

TOKSISITAS GLISEROL DAN KUALITAS SPERMATOZOA SAPI BALI POST THAWING

LESTARI, S.A., DARMAWAN, DAN B. ROSADI

Program Studi Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Jambi
e-mail: bayurosadi@unja.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh toksisitas gliserol terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali post thawing. Penelitian dilaksanakan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), terdiri dari 5 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan didasarkan atas konsentrasi gliserol dalam larutan pengencer tris sitrat kuning telur (TSK) yaitu P₀ (0%), P₁ (6%), P₂ (12%), P₃ (18%) dan P₄ (24%). Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa *post thawing*. Data dianalisis menggunakan sidik ragam dengan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi gliserol berpengaruh sangat nyata terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa ($P < 0,01$). Konsentrasi gliserol 6% dalam pengencer dapat mengurangi penurunan motilitas dan viabilitas serta mencegah kenaikan abnormalitas spermatozoa. Efek toksik gliserol lebih kuat dengan peningkatan konsentrasi mulai 12%.

Kata kunci: gliserol, pembekuan, sapi bali, spermatozoa, toksisitas

GLYCEROL TOXICITY AND QUALITY OF FROZEN-THAWED BALI CATTLE SPERMATOZOAS

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of glycerol concentration on motility, viability and abnormalities of frozen thawed spermatozoa of Bali cattle. The study was conducted using a completely randomized design with 5 treatments and 6 replications. The treatments consisted of T₀ (0% glycerol), T₁ (6% glycerol), T₂ (12% glycerol), T₃ (18% glycerol), P₄ (24% glycerol). The results showed that the administration of glycerol had a very significant effect ($p < 0.01$) on the motility, viability, and abnormality of spermatozoa. Six percent glycerol in diluent able to reduce the decrease in motility, viability. and prevent the increase of spermatozoa abnormality. Toxic effects of glycerol were higher in accordance to higher concentration started in 12%.

Key words: glycerol, freezing, bali cattle, spermatozoa, toxicity

PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan sapi yang perkembangannya tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Upaya peningkatan populasi dan peningkatan mutu genetik sapi Bali terus dilakukan secara intensif mulai tahun 1980-an. Salah satu teknologi yang telah digunakan untuk perkembangbiakan sapi adalah inseminasi buatan (IB). Faktor penting yang menentukan dalam keberhasilan IB adalah kualitas spermatozoa (Toelihere, 1993). Kualitas spermatozoa post-thawing dipengaruhi beberapa faktor di antaranya adalah bahan pengencer, proses pembekuan, dan pemberian krioprotektan (Hammerstedt *et al.*, 1990; Ugur *et al.*, 2019).

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentu-

gian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati, 2000). Sebagian besar kerusakan spermatozoa terjadi pada saat pembekuan akibat adanya pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) yang berakibat kematian spermatozoa. Pada saat pembekuan, spermatozoa mengalami penurunan kualitas sekitar 10-40% hingga 50% (Parrish, 2003). Untuk meminimalkan kerusakan sel dapat dilakukan penambahan krioprotektan ke dalam pengencer semen (Fitriati, 2008). Salah satu jenis krioprotektan yang sering digunakan pada proses pembekuan semen adalah gliserol.

Gliserol berperan dalam melindungi membran plasma, mencegah kerusakan fisik dan fungsional spermatozoa selama proses pembekuan akibat pembentukan

kristal-kristal es. Gliserol mencegah pengumpulan molekul air sehingga tidak terjadi kristalisasi es (Bailey *et al.*, 2000) serta mencegah terjadinya kehilangan air karena mempunyai daya ikat yang kuat terhadap air (Supritana dan Pasaribu, 1992). Efisiensi krioprotektan selama proses pembekuan sangat dipengaruhi oleh konsentrasi yang digunakan dalam media pengencer (Arifiantini *et al.*, 2007).

