadap pengaruh buruk penyimpanan dan pembekuan dalam nitrogen (N₂) cair (Fernández-Santos *et al.*, 2007). Rafinosa yang merupakan golongan gula pereduksi ditambahkan ke dalam Tris *soya* yang komponen utamanya adalah protein yang mengandung asam-asam amino seperti asam aspartat, asam glutamat, serin, protin, volin, isoleusin, leusin, phenilalanin, dan lisin menjadikan kombinasi perlakuan tersebut lebih optimal dalam melindungi membran sel. Karbohidrat molekul besar dapat menyediakan energi dalam jumlah yang cukup banyak yang diperlukan untuk metabolisme dan fisiologi secara normal, namun tidak dapat melewati membran plasma spermatozoa (Naing *et al.*, 2010).

Pemeriksaan motilitas spermatozoa ditunjang dengan pemeriksaan membran plasma utuh dan spermatozoa hidup. Pemeriksaan membran plasma utuh penting dilakukan karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hasil penyimpanan semen

cair pada semua pengencer dalam suhu 5°C didapatkan rataan persentase hidup lebih tinggi 6-9% daripada rataan persentase motilitas spermatozoa. Pada pengencer Tris kuning telur didapatkan rataan persentase hidup (59,24%) lebih tinggi daripada rataan persentase motilitas spermatozoa (52,23%), demikian pula pada Tris *soya* rataan persentase spermatozoa hidup (60,49%) lebih tinggi daripada rataan persentase motilitas spermatozoa (52,41%) (Tabel 4). Hasil rataan persentase membran plasma utuh pada semua pengencer cenderung sama dengan rataan persentase motilitas spermatozoa yang mencapai kira-kira 50%. Pada pengencer tris kuning telur didapatkan rataan persentase membran plasma utuh (53,80%), sedangkan pengencer tris *soya* (54,14%) (Tabel 4).

Kelangsungan hidup spermatozoa berkaitan dengan membran sperma. Metabolisme berlangsung dengan baik, jika membran plasma sel dalam keadaan utuh sehingga fertilitas spermatozoa dapat berlangsung dengan baik. Hal tersebut berperan mengatur lalu lintas keluar masuk seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Menurut Paulenz *et al.*, (2003) penambahan kuning telur yang berisi fosfolipid dan lesitin ke dalam pengencer, dapat melindungi membran spermatozoa terhadap kejutan dingin. Kerusakan spermatozoa pada saat preservasi yang disebabkan oleh efek *cold shock* mengubah membran spermatozoa dari konfigurasi normal ke konfigurasi heksagonal yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa (Morel, 1999). Ketika membran spermatozoa mengalami kerusakan, enzim aspartat aminotransferase (AspAT) yang

merupakan enzim utama dalam mitokondria yang memproduksi ATP akan dilepaskan dari sel dan masuk ke seminal plasma. Kehilangan AspAT akan mengganggu produksi ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa (Colenbrander et al., 1992; Arifiantini dan Purwantara, 2010).

Membran plasma spermatozoa dalam menunjang fungsi pompa ion yang masuk dan keluar sel sangat dipengaruhi oleh tekanan osmotik pada bahan pengencer. Tekanan osmotik ini sangat penting dalam mempertahankan keutuhan membran plasma, karena itu spermatozoa memerlukan lingkungan yang bersifat isotonik. Dalam pengencer, spermatozoa memiliki toleransi tekanan osmotik 270 sampai 360 mosmol/kg (Guthrie, 2002). Spermatozoa akan mengalami kebengkakan (*swelling*) jika dipaparkan pada larutan hipotonik, akibat masuknya cairan dari bagian luar sel ke bagian dalam dan sebaliknya akan mengalami penyusutan apabila berada pada lingkungan hipertonik. Hasil pengukuran tekanan osmotik pengencer Tris kuning telur, Tris kuning telur trehalosa, Tris kuning telur rafinosa, Tris soya, Tris soya trehalosa dan Tris soya rafinosa masing-masing adalah 273; 302; 309; 307; 345; 349 mosmol/kg.

Semen segar dari ketiga kambing PE jantan yang digunakan pada penelitian berturut-turut adalah 244; 233; 236 mosmol/kg dengan rata-rata tekanan osmotik sebesar 237,67 mosmol/kg. Berdasarkan hasil pengujian tekanan osmotik, pengencer Tris soya lebih hipertonik jika dibandingkan dengan pengencer Tris kuning telur. Pengencer yang hipertonik menandakan bahwa molekul-molekul atau partikel-partikel di luar sel lebih banyak daripada di dalam sel. Akibatnya terjadi pengeluaran air dari dalam sel untuk mengencerkan molekul-molekul di luar sel, sehingga sel akan mengerut. Efek yang ditimbulkan adalah muncul gejala *osmotic shock* pada spermatozoa yang menyebabkan kerusakan pada organel-organel intraseluler sehingga dapat menyebabkan penurunan motilitas dan spermatozoa hidup. Kerusakan organel intraseluler menyebabkan metabolisme terganggu dan pada akhirnya terjadi penurunan motilitas dan penurunan spermatozoa hidup (Tambing et al., 2003). Perubahan tekanan osmotik larutan pengencer menjadi hipoosmotik atau hiperosmotik dapat menyebabkan kematian spermatozoa, sehingga karbohidrat yang digunakan sebagai tambahan bahan pengencer sebaiknya yang tidak mudah

mengalami perubahan struktur menjadi bentuk ion yang dapat mengubah tekanan osmotik larutan pengencer agar integritas membran plasma sel tidak mudah rusak (Souhoka et al., 2009).

Keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan akan memberikan efek yang baik terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Darnell et al., (1990) dan Kimball (1998) menyatakan bahwa lapisan luar membran sel dibangun dari kompleks protein-karbohidrat (oligosakarida; polisakarida) yang berikatan dengan lipid (glikolipid) dan dengan protein (glikoprotein) yang disebut dengan selubung sel atau glikokaliks. Hal tersebut menjelaskan mengapa karbohidrat disebut dengan krioprotektan ekstraseluler, karena karbohidrat yang ditambahkan ke dalam pengencer berfungsi melindungi glikokaliks dari kerusakan. Karbohidrat tidak dapat menembus membran plasma sel secara difusi bebas karena tidak larut di dalam lemak dan memiliki bobot molekul yang besar, sehingga sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, karbohidrat melindungi sel dari luar (Souhoka et al., 2009).

Trehalosa dan rafinosa yang ditambahkan ke dalam pengencer akan berasosiasi dengan karbohidrat yang ada pada selubung sel sehingga membran plasma dapat terlindungi dari kerusakan secara mekanik selama proses pengolahan semen berlangsung, terutama saat penyimpanan pada suhu rendah. Kalaupun karbohidrat yang ada pada membran plasma sel tersebut rusak selama proses preservasi, diharapkan trehalosa dan rafinosa yang ditambahkan dapat menjadi pengganti sehingga struktur selubung sel tetap utuh. Trehalosa dan rafinosa dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin selama penyimpanan pada suhu rendah (5°C). Kejutan dingin tersebut berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma dan perubahan tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma sehingga ion-ion seperti kalsium bebas masuk ke dalam sel. Oleh karena itu, pada proses preservasi semen memerlukan zat-zat pelindung di dalam pengencer, seperti fosfolipid dan krioprotektan.

Beberapa laporan mengungkapkan bahwa Tris kuning telur sebagai pengencer terbaik untuk pengawetan semen sapi *Friesian Holstein/FH* (Arifiantini dan Purwantara, 2010), kerbau (Rasul et al., 2000; Sukhato et al., 2001), kambing (Fukui et al., 2008; Purdy, 2006a),

kambing *spanish ibex* (Santiago-Moreno *et al.*, 2008), domba (Nel-Themaat *et al.*, 2006; Paulenz *et al.*, 2003; Purdy, 2006b; Soylu *et al.*, 2007), anjing (Hermansson dan Linde-Forsberg, 2006; Schafer-Somi *et al.*, 2006), gajah (Graham *et al.*, 2004). Arifiantini *et al.* (2005), menggunakan Tris Raffinosa-kuning telur, Tris Fruktosa-kuning telur dan bahan pengencer komersial berbasis *soya lechitin* untuk pengawetan semen sapi FH. Keunggulan penambahan trehalosa dalam mempertahankan kualitas spermatozoa telah dilaporkan pada semen tikus (Sztein *et al.*, 2001), sapi (Woelders *et al.*, 1997), anjing (Yildiz *et al.*, 2000), domba (Aisen *et al.*, 2002), kambing (Aboagla dan Terada, 2004), dan babi (Hu *et al.*, 2009). Sementara itu keunggulan penambahan rafinosa dalam mempertahankan kualitas spermatozoa juga telah dilaporkan pada semen kambing angora (Salamon dan Ritar, 1982) dan tikus (Holt, 2000).

SIMPULAN

Pengencer terbaik untuk preservasi semen cair kambing PE adalah pengencer Tris kuning telur dengan suplementasi trehalosa atau dalam pengencer Tris *soya* dengan suplementasi rafinosa.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan informasi tentang lesitin kacang kedelai. Perlu dilakukan IB pada kambing betina menggunakan semen cair hasil penelitian ini untuk mengetahui fertilitas spermatozoa yang sebenarnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada RM Maulana selaku Ketua Koperasi Daya Mitra Primata, Cikarawang, Bogor beserta para karyawan yang telah memberikan ijin untuk menggunakan tiga ekor kambing PE jantan sebagai hewan percobaan, Bondan Ahmadi selaku staff pegawai di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bapak Heryadi, Purwo Siswoyo,

