

Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengencer terhadap Kualitas Semen Beku Domba Priangan

I. HERDIWAN

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi 2 Maret 2004)

ABSTRACT

I. HERDIWAN. 2004. The effect of freezing rate temperatures and kind of extenders on the quality of frozen sperm of Priangan Goat. *JITV* 9(2): 98-107.

The study has been conducted on Animal Reproduction Laboratory of Animal Husbandry Faculty, Padjadjaran University, in Jatinangor, Sumedang, West Java to find out the interaction of freezing rate temperatures and kind of extenders on frozen semen quality after thawing. Factorial completely randomized design was used in the experiment with first factor was freezing rate temperatures (7, 13, and 20°C/mins), and second factor was semen extenders (egg yolk-citrate and egg yolk tris-base). Each treatment had four replication. Variables observed were sperm motility and abnormality, acrosome and membrane sperm cell integrities, sperm viability incubated in water for four to seven hours, and sperm recovery after thawing. Results of statistical analysis show that there was interaction between freezing rate of 13°C/mins and egg yolk tris-base on sperm motility. However, other variables did not indicated interactions. The best sperm motility was observed from the freezing rate 13°C/mins on egg yolk tris-base, it had recovery value of 52.53%. Main effect analysis show that freezing rate 13°C/mins had highly significantly results than others treatment ($P < 0.01$) on lowest abnormality, best integrity of acrosome and membrane cell, viability in water incubation for four and seven hours and recovery value after thawing, subsequently they were 16.04, 42.88, 37.90, 35.54, 23.51 and 50.92%. Main effect on extender showed that egg yolk tris-base significantly ($P < 0.05$) best for lowest abnormality west for integrity of acrosome and membrane cell, viability in water incubation for four and seven hour, sperm recovery value after thawing subsequently they were 19.05, 39.17, 35.86, 32.30, 21.12 and 50.00%.

Key words: Freezing rates, extender, quality of frozen semen, Priangan goat

ABSTRAK

I. HERDIWAN. 2004. Pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba Priangan. 9(2): 98-107.

Penelitian mengenai pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba Priangan, telah dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat. Penelitian bertujuan untuk mengetahui interaksi antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku Domba Priangan pasca *thawing*. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 x 2, dengan faktor pertama adalah laju penurunan suhu (7, 13, dan 20°C/menit), dan faktor kedua adalah jenis pengencer (Sitrat dan Tris-kuning telur), setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Peubah yang diamati meliputi; motilitas, abnormalitas, keutuhan membran dan akrosom, daya tahan hidup spermatozoa selama 4 dan 7 jam, dan laju pemulihan spermatozoa pasca *thawing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang nyata ($P < 0,05$) antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap motilitas spermatozoa domba pasca *thawing*, Laju penurunan suhu 13°C/menit dan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan angka motilitas spermatozoa terbaik yaitu sebesar 52,53%. Sedangkan pada peubah lainnya tidak terdapat interaksi, yang melalui uji pengaruh faktor utama laju penurunan suhu 13°C/menit menunjukkan hasil berbeda sangat nyata ($P < 0,01$), dengan angka terbaik untuk abnormalitas, keutuhan membran dan akrosom, daya tahan hidup spermatozoa selama 4 dan 7 jam, serta laju pemulihan spermatozoa, berturut-turut sebesar 16,04; 42,88 dan 37,90%; 35; 54 dan 23,51%, serta 50,92%. Hasil uji pengaruh faktor utama jenis pengencer tris-kuning telur menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$), dengan angka terbaik abnormalitas, keutuhan membran dan akrosom, daya tahan hidup spermatozoa selama 4 dan 7 jam, serta laju pemulihan spermatozoa, masing-masing sebesar 19,05; 39,17 dan 35,86%; 32,30 dan 21,12%, serta 50,00%.

Kata kunci: Laju penurunan suhu, jenis pengencer, kualitas semen beku, domba Priangan

PENDAHULUAN

Pengawetan semen domba Priangan dalam bentuk penyimpanan beku (kriopreservasi) sel-sel germinal merupakan salah satu metode konservasi plasma nutfah

yang memiliki keunggulan spesifik. Melalui program inseminasi buatan, tingkat keberhasilan penyimpanan semen beku ini, dapat dijadikan tolok ukur yang signifikan. Berdasarkan fakta di lapang ternyata pengawetan semen domba melalui proses pembekuan,

memungkinkan menurunnya tingkat fertilitas bila dibandingkan dengan semen segar. Selanjutnya dikatakan pula bahwa motilitas spermatozoa pada semen sapi yang dibekukan mengalami penurunan sekitar 30-60% dibandingkan dengan semen segar (LAKE, 1966).

Beberapa jenis pengencer tris, sitrat, laktosa, dan lainnya telah digunakan dalam pembuatan semen beku. Pengencer tris memiliki kelebihan dari pengencer lainnya karena konsistensinya encer dan transparan, sehingga mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat pembekuan, tidak membatasi gerakan sel spermatozoa dan memudahkan dalam melakukan penilaian (SALISBURY dan VANDEMARK, 1985). Pengencer tris (hydroxymethyl-aminometan) terdiri atas tris, asam sitrat, fruktosa dan air memiliki spesifikasi sebagai pencegah perubahan pH, mempertahankan tekanan osmotik, menjaga keseimbangan elektrolit, mengikat butir-butir lemak, sumber energi, melindungi sel spermatozoa dari *cold shock* dan dapat mempertahankan daya hidup sel spermatozoa selama proses pengawetan. Adanya kuning telur dalam pengencer tris (hydroxymethyl-aminometan) akan melengkapi fungsinya dalam melindungi dan mempertahankan motilitas sel spermatozoa lebih baik pada saat terjadinya perubahan penurunan suhu dari 5 hingga -196°C (BEARDEN dan FUQUAY, 1984). Sementara itu, FOOTE (1978), menyatakan bahwa pengencer sitrat-kuning telur digunakan sebagai media hidup sel spermatozoa, karena semen itu sendiri mengandung sitrat natricus yang merupakan penyanggah bersifat isotonis, berguna bagi metabolisme sel, sebagai *buffer* dalam mempertahankan pH dan daya hidup sel sperma. Selanjutnya sitrat natricus akan mengikat logam kalsium dan logam berat lainnya serta mengkoagulasikan butir lemak pada kuning telur saat proses pembekuan berlangsung, sehingga spermatozoa mudah diobservasi dengan baik.

