



**REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA**

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia Republik Indonesia, berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta yaitu Undang-Undang tentang perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra (tidak melindungi hak kekayaan intelektual lainnya), dengan ini menerangkan bahwa hal-hal tersebut di bawah ini telah tercatat dalam Daftar Umum Ciptaan:

- I. Nomor dan tanggal permohonan : C00201504089, 12 November 2015
- II. Pencipta
Nama : **ENIKE DWI KUSUMAWATI**
Alamat : Tempursari Utara Rt.004 Rw.001, Desa Tempursari
Kec. Donomulyo, Kab. Malang, Jawa Timur.
Kewarganegaraan : Indonesia
- III. Pemegang Hak Cipta
Nama : **UNIVERSITAS KANJURUHAN MALANG**
Alamat : Jalan Sudanco Supriadi No.48
Malang, Jawa Timur.
Kewarganegaraan :
- IV. Jenis Ciptaan : Buku
- V. Judul Ciptaan : **SEXING SPERMATOZOA KAMBING**
- VI. Tanggal dan tempat diumumkan : 30 Juni 2015, di Malang
untuk pertama kali di wilayah
Indonesia atau di luar wilayah
Indonesia
- VII. Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak pertama
kali diumumkan.
- VIII. Nomor pencatatan : 076823

Pencatatan Ciptaan atau produk Hak Terkait dalam Daftar Umum Ciptaan bukan merupakan pengesahan atas isi, arti, maksud, atau bentuk dari Ciptaan atau produk Hak Terkait yang dicatat. Menteri tidak bertanggung jawab atas isi, arti, maksud, atau bentuk dari Ciptaan atau produk Hak Terkait yang terdaftar. (Pasal 72 dan Penjelasan Pasal 72 Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta)

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
u.b.
DIREKTUR HAK CIPTA DAN DESAIN INDUSTRI



Dr. Dra. Erni Widhyastari, Apt., M.Si.
NIP. 196003181991032001



SEXING

SPERMATOZOA

KAMBING



Enike Dwi Kusumawati, S.Pt, MP.



SEXING SPERMATOZOA KAMBING

Enike Dwi Kusumawati, S.Pt, MP.



SEXING SPERMATOCYTES KAMBING

Penulis

Enike Dwi Kusumawati, S.Pt, MP.

Desain Cover

Enike Dwi Kusumawati, S.Pt, MP.

Layout

Tim MNC Publishing

Cetakan I, November 2015

Diterbitkan oleh



Media Nusa Creative

Anggota IKAPI (162/JTI/2015)

Bukit Cemara Tidar H5 No. 34 Malang

Telp : 0341-563 149 / 08223 2121 888

Email : mnc.publishing.malang@gmail.com

ISBN : 978-602-0839-91-2

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ke dalam bentuk apapun, secara elektronis maupun mekanis, termasuk fotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari Penerbit. Undang-Undang Nomor 19 Tahun 2000 tentang Hak Cipta, Bab XII Ketentuan Pidana, Pasal 72, Ayat (1), (2), dan (6)

KATA PENGANTAR

Sexing merupakan suatu teknologi yang telah banyak digunakan sebagai salah satu cara untuk meningkatkan kualitas ternak secara genetik. Penelitian-penelitian terus dilakukan dan penemuan-penemuan baru pun terus bermunculan.

Penerbitan buku ini dimaksudkan agar mahasiswa Fakultas Peternakan dan Fakultas Kedokteran Hewan dapat menambah wawasan mereka dan sebagai standar pelajaran di bidang teknologi reproduksi ternak. Selain itu dapat dimanfaatkan oleh semua pihak yang berkepentingan dengan pembangunan peternakan.

Buku ini dilengkapi dengan gambar-gambar yang diangkat dari hasil penelitian dan dari beberapa buku teks sebagai acuan dalam rangka memasyarakatkan pengetahuan. Oleh karena itu penulis mengucapkan penghargaan dan terima kasih kepada mereka yang turut melengkapi buku ini.

Ucapan terimakasih disampaikan kepada semua pihak yang tanpa bantuannya penulisan buku ini tidak akan dapat dilaksanakan.

