

OPTIMASI PROGRAM INSEMINASI BUATAN PADA KERBAU

SURYA NATAL TAMBING¹, MOZES R. TOELIHERE², dan TUTY L. YUSUF²

¹ *Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Gowa
Kotak Pos 4, Sunguminasa, Gowa, Indonesia*

² *Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jalan Lodaya II Ujung Bogor, Indonesia*

ABSTRAK

Perkembangan ternak kerbau di Indonesia cenderung relatif rendah dalam lima tahun terakhir (1993-1997), tetapi tingkat pemotongan ternak tersebut cenderung meningkat dalam periode yang sama. Faktor-faktor yang menghambat perkembangannya adalah sistem pemeliharaan masih bersifat ekstensif, usaha sambilan, pertumbuhan lambat dan efisiensi reproduksinya rendah. Optimasi program inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu alternatif untuk memperbaiki produktivitas usahaternak kerbau di Indonesia. IB merupakan alat yang cukup efektif untuk memperbaiki mutu genetik dan meningkatkan populasi ternak. Penerapannya pada kerbau dimulai sejak tahun 1975, namun hasilnya sampai sekarang masih belum nyata. Jumlah kelahiran dan realisasi IB masih rendah dalam empat tahun terakhir (masing-masing: \pm 750 ekor dan $<$ 50% per tahun), dengan nilai S/C masih di atas 2 dan CR 38,32%. Faktor-faktor pembatas yang mempengaruhi rendahnya kinerja IB diantaranya: kualitas *semen* pejantan, kesuburan betina, keterampilan inseminator dan pengetahuan zooteknis peternak. Perbaikan efisiensi reproduksi ternak kerbau dalam kaitannya dengan optimasi program IB dapat ditempuh melalui peningkatan kemampuan peternak untuk mendeteksi berahi, metode sinkronisasi berahi melalui penggunaan preparat hormon (PGF-2 α dan progesteron), perbaikan kualitas *semen* beku dengan memperhatikan jenis pengencer yang digunakan, pengaturan waktu ekuilibrasi, dan pengaturan suhu dan waktu *thawing*, serta ketepatan waktu inseminasi.

Kata kunci : IB, kerbau, kualitas *semen*, optimasi, sinkronisasi berahi

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ARTIFICIAL INSEMINATION PROGRAM IN BUFFALO

Development of buffalo was relatively slow in the last five years (1993-1997), but the number of slaughtered animals was also increased in the same period. Factors limiting their development were extensive farming system, farming as a secondary enterprise, slow growth and low reproductive efficiency of the animals. Optimization of artificial insemination (AI) program in one of the alternative to improve buffalo productivity in Indonesia. AI is an effective tool to improve the genetic quality and to increase the buffaloes population. Application of AI in buffalo has been conducted since 1975, but until now the results are not still significant. Within the last four years the calving average was 750 head/year, the implementation of targeted insemination doses reached less than 50%/year with S/C still above 2 and CR 38.32%. The limiting factors affecting this low performance are quality of *semen*, female fertility, skill of technician and zootechnical knowledge of farmers. Improvement of reproductive efficiency of buffaloes interrelated with optimization of AI program could be imposed through increasing of ability of farmers to detect oestrus, oestrus synchronization using hormones (PGF-2 α and progesterone), improvement of quality of frozen *semen* with special attention on dilution materials used, control of equilibration time, and control of duration and temperature of *thawing*, as well as accuracy of insemination time.

Key words: AI, buffalo, *semen* quality, optimization, oestrus synchronization

PENDAHULUAN

Peranan utama ternak kerbau di Indonesia adalah sebagai tenaga kerja di persawahan dan tabungan hidup keluarga petani-peternak jika pada suatu saat terdapat kebutuhan yang mendesak. Bahkan di daerah tertentu seperti di Tana Toraja (Sulawesi Selatan), ternak kerbau mempunyai arti sosial budaya yang tinggi karena merupakan simbol dan kurban sembelihan pada upacara kematian (*rambu solo*), bila semakin banyak

kerbau dipotong maka semakin meningkat status sosial orang tersebut di masyarakat setempat.

Peningkatan populasi ternyata tidak begitu pesat dalam lima tahun terakhir (1993-1997), yaitu rata-rata 1,12% (3.056.514 ekor – 3.238.104 ekor) dengan tingkat kelahiran 0,34% per tahun. Dalam periode yang sama, tingkat pemotongan meningkat sebesar 2,60% (DITJENNAK, 1997). Hal ini menunjukkan tidak adanya keseimbangan antara peningkatan produksi dibandingkan dengan tingkat pemotongan. Apabila tidak diatasi, maka dikawatirkan pada tahun-tahun

mendatang akan semakin menurun populasinya di Indonesia. Hal ini sudah terlihat bahwa populasi kerbau di Indonesia pada tahun 1998 menurun menjadi 3.113.800 ekor (BPS, 1998).

Masalah lain pada kerbau adalah tingkat reproduktivitasnya rendah, yang ditandai dengan umur pubertas yang lebih lambat dan selang beranak yang lebih panjang dibandingkan dengan sapi. Pubertas pada ternak kerbau dicapai pada umur 21 bulan dengan selang beranak 18 bulan, sedangkan pubertas pada sapi dicapai pada umur 15 bulan dengan selang beranak 15 bulan (HAFEZ, 1993).

Faktor-faktor yang diduga mempengaruhi produktivitas usahaternak kerbau di Indonesia, antara lain adalah manajemen pemeliharaan pada umumnya masih bersifat tradisional, beternak hanya sebagai usaha sampingan, serta keragaan produksi dan reproduksinya masih rendah. PUTU (1992) melaporkan bahwa berbagai kendala yang mempengaruhi pengembangan ternak kerbau di Indonesia, yaitu: pemasaran daging kerbau yang kurang diminati konsumen dibandingkan dengan daging sapi, pertumbuhan yang lambat, hambatan dalam fungsi reproduksi dan program seleksi yang belum terarah.

Inseminasi Buatan (IB) adalah salah satu bioteknologi reproduksi alternatif yang dapat digunakan untuk memperbaiki produktivitas usahaternak kerbau di Indonesia. IB merupakan alat yang efisien dan efektif dalam melaksanakan kebijaksanaan pemuliaan ternak secara nasional untuk memperbaiki mutu genetik keturunannya secara cepat. Keberhasilan IB ditunjukkan dengan jumlah anak yang dilahirkan dari sejumlah induk yang diinseminasi.

