

Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang dalam Bahan Pengencer Andromed yang Mendapat Penambahan Sukrosa

The Quality of Spotted Buffalo Epididymal Semen in Andromed Containing Sucrose

M. Surachman^a, Herdis^a, Yulnawati^{b*}, M. Rizal^c & H. Maheshwari^d

^aBadan Pengkajian dan Penerapan Teknologi,
Jln. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340

^{b*}Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Jln. Raya Bogor km. 46, Cibinong 16911

^cJurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura,
Jln. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon 97233

^dDepartemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor,
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
(Diterima 24-11-2008; disetujui 18-02-2009)

ABSTRACT

The aim of this research was to observe the quality of spotted buffalo epididymal sperm after storage at 4 °C as liquid semen for 12 and 24 hours in andromed containing sucrose 0.2% and 0.4%. Sperm was collected from epididymal tissues by combination of slicing and pressing methods. The parameters observed were the percentage of progressive motility and live sperm. The results showed that the percentage of progressive motility of the liquid semen after storage for 12 hours in andromed (A), andromed + sucrose 0.2% (P1) and andromed + sucrose 0.4% (P2) were 48.33%; 53.33% and 55% ($P>0.05$), respectively. In addition, the percentage of motility after 24 hours of storage in those extenders were 45%; 46.67% and 46.67% ($P>0.05$), respectively. The percentage of live sperm in A, P1 and P2 after 12 hours of storage were 70.33%; 73% and 73.33% while after 24 hours of storage, the percentage of live sperm in those extenders were 66.33%; 68.67% and 69.67%, respectively. In conclusion, the addition of 0.2% and 0.4% sucrose in andromed extender could maintain the quality of the spotted buffalo epididymal sperm after storage for 12 and 24 hours at 4 °C.

Key words: epididymal sperm, spotted buffalo, sucrose, liquid semen, andromed

PENDAHULUAN

Upaya penyelamatan keanekaragaman hayati asli Indonesia merupakan salah satu agenda penting dalam pelaksanaan kegiatan

*Korespondensi:
Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Jln. Raya Bogor km. 46, Cibinong 16911
e-mail: yulnawati@yahoo.com

penelitian di Indonesia. Sebagai hewan asli dan diketahui sebagai ternak khas Kabupaten Tana Toraja, Sulawesi Selatan, kerbau belang perlu mendapat perhatian khusus dalam hal peningkatan populasi dan pencegahan dari ancaman kepunahan. Hewan ini digunakan oleh masyarakat setempat sebagai hewan persembahan dalam berbagai upacara adat, terutama upacara kematian. Masyarakat mempercayai bahwa semakin banyak kerbau belang jantan yang dikorbankan, semakin mudah jalan orang yang meninggal menuju surga. Selain itu, sistem pemeliharaan kerbau belang jantan juga unik, yaitu selalu dipisahkan dari kerbau betina untuk mencegah terjadinya aktivitas reproduksi. Kedua hal tersebut memberikan dampak negatif dalam upaya penyelamatan dan peningkatan populasi kerbau belang yang cenderung mengalami penurunan setiap tahunnya.

Pendekatan teknologi reproduksi merupakan salah satu upaya penting yang sebaiknya dilakukan untuk mengatasi permasalahan kerbau belang tersebut. Seperti diketahui, bagian *cauda* epididimis merupakan gudang penyimpanan spermatozoa sebelum dikeluarkan pada proses ejakulasi (Hafez & Hafez, 2000). Spermatozoa asal epididimis ternak atau hewan yang telah dipotong merupakan salah satu alternatif sumber spermatozoa untuk memenuhi kebutuhan dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi. Menurut Axner *et al.* (1998), spermatozoa yang berasal dari bagian *cauda* epididimis telah memiliki motilitas dan kemampuan membuahi oosit yang sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa epididimis pada berbagai spesies lainnya seperti sapi (Graham, 1994), rusa (Soler *et al.*, 2003) dan kerbau Afrika (Herrick *et al.* 2004; Herold *et al.*, 2004; Harshan *et al.* 2005; Herold *et al.*, 2006), diketahui memiliki kualitas seperti halnya spermatozoa hasil ejakulasi.