Dosis penambahan gliserol pada beberapa pengencer berbeda-beda. Menurut Evans dan Maxwell (1987) untuk melakukan pembekuan semen, standar penggunaan gliserol yang dianjurkan adalah 6%-8%, jika kurang dari dosis tersebut, maka gliserol tidak akan memberikan efek yang berarti, sedangkan jika lebih tinggi akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa. Konsentrasi gliserol 6% dilaporkan optimal pada pembekuan semen sapi Brahman (Setiono *et al.*, 2015), dan konsentrasi 5% menghasilkan kualitas spermatozoa post thawing terbaik pada sapi Aceh (Riski *et al.*, 2018) dan pada sapi Simmental (Mumu *et al.*, 2009). Efek toksik dari gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi menghambat metabolisme energi (McLaughlin *et al.*, 1992) serta mengubah osmolaritas pengencer (Farstad, 1996).

Toksitas gliserol akan meningkat seiring peningkatan konsentrasi melebihi konsentrasi optimal (Evans dan Maxwell, 1987). Dampak toksik gliserol akan terlihat pada parameter-parameter yang menunjukkan kualitas spermatozoa seperti motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Motilitas merupakan salah satu faktor yang menentukan gambaran spermatozoa yang sehat. Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dapat dijadikan indikator integritas struktur membran spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2014). Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa. Penelitian ini bertujuan mengukur toksitas gliserol terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali post thawing.

MATERI DAN METODE

Koleksi dan Transportasi Semen

Semen yang digunakan berasal dari hasil koleksi pejantan sapi Bali milik UPTD Perbibitan Provinsi Jambi dengan metode vagina buatan. Semen diencerkan dengan pengencer tris sitrat kuning telur (TSK) dengan perbandingan 1:4. Komposisi bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang digunakan terdiri dari 20 ml kuning telur 20 ml, 1,6 g tris amino metan, 1,86 g asam sitrat, 1,37 g fruktosa, 100.000 IU penisilin, dan 0,1 g streptomisin, aquabides 80 ml. Semen dibawa ke laboratorium Fakultas Peternakan Universitas menggunakan tabung tertutup yang ditempatkan dalam termos berisi air un-

tuk mencegah fluktuasi suhu (lama transportasi \pm 15 menit).

Penambahan Gliserol dalam Semen

Semen diencerkan lebih lanjut dalam pengencer TSK dengan konsentrasi akhir 2×10^8 spermatozoa/ml. Semen ditempatkan yang sudah diencerkan ditempatkan dalam refrigerator dengan suhu 5°C. Pada saat bersamaan disiapkan juga pengencer yang sudah dicampur gliserol dan disimpan bersamaan pada suhu yang sama.

Ekuilibrasi, Filing, dan Pembekuan Semen

Semen dipaparkan pada 5 °C selama 2 jam. Selanjutnya semen dicampurkan dengan larutan mengandung gliserol dengan konsentrasi diatur sedemikian rupa sehingga diperoleh konsentrasi spermatozoa 10^8 /ml dan konsentrasi gliserol sebagai berikut: P0 (0%), P1 (6%), P2 (12%), P3 (18%), dan P4 (24%). Semen dimasukkan ke dalam straw 0,25 ml masing-masing sebanyak 6 straw (ulangan) untuk setiap perlakuan.

Semen dalam straw kembali disimpan pada suhu 5°C selama 2 jam. Selanjutnya straw disusun pada rak dalam wadah styrofoam berisi nitrogen cair dengan jarak 10 cm dari permukaan nitrogen cair dan dibiarkan terpapar dalam uap nitrogen cair selama 5 menit. Straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair dan disimpan dalam container.

Pengamatan Motilitas, Viabilitas, dan Abnormalitas Post Thawing

Straw dikeluarkan dari container nitrogen cair, kemudian ditempatkan dalam air bersuhu 37 °C selama 30 detik, dipaparkan dalam suhu kamar selama 5 menit dan dilakukan evaluasi. Peubah yang diamati sebagai indikator kualitas spermatozoa adalah motilitas, viabilitas, dan abnormalitas (Sinurat *et al.*, 2020).