Penerapan IB pada ternak kerbau lumpur di Indonesia bahkan di Asia Tenggara dilakukan pertama kali oleh TOELIHERE tahun 1975 pada kerbau belang (*tedong bonga*) di Toraja (TOELIHERE, 1985). Namun demikian keberhasilannya tidak sebaik dibandingkan pada sapi, dan tingkat kebuntingan yang dicapai baik di lapangan maupun laboratorium masih bervariasi. Ada berbagai faktor yang mungkin mempengaruhinya antara lain kondisi reproduksi kerbau betina, kesalahan dan kelalaian peternak mendeteksi berahi dan

melaporkannya kepada petugas IB pada waktu yang tepat, kualitas *semen* yang rendah, keterampilan inseminator, serta sarana yang belum memadai untuk IB pada ternak kerbau dan prasaranan yang kurang menunjang pelaksanaan IB pada ternak tersebut. Perbaikan faktor-faktor tersebut di atas mutlak harus dilakukan, sehingga pada saatnya nanti teknologi IB akan lebih mampu lagi meningkatkan performans reproduksi dan memperbaiki produksi ternak kerbau.

EFISIENSI PELAKSANAAN IB PADA KERBAU

Realisasi IB

Tingkat realisasi IB pada kerbau dalam empat tahun anggaran terakhir (TA. 1994/1995 s/d 1997/1998) mengalami penurunan. Dari target dosis yang telah ditetapkan ternyata tingkat realisasinya masih di bawah 50% (Tabel 1). Kemungkinan penyebabnya adalah ketersediaan betina akseptor kurang. Dari populasi ternak betina dewasa sebanyak kurang lebih 6.861.850 ekor (DITJENNAK, 1997), hanya sekitar 6000 ekor (0,087%) yang telah dijangkau oleh program IB selama tahun 1994/1995 sampai 1997/1998. Angka kelahiran yang dicapai melalui program IB tersebut dengan sendirinya masih sangat rendah.

Belum lagi adanya masalah gangguan reproduksi pada betina akseptor (seperti: *hypofungsi ovary*, sub estrus, *silent heat* dan sebagainya). *Hypofungsi ovary* terjadi karena ketidakmampuan hormon FSH (*follicle stimulating hormone*) merangsang ovarium untuk menumbuhkan folikel sehingga mengakibatkan pada ovarium tidak terlihat adanya folikel. Sub estrus adalah tanda-tanda berahi jelas akan tetapi kejadian berahinya singkat (kurang dari normal). *Sementara* itu, kejadian berahi tenang (*silent heat*) ditandai dengan tidak jelasnya tanda-tanda berahi namun ovulasi terjadi. Hal ini menyulitkan bagi peternak untuk melaporkan kapan terjadinya berahi dan pada akhirnya menyulitkan petugas IB (inseminator) untuk melakukan inseminasi.

Tabel 1. Target dan realisasi IB

Tahun anggaran	Target (dosis)		Realisasi (dosis)		% realisasi	
	Kerbau	Sapi potong	Kerbau	Sapi potong	Kerbau	Sapi potong
1994/1995	43.300	2.089.200	16.027	1.636.055	37,01	78,31
1995/1996	47.000	2.185.000	13.067	1.615.839	27,80	73,95
1996/1997	42.250	1.794.370	8.395	1.473.178	19,87	82,10
1997/1998	36.850	1.856.350	5.195	1.109.270	14,10	59,76

Sumber : DITBINPROD, DITJENNAK (1998)

Efisiensi reproduksi

Penilaian keberhasilan program IB di lapangan dinyatakan secara sederhana dalam *Service per Conception* (S/C) atau jumlah pelayanan (dosis) IB per kebuntingan dan *Conception Rate* (CR) atau angka konsepsi, yaitu jumlah hewan betina yang bunting pada IB pertama dibagi seluruh hewan betina yang di-IB dalam satu kurun waktu tertentu dikali 100%.

Tingkat pencapaian S/C dan CR pada kerbau cenderung berfluktuasi selama empat tahun terakhir dibandingkan pada sapi potong (Tabel 2). Rataan nilai S/C masih di atas 2 dan CR di bawah 50%. Nilai S/C yang dicapai ini masih jauh dari nilai S/C yang normal, yaitu 1,6 – 2,0 (TOELIHERE, 1985), sedangkan nilai CR yang optimum adalah 65-70% (TOELIHERE, 1997). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat fertilitas (kesuburan) ternak kerbau masih lebih rendah dibandingkan pada sapi. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan oleh berbagai peneliti, diantaranya oleh SITUMORANG dan SITEPU (1991) yang mendapatkan CR sekitar 30% pada kondisi lapangan dan pada kondisi stasiun percobaan 60%. Sebagai bahan perbandingan, hasil program IB pada kerbau di Thailand diperoleh hasil CR sebesar 49,94% dengan nilai S/C 2,40 (KAMONPATANA, 1984).

Rendahnya pencapaian S/C dan CR kemungkinan disebabkan keterlambatan peternak melaporkan kejadian berahi dan masalah penanganan *semen* di lapangan. Keterlambatan peternak melaporkan kejadian berahi mungkin disebabkan peternak belum mengetahui dengan pasti tanda-tanda berahi ataupun kerbaunya sendiri tidak jelas memperlihatkan tanda-tanda berahi. Penanganan *semen* di lapangan oleh inseminator saat ini masih menjadi masalah. Seringnya inseminator mengeluarkan *semen* beku dari *container* kurang hati-hati dan tidak segera dicairkan (*thawing*). Padahal *semen* beku yang telah dikeluarkan dari *container* harus segera mungkin *dithawing* dan harus diinseminasikan. Proses penanganan *semen* beku mulai dari pengeluaran dari *container*, *thawing* sampai

diinseminasikan tidak boleh lebih dari 2,5 menit (TOELIHERE, 1995).

Calving rate

Peningkatan jumlah kelahiran anak kerbau hasil IB berfluktuasi selama empat tahun terakhir, pada awalnya (1995/1996) meningkat tetapi pada tahun berikutnya (1996/1997) menurun drastis kemudian meningkat lagi pada tahun anggaran 1997/1998 (rata-rata kelahiran per tahun 750 ekor). Sementara itu, banyaknya anak sapi potong yang lahir dari hasil IB dalam kurun waktu yang sama tetap konstan dengan rata-rata 400.000 ekor per tahun (Tabel 3). Hal ini dapat dimengerti karena IB pada ternak kerbau belum seintensif pada ternak sapi potong, walaupun IB pada ternak sapi potong sendiri baru dapat menjangkau kurang dari 10% populasi sapi betina sebanyak ± 6 juta (50% dari populasi sekitar 12 juta ekor sapi potong jantan dan betina) di Indonesia.