Penggunaan epididimis dapat dijadikan sebagai alternatif sumber spermatozoa untuk menggantikan spermatozoa asal ejakulat pada kasus kerbau belang yang memiliki aktivitas reproduksi dibatasi, bahkan dilarang oleh

peternak. Teknik tersebut potensial untuk penyelamatan dan peningkatan populasinya. Epididimis kerbau belang dapat dikumpulkan pada saat prosesi upacara adat kematian dan upacara adat lainnya, sehingga penyelamatan spesies ini dapat dilakukan tanpa mengganggu kepercayaan dan kebiasaan masyarakat setempat dalam sistem pemeliharaan ternak. Spermatozoa dari epididimis kerbau belang dapat dikoleksi dengan berbagai metode, seperti penyayatan (*slicing*), aspirasi, penekanan pada jaringan dan pembilasan (*flushing*). Selanjutnya spermatozoa epididimis tersebut dapat disimpan, baik dalam bentuk cair maupun beku, sampai digunakan lebih lanjut untuk tujuan inseminasi buatan (IB), *in vitro embryo production* (IVEP) maupun *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) untuk memperoleh keturunan yang membawa sifat belang dari pejantan.

Bahan pengencer yang digunakan untuk tujuan penyimpanan spermatozoa, baik dalam bentuk cair maupun beku, memegang peranan penting dalam upaya mempertahankan kualitas spermatozoa selama masa penyimpanan. Sukrosa termasuk dalam golongan disakarida yang terdiri dari glukosa dan fruktosa. Sebagai karbohidrat, sukrosa diduga dapat digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler dan sumber energi bagi metabolisme spermatozoa selama penyimpanan pada suhu rendah (4°C). Penambahan sukrosa dengan dua konsentrasi yang berbeda, yaitu 0,2% dan 0,4% w/v ke dalam bahan pengencer andromed, dilakukan dalam penelitian ini sebagai usaha mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang selama penyimpanan dalam bentuk cair pada suhu rendah.

MATERI DAN METODE

Koleksi epididimis kerbau belang dilakukan pada saat upacara pemakaman keluarga di Desa Pangli, Kecamatan Sa'dan, Kabupaten Tana Toraja. Bagian *cauda* epididimis dibilas dan disimpan dalam larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebagai media transportasi. Selanjutnya spermatozoa dari bagian *cauda* epididimis

dikoleksi dengan kombinasi teknik *slicing*/penyayatan dan penekanan pada setiap jaringan *cauda* (Rizal *et al.*, 2004a) menggunakan larutan andromed sebagai medium pengencer. Spermatozoa segar (sebelum diencerkan) hasil koleksi dievaluasi kualitasnya, meliputi konsentrasi spermatozoa, persentase (%) motilitas, % hidup, % abnormalitas dan % membran plasma utuh (MPU).

Haemositometer dan *neubauer chamber* digunakan untuk menghitung konsentrasi spermatozoa. Spermatozoa hasil koleksi yang belum diencerkan diletakkan di atas gelas objek kemudian disedot dengan pipet eritrosit hingga angka 0,5, dan ditambahkan larutan NaCl 3% hingga mencapai angka 101 dan dihomogenkan. Konsentrasi dihitung pada lima kamar hitung neubauer (Toelihere, 1993). Persentase motilitas progresif (bergerak ke depan) spermatozoa dihitung secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0%-100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa yang hidup ditentukan dengan menggunakan pewarnaan eosin B (Merck, Cat. No. 509 K5003834, Germany) (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih (transparan), sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah. Sebanyak minimal 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Persentase abnormalitas spermatozoa meliputi spermatozoa yang tidak memiliki kepala atau ekor, kepala besar atau kecil, memiliki dua kepala atau ekor (Toelihere, 1993). Sebanyak minimal 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Persentase MPU ditentukan menggunakan metoda Rodriguez-Gil *et al.* (1994) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 0,1 ml semen dicampur dengan 9,9 ml medium hipoosmotik. Medium hipoosmotik dibuat dengan melarutkan 0,3 g fruktosa (Merck, Cat. No. 4007.1.0250, Germany) dan 0,7 g Na sitrat (Merck, Cat. No. 6448, Germany) ke dalam

100 ml akuabidestilata. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 45 menit. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Sebanyak minimal 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Spermatozoa hasil koleksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 G selama 20 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sedimen yang mengandung spermatozoa diencerkan kembali dengan bahan pengencer yang disesuaikan dengan perlakuan yang akan dilakukan. Jumlah pengencer yang digunakan disesuaikan berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi yang telah dilakukan sebelumnya.