Pembekuan pada dasarnya adalah suatu proses pengeringan fisik di bawah titik beku. Bilamana suatu larutan dibekukan, maka zat pelarutnya berupa air akan membeku dan membentuk kristal-kristal es, sedangkan bahan terlarutnya tidak dapat bersatu dengan kristal-kristal es tersebut, melainkan berakumulasi semakin pekat. Kristal-kristal es yang terdapat di dalam sel sperma ini dapat merusak secara mekanik, sedangkan konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein pada dinding sel spermatozoa, sehingga pada saat pencairan kembali (*thawing*), permeabilitas membran selnya akan berubah dan mengakibatkan kematian sel (SALISBURY dan VANDEMARK, 1985).

Bahan pengencer tris dan laktosa-kuning telur dengan laju penurunan suhu pembekuan optimum yang

berada pada kisaran $13-24^{\circ}\text{C}/\text{menit}$, memberikan angka motilitas spermatozoa paling tinggi, bila dibandingkan bahan pengencer sitrat-kuning telur dengan laju penurunan suhu pembekuan $24^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Hal ini terjadi karena pembentukan kristal-kristal es intraseluler selama proses pembekuan pada bahan pengencer tris dan laktosa kuning telur bertekstur lebih halus, sehingga kerusakan fisik sel sperma dapat dihindari. Sementara itu, kristal-kristal es intraseluler yang terbentuk pada bahan pengencer sitrat kuning telur berukuran lebih kasar, dan dapat menyebabkan kerusakan sel spermatozoa secara fisik (ROBBINS *et al.*, disitasi SALAMON dan MAXWELL, 1995).

Motilitas dan keutuhan akrosom spermatozoa yang dibekukan dengan kecepatan penurunan suhu $16^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ pada media sitrat-kuning telur nyata lebih tinggi sebesar 50,17% dibandingkan dengan penurunan suhu yang sama pada media laktosa kuning telur sebesar 45,23%. Sementara keutuhan akrosom pada media laktosa-kuning telur dengan laju pembekuan 10 dan $24^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ nyata lebih rendah dibandingkan dengan laju pembekuan $16^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ pada media yang sama (PARK dan PURSEL, 1985). Selanjutnya motilitas dan keutuhan akrosom spermatozoa yang dibekukan dengan menggunakan tris kuning telur pada metode lambat ($7,25^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) memberikan hasil yang sama dengan laju penurunan suhu pada metode sedang ($13,3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) yaitu sekitar 56,6%, dan ternyata lebih besar bila dibandingkan metode pembekuan cepat ($30,9^{\circ}\text{C}/\text{menit}$), sehingga ditemukan laju penurunan suhu optimum sekitar $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ (SENGER *et al.*, 1983).

Motilitas dan integritas akrosom spermatozoa yang dibekukan pada media pengencer laktosa-kuning telur dengan metode pembekuan lambat dan cepat memberikan hasil yang lebih rendah, dibandingkan dengan media pengencer tris-kuning telur pada laju pembekuan yang sama. Sementara itu, pada metode pembekuan optimum dengan kedua jenis pengencer tersebut memberikan hasil yang lebih tinggi (VISSER dan SALAMON, 1974; SENGER *et al.*, 1983). Laju penurunan suhu, kadar krioprotektan, dan jenis bahan pengencer, serta komponen lainnya berinteraksi sangat erat dalam mempengaruhi kualitas semen yang dibekukan. Dengan demikian berarti bahwa setiap terjadi perlakuan laju penurunan suhu pembekuan dengan jenis pengencer yang berbeda akan memberikan respon terhadap kualitas semen beku yang berbeda pula (ENWISTLE dan MARTIN, 1972).

Penelitian dimaksudkan untuk mengetahui interaksi serta pengaruh dari laju penurunan suhu pembekuan dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba Priangan pasca *thawing*.

MATERI DAN METODE

Penampungan semen

Penampungan semen dilakukan dengan vagina buatan yang terdiri atas tabung karet yang berlubang pentil, karet *inner liner*, karet pengikat, corong karet, dan tabung penampung berskala. Air panas (40-52°C) dimasukkan ke dalam vagina buatan melalui lubang pentil hingga mencapai setengah bagian, kemudian lubang pentil ditutup dan dipompa. Kekenyalan vagina buatan diukur dengan jari jika dirasakan cukup, karet bagian luar vagina buatan diberi vaselin hingga 1/3 bagian panjangnya. Domba betina pemancing (*teaser*) dimasukkan ke dalam *service create*, selanjutnya domba pejantan dibiarkan mendekati domba betina pemancing beberapa kali untuk meningkatkan libido dan setelah domba pejantan menaiki pemancing, bagian preputium dipegang, ujung penis diarahkan ke lubang vagina buatan dengan posisi miring. Semen yang tertampung segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Pengenceran semen

Setelah diketahui jumlah volume pengencer sampel semen dibagi dua bagian, satu bagian diencerkan dengan Sitrat-kuning telur dan satu bagian lagi diencerkan Tris-kuning telur melalui metode pengenceran satu tahap (*one step method*). Pengenceran dengan metode satu tahap, dilakukan dengan cara memasukkan pengencer melalui dinding gelas erlenmeyer yang berisi semen secara perlahan hingga seluruh pengencer tercampur homogen. Pencampuran antara semen segar dan pengencer dilakukan pada suhu kamar atau menggunakan *water bath* bersuhu 30°C.

Ekuilibrasi

Proses ekuilibrasi dilakukan setelah sampel semen dicampur dengan masing-masing bahan pengencer pada gelas erlenmeyer yang telah diberi label SKT (sitrat-kuning telur) dan TKT (tris-kuning telur), berlangsung selama 2 jam di dalam lemari pendingin (*refrigerator*) bersuhu 5°C. Selama proses ekuilibrasi berlangsung, sampel semen pada setiap perlakuan pengencer sitrat dan tris-kuning telur dilakukan penambahan gliserol sebanyak 7% dari total volume pengencer secara perlahan-lahan melalui dinding gelas erlenmeyer (proses gliserolisasi) sampai seluruhnya tercampur merata.