Faktor penyebab rendahnya tingkat kelahiran hasil IB pada kerbau kemungkinan disebabkan masalah penanganan induk bunting oleh peternak yang kurang baik (terutama penyediaan pakan kualitas dan kuantitasnya rendah) sehingga mengakibatkan terjadinya kematian embrio dan terjadinya gangguan pada saat kelahiran (*distokia*). *Distokia* ini terjadi karena ketidakmampuan hormon oxytocin untuk melakukan kontraksi pada uterus sehingga menyebabkan induk sulit mengeluarkan pedet. Apabila tidak segera ditangani akan menimbulkan kematian pada pedet.

Masalah lain terjadinya fluktuasi kelahiran hasil IB pada kerbau adalah kemungkinan berhubungan dengan tingkat realisasi IB (dosis) yang dicapai. Tingkat realisasi dosis IB pada ternak kerbau menurun secara drastis (persentase realisasi rata-rata di bawah 50%) selama empat periode tahun anggaran dibandingkan pada sapi potong (Tabel 1). Setiap ternak betina akseptor IB rata-rata memerlukan dua dosis IB (dua minitraw *semen* beku per kebuntingan).

Tabel 2. Rata-rata nilai S/C dan CR pada kerbau dan sapi potong

Tahun anggaran	S/C (kali)		CR (%)	
	Kerbau	Sapi potong	Kerbau	Sapi potong
1994/1995	3,18	1,85	29,81	57,42
1995/1996	2,59	1,78	39,80	54,58
1996/1997	1,87	1,66	51,85	59,33
1997/1998	3,12	1,71	31,34	58,30
Rata-rata	2,69	1,75	38,32	57,41

Sumber : DITBINPROD, DITJENNAK (1998)

Tabel 3. Kelahiran hasil IB

Tahun anggaran	Kelahiran (ekor)	
	Kerbau	Sapi potong
1994/1995	903	366.489
1995/1996	1.103	442.487
1996/1997	363	360.829
1997/1998	614	373.895
Total	2.983	1.543.700

Sumber : DITBINPROD, DITJENNAK (1998)

Keberhasilan program IB atau efisiensi reproduksi dalam program IB pada suatu kelompok ternak ditentukan oleh empat faktor utama yaitu kualitas *semen* pejantan, kesuburan ternak betina, keterampilan teknis dan pengetahuan zooteknik peternak. Keempat faktor tersebut tidak berdiri sendiri, tetapi tergantung secara merata pada semua faktor tersebut. Penurunan drastis pada salah satu faktor akan menurunkan secara drastis pula nilai akhir efisiensi reproduksi (TOELIHERE, 1997). Oleh karena itu keberhasilan suatu program IB, keempat faktor tersebut harus dipertahankan pada tingkat tinggi.

Kualitas *semen* pejantan yang baik harus memiliki konsentrasi spermatozoa yang tinggi per satuan volume dan daya gerak progresif (motilitas) spermatozoa $\geq 80\%$ sebelum dibekukan dan $\geq 40\%$ sesudah pembekuan. Pejantan tersebut haruslah terseleksi sebagai pejantan berpotensi genetik unggul. Kesuburan hewan betina akseptor IB sangat tergantung pada kesehatan reproduksi dan faktor nutrisi/pakan yang memadai baik secara kuantitas maupun kualitasnya. Keterampilan teknis tidak hanya mencakup petugas inseminasi (inseminator), melainkan juga petugas pemeriksa kebuntingan (PKB) dan asisten teknis reproduksi (ATR) yang membantu dokter hewan di lapangan dalam menanggulangi masalah gangguan reproduksi. Keterampilan zooteknik peternak terutama menyangkut manajemen dalam sistem beternaknya, pengenalan dan pengamatan atau deteksi berahi serta pelaporan berahi untuk diinseminasi tepat pada waktunya.

Semua faktor-faktor tersebut di atas hanya dapat tercapai secara optimal pada suatu sistem peternakan yang intensif dan terkendali pada setiap saat dengan segala sarana penunjang yang memenuhi kebutuhan. Dalam suatu sistem peternakan tradisional, sebagaimana pada peternakan kerbau, keberhasilan program IB akan sulit tercapai tanpa tindakan-tindakan/terobosan untuk menghadapi atau meminimalkan kendala-kendala tersebut di atas.

Program IB pada kerbau tidak akan bermanfaat jika tidak diikuti pula dengan program pemuliaan. Program pemuliaan yang perlu dilakukan adalah

program seleksi disertai dengan perbaikan manajemen (tatalaksana) pemeliharaan sehingga akan mampu meningkatkan produktivitasnya.

UPAYA PENINGKATAN EFISIENSI REPRODUKSI PADA KERBAU DALAM KAITANNYA DENGAN OPTIMALISASI PROGRAM IB

Deteksi berahi

Deteksi berahi merupakan hal yang sangat penting dalam pelaksanaan IB pada ternak, karena dengan melakukan pendeteksian berahi akan dapat ditentukan kapan saatnya yang tepat untuk melakukan pelayanan inseminasi pada saat ternak betina berada pada puncak kesuburannya. Namun adanya fenomena *silent heat* (berahi tenang) pada kerbau menyulitkan pendeteksian berahi. Fenomena ini terjadi karena hormon FSH tidak mampu mendorong sistesis hormon estrogen oleh sel granulosa dari folikel *den Graaf* sehingga tidak muncul tanda-tanda berahi walaupun hormon FSH itu sendiri mampu menumbuhkan folikel pada ovarium sehingga terjadi ovulasi (HAFEZ, 1993). ARORA dan KENDEY (1982) dalam SHAH (1990) mengatakan sekitar 50% dari kerbau perah di India memperlihatkan gejala berahi tenang selama periode post-partum. Padahal untuk mengoptimalkan efisiensi reproduksi kerbau, faktor-faktor penghambat tersebut harus dikeluarkan.