Spermatozoa epididimis diencerkan dengan menggunakan medium pengencer dasar komersial andromed (Minitub, Germany). Andromed terdiri atas tris hidroksi metil aminometan, fruktosa, asam sitrat dan beberapa jenis antibiotik (Minitub, 2001). Sebagai kontrol, digunakan andromed yang diencerkan dengan akuabidestilata dengan perbandingan 1:4. Sebagai perlakuan dilakukan penambahan sukrosa dengan dosis 0,2% dan 0,4% ke dalam medium pengencer andromed seperti pada kontrol. Pengamatan dilakukan setelah 12 dan 24 jam penyimpanan dalam bentuk cair pada suhu ± 4 °C.

Peubah yang dievaluasi dalam penelitian ini adalah kuantitas dan kualitas spermatozoa segar setelah koleksi, meliputi konsentrasi, motilitas, spermatozoa hidup, abnormalitas dan MPU serta kualitas spermatozoa selama penyimpanan dalam bentuk semen cair meliputi motilitas dan persentase spermatozoa hidup. Data yang diperoleh dianalisa dengan sidik ragam (ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan bahan pengencer dan lima kali pengamatan sebagai ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa Segar dari Epididimis

Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh sebesar $10.533,3 \times 10^6$ spermatozoa/ml (Tabel 1). Hasil ini masih dalam kisaran jumlah seperti yang dilaporkan Senger (1999) bahwa konsentrasi spermatozoa di bagian *cauda* epididimis hewan mamalia sebanyak 10.000–50.000 juta sel/ml. Hasil yang diperoleh berbeda dengan yang dilaporkan pada domba. Menurut Rizal *et al.* (2004b), *cauda* epididimis domba garut mempunyai konsentrasi spermatozoa rata-rata sebanyak 13.993,33 juta sel/ml (berkisar antara 13.530 dan 14.520 juta sel/ml). Perbedaan hasil yang diperoleh diduga disebabkan karena perbedaan jenis ternak dan perbedaan metode koleksi yang digunakan.

Persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang diperoleh dari penelitian ini ($65,0 \pm 0,0\%$) lebih tinggi nilainya daripada hasil penelitian Herrick *et al.* (2004), Herold *et al.* (2006) serta Herold *et al.* (2004) terhadap spermatozoa epididimis kerbau Afrika (*Syncerus caffer*), yakni berturut-turut sebesar $60,0 \pm 3,82\%$, $58 \pm 17\%$ dan $53,0 \pm 12,51\%$. Perbedaan ini diduga akibat perbedaan spesies kerbau dan kondisi individu masing-masing pejantan yang digunakan dalam penelitian tersebut. Hasil penelitian pada beberapa ternak dilaporkan bahwa persentase spermatozoa motil *cauda* epididimis pada domba garut rata-rata sebesar $70,83\%$ (Rizal *et al.*, 2004b), pada badak rata-rata sebesar $70\%–75\%$ (Lubbe *et al.*, 1999), pada kuda rata-rata sebesar $38\%–77\%$

(Squires *et al.*, 2000) dan pada rusa merah rata-rata sebesar $57,6\%$ (Soler *et al.*, 2003).

Persentase hidup spermatozoa epididimis segar yang diperoleh dalam penelitian ini sebesar $76 \pm 2,83\%$, lebih rendah nilainya daripada laporan Herrick *et al.* (2004) pada spermatozoa asal epididimis kerbau afrika yakni sebesar $92,75 \pm 2,25\%$. Hal tersebut diduga terjadi akibat perbedaan jenis ternak dan kondisi dari masing-masing individu pejantan yang digunakan. Persentase abnormalitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar $15,33 \pm 2,49\%$. Abnormalitas spermatozoa paling banyak ditemukan pada pengamatan ini disebabkan masih adanya *cytoplasmic droplet* pada bagian distal. Meskipun demikian, angka ini masih berada dalam kisaran normal abnormalitas spermatozoa yang layak digunakan proses fertilisasi.