Pengisian *straw* (*packing*)

Pengisian *straw* dilakukan dengan menggunakan *filler* (mikropipet) yang dihubungkan dengan slang

plastik pada alat penghisap. Bagian ujung *ministrav* yang terbuka ditutup dengan *cryoseal* atau alat *sealer*. *Ministrav* dibedakan dalam tiga warna yaitu biru untuk tingkat perlakuan laju penurunan suhu 7°C/menit; kuning untuk tingkat perlakuan laju penurunan suhu 13°C/menit, dan merah untuk tingkat perlakuan laju penurunan suhu 20°C/menit. Sedangkan untuk membedakan jenis pengencer *straw* ditandai kertas label SKT dan TKT, setiap perlakuan diulang 4 kali.

Pembekuan semen

Pembekuan semen dilakukan secara manual menggunakan kotak *styrofoam*, yang dibagi menjadi tiga ruang pembekuan yang sama. Di dalam setiap ruang pembekuan terdapat wadah aluminium penampung N₂ cair, dan rak tempat *straw* dengan ketinggian berbeda, berturut-turut 10, 11 dan 12 cm dari permukaan N₂ cair. Bagian atas kotak *styrofoam* diisolasi dengan kaca setebal 5 mm, dan pada setiap ruangan diberi lubang untuk memasukkan sensor thermometer digital saat mengamati suhu pembekuan. Proses pembekuan pada setiap ruangan, diawali dengan menuangkan N₂ cair ke dalam wadah aluminium pada setiap ruang pembekuan setinggi 5 cm. Selanjutnya *straw* diletakkan pada rak-rak yang ada, dengan bagian atas ditutup kaca sebagai *isolator*. Untuk memperoleh suhu pembekuan yang berbeda, *straw* dibekukan hingga -80°C pada tiga tingkat suhu uap N₂ yaitu -95, -105, dan -135°C, yaitu dengan cara mengatur ketinggian rak tempat *straw* dari permukaan N₂ cair, setinggi 12, 11, dan 10 cm. *Straw* warna biru dibekukan pada ketinggian rak 12 cm di atas permukaan N₂ cair, selama 2 menit 50 detik, *straw* kuning pada ketinggian rak 11 cm selama 1 menit 55 detik, dan *straw* merah pada ketinggian 10 cm selama 1 menit 45 detik, hingga mencapai suhu pembekuan -80°C.

Evaluasi semen beku

Evaluasi semen beku dilakukan setelah *straw* di *thawing* di dalam *minitub* bersuhu 39°C selama 2 menit, sampai semen dalam *straw* benar-benar mencair, kemudian sampel semen dikeluarkan untuk dievaluasi secara mikroskopis sesuai dengan peubah yang diamati.

Desain penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 2x3. Faktor I, laju penurunan suhu pembekuan (7, 13 dan 20°C/menit), dan faktor II, dua jenis pengencer semen (tris dan sitrat-kuning telur) dengan krioprotektan gliserol 7%. Data hasil pengamatan dianalisis dengan metode sidik ragam klasifikasi dua arah, selanjutnya untuk mengetahui

perbedaan antar rataan setiap perlakuan dilakukan uji jarak berganda Duncan.

Peubah penelitian

Peubah yang diamati yaitu peubah bebas meliputi laju penurunan suhu dan jenis bahan pengencer, serta peubah tak bebas yang meliputi pengujian kualitas semen. Evaluasi semen beku dilakukan terhadap peubah 1) Motilitas progresif, 2) Abnormalitas, 3) Keutuhan membran, 4) Keutuhan akrosom, 5) Daya tahan hidup sperma (*Water Incubation Test*), dan 6) Laju pemulihan (*Recovery rate*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar domba Priangan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan melalui evaluasi semen segar, baik secara mikroskopis maupun makroskopis diperoleh rataan karakteristik semen segar domba Priangan, seperti disajikan pada Tabel 1.

Hasil penampungan semen selama penelitian diperoleh rataan volume semen segar yang berkisar antara 0,85-0,87 ml per ejakulat, sesuai dengan standar volume semen domba yang berkisar antara 0,8-1,2 ml per ejakulat (TOELIHERE, 1985; GARNER dan HAFEZ, 1980). Rataan derajat keasaman (pH) semen segar domba Priangan yang diamati berkisar antara 6,8-7,2, sesuai dengan standar derajat keasaman semen domba yang dapat diolah menjadi semen beku yaitu 6,2-7,8 (HAFEZ, 1987).

Tabel 1. Rataan karakteristik semen segar domba Priangan

Karakteristik semen	Nilai rataan
Volume (ml)	0,85-0,87
pH	6,8-7,2
Warna	krem
Bau	khas anyir
Konsistensi	kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi (juta spermatozoa/ml)	3897-4107
Motilitas progresif (%)	86-87
Abnormalitas (%)	8,3-8,7

Hasil evaluasi secara makroskopis terhadap warna, bau, dan konsistensi semen segar domba Priangan yang diamati menunjukkan rataan hasil penilaian yang sama dengan hasil pengamatan EVAN dan MAXWELL (1987), yang menyatakan bahwa warna semen segar pada

domba yang normal adalah putih susu sampai krem, baunya khas atau spesifik, dengan konsistensi atau derajat kekentalan dari encer hingga kental. Konsistensi semen berhubungan erat dengan warna semen, warna semen krem berarti konsistensinya kental, sedangkan bila warna semen krem keputihan sampai putih konsistensinya encer. Selanjutnya warna semen berkaitan erat dengan konsentrasi dan kelainan patologis pada semen yang diamati. Semen yang berwarna putih kekuning-kuningan menunjukkan adanya pigmen riboflavin yang diturunkan secara genetik, warna semen krem kehijau-hijauan adanya kontaminasi mikroba atau kotoran pada saat penampungan, dan warna kecoklat-coklatan ditimbulkan karena adanya dekomposisi darah yang berasal dari saluran reproduksi (TOELIHERE, 1985; HAFEZ, 1987).

Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap gerakan massa semen segar domba yang diamati menunjukkan rataan gerakan massa +++, yang diperlihatkan dengan adanya gelombang awan hitam, gelap, tebal dan pergerakannya cepat, ini berarti bahwa semen tersebut memiliki pergerakan massa yang cukup baik untuk diolah menjadi semen beku. Seperti dinyatakan PARTODIHARDJO (1980) gerakan massa berhubungan erat dengan konsentrasi dan motilitas spermatozoa bila semen segar memiliki gerakan massa +++ artinya tingkat kepadatan spermatozoa tinggi, gelombang bergerak cepat, dan diperkirakan terdapat 90% bahkan lebih spermatozoa yang aktif.

Rataan konsentrasi spermatozoa yang diamati berkisar antara 3610-3857 juta sel/ml semen segar, sedikit lebih rendah dari hasil pengamatan EVAN dan MAXWELL (1987), karena domba yang dipergunakan dalam penelitiannya berukuran lebih besar. Selanjutnya CAMERON dan FAIRNIE (1984), menyatakan bahwa konsentrasi sperma dalam semen memiliki nilai korelasi positif dengan angka konsepsi, bila konsentrasi sperma di dalam semen domba sekitar 6000 juta sel/ml dapat dipastikan memiliki angka konsepsi sebesar 95%, dan di bawah angka konsentrasi tersebut angka konsepsinya hanya sebesar 35%. Konsentrasi, volume, dan motilitas spermatozoa, menentukan jumlah dosis inseminasi, berdasarkan perhitungan berapa jumlah pengencer serta betina yang dapat diinseminasi dalam satu ejakulat (TOELIHERE, 1985; HAFEZ, 1987).

Rataan motilitas progresif sel spermatozoa pada semen domba segar yang diamati berkisar antara 85,0-87%, yang lebih tinggi dari hasil pengamatan GARNER dan HAFEZ (1980) dikatakan bahwa semen domba yang baik memiliki persentase sperma motil antara 60-80%, dari angka tersebut dapat diidentifikasi bahwa semen tersebut memiliki tingkat fertilitas yang tinggi, dan semennya dapat diproses menjadi semen beku. Seperti halnya konsentrasi dan volume semen, motilitas progresif spermatozoa juga akan menentukan jumlah

dosis inseminasi yang berpengaruh terhadap tingginya angka konsepsi. Lebih jelas dikatakan CAMERON dan FAIRNIE (1984), bahwa motilitas spermatozoa sebesar 59,3% masih memberikan hasil yang cukup baik terhadap angka konsepsi pada domba yang bersifat prolifrik, sedangkan bagi domba yang tidak prolifrik angka konsepsinya akan lebih rendah. Abnormalitas spermatozoa pada semen domba yang diamati, secara morfologi tidak menunjukkan adanya abnormalitas primer, namun lebih terlihat sebagai penilaian abnormalitas sekunder seperti kelainan melipatnya ekor, kepala putus, atau ekornya putus. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa domba yang diamati berkisar antara 8,3-8,7%, hal ini menunjukkan bahwa semen tersebut sangat baik untuk diproses menjadi semen beku dan semen dapat dinyatakan fertil. Seperti dikatakan TOELIHERE (1985), bahwa abnormalitas spermatozoa yang melampaui angka 14% menunjukkan adanya gejala infertilitas atau ketidaksuahan seekor pejantan, sedangkan menurut HAFEZ (1987), jumlah spermatozoa abnormal dalam semen hingga mencapai 20% tidak akan menyebabkan penurunan angka fertilitas. Hasil uji

analisis dan signifikansinya pada berbagai peubah disajikan pada Tabel 2.

Motilitas sperma

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan adanya interaksi yang nyata ($P < 0,05$) antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap motilitas spermatozoa pasca *thawing*. Berdasarkan Tabel 2, nilai rata-rata motilitas spermatozoa pada tingkat perlakuan laju penurunan suhu 13°C/menit lebih tinggi sebesar 52,53%, dibandingkan laju penurunan suhu 20 dan 7°C/menit yang berturut-turut sebesar 46,13 dan 42,04%. Selanjutnya rata-rata motilitas spermatozoa pada perlakuan jenis pengencer, Tris-kuning telur memberikan hasil lebih tinggi sebesar 49,64% dibandingkan tingkat perlakuan jenis pengencer Sitrat kuning telur sebesar 44,83%. Hasil uji beda nyata terkecil (LSD), menunjukkan bahwa tingkat perlakuan jenis pengencer sitrat-kuning telur pada setiap laju

Tabel 2. Rangkuman hasil penelitian kualitas semen beku domba Priangan (%)

Parameter	Jenis parameter	Laju penurunan suhu (°C/menit)			Rataan
		7	13	20	
Motilitas	SKT	42,45	46,49	45,54	44,87 ^x
	TKT	43,63	58,57	46,71	49,64 ^y
	Rataan	43,04 ^a	52,53 ^b	46,13 ^a	
Abnormalitas	SKT	23,19	17,01	24,81	21,67 ^x
	TKT	22,89	15,07	19,20	19,05 ^y
	Rataan	23,04 ^a	16,04 ^b	22,01 ^a	
MPU	SKT	31,41	38,30	35,20	34,97 ^x
	TKT	35,97	47,46	34,09	39,17 ^y
	Rataan	33,69 ^a	42,88 ^b	34,65 ^a	
TAU	SKT	31,95	34,35	31,16	32,49 ^x
	TKT	30,44	41,45	35,70	35,86 ^y
	Rataan	31,20 ^a	37,90 ^b	33,43 ^a	
WIT 4 jam	SKT	28,47	31,84	27,49	29,27 ^x
	TKT	28,56	39,24	29,11	32,30 ^y
	Rataan	28,52 ^a	35,54 ^b	28,30 ^a	
WIT 7 jam	SKT	17,47	20,34	17,22	18,34 ^x
	TKT	17,19	26,68	19,48	21,12 ^y
	Rataan	17,33 ^a	23,51 ^b	18,35 ^a	
Recovery rate	SKT	43,60	47,00	45,68	45,43 ^x
	TKT	47,32	54,84	47,84	50,00 ^y
	Rataan	45,46 ^a	50,92 ^b	46,76 ^a	