Ada berbagai metode dan sistem pendeteksian berahi yang mungkin dapat diterapkan pada kerbau, seperti penggunaan pejantan pengusik (*teaser-animal*), pedometer ataupun dengan *mount-detectors*. Metode ini ternyata mampu mendeteksi berahi pada ternak sapi dengan tingkat akurasi dan efisiensi yang tinggi. Hal ini terlihat dari hasil penelitian LEHRER *et al.* (1992) yang mendapatkan bahwa dengan menggunakan pejantan pengusik dan *mount-detectors* ditambah dengan melihat aktivitas fisik dari sapi mampu mendeteksi berahi dengan tingkat efisiensi sebesar 97%, sedangkan bila hanya menggunakan kedua metode di atas (pengusik dan *mount-detectors*) memberikan efisiensi sebesar 93%. BARKAWI *et al.* (1998) melaporkan deteksi berahi selama empat kali sehari dengan interval enam jam dan disertai dengan penggunaan hewan pengusik dihasilkan efisiensi deteksi berahi pada kerbau sebesar 93,8% dibandingkan bila deteksi berahi hanya dua kali sebesar 56,8%. Bila menggunakan pedometer ternyata tingkat akurasi deteksi berahi kerbau 85% bila dibandingkan melalui visualisasi hanya 14% (WILLIAMS *et al.*, 1986).

Masalah utama yang dihadapi di lapangan adalah intensitas berahi pada ternak kerbau hanya nyata pada malam hari karena ternak tersebut bersifat nokturnal, sehingga berahi jarang teramati pada siang hari. Namun demikian, pengamatan berahi yang dilakukan pada

waktu subuh sampai sebelum fajar menyingsing dan pada waktu magrib sesudah matahari terbenam sampai satu jam sesudahnya dapat mengungkapkan gejala-gejala berahi pada ternak kerbau (TOELIHERE, 1985). Dari berbagai alat yang telah disebutkan di atas, mungkin yang bisa digunakan untuk mendeteksi berahi adalah penggunaan pejantan pemacek. Namun yang menjadi permasalahan adalah sistem peternakan di Indonesia khususnya ternak kerbau yang masih tradisional yang menyebabkan peternak mengalami kesulitan untuk mengontrol siklus berahi sehingga sulit menerapkan penggunaan alat tersebut, kecuali untuk sistem pemeliharaan semi intensif ataupun intensif mungkin bisa digunakan. Satu-satunya cara yang lebih efektif adalah dengan jalan merangsang dan mensinkronisasikan berahi pada sekelompok ternak kerbau betina. Sinkronisasi berahi dengan menggunakan hormon akan lebih memperjelas ekspresi tanda-tanda berahi yang dapat diamati dan dideteksi secara bersamaan pada kelompok ternak tersebut.

Sinkronisasi berahi

Sinkronisasi berahi pada ternak dimaksudkan agar ternak-ternak betina serentak berahinya dalam waktu yang sama. Selanjutnya ternak-ternak tersebut dapat diinseminasi secara bersama-sama sehingga dapat diprediksi waktu kelahiran yang bersamaan. Sistem ini dapat dipakai dalam perencanaan kelahiran anak dan pemasaran ternak di masa depan. Metode sinkronisasi berahi pada kerbau dapat dilakukan dengan menggunakan preparat hormon seperti prostaglandin dan progesteron.

Prostaglandin. Prostaglandin $F2\alpha$ (PGF- 2α) bersifat luteolitik yang berperan untuk meregresikan *corpus luteum* (CL), mengakibatkan penghambatan yang dilakukan hormon progesteron yang dihasilkan oleh CL terhadap gonadotropin menjadi hilang. Akibat yang ditimbulkannya ialah terjadi pertumbuhan dan pematangan folikel dalam ovarium. TOELIHERE (1995) menyatakan bahwa efek pemberian PGF- 2α akan

menurunkan level progesteron dan akan memberikan *rebound effect* terhadap pelepasan hormon gonadotropin (FSH = *follicle stimulating hormone* dan LH = *luteinizing hormone*). Berbagai hasil penelitian mengenai penggunaan PGF- 2α dapat dilihat pada Tabel 4.

Berdasarkan data pada Tabel 4 terlihat bahwa aplikasi PGF- 2α untuk sinkronisasi berahi pada kerbau bervariasi tergantung pada metode yang digunakan. Penyuntikan satu kali secara intramuskuler kurang berhasil dibandingkan penyuntikan dua kali. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain : (1) belum terbentuknya CL dalam ovarium, (2) hipofungsi ovarium, dan (3) berahi pendek. Oleh karena itu disarankan untuk melakukan penyuntikan, yaitu 11-12 hari setelah penyuntikan pertama.

Penyuntikan PGF- 2α dapat saja dilakukan satu kali asalkan dilakukan pada fase luteal dari siklus berahi. MACMILLAN *et al.* (1991) mengatakan penyuntikan PGF- 2α untuk menyerentakan berahi dapat dilakukan satu kali secara intramuskuler pada fase luteal dan hasilnya tidak berbeda dibandingkan dua kali selang 11 hari. Berhubung harga PGF- 2α untuk satu dosis penyuntikan secara intramuskuler cukup mahal bagi para peternak di Indonesia, maka diupayakan pemberiannya secara intrauterin yang membutuhkan hanya $\frac{1}{4}$ sampai $\frac{1}{5}$ dari dosis untuk injeksi secara intramuskuler (TOELIHERE, 1995). Cara pemberian PGF- 2α secara intrauterin dilakukan memakai kateter uterin yang disambung dengan spuit yang berisi PGF- 2α ($\frac{1}{5}$ dosis intramuskuler) dan kateter uterin dimasukkan sebagaimana layaknya melakukan inseminasi dan menyemprotkan hormonnya (PGF- 2α) ke dalam *corpus uteri*. PGF- 2α akan diserap ke dalam darah memasuki ovarium dan meruntuhkan *corpus luteum* (CL) dalam waktu ± 2 hari. Untuk kondisi lapangan dengan sistem pemeliharaan ekstensif, penyuntikan PGF- 2α untuk sinkronisasi berahi kerbau sebaiknya dilakukan dua kali dengan selang 11-12 hari.