Persentase MPU yang diperoleh pada penelitian ini sekitar $80,8\%$, lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan Soler *et al.* (2003) pada rusa merah yakni sebesar 90% . Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup spermatozoa yang dihasilkan. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Kualitas Spermatozoa Epididimis Setelah Proses Penyimpanan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah penyimpanan 12 dan 24 jam pada suhu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, secara umum kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang cenderung mengalami penurunan (Tabel 2). Persentase motilitas dalam ketiga bahan pengencer (A, P1, dan P2) pada saat 0 jam penyimpanan adalah sebesar 65% , namun kemudian mengalami penurunan setelah disimpan selama 12 jam dalam tiga jenis bahan pengencer, yaitu kontrol/A

Tabel 1. Rataan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang

Peubah	Hasil
Konsentrasi ($\times 10^6$ sperma/ml)	$10.533,30 \pm 47,17$
Motilitas progresif (%)	$65,00 \pm 0,00$
Hidup (%)	$76,00 \pm 2,83$
Abnormalitas (%)	$15,33 \pm 2,49$
Membran plasma utuh (MPU; %)	$80,80 \pm 0,40$

Tabel 2. Persentase motilitas dan hidup spermatozoa epididimis kerbau belang pada penyimpanan dalam bentuk cair (rata-rata±stdev)

Perlakuan	0 jam (segar)		12 jam		24 jam	
	%M	%H	%M	%H	%M	%H
Kontrol (A)	65,00±0,00	76,00±2,83	48,33±2,36	70,33±0,47 ^a	45,00±4,08	66,33±1,25 ^a
Sukrosa 0,2% (P1)	65,00±0,00	78,33±0,94	53,33±4,71	73,00±1,63 ^{ab}	46,67±2,36	68,67±1,25 ^{ab}
Sukrosa 0,4% (P2)	65,00±0,00	77,67±1,70	55,00±4,08	73,33±1,25 ^b	46,67±2,36	69,67±1,25 ^b

Keterangan: %M=persentase motilitas progresif, %H=persentase hidup; superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$).

(48,33%), P1 (53,33%) dan P2 (55%). Tidak ada perbedaan nyata persentase motilitas spermatozoa setelah penyimpanan 12 dan 24 jam, dalam ketiga jenis bahan pengencer. Setelah 24 jam penyimpanan, persentase motilitas dalam bahan pengencer A, P1 dan P2 secara berturut-turut adalah 45%; 46,67% dan 46,67%.

Penurunan persentase motilitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu rendah memang sudah sewajarnya terjadi. Metabolisme sel masih terus terjadi pada saat disimpan dalam bentuk cair walaupun dengan kecepatan rendah. Hal tersebut menyebabkan proses apoptosis sel terus berjalan sehingga semakin lama penyimpanan maka persentase motilitas dan hidup spermatozoa menjadi semakin rendah.

Persentase hidup spermatozoa dalam ketiga bahan pengencer A, P1, dan P2 pada saat 0 jam (kondisi segar) secara berturut-turut adalah 76%; 78,33% dan 77,67% ($P>0,05$). Persentase hidup spermatozoa setelah 12 jam penyimpanan pada suhu rendah berturut-turut dalam bahan pengencer A, P1, dan P2 adalah 70,33%; 73% dan 73,33% ($P<0,05$). Sementara itu, persentase hidup spermatozoa dalam ketiga bahan pengencer tersebut setelah disimpan 24 jam pada suhu rendah menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P<0,05$) dibandingkan pada saat kondisi segar (0 jam).

Membran plasma sel terdiri atas karbohidrat yang berikatan dengan lipida (glikolipida) dan protein (glikoprotein) atau yang disebut dengan selubung sel/glikokaliks (Subowo 1995). Glikokaliks menyebabkan karbohidrat seperti sukrosa berperan sebagai krioprotektan

ekstraseluler untuk melindungi membran dari kerusakan selama penyimpanan pada suhu rendah. Membran sel yang lebih terlindungi oleh keberadaan sukrosa dalam penelitian ini menghasilkan persentase hidup sel lebih tinggi dalam bahan pengencer perlakuan setelah 12 dan 24 jam penyimpanan. Karbohidrat dari golongan disakarida seperti sukrosa dan laktosa diketahui lebih baik dalam mempertahankan fungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler dibandingkan dengan monosakarida seperti glukosa dan fruktosa (Aisen *et al.*, 2002).

Fruktosa sebagai substrat energi utama yang terkandung dalam bahan pengencer dasar andromed dapat bekerja secara sinergis dengan sukrosa sebagai substrat energi tambahan dalam penelitian ini. Keberadaan sukrosa sebagai substrat energi tambahan diduga dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis selama penyimpanan dalam bentuk cair pada suhu rendah.