Malang, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	v
BAB I Pengencer Semen.....	1
BAB II Semen Kambing	11
BAB III Evaluasi Semen	23
BAB IV Semen Cair.....	35
BAB V Sexing	43
DAFTAR PUSTAKA	53

1

PENGECER SEMEN

Tujuan pengenceran semen

Pengenceran semen bertujuan untuk memperbanyak volume dan mempertahankan daya fertilisasi sebelum disemprotkan ke dalam saluran kelamin betina pada saat birahi serta memperbanyak jumlah betina yang bisa dibuahi dari satu ejakulat dengan fertilitas yang relatif sama dengan kawin alam (Hafez, 2008). Pengenceran dan penyimpanan juga bertujuan untuk menurunkan aktivitas metabolisme yang berlebihan agar dapat memperpanjang waktu hidup spermatozoa di dalamnya, bahan pengencer yang digunakan hendaknya mampu menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi, mencegah stres dingin, mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan sebagai *buffer* untuk mencegah perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat yang membahayakan spermatozoa (Brackett *et al.*, 1981; Hafez, 2008).

Bahan pengencer semen harus memenuhi syarat tidak hanya untuk memperbanyak volume semen atau memperkecil konsentrasi spermatozoa hingga tingkat yang diinginkan untuk keperluan IB dalam jumlah banyak, tetapi harus menyediakan lingkungan yang sesuai bagi spermatozoa, sehingga mampu mempertahankan kapasitas pembuahan spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 4°-5°C (Foote *et al.*, 1993; Tuli dan Holtz, 1992).

Layak atau tidaknya semen untuk diencerkan serta tingkat pengencerannya, karakteristik spermatozoa pada setiap ml perlu diketahui (Tambing *et al.*, 2000). Kualitas spermatozoa kambing secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti perbedaan

suhu selama inkubasi, jenis dan variasi antar individu hewan asal semen (Flesch dan Gadelia, 2000).

Tingkat pengenceran 1;1 - 1;23 (v/v; semen ; pengencer) telah terbukti mampu mempertahankan motilitas spermatozoa selama beberapa hari (Evans dan Mazwell, 1987; Ritar *et al.*, 1990). Pengenceran semen dengan larutan sitrat kuning telur dilakukan dengan dosis pengenceran $50 \times 10^6 / 0,2$ ml terbukti cukup baik mempertahankan kualitas spermatozoa (Arifianti *et al.*, 1999), dan jika semen cair akan dibekukan dengan angka fertilitas dipertahankan secara maksimal maka konsentrasi berkisar 80 - 500 $\times 10^6 / \text{ml}$ (Corteel, 1974; Karatzas *et al.*, 1997; Ritar *et al.*, 1990).

Oleh karena itu bahan pengencer dipersiapkan bukan hanya sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa tetapi harus mampu melindungi spermatozoa dari berbagai efek negatif akibat aktifitas metabolisme, kapasitas, stress dingin, radikal bebas dan lainnya. Unsur-unsur yang ditambahkan seperti antibiotik, fruktosa, kuning telur, antioksidan, dan berbagai subtrat yang lain dengan berbagai kadar dan dampak terhadap kualitas spermatozoa, baik dalam bentuk semen encer maupun beku (Hafez, 2008).

Bahan pengencer semen

Dalam proses pengolahan semen, bahan pengencer adalah bahan yang paling penting untuk mempertahankan kualitas spermatozoa. Triss - kuning telur - glukosa dan susu skim adalah bahan yang paling umum dipakai untuk cryopreservasi semen kambing. Diberbagai literatur disebutkan bahwa kedua pengencer tersebut terbukti mampu mempertahankan kualitas spermatozoa kambing dan pada berbagai hewan domestikasi termasuk kualitas semen beku *post thawing* (Purdy, 2006).

Walaupun pemanfaatan kuning telur ada dampak negatifnya seperti *Egg Yolk Coagulation Enzymes* (EYCE), pemanfaatan kuning telur di dalam pengencer semen masih menjadi bahan pengencer yang penting dan sudah umum

digunakan (Jeyendran, 1995; Papa *et al.*, 2010). Penelitian pada semen sapi menggunakan pengencer komersial *Bioxcell*® dan tris-sitrat telur mendapatkan efisiensi dan fertilitas yang dihasilkan oleh kedua pengencer komersial hanya sanitasi yang lebih terjamin sehingga kemungkinan terjadinya resiko kontaminasi zat kimia tertentu jauh lebih rendah dan *extender* tersebut siap untuk digunakan (Akhter *et al.*, 2010).

