

Kualitas Semen Beku Domba Garut dalam Berbagai Konsentrasi Gliserol

MUHAMMAD RIZAL¹, M.R. TOELIHERE², T.L. YUSUF², B. PURWANTARA², dan P. SITUMORANG³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon 97233
²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga 16680
³Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221, Bogor 16002, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 29 Nopember 2002)

ABSTRACT

RIZAL, M., M. R. TOELIHERE, T. L. YUSUF, B. PURWANTARA and P. SITUMORANG. 2003. Quality of Garut ram frozen semen in various glycerol concentrations. *JITV* 7(3): 194-199.

Semen was collected once a week using artificial vagina from four mature Garut rams. Immediately after initial evaluation, semen was divided into three parts and diluted with tris extender containing 3% (G₃), 5% (G₅), and 7% (G₇) glycerol, respectively, each with the concentration of 100 million motile sperm 0.25 ml⁻¹. Semen was loaded in 0.25 ml mini straws, and equilibrated at 5°C for three hours, then frozen and stored in liquid nitrogen container. Results indicated that percentages of post thawing motility and live sperm for G₅ (40 and 50.50%) were significantly higher than G₃ (32.50 and 45.33%) (P<0.05), but not significantly different with G₇ (39.17 and 47.67%) (P>0.05). Percentages of post thawing intact acrosomal and plasma membrane for G₅ (42.67 and 43.17%) were significantly higher than G₃ (36.17 and 38.17%) (P<0.05), but not significantly different with G₇ (38 and 39.83%) (P>0.05). In conclusion, concentration of 5% glycerol is the optimal dose in maintaining frozen semen quality of Garut rams.

Key words: Glycerol concentrations, frozen semen, Garut ram

ABSTRAK

RIZAL, M., M. R. TOELIHERE, T. L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2003. Kualitas semen beku domba Garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *JITV* 7(3): 194-199.

Semen ditampung dari empat pejantan domba Garut satu kali dalam satu minggu menggunakan vagina buatan. Segera setelah dievaluasi, semen dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer tris yang mengandung gliserol 3% (G₃), 5% (G₅), dan 7% (G₇). Semen dikemas di dalam straw mini (0,25 ml) dengan dosis 100 juta sperma motil, kemudian diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama tiga jam dan dibekukan serta disimpan di dalam tabung N₂ cair. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tahap setelah thawing, persentase motilitas dan hidup perlakuan G₅ (40 dan 50,5%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan G₃ (32,5 dan 45,33%) (P<0,05), tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan G₇ (39,17 dan 47,67%) (P>0,05). Hasil yang sama juga ditunjukkan pada parameter persentase TAU dan MPU. Pada tahap setelah thawing, persentase TAU dan MPU perlakuan G₅ (42,67 dan 43,17%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan G₃ (36,17 dan 38,17%) (P<0,05), tetapi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan G₇ (38 dan 39,83%) (P>0,05). Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 5% gliserol merupakan dosis yang optimal dalam mempertahankan kualitas semen beku domba Garut.

Kata kunci: Konsentrasi gliserol, semen beku, domba Garut

PENDAHULUAN

Saat ini keberhasilan program inseminasi buatan (IB) yang menggunakan semen beku pada ternak termasuk domba belum sesuai dengan yang diharapkan. Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya angka kebuntingan adalah kualitas semen beku yang digunakan. Hal ini disebabkan karena dalam proses pembuatan semen beku terdapat beberapa perlakuan yang sebenarnya tidak menguntungkan bagi upaya mempertahankan kualitas sperma.

Pada proses pembuatan semen beku, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah (sekitar -196°C) akan terbentuk kristal-kristal es dan perubahan

konsentrasi elektrolit yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel. Guna mengurangi efek yang tidak menguntungkan bagi sperma ini, di dalam pengencer harus ditambahkan senyawa krioprotektan. Jenis krioprotektan yang baik dan sudah sangat lazim digunakan dalam proses pembekuan semen adalah gliserol. Gliserol berfungsi memodifikasi pembentukan kristal es melalui pencegahan peningkatan konsentrasi elektrolit di atas efek yang membahayakan dalam medium (KUMAR *et al.*, 1992) serta mencegah pengumpulan molekul H₂O dan kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (MAZUR, 1980). Sementara itu, menurut HOLT (2000a) selain berfungsi sebagai senyawa krioprotektan, gliserol juga menjadi salah satu

senyawa sumber energi bagi sperma karena dapat dimetabolisme oleh sperma domba, sapi, babi, dan kambing.