Huruf sama pada baris atau kolom yang sama tidak berbeda nyata ($P < 0,05$)

pembekuan 7, 13 dan 20°C/menit tidak menunjukkan perbedaan, sedangkan jenis pengencer tris-kuning telur pada laju suhu pembekuan 13°C/menit nyata lebih tinggi dibandingkan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit, namun antara perlakuan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit tidak menunjukkan adanya perbedaan. Pengaruh tingkat perlakuan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit pada jenis pengencer sitrat dan tris-kuning telur tidak menunjukkan perbedaan, sedangkan tingkat perlakuan laju pembekuan 13°C/menit dengan jenis pengencer tris-kuning telur nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan jenis pengencer sitrat-kuning telur pada laju pembekuan yang sama. Dapat disimpulkan bahwa kombinasi perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur dengan laju penurunan suhu 13°C/menit memberikan respon yang paling baik terhadap motilitas spermatozoa domba pasca *thawing*.

Pengencer tris-kuning telur merupakan jenis pengencer yang memiliki titik beku lebih rendah sebesar -15°C daripada pengencer sitrat-kuning telur sebesar -12°C, dengan demikian perbedaan titik beku tersebut berhubungan erat dengan kecepatan laju penurunan suhu dan proses pembentukan kristal-kristal es, serta tingkat keseimbangan tekanan osmotik sebagai akibat perbedaan konsentrasi elektrolit intraseluler dan ekstraseluler. Mekanisme pembentukan kristal-kristal es pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur dan laju penurunan suhu pembekuan 7, 13 dan 20°C/menit, terjadi lebih lambat dengan ukuran kristal yang halus. Disamping mencegah terjadinya proses dehidrasi sel spermatozoa selama proses pembekuan berlangsung, sehingga kerusakan fisik maupun kimia sel spermatozoa dapat dikurangi. Sedangkan pada tingkat perlakuan jenis pengencer sitrat-kuning telur pada laju penurunan suhu pembekuan yang sama memberikan angka motilitas lebih rendah. Perbedaan titik beku pada jenis pengencer tersebut menyebabkan kerusakan sel secara fisik maupun kimia lebih tinggi, sebagai akibat percepatan pembentukan kristal-kristal es dengan ukuran lebih kasar dan terjadinya proses dehidrasi karena pengeluaran cairan intraseluler akibat keseimbangan tekanan osmotik intra dan ekstraseluler terganggu, sehingga sel spermatozoa mengalami kerusakan secara fisik maupun kimia.

Seperti dikemukakan MOLOVA (1983), jenis pengencer tris-kuning telur pada laju penurunan suhu optimum memberikan hasil persentase motilitas spermatozoa paling tinggi dibandingkan dengan jenis pengencer lain pada laju penurunan suhu yang sama. Hal ini terjadi karena pembentukan kristal es intraseluler selama proses pembekuan pada jenis pengencer tris-kuning telur, bertekstur lebih halus, dan tingkat kerusakan sel dapat dihindari. Sedangkan pembentukan kristal es intraseluler yang terjadi pada jenis pengencer sitrat-kuning telur bertekstur lebih kasar dan dapat menyebabkan kematian sel spermatozoa

secara fisik, sehingga angka motilitas yang diperoleh lebih rendah. Motilitas dan integritas akrosoma dapat dipertahankan pada tingkat laju penurunan suhu optimum yang berada pada kisaran 13°C/menit, di samping penggunaan jenis pengencer yang mampu melindungi dan mempertahankan kehidupan spermatozoa seperti halnya jenis pengencer tris dengan bahan pelindung (krioprotektan) gliserol, selama proses pengawetan beku (kriopreservasi) berlangsung (KWON *et al.*, 2002). Kerusakan sel spermatozoa sebagai akibat metode pembekuan lambat, adalah keluarnya air yang cukup banyak untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi intra dan ekstraseluler. Akibatnya sel mengalami dehidrasi, konsentrasi larutan intraseluler meningkat dan spermatozoa menjadi rusak. Sedangkan bila sel spermatozoa dibekukan dengan metode cepat, maka keseimbangan potensial akan terganggu dan bagian intraseluler membeku menjadi kristal es yang halus. Mekanisme pembekuan ini menyebabkan sel tidak mampu mengeluarkan air dengan cepat sehingga kristal es dapat merusak integritas sel yang menyebabkan melemahnya daya gerak, bahkan sampai menyebabkan kematian sel spermatozoa (SUPRIATNA dan FACHRIYAN, 1992).

Abnormalitas sperma

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan tidak terdapat interaksi antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap abnormalitas spermatozoa. Terdapat pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dari laju penurunan suhu dan pengaruh nyata ($P < 0,05$) dari jenis pengencer terhadap abnormalitas spermatozoa domba Priangan pasca *thawing*. Laju penurunan suhu 13°C/menit memberikan hasil nilai rata-rata abnormalitas lebih rendah yaitu sebesar 16,04%, dibandingkan perlakuan laju pembekuan 20 dan 7°C/menit, yang secara berturut-turut adalah sebesar 22,01% dan 23,04%. Selanjutnya rata-rata abnormalitas spermatozoa paling rendah dicapai pada tingkat perlakuan jenis pengencer Tris-kuning telur sebesar 19,05% dibanding tingkat perlakuan jenis pengencer Sitrat kuning telur yaitu sebesar 21,67%. Hasil uji jarak berganda Duncan, menunjukkan tingkat perlakuan laju suhu pembekuan memiliki respon yang cukup besar terhadap angka abnormalitas spermatozoa selama pembekuan. Tingkat perlakuan laju pembekuan 13°C/menit sangat nyata lebih rendah dibandingkan dengan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit. Antara perlakuan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit tidak menunjukkan perbedaan nyata terhadap abnormalitas spermatozoa. Angka abnormalitas spermatozoa pada jenis pengencer sitrat-kuning telur nyata lebih tinggi dibandingkan tris-kuning telur. Hal ini terjadi karena pada tingkat laju pembekuan lambat maupun cepat pada media yang berbeda akan berpengaruh sekali pada tingkat

abnormalitas spermatozoa sebagai akibat terjadinya perubahan fisik media hidupnya, baik perubahan tekanan osmotik, maupun pembentukan kristal-kristal es intraseluler. Hal tersebut dapat menyebabkan perubahan struktur spermatozoa seperti bentuk spermatozoa yang ekornya membengkok atau kepala terlepas. Fluktuasi perubahan suhu pembekuan dan pada saat *thawing* akan mengurangi proporsi spermatozoa motil dan menyebabkan kerusakan ultrastruktural, biokimia dan fungsional.