Kuning telur merupakan bahan yang sudah dikembangkan dengan sukses dan umumnya ditambahkan di dalam sitrat dan tris. Fraksi *lipoprotein* dan *fosfolipid* yang berasal dari kuning telur dapat mencegah *cold shock* selama pendinginan dan pembekuan dengan melindungi integritas membran spermatozoa. Aktifnya kontituen di dalam fraksi lipoprotein densitas rendah menyebabkan pengikatan lipida pada membrane (Jeyendran *et al.*, 1995). Selain itu aksi proteksi dari kuning telur adalah menjaga tekanan osmotik, mengurangi kerusakan membran akibat radikal bebas dari aktivitas peroksidase dan interaksi antara kuning telur dengan protein plasma (Jeyendran dan Graham, 1980).

Motilitas spermatozoa di dalam semen segar maupun semen beku *post thawing* dengan pengencer yang ditambahkan 15% jauh lebih baik dibandingkan pengencer yang ditambahkan 4,5% kuning telur. Kesimpulannya, kuning telur adalah bahan yang sulit dicari penggantinya sebagai bahan pengencer semen kambing (Valente *et al.*, 2010).

Bahan lain yang sudah digunakan untuk mengencerkan semen adalah sitrat-kuning telur, tris-kuning telur, susu skim, air kelapa, sitrat kuning telur burung puyuh (Evans dan Maxwell, 1987; Toelihere, 1993). Hampir semua pengencer ini mengandung bahan hewani yang pada umumnya cepat rusak apabila disimpan selama lebih lama dari 3 hari. Kerusakan bahan-bahan pengencer juga turut mempercepat kerusakan struktur dan fungsi spermatozoa. Kerusakan diduga akibat terjadinya akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) dengan meningkatkan peroksidasi lipida (Papa *et al.*, 2010).

Pemanfaatan bahan nabati seperti *lecithin* yaitu protein yang diisolasi dari kedelai telah dilakukan untuk mensubstitusi peran kuning telur didalam pengencer semen kuda. Keuntungan menggunakan *lecithin* kedelai memperkecil kemungkinan terjadinya kontaminasi mikroba negatif yang berasal dari kuning telur dan susu. Hasil penelitian menunjukkan, *lecithin* dengan konsentrasi 10 g/l pengencer pada semen kuda *post thawing* diperoleh hasil motilitas massa, motilitas progresif dan integritas membran spermatozoa berturut-turut $68,1 \pm 15,9\%$, $28,8 \pm 9,2\%$ dan $50,7 \pm 10,3\%$ (Papa *et al.*, 2010).

Penelitian yang sudah dilakukan oleh Herdis *et al.* (2003) menyimpulkan kombinasi dari sebuah melon ditambah 40% kuning telur mampu mempertahankan motilitas spermatozoa domba Garut sampai hari ketiga sebesar $45,83 \pm 4,92\%$ atau tidak berbeda nyata dibandingkan dengan pengencer tris dan 20% kuning telur ($51,67 \pm 2,06\%$). Pengencer semen kambing dengan komposisi 20% santan kelapa dan 80% sitrat buffer menunjukkan performan motilitas tertinggi yaitu 52,6% dibandingkan pengencer dengan komposisi 40% santan kelapa dan 60% sitrat buffer serta 50% santan kelapa dan 50% sitrat buffer yaitu berturut-turut $19,6 \pm 5,98$ dan $9,0 \pm$ yang diamati 3 jam setelah pengenceran dan disimpan pada suhu kamar (Sule *et al.*, 2007).