Motilitas dihitung menggunakan metode estimasi. Motilitas spermatozoa dihitung dengan estimasi spermatozoa bergerak progresif dari lima lapang pandang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Nilai yang diberikan 0-100% dengan interval 5%.

Viabilitas dihitung berdasarkan persentase spermatozoa hidup menggunakan pewarnaan eosin negrosin. Perhitungan persentase hidup didasarkan atas perbandingan jumlah spermatozoa yang hidup (kepala tidak berwarna) dengan total spermatozoa yang dihitung. Pengamatan dilakukan dengan pembesaran 400x, total spermatozoa yang diamati minimal 200 setiap pengamatan.

Abnormalitas adalah penyimpangan dari bentuk morfologi normal spermatozoa yang dapat menyebabkan penurunan daya fertilitasnya. Penghitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan pewarnaan yang sama dengan spermatozoa hidup. Jumlah

spermatozoa yang dihitung minimal 200 setiap pengamatan.

Analisis Data

Data yang didapatkan dari setiap peubah yang diamati analisis dengan sidik ragam, Bila perlakuan berpengaruh nyata, dilakukan uji jarak berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa post thawing berbeda nyata pada konsentrasi gliserol yang berbeda ($P < 0,01$; Tabel 1). Dibandingkan kondisi segarnya, kualitas spermatozoa menurun karena adanya proses pembekuan dan thawing (Haugana *et al.*, 2007; Ugur *et al.*, 2019).

Tabel 1. Rataan motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa sapi bali post thawing

Perlakuan	Motilitas	Viabilitas	Abnormalitas
P0	5,13 ± 0,70 ^a	39,40 ± 1,26 ^a	10,67 ± 0,52 ^c
P1	55,01 ± 0,89 ^e	58,17 ± 1,32 ^c	3,50 ± 0,55 ^a
P2	43,67 ± 2,07 ^d	45,50 ± 2,42 ^b	8,30 ± 0,89 ^b
P3	40,83 ± 9,17 ^c	46,67 ± 1,63 ^b	8,00 ± 1,09 ^b
P4	19,17 ± 5,84 ^b	44,50 ± 2,42 ^b	9,00 ± 0,30 ^b

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,01$)

Motilitas Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berbagai level gliserol di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur memberikan pengaruh nyata terhadap motilitas ($P < 0,01$). Motilitas P1 lebih tinggi dibandingkan dengan P2, P3, dan P4. Efek protektif gliserol dalam melindungi spermatozoa selama pembekuan tampak pada angka motilitas yang lebih tinggi dibandingkan P0. Tanpa pemberian gliserol motilitas sangat rendah (5,13 %) dibandingkan dengan P1 yang mencapai 55,01%. Konsentrasi 6% memberikan pengaruh optimum terhadap persentase motilitas spermatozoa. Hasil ini mengkonfirmasi penelitian-penelitian sebelumnya pada semen sapi Brahman (Setiono *et al.*, 2015), sapi Aceh Aceh (Riski *et al.*, 2018) pada sapi Simmental (Mumu *et al.*, 2009) dan pada kambing (Sinha *et al.*, 1992) dengan kisaran konsentrasi gliserol optimum 5-6%.