Pengencer Tris-kuning telur merupakan media hidup spermatozoa yang mampu menjaga integritas dan motilitas spermatozoa selama pembekuan dan pasca *thawing*. Hal tersebut disebabkan pengencer bersifat dapat mencegah tekanan osmotik yang hipotonis terhadap membran sel yang menyebabkan leher spermatozoa membengkok. Dengan perkataan lain efek pembekuan terlalu cepat maupun lambat dapat dikurangi, sehingga kelainan morfologi spermatozoa lebih rendah (SALAMON dan MAXWELL, 1995). Selanjutnya penambahan pengencer dan pendinginan semen dari suhu kamar ke 5°C, ke suhu pembekuan sebenarnya mengakibatkan spermatozoa mengalami abnormalitas dengan mitokondria membengkok, penyusutan spermatozoa, dan ekor melingkar. Penyebab spermatozoa membengkok dan pecah serta membengkaknya membran spermatozoa diakibatkan tekanan osmotik yang hipotonis. Tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan bagian leher spermatozoa membengkok (*neck bent*) atau spermatozoa yang membengkok (*bent spermatozoa*) sedangkan penyusutan spermatozoa diakibatkan keluarnya cairan dari badan sel spermatozoa (PACC *et al.*, 1981).

Membran plasma utuh (MPU)

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan tidak terdapat interaksi antara kedua perlakuan. Namun terdapat pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dari laju penurunan suhu, dan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) dari perlakuan jenis pengencer terhadap keutuhan membran spermatozoa pasca *thawing*. Dari Tabel 2, terlihat bahwa laju penurunan suhu 13°C/menit memberikan angka rataan keutuhan membran spermatozoa lebih tinggi sebesar 42,88%, dibandingkan laju penurunan suhu 20 dan 7°C/menit, berturut-turut sebesar 34,65 dan 33,69%. Perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan hasil rataan keutuhan membran spermatozoa lebih tinggi sebesar 39,17% dibandingkan pengencer sitrat-kuning telur sebesar 34,97%. Berdasarkan uji jarak berganda Duncan keutuhan membran sel spermatozoa pada tingkat perlakuan laju pembekuan 13°C/menit nyata lebih tinggi dibandingkan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit, namun antara perlakuan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit masing-masing tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Selanjutnya keutuhan membran sel spermatozoa pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan jenis pengencer sitrat-kuning.

Kerusakan membran sel spermatozoa pada saat pembekuan dengan metode lambat (7°C/menit) terjadi karena adanya dehidrasi akibat perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler. Hal tersebut menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga selubung lipoproteinnya pecah dan membran sel mengalami kerusakan. Sedangkan pembekuan dengan metode cepat (20°C/menit) akan membentuk kristal-kristal es intraseluler yang akan mendesak membran sel ke segala arah, sehingga selaput membrannya pecah dan substansi kimia sel sperma keluar. Selanjutnya pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan angka keutuhan membran sel spermatozoa lebih baik dibandingkan dengan sitrat-kuning telur. Hal ini karena pembentukan kristal-kristal es intra dan ekstraseluler lebih lambat dan ukurannya lebih halus. Disamping itu pula perubahan tingkat konsentrasi elektrolit di dalam dan di luar sel menunjukkan adanya keseimbangan, sehingga permeabilitas dinding sel dapat dipertahankan selama proses pembekuan berlangsung (MOLOVA, 1983).

Tudung akrosom utuh (TAU)

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap keutuhan akrosom spermatozoa domba pasca *thawing*. Terdapat pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dari laju penurunan suhu dan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) dari jenis pengencer terhadap keutuhan akrosom spermatozoa. Berdasarkan Tabel 2, laju penurunan suhu 13°C/menit memberikan hasil rataan keutuhan akrosom lebih tinggi sebesar 37,90% dibandingkan laju penurunan suhu 7 dan 20°C/menit berturut-turut sebesar 31,20 dan 33,43%. Selanjutnya perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan persentase rataan keutuhan akrosom yang paling tinggi sebesar 35,86%, dibandingkan jenis pengencer Sitrat-kuning telur sebesar 32,49%.

Hasil uji jarak berganda Duncan, menunjukkan bahwa keutuhan akrosom sel spermatozoa domba pada tingkat perlakuan laju pembekuan 13°C/menit nyata lebih tinggi dibandingkan laju pembekuan 7 dan 20°C/menit. Namun antara laju pembekuan 7 dan 20°C/menit tidak menunjukkan perbedaan. Tingkat keutuhan akrosom pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan jenis pengencer sitrat-kuning telur.