Pemberian suplemen tradisional berupa madu, telur, temu kunci dan vitamin E pada sapi bali terbukti dapat meningkatkan motilitas spermatozoa secara signifikan dari $80,3 \pm 8,2\%$ sebelum pemberian suplemen menjadi $88,7 \pm 5,5\%$ setelah pemberian suplemen. Demikian juga dengan viabilitas spermatozoa meningkat dari $66,1 \pm 12,5\%$ sebelum pemberian suplemen menjadi $77,9 \pm 7,6\%$ setelah pemberian suplemen (Ratnawati *et al.*, 2008). Penambahan 5% madu didalam pakan selama 20 hari berturut-turut secara signifikan meningkatkan konsentrasi spermatozoa yang diambil dari epididymis sampai 37% (Salam *et al.*, 2008).

Selama penyimpanan semen baik dalam bentuk cair maupun beku akan terjadi perubahan struktur dan fungsi

spermatozoa yang disebabkan oleh aktivitas metabolisme selama persiapan dan penyimpanan. Penggunaan pengencer dan pengelolaan yang tidak akurat berpeluang menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Kerusakan ini dapat menghasilkan debris dan zat-zat yang bisa mengganggu integritas membrane sel, sehingga mempengaruhi struktur dan fungsi spermatozoa (Check *et al.*, 1991), menurunkan motilitas, merusak mitokondria, enzim-enzim dan akrosom (Wheeler, 1996).

Bahan pengencer yang ideal harus memenuhi syarat yaitu a) mengandung berbagai nutrisi sebagai sumber energy bagi spermatozoa, b) mengandung berbagai konstituen yang mampu melindungi efek negatif proses pembekuan, c) sebagai buffer yang akan mencegah perubahan pH, d) menjaga keseimbangan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, e) mengandung anti biotik untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, f) menambah volume semen sehingga meningkatkan jumlah ternak yang bisa di IB dari satu ejakulat, g) mempersiapkan lingkungan yang nyaman sehingga metabolisme spermatozoa dapat terjadi secara normal (Foote, 1980; Graham, 1978; Hafez, 2008).

Oleh karena itu bahan pengencer dipersiapkan tidak hanya sebagai sumber nutrisi tetapi harus mampu melindungi spermatozoa dari berbagai efek negatif akibat aktifitas metabolisme, kapasitas, *cold shock* dan lainnya. unsur-unsur yang ditambahkan seperti antibiotik, fruktosa, kuning telur dan berbagai substrat yang lain dengan berbagai kadar dan dampak terhadap kualitas semen (Evans dan Maxwell, 1987).

Osmolaritas pengencer dan integritas plasma membrane spermatozoa

Spermatozoa dibungkus oleh membran dari kepala sampai ekor yang secara umum memiliki susunan molekul dan fungsi yang kompleks baik secara molekuler maupun fungsional (Jhonson *et al.*, 1996; Arifiantini *et al.*, 1999). Membran plasma berfungsi sebagai

unsur transport dari dalam sel ke luar sel dan sebagai pelindung spermatozoa terhadap berbagai perubahan lingkungan. Apabila membran plasma mengalami kerusakan maka proses tersebut tidak dapat berlangsung sehingga akan menurunkan kualitas spermatozoa (Arifiantini *et al.*, 1999).

Keutuhan membran spermatozoa baik secara langsung maupun tidak langsung berhubungan dengan kemampuannya untuk berinteraksi dan menempel pada *cumulus oophyrus* (Rodrigues-Matrinez, 2003). Fertilitas spermatozoa dipengaruhi oleh motilitas, kapasitasi dan reaksi akrosoma, vibilitas dan keutuhan DNA. Berbagai metode sederhana, murah, dan efektif untuk menilai kualitas spermatozoa ternak telah dilakukan dan integritas plasma membrane adalah salah satu faktor yang berpengaruh langsung terhadap kualitas spermatozoa (Pawar dan Kaul, 2011). Sehingga keutuhan membran dan viabilitas spermatozoa adalah syarat utama untuk terjadinya fertilisasi (Moce dan Graham, 2008).

Integritas membran spermatozoa secara fisiologis berperan pada sebagai proses yang sangat vital yang terjadi pada spermatozoa, termasuk melindungi dan mempertahankan motilitas spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina, kapasitasi dan fertilisasi (Moce dan Graham, 2008). Pengaruh *cold shock* terhadap sel spermatozoa menyebabkan terjadi penurunan motilitas, pelepasan enzim pada akrosom, perpindahan ion melewati membrane dan penurunan kandungan lipid (fosfolipid dan kolesterol) yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas structural plasma membrane (Weitze dan Petzoldt, 1992; White, 1993).