Gliserol mencegah pengumpulan molekul air sehingga tidak terjadi kristalisasi es melindungi membran plasma, mencegah kerusakan fisik dan fungsional spermatozoa selama proses pembekuan (Bailey *et al.*, 2000; Siswanto, 2006). Pada P0, tidak ada gliserol yang ditambahkan dalam larutan pengencer sehingga spermatozoa tidak terlindungi terhadap kerusakan kromosomik. Baust *et al.* (2009) melaporkan selama proses pembekuan spermatozoa mengalami fluktuasi suhu

yang menimbulkan sumber-sumber cekaman diantaranya ketidakseimbangan ion, decoupling metabolik, aktivasi protease, penekanan energi, asidosis seluler, dan produksi ROS. Konsentrasi ROS yang tinggi berkaitan dengan peningkatan peroksidasi lipid yang meningkat di membran plasma spermatozoa (Scherle *et al.*, 2011) yang merupakan lokalisasi berbagai komponen yang berpartisipasi dalam proses motilitas mencakup pembentukan tenaga, perlekatan, signaling dan regulasi (Keren, 2011). Keutuhan organel sel penting agar spermatozoa mampu bergerak karena dilaporkan Esseltine dan Scott (2013) bahwa fungsi motilitas tergantung pada AMP intraseluler yang dihasilkan adenyl cyclase, dan pada fosforilasi protein berikutnya mencakup protein kinase A serta banyak protein terfosforilasi lainnya.

Pemberian gliserol pada konsentrasi yang lebih tinggi pada P2, P3, dan P4 menghasilkan motilitas yang rendah dibandingkan dengan konsentrasi 6%. Kadar gliserol yang terlalu tinggi atau rendah tidak akan efektif menjalankan fungsi protektifnya (Mumu, 2009), penggunaan gliserol harus memperhatikan konsentrasi yang tepat agar dapat berfungsi dengan baik, apabila berlebih akan menjadi toksik bagi spermatozoa (Rizal, 2010).

Konsentrasi gliserol yang tinggi akan mengakibatkan kerusakan seluler melalui efek osmotik dan biokimiawi (Fahy, 1986). Permiabilitas membran plasma terhadap gliserol akan mengontrol kerusakan osmotik dan gliserol kurang permiabel dibanding krioprotektan yang lain (Glazar *et al.*, 2009). Konsentrasi gliserol rendah tidak menyebabkan perubahan pada volume spermatozoa, toksisitas biokimiawi gliserol terjadi pada sitoskeleton actin dengan cara depolimerisasi actin f, sedangkan hiperosmolaritas menginduksi redistribusi actin f (Garcia *et al.*, 2012).

Kerusakan tidak bersifat oksidatif karena peroksidasi lipid tidak terpengaruh oleh konsentrasi gliserol, percobaan pada spermatozoa kuda menunjukkan bahwa mitokondria memiliki resistensi terhadap toksisitas gliserol (Gracia *et al.*, 2012), gliserol juga mampu menangkap radikal hidroksil (Miller dan Cornwell, 1978). Mitokondria diketahui sebagai sumber utama ROS pada spermatozoa (Koppers *et al.*, 2010) dan mitokondria adalah struktur yang lebih sensitif terhadap kerusakan akibat kriopreservasi (Ortega *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009), tetapi toksisitas gliserol bukan faktor utama yang terlibat dalam kerusakan mitokondria (Garcia *et al.*, 2012). Konsentrasi gliserol tinggi pada P2, P3, dan P4 diduga merusak spermatozoa melalui stress osmotik dan kerusakan sitoskeleton bukan karena kenaikan radikal bebas seperti yang diduga kuat terjadi pada P0. Kerusakan sitoskeleton menyebabkan terganggunya proses biokimiawi yang diperlukan dalam produksi energi untuk pergerakan spermatozoa.

Viabilitas Spermatozoa

Perlakuan berbagai level gliserol di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur memberikan pengaruh terhadap viabilitas ($P < 0,01$). Persentase spermatozoa hidup tertinggi diperoleh pada P1 (58,17%) dan paling rendah pada P0 (39,40%). Pada P2, P3, dan P4 dengan konsentrasi gliserol yang lebih tinggi dari P1, viabilitas lebih rendah dibandingkan P1.