Metode pembekuan lambat (7°C/menit) menyebabkan kerusakan sel spermatozoa karena

terjadinya proses dehidrasi akibat perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler. Keadaan tersebut menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga selubung lipoproteinnya pecah dan membran sel mengalami kerusakan. Sedangkan pada pembekuan metode cepat ($20^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) terjadi pembentukan kristal-kristal es intraseluler dengan cepat dan secara fisik akan mendesak membran sel ke segala arah. Sebagai konsekuensinya selaput membrannya pecah dan substansi kimia sel spermatozoa keluar, yang pada gilirannya akan berdampak pada kerusakan akrosom. Selanjutnya perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan angka keutuhan akrosom lebih baik dibandingkan dengan pengencer sitrat-kuning telur. Hal ini terjadi karena jenis pengencer tris-kuning telur mampu melindungi motilitas dan integritas akrosom dari perlakuan suhu pembekuan, terutama pada tingkat laju penurunan suhu pembekuan optimum ($13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$). Seperti dikemukakan KWON *et al.* (2002), motilitas dan integritas akrosom spermatozoa dapat dipertahankan pada tingkat laju penurunan suhu optimum yang berada pada kisaran $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Penggunaan jenis pengencer mampu melindungi dan mempertahankan kehidupan spermatozoa seperti halnya jenis pengencer tris yang berbahan pelindung (krioprotektan) gliserol, selama proses pengawetan beku (kriopreservasi) berlangsung. Integritas akrosom dapat dipengaruhi oleh perubahan fisik maupun kimia pengencer, serta proses pembekuan yang terlalu ekstrim. Kerusakan akrosom ini tidak selalu menimbulkan kematian pada spermatozoa, tetapi sangat berpengaruh terhadap daya fertilitas spermatozoa. Selanjutnya disebutkan kerusakan akrosom sebesar 15-25% pada semen yang diolah menjadi semen beku akan menyebabkan infertilitas (CAMERON dan FAIRNIE, 1984).

Daya tahan hidup sperma selama 4 dan 7 jam

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap daya tahan hidup spermatozoa selama penyimpanan 4 dan 7 jam. Terdapat pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dari laju penurunan suhu dan pengaruh nyata ($P < 0,05$) dari jenis pengencer terhadap keutuhan akrosom spermatozoa. Dari Tabel 2, terlihat bahwa daya tahan spermatozoa domba selama penyimpanan 4 jam tertinggi dicapai pada laju penurunan suhu $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sebesar 35,54%, disusul kemudian oleh laju penurunan suhu 7 dan $20^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ berturut-turut sebesar 28,52 dan 28,30%. Selanjutnya rata-rata daya tahan spermatozoa 7 jam tertinggi dicapai pada laju penurunan suhu $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ yaitu sebesar 23,51%, kemudian disusul oleh laju penurunan suhu 20 dan $7^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ yang secara berturut-turut sebesar 18,35 dan 17,33%. Selanjutnya rata-rata daya tahan 4 jam

spermatozoa pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur paling tinggi sebesar 21,12%, dibandingkan jenis pengencer sitrat-kuning telur sebesar 18,34%. Daya tahan hidup spermatozoa 7 jam tertinggi dicapai pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur sebesar 32,30%, dibandingkan jenis pengencer sitrat-kuning telur yaitu sebesar 29,27%.

Tingkat motilitas dan integritas spermatozoa dapat dipertahankan pada laju penurunan suhu optimum yang berada pada kisaran $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Disamping penggunaan jenis pengencer yang mampu melindungi dan mempertahankan kehidupan spermatozoa seperti halnya jenis pengencer tris dengan bahan pelindung (krioprotektan) gliserol, tingkat motilitas dan integritas spermatozoa dapat dipertahankan selama proses pengawetan beku (kriopreservasi) berlangsung (KWON *et al.*, 2002). Seperti dinyatakan NORMAN (1988) dan LEUNG (1991), bahwa proses pembekuan cepat maupun lambat, dapat menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi garam atau elektrolit yang menyebabkan perubahan tekanan osmotik dan diindikasikan dengan keluarnya cairan intraseluler secara cepat yang dapat merusak selubung lipoprotein sel spermatozoa. Rusaknya selubung lipoprotein ini akan menyebabkan mantel pelindung pecah, akibatnya substansi intraselulernya keluar dan spermatozoa kehilangan daya motilitasnya.

Laju pemulihan sperma (*recovery rate*)

Hasil analisis sidik ragam, menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap laju pemulihan spermatozoa domba pasca *thawing*. Terdapat pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) dari laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap laju pemulihan spermatozoa. Berdasarkan Tabel 2, laju pemulihan spermatozoa domba tertinggi dicapai pada laju penurunan suhu $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sebesar 50,92%, disusul kemudian oleh laju penurunan suhu 7 dan $20^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ berturut-turut sebesar 46,76 dan 45,46%. Selanjutnya rata-rata laju pemulihan pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur paling tinggi yaitu sebesar 50,00%, dibandingkan jenis pengencer sitrat-kuning telur sebesar 45,43%. Namun perlakuan laju penurunan suhu dan jenis pengencer berpengaruh nyata ($P < 0,05$), terhadap laju pemulihan spermatozoa domba selama penelitian.

Hasil uji jarak berganda Duncan, laju pemulihan spermatozoa pada tingkat perlakuan laju pembekuan $13^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ nyata lebih tinggi dibandingkan dengan laju pembekuan 7 dan $20^{\circ}\text{C}/\text{menit}$, namun antara perlakuan laju pembekuan 7 dan $20^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ tidak menunjukkan perbedaan. Laju pemulihan spermatozoa pasca *thawing* pada tingkat perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur nyata lebih tinggi dibandingkan jenis pengencer sitrat-kuning telur.

Metode pembekuan lambat (7°C/menit) menyebabkan kerusakan sel spermatozoa karena terjadinya proses dehidrasi akibat perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler. Hal tersebut menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga selubung lipoproteinya pecah dan membran sel mengalami kerusakan. Sedangkan pada pembekuan metode cepat (20°C/menit) terjadi pembentukan kristal-kristal es intraseluler dengan cepat dan secara fisik akan mendesak membran sel ke segala arah. Konsekuensinya selaput membrannya pecah dan substansi kimia sel spermatozoa keluar, yang pada gilirannya akan berdampak pada penurunan tingkat motilitasnya setelah pembekuan berlangsung.

Jenis pengencer tris-kuning telur merupakan jenis pengencer yang mampu melindungi dan mempertahankan kehidupan spermatozoa selama proses pembekuan dibandingkan pengencer sitrat-kuning telur. Angka motilitas setelah pembekuan pada perlakuan jenis pengencer tris-kuning telur lebih tinggi. Tingkat motilitas dan integritas spermatozoa dapat dipertahankan pada laju penurunan suhu optimum pada kisaran 13°C/menit.