Tabel 4. Penggunaan PGF- 2α untuk sinkronisasi berahi pada ternak kerbau

Dosis	Metode	Hasil		Narasumber
		Muncul berahi	% berahi	
30 mg (i.m)	Dua kali (selang 11 hari)	2-3 hari setelah penyuntikan	-	PERERA (1979)
3,5 dan 7 mg	Dua kali (selang 11 hari)	12-15 jam setelah penyuntikan	100%	BATOSAMMA (1980)
500 μ g	Satu kali	45-96 jam setelah penyuntikan	80%	CHOHAN <i>et al.</i> (1991)
2 ml	Dua kali (selang 11 hari)	72 jam setelah penyuntikan	-	SITUMORANG dan SIREGAR (1997)

Progesteron. Prinsip penggunaan progesteron dalam sinkronisasi berahi didasarkan pada daya kerja hormon tersebut dengan umpan balik negatifnya terhadap FSH dan LH. Penghambatan pengeluaran FSH dan LH dan penghilangan hambatan tersebut 7-9 hari kemudian akan menimbulkan berahi pada sekelompok ternak betina pada waktu yang (hampir) bersamaan. Alat yang umum dipakai adalah CIDR (*controlled internal drug release*) dan PRID (*progesteron releasing intravaginal device*). CIDR merupakan alat yang terbuat dari sebatang silikon berbentuk huruf T dan mengandung 1,9 gram hormon progesteron untuk hewan besar (seperti sapi dan kerbau) dan 0,33 gram hormon progesteron untuk hewan kecil (seperti kambing dan domba). Keuntungan penggunaan alat ini adalah untuk mengontrol siklus berahi, mengatasi problem fertilitas seperti *anovulatory anoestrus* (ternak yang tidak bersiklus) dan ovarium yang sistik, serta untuk program seleksi dan transfer embrio. Hampir sama dengan CIDR, PRID merupakan alat mengontrol siklus berahi pada ternak, mengandung hormon progesteron sebanyak 1,9 gram dan berbentuk spons.

Mekanisme kerja dari kedua alat ini sama, yaitu alat ini dimasukkan dan didiamkan dalam vagina selama beberapa hari, selanjutnya progesteron yang terdapat di dalam alat ini akan diserap oleh vagina dan segera disekresikan ke dalam aliran darah yang akan menghambat pelepasan FSH dan LH dari adenohipofisis melalui mekanisme umpan balik negatif. Kadar progesteron dalam darah akan meningkat pada saat alat disisipkan dalam vagina dan tetap stabil dipertahankan selama periode penyisipan alat ini, kemudian akan segera turun dan mencapai level basal setelah alat ini dicabut. Setelah alat ini dicabut akan terjadi *rebound-effect* dan akhirnya terjadi pelepasan hormon FSH dan LH dari adenohipofisis sehingga akan terjadi pematangan folikel, berahi dan ovulasi.

Penggunaan CIDR dan PRID untuk penyerentakan berahi kerbau dapat dilihat pada Tabel 5. Dari data tersebut terlihat bahwa penggunaan kedua alat tersebut cukup efektif untuk program sinkronisasi berahi pada kerbau yang diketahui efisiensi reproduksinya lebih rendah dibandingkan dengan ternak lain (terutama sapi). Sebagai bahan perbandingan, hasil penelitian VARGAS *et al.* (1994) menunjukkan bahwa persentase sapi perah yang memperlihatkan berahi 100, 93 dan 86,8% dalam empat jam setelah CIDR dikeluarkan dengan lama periode implan dalam vagina masing-masing 14, 12 dan 7 hari.

Perbaikan kualitas *semen* beku

Rendahnya keberhasilan IB pada kerbau yang ditandai dengan rendahnya pencapaian CR karena diduga rendahnya kualitas *semen* beku. *Semen* beku kerbau baik pada waktu pembekuan maupun pada waktu *thawing* perlu mendapatkan penanganan yang lebih serius dan hati-hati, karena spermatozoa kerbau lebih mudah rusak selama proses kriopreservasi *semen*. Hal ini disebabkan dalam plasma *semen* kerbau mengandung faktor antimotilitas dan spermiostatik yang dapat menurunkan daya hidup spermatozoa selama proses pembekuan. AHMAD *et al.* (1996) melaporkan kandungan antimotilitas plasma *semen* kerbau lebih tinggi daripada plasma *semen* sapi. Antimotilitas ini diduga adalah nitrogen non protein (NPN) yang mempunyai potensi berubah menjadi amoniak (NH₃) sehingga akan mengganggu proses metabolisme dan motilitas serta dapat membunuh spermatozoa. Akibat adanya faktor antimotilitas menyebabkan persentase motilitas spermatozoa hanya sekitar 20% sampai 50% pada *semen* yang telah dibekukan (GOYAL *et al.*, 1996).

Tabel 5. Penggunaan hormon progesteron untuk penyerentakan berahi kerbau

Jenis	Lama penyisipan (hari)	Hasil		Narasumber
		Muncul berahi	% keserempakan berahi	
CIDR	7	60 jam setelah pencabutan alat	62,5	SUBRAMANIAM dan DEVARAJAN (1992)
	12	Intensitas berahi dan fertilitas tinggi	-	ANDURKAR dan KADU (1995)
PRID	12	60-84 jam setelah pencabutan alat	87,5	RAJAMAHENDRAN dan THAMOTHARAM (1983)
	11	-	78-100	PUTU <i>et al.</i> (1986)

Untuk mengatasi masalah rendahnya kualitas *semen* beku kerbau maka ada beberapa hal yang perlu diperhatikan khususnya dalam proses pembekuan *semen* yaitu (a) jenis pengencer yang digunakan, (b) penggantian/pengeluaran plasma *semen*, dan (c) penanganan *semen* beku selama proses pembekuan.

Jenis Pengencer. Jenis pengencer untuk *semen* kerbau sampai saat ini belum ada standarnya, namun yang umum digunakan adalah pengencer Tris, susu skim dan laktosa. Hasil penelitian penggunaan ketiga jenis pengencer ini bervariasi (Tabel 6), hal ini mungkin disebabkan ketiga jenis pengencer ini mempunyai peranan yang berbeda-beda. Tris berperan sebagai bahan penyangga yang dapat digunakan untuk mempertahankan pH *semen* secara fisiologik. HAFEZ (1993) mengemukakan bahwa kelebihan Tris terletak pada kandungan garam dan asam amino yang dikandungnya yang berperan mempertahankan osmolaritas. Sementara itu, peranan susu skim terletak pada lesitin yang dikandungnya yakni mencegah terjadinya efek kejutan dingin (*cold-shock*) selama proses pembekuan *semen*. Laktosa berperan sebagai sumber energi yang melindungi spermatozoa terhadap pengaruh buruk selama proses pendinginan, pembekuan dan *thawing*. Sebagai krioprotektan, laktosa seluler akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari luar akibat terbentuknya kristal-kristal es selama proses pembekuan *semen*.