Metode kiopreservasi yang tepat merupakan salah satu alternatif meminimalkan kerusakan pada spermatozoa selama penyimpanannya. Alternatif lain untuk mengurangi kerusakan spermatozoa selama proses penyimpanan dengan teknik kriopreservasi adalah menentukan jenis pengencer yang tepat. Jenis pengencer yang tepat akan menjamin kebutuhan fisik dan kimia,

melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat proses pendinginan, menghambat pertumbuhan bakteri serta mencegah efek yang membahayakan akibat perubahan pH serta mempertahankan tekanan osmosis atau osmolaritas dan keseimbangan elektrolit (Gazali dan Tambing, 2002).

Tekanan osmosis dan osmolaritas didefinisikan sebagai sebuah proses perpindahan air secara pasif pada suatu larutan di dalam sel (Campbell *et al.*, 2002). Supaya spermatozoa bisa bertahan secara normal dalam suatu media dibutuhkan keseimbangan dengan konsentrasi tertentu. Spermatozoa sapi, sebagai contoh, dapat bertahan hidup normal selama beberapa waktu pada medium dengan tekanan 300 mOsm (De Pauw *et al.*, 2003). Untuk membandingkan larutan dengan konsentrasi zat terlarut berbeda, maka larutan dengan zat terlarut lebih tinggi disebut hipertonik dan sebaliknya larutan dengan zat terlarut lebih rendah disebut hipotonik. Air akan berpindah dari larutan hipotonik ke larutan hipertonik walaupun larutan hipotonik memiliki lebih banyak jenis zat terlarut (Campbell *et al.*, 2002).

Pada kondisi medium pengencer yang osmolaritas atau konsentrasi medium pengencer lebih tinggi atau hipertonik dari pada di dalam sel akan mengakibatkan cairan yang terdapat di dalam sel akan keluar sampai tercapai tingkat keseimbangan osmolaritas yang sama sehingga akan menyebabkan *lipid bilayers destabilitation* sebagai akibat dari terjadinya fusi dua permukaan membrane (luar dan dalam) yang ditandai dengan bentuk yang mengerucut dan fisiologi spermatozoa akan menurun. Demikian juga halnya pada pengencer osmolaritas di luar sel lebih rendah dari pada di dalam sel atau hipertonik, akan mengakibatkan air dari luar sel akan masuk ke dalam sel sampai tekanan antara di luar dan di dalam sel mencapai keseimbangan yang ditandai dengan sel yang menggelembung (Sum *et al.*, 2003).

Meningkatnya osmolaritas pengencer menjadi lebih tinggi dari nilai normal yaitu 300 mOsm menjadi 600 mOsm akan mengakibatkan menurunnya viabilitas spermatozoa sampai 50%

(Griggers *et al.*, 2001). Untuk menguji integritas membran spermatozoa pada beberapa hewan domestikasi seperti sapi, kuda, babi dan kambing digunakan metode *hypoosmotic swelling test* (HOS test) (Fonseca *et al.*, 2005). HOS test adalah metode khusus untuk menguji keutuhan membran plasma spermatozoa untuk mengetahui permeabilitas membrane dan mengindikasikan jumlah spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi (Jeyendran *et al.*, 1984).

Beberapa cara telah dicoba untuk menguji keutuhan membrane plasma. Diantaranya adalah 50 μ l semen dilarutkan ke dalam 1 ml larutan *hypoosmotic* yang sudah dipersiapkan dengan komposisi 7,35 g of sodium sitrat (2H₂O) dan 13,51 g fruktosa dilarutkan di dalam 1000 ml aquades. Larutan semen dan hypoosmotik diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C sebelum dilakukan pemeriksaan (Hu *et al.*, 2009). Komposisi larutan hypoosmotik lain adalah 1,35 g fructose (Riedel-DeHaen, Switzerland), dilarutkan kedalam 100 ml aquades (tekanan osmotik - 190 mOsmol/ kg). pemeriksaan dengan mencampur 50 μ l semen beku yang sudah dicairkan kedalam 500 μ l larutan HOS dan diinkubasi selama 40 menit pada suhu 37°C (Jeyendran *et al.*, 1984). Setelah inkubasi, 1 tetes semen diperiksa dibawah mikroskop phase kontras dengan pembesaran 400x, kemudian hitung 200 spermatozoa. Spermatozoa dengan ekor melingkar mengidentifikasi bahwa plasma membrannya masih intak (Ahmad *et al.*, 2003). Kemampuan spermatozoa membengkak dalam larutan hypoosmotik menunjukkan membrane tersebut berfungsi dengan baik (Jeyendran *et al.*, 1984).