Namun demikian penggunaan gliserol harus memperhatikan konsentrasi yang tepat, agar dapat berfungsi dengan baik. Apabila konsentrasi kurang, daya protektif gliserol tidak akan optimal, sebaliknya bila berlebih akan meracuni sperma. Konsentrasi gliserol yang dimasukkan ke dalam pengencer untuk pembekuan semen domba dibatasi oleh sifat toksiknya (FAHY, 1986) yang bergantung pada tingkat pendinginan dan pembekuan, komposisi pengencer, metode penambahan, dan jenis sperma. Pada penelitian ini dicoba beberapa konsentrasi gliserol dalam pengencer tris untuk mengetahui dosis yang optimal pada semen domba Garut.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah empat ekor pejantan domba Garut dewasa kelamin berumur sekitar tiga sampai empat tahun dan berat badan 70–98 kg dengan kondisi tubuh dan kesehatan baik, sebagai sumber semen yang diuji kualitasnya. Setiap domba dikandangkan secara individu dan diberikan pakan berupa rumput dan leguminosa segar sekitar 7 – 9 kg ekor⁻¹ hari⁻¹.

Metode percobaan

Semen ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu minggu. Semen ditampung dua sampai tiga ejakulat setiap ekor kemudian dicampur. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopik dan mikroskopik dari masing-masing individu. Penilaian makroskopik meliputi: volume, warna, konsistensi (kekentalan), dan derajat keasaman (pH). Penilaian mikroskopik meliputi: gerakan massa, motilitas, jumlah sperma hidup, konsentrasi, dan abnormalitas sperma, serta integritas membran plasma sel sperma, yakni tudung akrosom utuh (TAU) dan membran plasma utuh (MPU). Semen segar yang memenuhi syarat (motilitas $\geq 70\%$, konsentrasi ≥ 2000 juta sel ml⁻¹, gerakan massa ++ atau +++, dan abnormalitas <15%) diencerkan sesuai dengan perlakuan yang dicobakan.

Semen diencerkan dengan pengencer tris yang terdiri atas: 3,32 g tris (*Merck*, Germany, Cat. K27219882 003), 1,86 g asam sitrat (*Merck*, Germany, Cat. K22939944 632), 1,37 g fruktosa (*Merck*, Germany, Cat. K27917123 038) dilarutkan dengan akuabidestilata (*Supracointra*, Indonesia) hingga

mencapai volume 100 ml, kemudian ditambahkan antibiotika penisilin (*Meiji*, Japan, Cat. APG. 0598 J) 1000 IU ml⁻¹ dan streptomisin (*Meiji*, Japan, Cat. SSL. 1095 A) 1000 µg ml⁻¹. Pengenceran semen dilakukan dengan satu tahap pada suhu kamar. Komposisi perlakuan konsentrasi gliserol (*Merck*, Germany, Cat. K28328694 044) yang dicobakan adalah sebagai berikut:

1. 77% pengencer tris + 20% kuning telur + 3% gliserol (G3).
2. 75% pengencer tris + 20% kuning telur + 5% gliserol (G5).
3. 73% pengencer tris + 20% kuning telur + 7% gliserol (G7).

Semen yang telah diencerkan diperiksa kualitasnya dan apabila memenuhi syarat (motilitas maksimal turun sekitar 10% dari semen segar) dikemas ke dalam *straw* mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 100 juta sperma motil per *straw*, kemudian diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu sekitar 5°C selama tiga jam. Setelah ekuilibrasikan, semen diperiksa kualitasnya dan apabila memenuhi syarat (motilitas minimal 50%) dilakukan pembekuan dengan cara meletakkan *straw* 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit, kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan di dalam tabung nitrogen cair. Setelah disimpan selama satu minggu, semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air hangat bersuhu 37°C selama 30 detik untuk diperiksa kualitasnya.

Parameter yang diamati

Parameter kualitas semen yang diamati adalah: persentase motilitas, persentase hidup, persentase TAU, dan persentase MPU sperma masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*.

Persentase sperma yang bergerak progresif ke depan dihitung secara subjektif pada delapan pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Sperma yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah dengan menggunakan pewarna eosin (TOELIHERE, 1993). Tudung akrosom utuh (TAU) ditandai oleh ujung kepala sperma yang berwarna hitam tebal apabila semen dipaparkan di dalam larutan NaCl fisiologis-1% formalin (modifikasi metode SAACKE dan WHITE, 1972). Membran plasma utuh (MPU) ditandai oleh ekor sperma yang melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hiposmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit (REVELL dan MRODE, 1994). Jumlah sperma yang dievaluasi minimal 200.