Untuk menghindari kematian spermatozoa *semen* kerbau akibat terbentuknya kristal-kristal es, sebaiknya ditambahkan krioprotektan seperti gliserol ke dalam pengencer. Gliserol berperan mencegah efek merugikan akibat adanya pembentukan kristal-kristal es dan perubahan konsentrasi elektrolit serta mampu mencegah pengeluaran air yang berlebih-lebihan dari dalam sel spermatozoa. TOELIHERE (1985) menyatakan bahwa gliserol akan digunakan oleh spermatozoa untuk metabolisme oksidatif dan menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler. Penambahan gliserol 6% dalam pengencer Tris akan memberikan daya perlindungan yang optimal bagi *semen* kerbau (KUMAR *et al.*, 1992) dan dapat mempertahankan kualitas *semen* beku kambing Peranakan Etawah (PE) setelah *thawing* (TAMBING, 1999).

Salah satu penyebab terjadinya kematian sperma kerbau selama proses pembekuan dan *thawing* adalah terjadinya peroksidasi lipid, yang menyebabkan terjadinya perubahan atau kerusakan pada struktur spermatozoa, seperti membran plasma dan tudung akrosom. Peroksidasi lipid dapat menurunkan daya pemuatan spermatozoa. Kerusakan tersebut dapat dicegah dengan penambahan antioksidan (seperti vitamin C, vitamin E dan BHT) ke dalam bahan pengencer (HOFFMAN *et al.*, 1995; WIJAYA, 1996). Hasil penelitian SUMARSONO (1998) menunjukkan bahwa penambahan vitamin C sebanyak 1,5mM dapat

mempertahankan keutuhan membran plasma dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa dari pengaruh kerusakan oleh adanya peroksidasi lipid.

Berdasarkan hal tersebut di atas maka untuk pembekuan *semen* kerbau sebaiknya menggunakan pengencer Tris-sitrat-kuning telur ditambah gliserol untuk meminimalkan kristal-kristal es yang terbentuk dan antioksidan berupa vitamin C untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid.

Pengeluaran/penggantian plasma semen.

Plasma *semen* juga berperan dalam mempengaruhi daya hidup spermatozoa selama pengenceran maupun pembekuan *semen*. Plasma *semen* mengandung berbagai unsur kimia, diantaranya protein, asam askorbat dan mineral. Protein yang terdapat dalam plasma *semen* umumnya glikoprotein yang berperan dalam melindungi dan membungkus membran plasma dan bertalian dengan proses pemuatan (fertilitas). Telah diketahui bahwa plasma *semen* kerbau rendah kandungan proteinnya dibandingkan pada sapi. Melalui penggantian plasma *semen* kerbau dengan plasma *semen* ternak lain diduga akan memperbaiki kualitas sperma kerbau dalam kaitannya dengan fertilitas. AHMAD *et al.* (1996) melaporkan pengeluaran plasma *semen* akan meningkatkan daya hidup spermatozoa *semen* beku kerbau. Hal yang sama dilaporkan oleh AMIN (1998) bahwa penggantian plasma *semen* kerbau dengan plasma *semen* sapi dapat mempertahankan keutuhan membran plasma dan daya hidup spermatozoa kerbau setelah dibekukan maupun *thawing*.

Penanganan selama proses pembekuan.

Penanganan selama proses pembekuan *semen* kerbau yang perlu mendapat perhatian adalah pada waktu ekuilibrisasi, pemindahan ke dalam *container* dan *thawing* (pencairan kembali).

Waktu ekuilibrisasi merupakan fase adaptasi antara spermatozoa dengan bahan pengencer dari suhu kamar ke suhu pembekuan sehingga kematian spermatozoa yang berlebih-lebihan akibat efek kejutan dingin dapat dihindarkan. Dengan adanya penyesuaian antara *semen* dan bahan pengencer diharapkan pula konsentrasi intra dan ekstraseluler menjadi seimbang sehingga kualitas dan perubahan struktur spermatozoa tidak terjadi. Pengaruh yang ditimbulkan bila waktu ekuilibrisasi tidak optimal adalah penurunan kualitas spermatozoa, yaitu timbulnya kerusakan pada struktur sel spermatozoa. Hasil penelitian HERDIS (1998) menunjukkan lama ekuilibrisasi empat jam pada proses pembekuan *semen* kerbau lumpur menghasilkan kualitas *semen* yang lebih baik bila dibandingkan pada dua jam dan enam jam. Bahkan TOELIHERE (1985) menganjurkan ekuilibrisasi minimal empat jam untuk menghindari efek negatif dari gliserol yang ada dalam pengencer.

Proses pemindahan *semen* ke dalam *container* sering kurang diperhatikan padahal turut pula

mempengaruhi kualitas *semen* beku. Sebelum *semen* dipindahkan ke dalam *container*, terlebih dahulu dilakukan proses penguapan selama 10-15 menit, dengan jalan menempatkan *semen* pada rak 2-3 cm di atas permukaan N₂ cair. Setelah mengalami proses penguapan, *semen* langsung dipindahkan ke dalam *container* yang berisi N₂ cair. *Semen* yang telah berada dalam *container* harus dijaga dan jangan terlalu sering dipindah-pindahkan atau dikeluarkan lewat mulut *container*, karena salah satu penyebab tingginya kematian spermatozoa setelah *thawing* adalah terjadinya perubahan suhu *semen* beku dalam *container* akibat manipulasi *semen* beku di dalam *container* N₂ cair yang tidak benar.

Faktor lain yang perlu diperhatikan dalam proses kriopreservasi *semen* kerbau adalah pengaturan suhu dan waktu *thawing*. *Semen* beku yang *dithawing* pada suhu yang tidak tepat akan menurunkan kualitas spermatozoa dan mempengaruhi fertilitas. Suhu yang tinggi dalam media *thawing* akan menyebabkan proses metabolisme spermatozoa meningkat sehingga memerlukan energi yang tinggi pula (SOEPRIONDO, 1985). Namun pada kondisi tersebut spermatozoa akan cepat kehilangan energi sehingga berakibat kematian pada spermatozoa itu sendiri.

Standar suhu dan waktu *thawing semen* beku kerbau saat ini masih bervariasi, namun dari berbagai hasil penelitian (Tabel 7) memperlihatkan suhu *thawing semen* beku kerbau terbaik tidak melebihi suhu kamar (37°C) dengan lama *thawing* 15-30 detik.

Pelaksanaan IB

Faktor terpenting dalam pelaksanaan inseminasi adalah ketepatan waktu pemasukan *semen* pada puncak kesuburan ternak betina. Puncak kesuburan ternak betina adalah pada waktu menjelang ovulasi. Waktu terjadinya ovulasi selalu terkait dengan periode berahi. Pada umumnya ovulasi berlangsung sesudah akhir periode berahi. Menurut HAFEZ (1993) bahwa ovulasi pada ternak kerbau terjadi 15-18 jam sesudah akhir berahi atau 35-45 jam sesudah munculnya gejala berahi.