Hypoosmotic swelling test yang dilakukan pada semen segar kambing dengan tingkat osmolaritas pengencer berturut-turut 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 290, dan 300 mOsm menghasilkan integritas membran berturut-turut 34,1; 38,8; 45,3; 51,5; 42,8; 38,2; 29,0; 19,4 dan 23% dari 200 spermatozoa yang diamati untuk setiap tingkat osmolaritas pengencer tersebut. Menurut hasil uji HOS tersebut, kualitas integritas membran terbaik diperoleh pada

tingkat osmolaritas 125 mOsm/l (Fonseca *et al.*, 2005). Hasil yang jauh berbeda diperoleh oleh Joshi *et al.*, (2006), bahwa persentase motilitas dan motilitas progresif spermatozoa tertinggi pada pengencer dengan tekanan osmose 1.500 mOsm/kg dan terendah pada tekanan 900 mOsm/kg.

2

SEMEN KAMBING

Karakteristik

Semen adalah cairan yang keluar dari saluran kelamin hewan jantan pada saat kopulasi atau penampungan. Semen mengandung sel-sel mikroorganisme yang dapat bergerak disebut spermatozoa dan cairan tempat Bergeraknya spermatozoa disebut plasma semen (Gamer dan Hafez, 2008). Volume semen dan konsentrasi spermatozoa per ejakulasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya spesies, umur, musim, lingkungan, temperature lingkungan, bangsa ternak, frekuensi penampungan, kondisi pakan dan kesehatan (Jainudeen *et al.*, 2008; Memon dan Ott, 1981). Volume semen kambing per ejakulasi berkisar antara 0,1 – 1,5 ml (Jainudeen *et al.*, 2008), 1 – 1.08 (Tambing *et al.*, 2000), 0,5 – 1,5 ml (Evans dan Maxwell, 1987), 0,5 – 1,0 ml (Smith, 1980), 0,5 – 1,2 ml (Ax *et al.*, 2008).

Sekitar 90% dari volume semen adalah plasma semen dan 10% sisanya adalah spermatozoa. 75% dari total plasma semen terdiri dari air, bersifat netral, isotonik dan sangat kaya bahan organik dan non organik yang berfungsi untuk melindungi serta sumber nutrisi bagi spermatozoa (Rijnders *et al.*, 1994). Plasma semen memiliki pH 7,0 dengan tekanan osmosis sama dengan darah, yaitu ekuivalen dengan 0,9% NaCl (Natrium Klorida), mengandung zat-zat nutrisi, energi dan preservasi bagi spermatozoa. Sepertiga dari zat nutrisi itu dihasilkan oleh kelenjar prostat dan dua per tiga bagian lagi oleh vesikula seminalis (Evans dan Maxwell, 1987; Rijnders *et al.*, 1994).

Fungsi utama plasma semen adalah sebagai media transportasi spermatozoa pada saluran reproduksi jantan selama ejakulasi, media yang mengaktifkan spermatozoa dan menyediakan penyanggah pH (buffer), serta media kaya nutrisi untuk membantu kelangsungan metabolisme dan hidup spermatozoa dalam saluran reproduksi betina (Evans dan Maxwell, 1987; Hafez, 2008). Konstituen khusus yang terdapat dalam plasma semen adalah fruktosa, asam sitrat, inositol, ergotionin, glyceril, asam lemak, sorbitol dan sejumlah enzim (Hafez, 2008). Juga ditemukan beberapa vitamin dan hormone prostaglandin yang tidak ditemukan di bagian tubuh lain dari hewan dalam konsentrasi tinggi (Toelihere, 1993).