Spermatozoa seharusnya lebih tidak sensitif terhadap kerusakan kriogenik karena rendahnya kandungan air dan tingginya fluiditas membran. Walaupun demikian, pembekuan merusak integritas spermatozoa karena berubahnya struktur membran dan metabolisme sel (Hammerstedt *et al.*, 1990). Baust *et al.* (2009) meringkas penyebab cekaman yang mempengaruhi sel selama kriopreservasi sebagai berikut: 1) selama pendinginan, sel-sel terpapar pengaruh merusak di antaranya energi metabolik, transisi fase membran, destabilisasi sitoskeleton, produksi radikal bebas (ROS), 2) Selama proses pembekuan, spermatozoa cenderung terpapar hiperosmolaritas, perubahan volume sel, dan denaturasi protein.

Pemberian gliserol dengan dosis yang tepat menghasilkan angka viabilitas yang lebih baik, sedangkan tanpa pemberian gliserol viabilitas lebih rendah. Pada P0, tidak ada proteksi dari krioprotektan (gliserol) yang dapat meminimalkan kerusakan kriogenik yang mengakibatkan kematian spermatozoa. Gliserol dalam pengencer berdifusi ke dalam spermatozoa dan dapat mengalami metabolisme menghasilkan energi dan membentuk fruktosa, selanjutnya akan dirombak menjadi asam laktat, menghasilkan energi berupa ATP (Tambing *et al.*, 2000).

Gliserol akan menurunkan konsentrasi natrium di luar sel sehingga kematian spermatozoa dapat dihindarkan dan pembentukan kristal-kristal es di dalam sel dapat dikurangi, menjadi es dan adanya peningkatan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel spermatozoa. Dengan adanya gliserol dalam medium pengencer diharapkan peningkatan konsentrasi elektrolit di atas level yang merugikan dapat dihindarkan (Robbins *et al.*, 1976; Kumar *et al.*, 1992).

Pada P0 (tanpa gliserol) serta P2, P3, P4 dengan konsentrasi gliserol yang tinggi diduga terjadi kerusakan kriogenik yang menyebabkan kematian spermatozoa (apoptosis). Peristiwa kematian spermatozoa berkaitan dengan kerusakan pada DNA (Johnston *et al.*, 2012). Kerusakan DNA berkaitan erat dengan mekanisme-mekanisme selama kriopreservasi, destruksi pita ganda karena produksi ROS yang tinggi (McCarthy *et al.*, 2009), rusaknya enzim-enzim untuk perbaikan DNA (Bogle *et al.*, 2017), dan cekaman mekanik areal genom molekul DNA, kompaksi kromatin meningkat karena sel mengerucut (Kopeika *et al.*, 2015). Keutuhan

DNA sangat krusial bagi spermatozoa, sintesis protein spesifik yang memperantarai respon terhadap rangsangan lingkungan untuk mempertahankan hidup dan menjalankan fungsinya. Kerusakan DNA mengakibatkan hilangnya kemampuan untuk merespon sinyal dari lingkungan sehingga terjadi apoptosis.

Abnormalitas Spermatozoa

Pengamatan abnormalitas spermatozoa didasarkan pada keutuhan struktur morfologi, kerusakan pada spermatozoa selama kriopreservasi menyebabkan abnormalitas jika terjadi penyimpangan dari struktur morfologi yang normal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi gliserol dalam pengencer mempengaruhi tingkat abnormalitas spermatozoa ($P < 0,01$), abnormalitas paling rendah pada P1 (3,50%) dan paling tinggi pada P0 (10,67%). Pada P2, P3, dan P4 dengan konsentrasi gliserol mulai 12%, persentase abnormalitas meningkat dibandingkan P1. Hal ini menunjukkan bahwa toksistas gliserol sebagai sumber cekaman menyebabkan kerusakan pada struktur morfologi spermatozoa.