Sebelum dapat membuahi sel telur yang dikeluarkan sewaktu ovulasi, spermatozoa membutuhkan waktu kapasitasasi untuk menyiapkan pengeluaran enzim-enzim *zona pelucida* dan masuk menyatu dengan ovum menjadi embrio. Waktu kapasitasasi pada kerbau diperkirakan sama dengan waktu kapasitasasi pada sapi, yaitu 5-6 jam (BEARDEN dan FUQUAI, 1997).

Tabel 6. Jenis pengencer untuk *semen* kerbau

Jenis pengencer	Hasil setelah <i>thawing</i>				Naasumber
	% motilitas	% hidup	% tudung akrosom utuh	CR (%)	
Tris	36,66	50,75	-	-	KUMAR <i>et al</i> (1988)
Tris	65,92	68,75	-	-	NATH <i>et al</i> (1991)
Tris	58,95	74,42	-	-	SINGH <i>et al</i> (1994)
Susu skim-kuning telur-gliserol	-	-	-	49,81	ALAM <i>et al</i> (1990)
Tris-sitrat	65,7	65,8	-	-	SITUMORANG (1993)
Laktosa	42,20	-	56,10	-	AKHTAR <i>et al</i> (1990)
Laktosa	49,52	60,09	48,28	-	AMIN (1998)

Tabel 7. Suhu dan lama *thawing semen* beku kerbau

Suhu <i>thawing</i>	Lama <i>thawing</i>	Hasil setelah <i>thawing</i>		Narasumber
		Motilitas (%)	CR (%)	
37°C	15 detik	40	-	AHMAD (1984)
27°C	5 detik	59,34	60	SOEPRIONDO (1985)
37°C	30 detik	>40	-	RAO <i>et al.</i> (1986)

Berdasarkan faktor-faktor tersebut di atas, penentuan waktu terbaik untuk inseminasi pada kerbau adalah mulai 12-16 jam sesudah munculnya gejala berahi sampai 8-9 jam sebelum akhir berahi (RANJHAN dan PTAHAK, 1979) dan ini telah dibuktikan oleh AVANELL (1981) dimana angka konsepsi yang diperoleh 57-83% bila diinseminasi 12-16 jam setelah munculnya gejala berahi pada kerbau lumpur. Metode inseminasinya adalah sama dengan pada sapi, yaitu peletakan *semen* pada posisi 4 (pada pangkal *corpus uteri*) (TOELIHERE, 1985).

KESIMPULAN DAN SARAN

Inseminasi Buatan sebagai alat yang efektif untuk memperbaiki mutu genetik dan meningkatkan populasi ternak, masih memerlukan penanganan dan perhatian yang serius pada ternak kerbau, karena adanya fenomena kesulitan mendeteksi berahi yang berkaitan dengan adanya fenomena *silent heat* (berahi tenang) dan rendahnya kualitas *semen* beku pasca *thawing*. Untuk mengoptimalkan program IB pada ternak kerbau sehingga efisiensi reproduksinya meningkat, ada beberapa hal yang perlu mendapat perhatian yaitu:

1. Melakukan program sinkronisasi berahi dengan menggunakan hormon seperti PGF-2 α yang dilakukan sebanyak dua kali selang 11-12 hari (injeksi intramuskuler) atau penyisipan CIDR atau PRID (mengandung hormon progesteron) selama 11-12 hari.
2. *Thawing semen* beku sebaiknya dilakukan dengan menggunakan air pada suhu 37°C dalam waktu 15-30 detik.
3. Waktu inseminasi sebaiknya dilakukan 12-16 jam sesudah munculnya gejala berahi atau 8-9 jam sebelum akhir berahi dengan peletakan *semen* pada pangkal *corpus uteri* (cincin 4).
4. Proses penanganan *semen* beku (pengeluaran dari *container*, *thawing* sampai diinseminasikan) tidak boleh lewat dari 2,5 menit.

DAFTAR PUSTAKA

AHMAD, K. 1984. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen in straws. *J. Dairy Sci.* 67:1535-1538.

AHMAD, M., A. KHAN, Z.A. SHAH, and K.M. AHMAD. 1996. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 41:193-199.

AKHTAR, T., R.A. CHAUDHARY, I.H. KHAN, and T.M. KHAN. 1990. Extracellular release of hyaluronidase and acrosin from buffalo bull spermatozoa extended in different extenders. Proc. Of the II World Buffalo Congress, New Delhi p. 75-79.

ALAM, N., N.V. KHAN, S.H. HANJRA, and R.H. CHAUDRY. 1990. Fertility of buffalo frozen *semen* using different extenders. *Buffalo Bull.* 9(2):33-34.

AMIN, M.R. 1998. Efektivitas Plasma *Semen Sapi* dan Berbagai Pengencer dalam Meningkatkan Kualitas *Semen* Belu Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

ANDURKAR, K.B. and M.S. KADU. 1995. Induction of oestrus and fertility with CIDR device and combination in on cycling buffaloes. *Indian J. Anim. Reprod.* 16:81-84.

AVANELL, J.A. 1981. Freezing of Swamp Buffalo *Semen* and Conception Following Insemination. Balai Penelitian Ternak Bogor, Indonesia.

BARKAWI, A.H., R.M. KHATTAB, and M.A. EL-WARDANI. 1998. Reproductive efficiency of Egyptian buffaloes in relation to oestrus detection systems. *Anim. Reprod. Sci.* 51:225-231.

BATOSAMMA, J.T. 1980. Penentuan Dosis Enzaprost-F dalam Penyerentakan Birahi dan Pengaruh Waktu Inseminasi terhadap Angka Konsepsi pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

BEARDEN, H.J. and J.W. FUQUAI. 1997. *Applied Animal Reproduction*. Reston Publishing Co., Inc. Prentice Hall Co. Reston Virginia.

BPS. 1998. *Statistik Indonesia Tahun 1998*. Biro Pusat Statistik, Jakarta, Indonesia.

CHOHAN, K.R., J. IQBAL, and A.A. ASGHAR. 1993. Influence of season on fertility of oestrus synchronized buffaloes. *Buffalo J.* 1:65-67.

DITBINPROD, DITJENNAK. 1998. *Rekapitulasi Laporan Pelaksanaan IB Periode 1994/1995-1997/1998*.