Semen kambing yang berwarna kekuningan yang diduga disebabkan oleh adanya riboflavin yang dihasilkan oleh kelenjar vesikularis (Ax *et al.*, 2008). Semen kambing juga mengandung fruktosa yang sewaktu-waktu siap dimetabolisasi dan merupakan sumber energi utama bagi sperma-tozoa (Evans dan Maxwell, 1987).

Konsentrasi spermatozoa tidak sama pada setiap kambing jantan. Beberapa peneliti mendapatkan kpnstrasi spermatozoa kambing rata-rata 3.387×10^6 /ml (Isnaini, 2006), 2.600×10^6 /ml (Jainudeen *et al.*, 2008), $2,5 - 10^9$ sampai $5,0 \times 10^9$ spermatozoa/ml (Ax *et al.*, 2008), 881×10^6 /ml (Tambing *et al.*, 2000). Produksi spermatozoa per tetestis per hari berkisar antara $2,76 - 7,23 \times 10^9$ (Lebueuf *et al.*, 2006; Ritar *et al.*, 1992). Produksi spermatozoa kambing jantan Angora pada musim kawin berkisar antara $4.0 - 6.4 \times 10^9$ (Ritar *et al.*, 1992). Semen kambing yang baik mengandung $2,5 - 5,0 \times 10^9$ spermatozoa/ml (Evans dan Maxwell, 1987), ada juga yang emndapatkan semen yang baik mengandung spermatozoa $6,5 \times 10^9$ /ml, motilitas 70 -90% dan jumlah spermatozoa abnormal 5 - 15% tidak selalu berdampak negative terhadap fertilitas kecuali jika abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% (Memon dan Ott, 1981). Atau $2,5 - 3 \times 10^9$ /ml dengan motilitas 85%, motilitas dibawah 60% tidak baik untuk diproses lebih lanjut, sementara jumlah

spermatozoa abnormal antara 3 - 15% adalah umum dilaporkan berbagai peneliti (Smith, 1980).

Morfologi spermatozoa

Secara morfologis spermatozoa terdiri kepala, badan dan ekor. Bagian ekor terdiri dari leher, tengah, utama dan bagian ujung. Secara fungsional spermatozoa memiliki *nucleus* atau *payload* yang mengandung genom, flagella atau propeller sebagai sarana penggerak, selubung mitokondria sebagai mesin pembakaran, akrosom sebagai tanda pengenalan dan penetrasi oosit (Tournaye, 1994). Total panjang spermatozoa kambing dan domba sekitar 60 mikron (60 μ m), panjang serta lebar dan tebal kepalanya berturut-turut 8 - 10 μ m, 4 μ m dan 1 μ m (Evans dan Maxwell, 1987). Masing-masing bagian mempunyai fungsi yang spesifik (Garner dan Hafez, 2008; Tournaye, 1994).

Spermatozoa memiliki lima bagian utama yang masing-masing bagian berkaitan satu sama lainnya yaitu bagian kepala terbagi empat bagian yaitu : *apical segment*, *principal segment*, *equatorial segment* dan *post acrosomal segment*. Bagian ekor (*flagella*) terdiri dari empat bagian yaitu leher (*neck*), *middle piece*, *principle piece* dan *piece* antara *mid* dan *principal piece* dipisahkan oleh annulus yang merupakan cincin fibrus yang mendasari membran plasma dan menempel pada partikel intra membran, membrane bagian kepala berfungsi dalam proses kapasitasi, reaksi akrosoma dan penembusan zona pellucida oosit pada saat fertilisasi serta fusi dengan dasar outer acrosomal membrane pada proses raksi akrosoma (Cummis, 2009; Gamer dan Hafez, 2008).

Aksonema flagella bertanggung jawab terhadap motilitas (gerakan) spermatozoa, dimana mikrotubulus dengan gerakan-gerakan diantara pasangan yang berdekatan menyebabkan ekor meliuk-liuk (Tournaye, 1994). Untuk bergerak spermatozoa membutuhkan energi yang diperoleh dari proses glikolisis dan metabolisme oksidatif (Hinting dan Marlinata, 1980). Energi yang

diperlukan untuk bergerak diperoleh dari proses dan metabolisme oksidatif. Adanya aktivitas metabolisme intraseluler menghasilkan asam laktat, CO₂ dan zat lainnya yang bersifat racun dan dapat merusak integritas membrane spermatozoa selama penyimpanan (Gamer dan Hafez, 2008).