Analisis data

Data dianalisis dengan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan jumlah penampungan semen sebanyak enam kali sebagai ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Evaluasi terhadap kuantitas dan kualitas semen segar dimaksudkan untuk mengetahui kadar pengenceran yang dibutuhkan serta untuk menentukan apakah semen tersebut layak atau tidak diproses lebih lanjut. Kuantitas dan kualitas semen yang diperoleh menunjukkan karakteristik semen segar domba Garut (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata sifat fisik semen segar domba Garut

Parameter	Ukuran
Volume (ml) :	
Ejakulat pertama	0,77 ± 0,19
Ejakulat kedua	0,95 ± 0,31
Ejakulat ketiga	0,77 ± 0,19
Warna	Putih susu
Derajat keasaman (pH)	7,12 ± 0,09
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi (x 10 ⁶ ml ⁻¹)	2845,00 ± 355,33
Persentase motilitas (%)	76,67 ± 2,36
Persentase hidup (%)	88,33 ± 2,87
Persentase abnormalitas (%)	4,33 ± 0,74
Persentase tudung akrosom utuh, TAU (%)	84,50 ± 2,06
Persentase membran plasma utuh, MPU (%)	87,33 ± 2,87

INOUNU *et al.* (2001) melaporkan bahwa volume semen domba Garut rata-rata 0,76 ml (kisaran 0,3 – 2 ml), warna bening hingga krem, konsistensi encer hingga kental, gerakan massa rata-rata 2,81 (kisaran 1–4), persentase motilitas rata-rata 58,08% (kisaran 10–80%), persentase hidup rata-rata 64,32% (kisaran 19 – 95%), dan konsentrasi rata-rata 2490,60 juta sperma ml⁻¹ (kisaran 950 – 4080 juta sperma ml⁻¹). Hasil penelitian FERADIS (1999) pada domba *St. Croix*

didapatkan volume rata-rata 1,66 ml, pH 6,80, konsentrasi 3785 juta sperma ml⁻¹, motilitas 81,67%, sperma hidup 89,33%, abnormalitas 8,33%, TAU 94%, dan MPU 86,33%. Sementara itu, SUTAMA *et al.* (2001) menyatakan bahwa semen kambing *Boer* memiliki volume rata-rata 0,5 ml, motilitas 72,5%, sperma hidup 78,52%, TAU 78,79%, dan MPU 83,26%.

Berdasarkan nilai karakteristik semen yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa semen segar domba percobaan memiliki kualitas yang baik sehingga layak diproses lebih lanjut, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku.

Efek perlakuan terhadap kualitas sperma

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan memperlihatkan pengaruh yang tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas, hidup, TAU, dan MPU sperma pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibriasi (Tabel 2). Tetapi pada tahap setelah *thawing*, rata-rata persentase motilitas dan hidup perlakuan G₅ (40 dan 50,5%) nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan G₃ (32,5 dan 45,33%), tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G₇ (39,17 dan 47,67%). Rata-rata persentase TAU dan MPU perlakuan G₅ (42,67 dan 43,17%) nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G₃ (36,17 dan 38,17%), tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan G₇ (38 dan 39,83%) (Tabel 2).

Hal ini menunjukkan bahwa gliserol berperan dalam menjaga kualitas sperma pada saat pembekuan dan *thawing* semen beku. Ini dapat dipahami karena pada saat pembekuan, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah terjadi pengeluaran molekul air secara besar-besaran dari dalam sel sperma sehingga menyebabkan peningkatan konsentrasi elektrolit intraseluler dan terbentuknya kristal-kristal es, yang kesemuanya dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel. Pada kondisi seperti inilah gliserol dapat mengurangi efek negatif tersebut, dan itu bergantung pada ketepatan dosis yang diberikan. Menurut LEIBO (1992), SUPRIATNA dan PASARIBU (1992) gliserol akan menggantikan air yang keluar dari dalam sel saat pembekuan berlangsung, sehingga keseimbangan konsentrasi elektrolit intra dan ekstraseluler tetap terjaga. Gliserol juga menurunkan titik beku larutan, sehingga memberikan kesempatan kepada sel mengeluarkan air dan memperpanjang aklimatisasi sel terhadap perubahan suhu yang drastis sehingga memperkecil jumlah air yang membeku intraseluler. Selain itu gliserol juga mengubah secara fisik kristal-kristal es yang terbentuk menjadi lebih lembut dan ikut melindungi membran plasma sel.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas, persentase hidup (viabilitas), TAU, dan MPU sperma