Sumber cekaman lain seperti pemaparan pada suhu dingin (Sinurat *et al.*, 2020) dan fluktuasi suhu saat pembekuan (Andryansyah *et al.*, 2020; Rosadi *et al.*, 2015) tidak menyebabkan peningkatan angka abnormalitas walaupun menyebabkan penurunan viabilitas dan motilitas spermatozoa. Penyebab kerusakan morfologi pada spermatozoa diduga karena pengaruh karena rusaknya struktur sel akibat pengaruh osmotik dan non osmotik pemberian gliserol yang berlebihan. Garcia *et al.* (2012) melaporkan bahwa pada spermatozoa kuda gliserol menampakkan toksistas pada konsentrasi di atas 3,5%, sitoskeleton aktin sensitif terhadap toksistas gliserol karena menginduksi depolimerisasi F aktin. Pada spermatozoa kambing, konsentrasi 6 % (P0) toksistas gliserol belum berdampak terhadap kerusakan struktur spermatozoa sehingga tidak terjadi peningkatan abnormalitas. Konsentrasi gliserol 12% (P2) atau lebih terjadi peningkatan kerusakan struktur morfologi spermatozoa kambing karena efek toksistas gliserol. Diduga, pada spermatozoa kambing dalam penelitian ini juga kerusakan sitoskeleton F aktin. Sitoskeleton aktin rusak selama kriopreservasi Watson (2000), bukti kerusakan telah digambarkan telah terjadi spermatozoa domba (Holt dan North, 1991).

Walaupun telah terjadi peningkatan abnormalitas morfologi akibat toksistas gliserol, tetapi tingkat abnormalitas masih di bawah ambang batas toleransi kualitas spermatozoa. Tingkat abnormalitas 8-10% tidak punya efek yang berarti bagi fertilitas, tetapi abnormalitas lebih dari 25% menyebabkan penurunan fertilitas (Bearden dan Fuquay, 1997).

SIMPULAN

Konsentrasi gliserol 6% dalam pengencer dapat mengurangi penurunan motilitas dan viabilitas serta mencegah kenaikan abnormalitas spermatozoa. Efek toksik gliserol lebih kuat dengan peningkatan konsentrasi mulai 12%.