DITJENNAK. 1997. *Statistik Peternakan*. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta.

GOYAL R.L., R.K. TULI, G.C. GEORGIE, and D. CHAND. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenology* 46:679-686.

HAFEZ, E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. 6th Edition. Lea and Febiger, Philadelphia.

HERDIS. 1998. Metode Pemberian Gliserol dan Lama Ekuilibrase pada Proses Pembekuan Semen Kerbau Lumpur. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

HOFFMAN, K.E., K. YANELLI, and K.R. BRIDGES. 1991. Ascorbic acid and iron metabolism: alternation in lysosomal function. *American J. Clinic Nut.* 54 Suppl. 6:1188-1192.

JINDAL, R., S.P.S. GILL, M.S. SETIA, and P.J.S. RATTAN. 1988. Estrus synchronization in buffaloes in Thailand. Evaluation of Large Ruminants for the Tropics. ACIAR Proc. p. 21-25.

- KAMONPATANA, M. 1984. Recent research and development program to improve buffalo production in Thailand. Evaluation of Large Ruminants for Tropics. ACIAR Proc. p. 21-25.
- KUMAR, S., K.L. SAHNI, and G. MOHAN. 1992. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 2:151-156.
- KUMAR, S., M.C. VERMA, and S.S. TRIPATHI. 1988. Comparative study on freezability and effect on physico-morphological characteristic of Murrah bull semen in different diluters. *Indian J. Anim. Sci.* 58:771-773.
- LEHRER, A.R., E. AIZINBUD, and G.S. LEWIS. 1992. Oestrus detection in cattle: Recent development. In: *Clinical Trends and Basic Research in Animal Reproduction*. Proc. Of the 12th International Congress on Animal Reproduction. p. 355-362.
- MACMILLAN, K.L., V.K. TAUFU, D.R. BARNES, and A.M. DAY. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cow treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 26:25-40.
- NATH, R., S.S. TRIPATHI, V.B. SAXENA, and R.P. TRIPATHI. 1991. Tris diluent and freezability of buffalo semen. *Indian Vet. J.* 68:135-138.
- PERERA, B.M.A.O. 1979. Synchronization of oestrus and fertility in buffalo of Sri Lanka. In: *Buffalo Reproduction and Artificial Insemination* (Proc.) FAO, Rome.
- PUTU, I.G., A. LUBIS, and I.C. FLETCHER. 1986. Reproduction in swamp buffalo cow after oestrus synchronization at two mating season and two level of nutrition. *Anim Reprod. Sci.* 11:99-100.
- PUTU, I.G. 1992. Prospek pengembangan kerbau di Indonesia. Pros. Pengolahan dan Komunikasi Hasil-Hasil Penelitian Ruminansia Besar. Balai Penelitian Ternak, Bogor.
- RAJAMAHENDRAN, R. and M. THAMOTHARAM. 1983. Effect of progesterone releasing intravaginal device (PRID) on fertility in the post-partum buffalo cow. *Anim. Reprod. Sci.* 6:111-118.
- RANJHAN, S.K. and N.N. Ptahak. 1979. *Management and Feeding Buffalo*. Vilas Publishing House PVT Ltd. New Delhi, Bombay, Bangalore, Calcutta and Kanpor.
- RAO, A.V.N., G.B. HARANATH, G.S. SEKHARAM, and J.R. RAO. 1986. Effect of thaw rates on motility, survival and acsosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium French straws. *Anim. Reprod. Sci.* 12:123-129.
- SHAH, S.N.H. 1990. Prolonged Calving Intervals in the Nili-Ravi Buffalo. Thesis. Faculty Veterinary, Uthrecht University, Netherlands.
- SINGH, T.I., B.N. MOHANTHY, D.N. MOHANTHY, and S.K.H. TRIPATHI. 1994. Effect of extenders on the freezability of buffalo semen. *Indian Vet. J.* 71:508-509.
- SITUMORANG, P. 1993. Daya hidup spermatozoa kerbau sungai, kerbau lumpur dan persilangannya setelah dibekukan dalam nitrogen cair. *Ilmu dan Peternakan* 6(1):6-9.
- SITUMORANG, P. and P. SITEPU. 1991. Comparative growth performance, semen quality and draught capacity of the Indonesian swamp buffalo and its crosses. ACIAR Proc. No. 34 :102-112.
- SITUMORANG, P. and A.R. SIREGAR. 1997. Pengaruh hormon HCG setelah penyuntikan estrumate terhadap kinerja reproduksi kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). *J. Ilmu Ternak Vet.* 2(4):213-217.
- SOEPRIONDO, Y. 1985. Pengaruh Waktu dan Suhu Thawing Semen Beku terhadap Angka Konsepsi pada Ternak Kerbau. Thesis. Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SUBRAMANIAM, A. and K.P. DEVARAJAN. 1991. Oestrus synchronization in non-descript Indian buffaloes with a new intravaginal progesterone pessary and PGF2 α . *Buffalo J.* 1:101-105.
- SUMARSONO, T. 1998. Peningkatan Kualitas Spermatozoa Kerbau Lumpur dengan Penambahan Asam Askorbat dalam Pengencer Semen Beku. Thesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TAMBING, S.N. 1999. Efektivitas Berbagai Dosis Gliserol di dalam Pengencer Tris dan Waktu Ekuilibrasi terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. Thesis. Program Pascasarjana Institut pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHERE, M. R. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung.
- TOELIHERE, M. R. 1995. Technical Cooperation Programme: Consultancy Mission Report; Development of Swamp Buffaloes Indonesia. FAO, Rome.
- TOELIHERE, M. R. 1997. Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembinaan Produksi Peternakan di Indonesia. Disampaikan pada Pertemuan Teknis dan Koordinasi Produksi (PERTEKSI) Peternak Nasional T.A. 1997/1998, Ditjennak di Cisarua, Bogor 4-6 Agustus 1997.
- VARGAS, R. B., Y. FUKUI, A. MIYAMOTO, and Y. TERWAKI. 1994. Estrus synchronization using CIDR in heifers. *J. Reprod. Develop.* 40(1): 59-63.
- WIJAYA, A. 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. Farm Diagnosticum No.1, Laboratorium Klinik Prodia.
- WILLIAMS, W. F., A.M. OSMAN, S.H.M. SHEHATA, and T.S. GROSS. 1986. Pedometer detection of Prostaglandin F2 α induced luteolysis and estrus in the Egyptian buffalo. *Anim. Reprod. Sci.* 11 : 237-241.