Selanjutnya dikatakan pula bahwa kerusakan sel akibat pembekuan dapat terjadi karena dehidrasi, peningkatan konsentrasi elektrolit, serta terbentuknya kristal es intraseluler yang dapat mempengaruhi permeabilitas dinding sel (KWON *et al.*, 2002), dan pada akhirnya spermatozoa kehilangan daya motilitasnya. Hilangnya daya motilitas spermatozoa selama proses pembekuan akan berpengaruh terhadap laju pemulihan (*recovery rate*) sperma setelah mengalami pencairan kembali.

KESIMPULAN

Terdapat interaksi antara perlakuan laju penurunan suhu 13°C/menit dan jenis pengencer tris-kuning telur memberikan respon yang sangat baik terhadap motilitas spermatozoa domba Priangan pasca *thawing*. Tingkat perlakuan laju penurunan suhu 13°C/menit dan tris-kuning telur, memberikan respons yang paling baik dibandingkan dengan tingkat perlakuan lainnya terhadap motilitas, abnormalitas, keutuhan membran dan akrosom, daya tahan spermatozoa selama 4 dan 7 jam pasca *thawing*, serta laju pemulihan spermatozoa domba Priangan pasca *thawing*.

Dari hasil penelitian ini, disarankan penggunaan kombinasi perlakuan laju penurunan suhu 13°C/menit dan jenis pengencer tris-kuning telur dapat dijadikan sebagai informasi dasar bagi pengolahan semen beku agar diperoleh kualitas semen beku domba paling baik, dan diharapkan memiliki tingkat fertilitas yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- BEARDEN, H.J. and J.W. FUQUAY. 1984. Applied Animal Reproduction. 2nd Ed. Rest and Publishing Co. Inc. A Prentice Hall Company. Virginia. pp. 196-199.
- CAMERON, A.W.N. and I.J. FAIRNIE. 1984. Semen quality, quantity and flock fertility. *In: Reproduction in Sheep*. LINDSAY (Ed). Cambridge University Press. London, New York. *Agri*. 64: 79-84.
- ENTWISTLE, K.W. and I.C.A. MARTIN. 1972. Effect of composition of diluent, method of addition of glycerol, freezing rate, and storage temperature on the revival of ram spermatozoa after deep freezing. *Aust. Bio. Sci.* 25: 379-386.
- EVANS, G. and W.M.C. MAXWELL. 1987. Salmon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Australia. pp. 122-139.
- FOOTE, R.H. 1978. Artificial insemination. *In: Reproduction of Farm Animals*. E.S.E. HAFEZ (Ed). 3th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 409-431.
- GARNER, D.L. and E.S.E. HAFEZ. 1980. Spermatozoa. *In: Reproduction in Farm Animals*. E.S.E. HAFEZ (Ed). 4th Edition Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 167-188.
- HAFEZ, E.S.E. 1987. Semen evaluation. *In: Reproduction in Farm Animals*. E.S.E. HAFEZ (Ed). 5th Edition. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 22: 466.
- KWON, A.Y., H.J. KO and C.S. PARK. 2002. Effect of diluent component, freezing rate, thawing time, and thawing temperature on AC acrosoma morphology, and motility of frozen thawed boar semen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15: 247-249.
- LAKE, P.E. 1966. Physiology and biochemistry of fowl semen. *In: Advance in Reproduction Physiology*. ANNE MCLAREN (Ed). Logos Academic Press. pp. 93-123.
- LEUNG, L.K.P. 1991. Principles of biological cryopreservation. *In: Fish Evolution and Systematics*. JAMIESON (Ed). Evidence From Spermatozoa. Cambridge University Press. London, New York. 14: 231-244.
- MOLOVA, 1983. Tris based diluent I. Improved protective effect on acrosom integrity. *In: Frozen Storage of Ram Semen Processing Freezing, Thawing, and Fertility after Cervical Insemination*. SALAMON dan MAXWELL (Ed.). Department of Animal Science, University of Sydney, Australia. p. 216.
- NORMAN, W.D. 1988. The technology of food preservation. 3rd Edition. Diterjemahkan oleh MUCHJI MULYOHARDJO. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Salemba, Jakarta. pp. 146-150.
- PACC, M.M., J.J. SULLIVAN, F.I. ELLIOT, E.T. GRAHAM and G.H. COULTER. 1981. Effect of thawing temperature, number of spermatozoa, and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa. Poulkage in 5 ml french straw. *J. Anim. Sci.* 53: 693-701.

- PARK, C.S., and V.G. PURSEL. 1985. Effect of freezing rate on boar sperm frozen in maxi-straw. *J. Anim. Sci.* 61 : 441.
- PARTODIHARDJO. 1980. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ketiga. Penerbit Mutiara Sumber Widya, Jakarta. pp. 499-556.
- ROBBINS, B.K., N.L. O'CORNER, P.T. CHADLER and R.C. SAACHE. 1976. Freezing of bovine semen in french straw. *J. Anim.Sci.* 37: 328-331.
- SALAMON, S., and W.M.C. MAXWELL. 1995. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing, and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- SALISBURY, G.W. dan N.L. VANDEMARK. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Diterjemahkan oleh R. DJANUAR, Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. hlm. 525-532.
- SENGER, P.L., J.R. MITCHELL and J.O. ALMQUIST. 1983. Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packages in 0,25 and 0,5 ml french straws. *J. Anim. Sci.* 56: 1261.
- SUPRIATNA, I. dan H.P. FACHRIYAN. 1992. *In Vitro* Fertilisasi, Tansfer Embrio dan Pembekuan Embrio. PAU-Bioteknologi IPB. Bogor. hlm. 35-48.
- TOELIHERE, M.R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak. Edisi ke 2, Penerbit Angkasa, Bandung. pp. 64-75; 265-269.
- VISSER, D. dan S. SALAMON. 1974. Effect of composition of tris-based diluent on survival boar spermatozoa following deep freezing. *Aust Bio. Sci.* 27: 485-497.