DAFTAR PUSTAKA

- Andryansyah, R., T. Sumarsono, F. Hoesni, dan B. Rosadi. 2020. Kualitas semen beku kambing peranakan etawah pada permukaan nitrogen cair dengan jarak yang berbeda *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(1): 1-5.
- Afriantini, R.I., S. Irnan, dan S. San. 2007. Penentuan waktu equilibrasi pada pembekuan semen kuda menggunakan bahan pengencer susu skim. *Animal Production* 9(3): 145-152
- Bailey, J.L., J.F. Bilodeau, and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*. 21: 1-7
- Baust, J.G., D. Gao, and J.M. Baust. 2009. Cryopreservation: an emerging paradigm change. *Organogenesis*. 5: 90-96.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuguay. 1980. *Applied Animal Reproduction*. Reston Publishing Company. Inc. Printice Hall Company, Reston Virginia
- Bogle, O.A., K. Kumar, C. Attardo-Parrinello, S.E.M. Lewis, J.M. Estanyol, and J.L. Balleascà. 2017. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *J. Andrology*. 5(1): 10-22
- Esseltine, J.L. and J.D. Scott. 2013. AKAP signaling complexes: pointing towards the next generation of therapeutic targets? *Trends Pharmacol. Sci*. 34: 648-655.
- Evans, G. dan W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Sydney: Butterworths.
- Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 23:1-13.
- Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididymis sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *J. Anim. Prod*. 10(1): 22-29.
- Garcia, B.M., C. O. Ferrusola, I.M. Aparicio, A. Miro-Moran, A.M. Rodriguez, J.M.G. Bolanos, L.G. Fernandez, C.M.B.d. Silva, H. Rodriguez-Martinez, J.A. Tapia, and F.J. Pena. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*. 77(7): 1280-1289.
- Glazar, A.I., S.F. Mullen, J. Liu, J.D. Benson, J.K. Critser, and E.L. Squires. 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*. 59: 201-206.
- Hammerstedt, R.H., J.K. Graham, and J.P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*. 11: 73-88
- Hugana, T., Y.T. Grohn, E. Kommissrud, E. Rosptad, and O. Raksen. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow coception. *Anim. Reprod. Sci*. 97: 1-11.
- Holt, W.V. and R.D. North. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert*. 91: 451-461.
- Johnston, S.D., N. Satake, Y. Zee, C. López-Fernández, W.V. Holt, and J. Gosálvez. 2012. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reprod* 143(6):787-797.
- Kopeika, J., A. Thornhill, and Y. Khalaf. 2015. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update*. 21(2): 209-227.
- Koppers, A.J., M.L. Garg, and R.J. Aitken. 2010. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*. 48: 112-119.
- McCarthy, M.J., J. Baumber, P.H. Kass, and S.A. Meyers. 2009. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod*. 82(3): 644-651.
- Kumar, S., K.L. Sahni, and G. Moohan. 1992. Effect of different levels of glycerols and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J*. 2: 151-156.
- Miller, J.S. and D.G. Cornwell. 1975. The role of cryoprotective agents as hydroxyl radical scavengers. *Cryobiology*. 5: 585-588.
- Ortega, F.C, L.G. Fernandez, J.M. Morrell, C.S. Sandoval, B.M. Garcia, and H. Rodriguez-Martinez. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*. 138: 55-63.
- Parera, F., Z. Prihatini, D.F. Souhoka, and M. Rizal. 2009. Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternatif spermatozoa epididymis sapi Bali. *J. Indon. Trop. Anim. Agric*. 34(1): 50-56.
- Parrish, J. 2003. *Tecniques in Domestic Animal Reproduction-Evaluation and Freezing of semen*. <http://www.wisc.edu/anscirepro/>.
- Pena, F.J., H. Rodriguez-Martinez, J.A. Tapia, C. Or-

- tega-Ferrusola, L. Gonzalez-Fernandez, and B. Macias-Garcia. 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim.* 44: 345-349.
- Robbins, R.K., R.G. Saacke, and P.T. Chandler. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J. Anim. Sci.* 42: 145-154.
- Rosadi, B., T. Sumarsono, dan Darmawan. 2015. Motilitas permatozoa kerbau umpur pada penyimpanan semen beku dalam es. *JHIP.* 18(2): 98-101.
- Rizal, M. dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa.* 20(3): 139-145.
- Scherle, C.C., M.S. Maia, S. Bicudo, L. Rodello, and H. Azevedo. 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rum Res.* 95(2-3): 144-149
- Setiono, N., S. Sri, dan E.S. Purnama. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu.* 3(2): 61-69.
- Sinurat, L.H., S. Erina, dan B. Rosadi. 2020. Efek penyimpanan epididimis sapi Bali pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa. *Jurnal Peternakan Sriwijaya.* 9(2): 27-34.
- Siswanto. 2006. Kualitas Semen di dalam Pengencer Tris dan Natrium Sitrat dengan Berbagai Sumber Karbohidrat dan Level Gliserol Pada Proses Kriopreservasi Semen Rusa Timor (*Cervus timorensis*). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sinha, S., B.C. Deka, M.K. Tamulu, and B.N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender of quality of frozen goat semen. *Indian Vet. J.* 69: 1107--1110.
- Supriatna, I. dan F.H. Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Susilawati, T. 2000. Teknologi Preservasi dan Krioprevasi Spermatozoa dan Ova. Tesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Ugur, M.R., A.S. Abdelrahman, H.C. Evans, A.A. Gilmore, M. Hitit, R.I. Arifiantini, B. Purwantara, A. Kaya, and E. Memili. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front. Vet. Sci.* 6: 1-15.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-92.