Anggraita Putra, Azmi F Bangkit dan Bachtari Hary Pravitasari dan Gholib atas bantuannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62 : 809-818.
- 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 semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57 : 1801-1808.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61 : 895-907.
- Arifiantini I, Yusuf TL, Graha N. 2005. *Recovery rate* dan *longivitas* pasca *thawing* semen beku sapi FH (Friesian Holstein) menggunakan berbagai bahan pengencer. *Buletin Peternakan* 29(2) : 53-61.
- Arifiantini RI, Purwantara B. 2010. Motility and viability of Friesian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *J Indonesian Trop Anim Agric* 35(4) : 222-226.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. *Semen Evaluation. Reproduction in Farm Animals* 7th (Ed). Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. pp 365-389.
- Best B. 2011. Viability, crioprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. <http://www.benbest.com>. (10 Mei 2011).
- Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACS, Silva AR. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63(3) : 263-266.
- Botham KM, Mayes PA. 2009. Pengangkutan dan Penyimpanan Lipid. Dalam: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2009. *Biokimia Harper*. Ed ke-27. Pendit BU,

- penerjemah. Jakrata (ID): EGC. Terjemahan dari: *Harper's Illustrated Biochemistry*. 27th ed. hlm 225-238.
- Colenbrander B, Raseli AR, Van Buiben A, Parlevliet J, Gadella BM. 1992. Assesment of Sperm Cell Membrane Integrity in The Horse. *Act Vet Scand Suppl* 88 : 49-58.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D. 1990. *Molecular Cell Biology* 2nd (Ed). New York : Scientific American Books, Inc. pp 489-583.
- Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodriguez I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim Reprod Sci* 112 : 150-157.
- Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci* 121 : 115-123.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macias V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 67(4) : 738-753.
- Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K. 2008. Fertility after insemination using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev* 54 : 286-289.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. pp 96-109.
- Graham LH, Bando J, Gray C, Buhr MM. 2004. Liquid storage of Asian (*Elephas maximus*) sperm at 4°C. *Anim Reprod Sci* 80: 329-340.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology Reprod* 67 : 1811-1816.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65 : 584-593.
- Higashiyama T. 2002. Novel function and applications of trehalose. *Pure Appl Chem* 74(7) : 1263-1269.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62 : 3-22.
- Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci* 112 : 107-118.
- Kimball JW. 1998. *Biologi* Jilid 1. Ed ke-5. Tjitrosomo SS, Sugiri N, penerjemah. Jakarta (ID): Erlangga. Terjemahan dari: *Biology*. hlm 86-115.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing Boer pada pengencer tris sitrat-fruktose. *J Sain Vet* 24(1) : 58-64.
- Morel DMCG. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Wallingford : CABI Publishing.
- Naing. SW, Wahid H, Azam MK, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristic of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122 : 23-28.
- Nel-Themaat L, Harding GD, Chandler JE, Chenevert JF, Damiani P, Fernandez JM, Humesa PE, Pope CE, Godke RA. 2006. Quality and freezing qualities of first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams. *Anim Reprod Sci* 95 : 251-261.
- Paulenz H, Soederquist L, Adnøy T, Fossen OH, Berg KA. 2003. Effect of milk and tris-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. *Theriogenology* 60 : 759-766.
- Paulenz H, Soederquist L, Adnøy T, Soltun K, Sæther PA, Fjellsøy KR, Berg KA. 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim Reprod Sci* 86 : 109-117.
- Purdy PH. 2006a. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63 : 215-225.
- Purdy PH. 2006b. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 93 : 114-123.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N. 2000. Effect of buffering system on post-thaw motion characteristic, plasma membrane integrity and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 59 : 31-4.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang B. 2003. Kualitas semen

- beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 7(3) : 194-199.
- Salamon S, Ritar AJ. 1982. Deep freezing of Angora goat semen : effect of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust J Biology Sci* 35 : 295-303.
- Santiago-Moreno J, Coloma MA, Tolendano-Diaz A, Gomez-Brunet A, Pulido-Pastor A, Zamora-Soria A, Carrizosa JA, Urrutia B, Lopez-Sebastian A. 2008. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 57 : 25-29.
- Schafer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66 : 173-182.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. Alih Bahasa: B. Sumantri. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M. 2009. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing Peranakan Etawah yang dipreservasi dengan plasma semen domba Priangan. *J Veteriner* 10(3) : 135-142.
- Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan I, Sagirkaya H, Gunay U, Kemal AK. 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bull Vet Inst Pulawy* 51 : 241-246.
- Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A, Songsasen N. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim Repr Sci* 67 : 69-77.
- Sztein JM, Noble K, Farley JJS, Mobraaten LE. 2001. Comparison of permeating and non permeating cryoprotektan for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 42 (1) : 28-39.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Utama IK. 2001. Kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah setelah ekuilibrasi. *Hayati* 8 : 70-75.
- Tambing SN, Toelihere MR, Purwantara B, Utama IK. 2003. Kualitas semen beku kambing Saanen pada berbagai jenis pengencer. *Hayati* 10 : 146-150.
- Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Reprod Sci* 62 : 23-53.
- Woelders H, Matthij A, Engel B. 1997. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35 : 95-105.
- 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.