Adanya ketersediaan substrat energi yang cukup selama penyimpanan, baik dalam bentuk cair maupun beku sangat penting artinya untuk metabolisme sel. Jika substrat energi yang terkandung dalam bahan pengencer tidak mencukupi kebutuhan sel, maka sel spermatozoa akan semakin cepat mengalami kematian. Oleh karena itu, penambahan substrat energi ke dalam bahan pengencer spermatozoa diharapkan dapat mempertahankan persentase motilitas dan hidup spermatozoa selama jangka waktu tertentu dan disimpan pada suhu rendah, baik dalam bentuk cair maupun beku.

Sukrosa merupakan disakarida yang terdiri atas satu unit fruktosa dan satu unit

α -glukosa, dengan rumus kimia $C_{12}H_{22}O_{11}$. Ikatan antara kedua gula tersebut dihubungkan dengan ikatan glikosida antara atom C_1 dari glukosa dengan atom C_2 dari fruktosa. Sukrosa dalam kehidupan sehari-hari dikenal sebagai pemanis yang mempengaruhi kadar gula dalam darah manusia.

Energi yang dihasilkan dari proses perombakan sukrosa dapat dimanfaatkan untuk proses sintesa biomolekul, diantaranya sintesa protein dalam upaya mempertahankan organel-organel sel supaya tetap aktif menjalankan fungsinya sehingga spermatozoa tetap hidup. Sukrosa dalam hal ini merupakan bahan baku (karbohidrat) sebagai sumber energi dalam proses metabolisme yang lebih banyak untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa dalam waktu yang lebih lama.

KESIMPULAN

Penambahan sukrosa hingga 0,4% ke dalam bahan pengencer andromed dapat mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang sampai 24 jam penyimpanan dalam bentuk cair.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA BIOTROP 2008 dengan nomor kontrak No. 047.1/PSRP-SP/III/2008. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sub Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja, Keluarga dr. Yulius dan Bapak Slamet Sumitro yang telah membantu dalam penyediaan peralatan laboratorium, pengadaan dan pengambilan sampel epididimis kerbau belang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisen, E.G., V.H. Medina & A. Venturino.** 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalosa concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Axner, E., B. Sormholst & C. Linde-Forsberg.** 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50: 973-979.
- Graham, J.K.** 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during cryopreservation process. *Theriogenology* 46: 1151-1162.
- Hafez, E.S.E. & B. Hafez.** 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed. Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Harshan H. M., L.P. Singh, A. Arangasamy, M. R. Ansari & S. Kumar.** 2005. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 124-133.
- Herold, F.C., J.E. Aurich & D. Gerber.** 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed[®] and Triladyl[™] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- Herold, F.C., K. de Haas, B. Colenbrander & D. Gerber.** 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl[™] or Andromed[®]. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
- Herrick, J.R., P. Bartels, & R.L. Krisher.** 2004. Postthaw evaluation of *in vitro* function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovines. *Biol. Reprod.* 71: 948-958.
- Lubbe, K., R.L. Smith, P. Bartels & R.A. Godke.** 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different cryodiluents. *Theriogenology* 51: 288. (Abstr).
- Minitub.** 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfull und Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- Rasul, Z., N. Ahmad & M. Anzar.** 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* 22: 278-283.
- Rizal, M., Herdis & A. Boediono.** 2004a. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5 °C). *J. Anim. Prod.* 6: 30-36.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara & P. Situmorang.** 2004b. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa

- epididimis domba garut. *J. Veteriner* 5: 95-103.
- Rodriguez-Gil, J.E., A. Montserrat, & T. Rigau.** 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 42: 815-830.
- Senger, P.L.** 1999. The organization and function of the male reproductive system. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc., Pullman, Washington.*
- Soler A.J., M.D. Perez-Guzman & J.J. Garde.** 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5 °C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *J. Exp. Zool.* 295A: 188-199.
- Squires, E.L., C. Gomez-Cuetara & J.K. Graham.** 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. *Proceedings 14th International Congress on Animal Reproduction.* 2(17): 38 (Abstr.).
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie.** 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika.* Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Subowo.** 1995. *Biologi Sel.* Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M.R.** 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak.* Angkasa, Bandung.