Parameter	Perlakuan	Tahap pengolahan semen		
		Pengenceran	Ekuilibrasi	Thawing
Motilitas (%)	G ₃	76,67 ± 2,36 ^a	64,17 ± 4,49 ^a	32,50 ± 2,50 ^a
	G ₅	76,67 ± 2,36 ^a	66,67 ± 2,36 ^a	40,00 ± 2,50 ^b
	G ₇	76,67 ± 2,36 ^a	65,83 ± 3,43 ^a	39,17 ± 1,86 ^b
Viabilitas (%)	G ₃	84,50 ± 2,36 ^a	77,83 ± 1,57 ^a	45,33 ± 5,59 ^a
	G ₅	84,00 ± 2,77 ^a	77,83 ± 1,86 ^a	50,50 ± 4,35 ^b
	G ₇	84,83 ± 2,67 ^a	76,17 ± 3,13 ^a	47,67 ± 5,62 ^{ab}
TAU (%)	G ₃	82,00 ± 1,82 ^a	71,50 ± 2,99 ^a	36,17 ± 3,02 ^a
	G ₅	82,17 ± 2,11 ^a	73,17 ± 3,24 ^a	42,67 ± 2,87 ^b
	G ₇	82,33 ± 2,36 ^a	73,00 ± 4,08 ^a	38,00 ± 3,70 ^{ab}
MPU (%)	G ₃	82,17 ± 3,93 ^a	72,83 ± 1,86 ^a	38,17 ± 1,07 ^a
	G ₅	81,50 ± 4,07 ^a	73,17 ± 2,85 ^a	43,17 ± 2,97 ^b
	G ₇	81,67 ± 3,99 ^a	72,50 ± 2,81 ^a	39,83 ± 4,22 ^{ab}

Angka dengan huruf yang berbeda dalam satu kolom masing-masing parameter, berarti berbeda nyata ($P < 0,05$)

PARKS dan GRAHAM (1992) menyatakan bahwa peranan gliserol dalam membran plasma sel sperma adalah mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga menurunkan ketidakstabilan membran dan berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein sehingga menyebabkan partikel-partikel intra membran terkumpul. Dengan demikian gliserol selain berfungsi sebagai krioprotektan intraseluler juga sebagai krioprotektan ekstraseluler (menjaga kelenturan membran sel). Apabila membran plasma sel dapat dipertahankan keutuhannya selama proses pembekuan, maka akan memberikan efek yang baik terhadap motilitas, daya hidup, dan keutuhan tudung akrosom sperma. Motilitas (daya gerak) sperma sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma sel ada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas keluar masuk sel substrat dan elektrolit-elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Perlakuan G₅ (konsentrasi gliserol 5%) memberikan hasil yang terbaik. Hal ini menunjukkan bahwa pada semen domba Garut, konsentrasi 5% gliserol di dalam pengencer tris adalah dosis yang paling optimal dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, serta keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sperma. Sebaliknya TAMBING (1999) menyatakan bahwa konsentrasi 6% gliserol dalam pengencer tris lebih efektif mempertahankan motilitas, daya hidup dan keutuhan membran plasma sel sperma kambing peranakan Etawah dibandingkan dengan konsentrasi 5% dan 7%. Sementara itu, LEBOEUF *et al.* (2000)

melaporkan bahwa pada semen kambing konsentrasi gliserol yang optimum adalah 4 – 7%. Perbedaan hasil ini diduga karena respon sperma terhadap gliserol berbeda berdasarkan spesies hewan. Konsentrasi gliserol yang berlebihan akan menimbulkan efek toksik pada sel sperma, sebaliknya apabila kurang, gliserol tidak akan memberikan efek yang optimal. Menurut FAHY (1986) konsentrasi gliserol yang dimasukkan ke dalam pengencer untuk pembekuan semen domba dibatasi oleh sifat toksiknya yang bergantung pada tingkat pendinginan dan pembekuan, komposisi pengencer, metode penambahan, dan spesies hewan.

FISER dan FAIRFULL (1986) menyatakan bahwa konsentrasi gliserol optimal dalam proses pembekuan semen domba adalah 4 – 6%, dan pada konsentrasi 8% terjadi kerusakan sel. Selanjutnya FISER dan FAIRFULL (1986) yang dilaporkan oleh WATSON (1995) menyatakan bahwa konsentrasi 9% gliserol akan menyebabkan toksik terhadap sperma domba apabila ditambahkan pada suhu 30°C. Beberapa peneliti yang lain juga melaporkan bahwa konsentrasi gliserol yang optimal dalam pembekuan semen domba dengan metode konvensional adalah 6 – 8% (FIRST *et al.*, 1961; SALAMON dan MAXWELL, 1995a,b; OLLERO *et al.*, 1998; HOLT, 2000b), sedangkan CURRY (1995) melaporkan konsentrasi gliserol sekitar 3 – 4%. Menurut MOLINIA *et al.* (1994) persentase motilitas dan akrosom utuh setelah *thawing* semen domba yang dikriopreservasi dengan pengencer tris yang mengandung 6% gliserol (51,7 dan 58,5%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 3% gliserol (44,6 dan 53%) dan 1,5% gliserol (40,9 dan 44,5%). Hasil penelitian EL-ALAMY dan FOOTE (2001)

didapatkan persentase motilitas setelah *thawing* sebesar 41% pada semen domba Finn dan 47% pada semen domba Dorset yang diencerkan dengan pengencer tris yang mengandung 7% gliserol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Perlakuan gliserol tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas sperma pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibrasi.
2. Konsentrasi 5% gliserol nyata lebih baik memperbaiki kualitas sperma setelah pembekuan dibandingkan dengan konsentrasi 3%, tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 7%.

Untuk mendapatkan semen beku domba Garut dengan kualitas yang baik, sebaiknya semen diencerkan dengan pengencer tris yang mengandung 5% gliserol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Jakarta dan peternakan domba "Lesan Putra" PT. Sarbi Moerhani Lestari, Ciomas, Bogor atas dukungan dana, hewan percobaan, dan fasilitas-fasilitas pendukung lainnya sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- CURRY, M.R. 1995. Cryopreservation of semen from domestic livestock *dalam* J.G. DAY and M.R. MCLELLAN (editors), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- EL-ALAMY, M. and R.H. FOOTE. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 65:245-254.
- FAHY, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*. 23:1-13.
- FERADIS. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba *St. Croix*. Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- FIRST, N.L., H.A. HANNEMAN, and J.A. WILLIAMS. 1961. The frozen storage of ram semen. *J. Anim. Sci.* 20:74-78.
- FISER, P.S. and R.W. FAIRFULL. 1986. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram semen. *Cryobiology*. 21:542-551.
- HOLT, W.V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.
- HOLT, W.V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53:47-58.
- INOUNU, I., N. HIDAJATI, S.N. JARMANI, D. PRIYANTO, HASTONO, B. SETIADI, dan SUBANDRIYO. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba hasil persilangan. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Puslitbang Peternakan. hlm. 64-73.
- KUMAR, S., K.L. SAHNI, and G. MOOHAN. 1992. Effect of different levels of glycerols and egg yolk on freezing and stored of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 2:151-156.
- LEBOEUF, B., B. RESTALL, and S. SALAMON. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62:113-141.
- LEIBO, S.P. 1992. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 21:767-787.
- MAZUR, P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. Proceeding 9th International Congress on Animals Reproduction and AI 1: pp. 99-114.
- MOLINIA, F.C., G. EVANS, and W.M.C. MAXWELL. 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42:849-858.
- OLLERO, M., R. PEREZ-PE, T. MUINO-BLANCO, and J.A. CEBRIAN-PEREZ. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*. 37:1-12.
- PARKS, J.E. and J.K. GRAHAM. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:202-222.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- SAACKE, R.G. and J.M. WHITE. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. Proceeding 4th Tech. Conf. on AI and Reprod., NAAB. pp. 22-27.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 1995a. Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37:185-249.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 1995b. Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38:1-36.
- STEEL, R.G.D. dan J.H. TORRIE. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik*. Terjemahan Bambang Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

- SUPRIATNA, I. dan F.H. PASARIBU. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SUTAMA, I.K., B. SETIADI, P. SITUMORANG, U. ADIATI, I.G.M. BUDIARSANA, T. KOSTAMAN, MAULANA, MULYAWAN, dan R. SUKMANA. 2001. Uji kualitas semen beku kambing peranakan Etawah dan kambing Boer. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Puslitbang Peternakan. hlm. 88-111.
- TAMBING, S.N. 1999. Efektivitas Berbagai Dosis Gliserol di dalam Pengencer Tris dan Waktu Ekuilibrasi terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHIRE, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891.