Proses metabolisme pada tingkat nucleus sangat terbatas, karena selama spermatogenesis genom tidak aktif (Hecht, 1990). Oleh karena itu, gerakan flagella adalah esensial bagi fungsi reproduksi spermatozoa. Flagella mengandung aksonema yang berada didalam selubung mitokondria, sehingga memungkinkan terjadinya proses metabolisme kompleks yang menyebabkan gerakan flagella. Selain itu antara mikrotubulus dalam pasangan (duplet) dihubungkan dengan dynein, suatu protein dengan aktivitas ATP-ase. Sementara duplet-duplet pada mikrotubulus dihubungkan dengan satu jembatan nexin. Apabila ada sinyal ionic yang cocok, maka ATP mitokondria terhidrolisa oleh dynein menjadi ADP untuk menghasilkan gerakan di antara duplet-duplet (Tournaye, 1994).

Faktor-faktor yang mengontrol pergerakan fladella adalah aktvias metabolisme intraseluler, integritas membrane spermatozoa, efek biomekanis elemen-elemen flagella dan faktor external diantaranya ketersediaan substrat dan benda-benda fisik disekitar spermatozoa (microenvironment). Pada kondisi anaerobik spermatozoa memecah glukosa, fruktosa atau manosa menjadi asam laktat. Aktivitas glukolisis atau fruktolisis ini menyebabkan spermatozoa tetap hidup. Keadaan ini sangat penting diperhatikan selama penyimpanan semen untuk tujuan IB (Garner dan Hafez, 2008).

Setiap semen sampel mengandung spermatozoa abnormal. Jumlah spermatozoa abnormal berhubungan langsung dengan fertilitas ternak. Salah satu faktor yang menyebabkan tingginya spermatozoa abnormal adalah stress panas atau suhu lingkungan dan kelembapan yang terlalu tinggi (Ax *et al.*, 2008).

Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer adalah abnormalitas yang berhubungan dengan adanya kelainan pada kepala dan akrosom. Abnormalitas sekunder ditandai dengan adanya kelainan pada ekornya yaitu adanya sitoplasmik droplet pada mid piece pada ekor spermatozoa (Susilawati, 2013). Bentuk normal kepala spermatozoa adalah oval, tumpul serta sempit pada sisi yang lain. Pada kepala spermatozoa terdapat inti (nucleus) dengan kromatin yang padat (Sutovsky dan Munandhar, 2006). Kromatin mengandung DNA yang kompleks yang disusun dari protein dasar yang dikenal sebagai protamine sperm. Spermatozoa dihasilkan dari proses pembelahan secara meiosis berbentuk haploid dan mengandung materi genetik jantan dan akrosom. Akrosom terdiri dari *apical ridge*, *principal* dan bagian *equatorial*. *Acrosomal cap segment* adalah membrane bagian luar dari apical dan principal segment. Antara inti dan akrosoma dihubungkan oleh selaput membrane luar (*outer acrosome membrane*) dan membrane dalam (*inner acrosome membrane*) (Garner dan Hafez, 2008).

Secara molekuler susunan membrane bagian luar dan membrane bagian dalam tidak sama. Membrane akrosom bagian luar menyatu dengan membrane plasma saat terjadi reaksi akrosom, sedangkan membrane akrosom bagian dalam menghilang pada saat terjadi fertilisasi. Bagian equatorial akrosom adalah bagian penting spermatozoa karena bagian ini yang mengawali penggabungan membrane oosit pada proses fertilisasi (Garner dan Hafez, 2008).

Penilaian kualitas spermatozoa baik cair maupun beku post thawing tidak cukup hanya berdasarkan kepala motilitas saja (Uysal *et al.*, 2006), tetapi perlu dilakukan terhadap integritas dan aktifitas fungsional membran plasma membrane sangat berperan untuk terjadinya proses fertilisasi sehingga penilaian plasma membrane adalah indikator yang sangat bermanfaat untuk memprediksi daya fertilitas spermatozoa (Uysal dan Korkmaz,

2004). Demikian juga dengan status kapasitas (Smith dan Yanagimachi, 1991) dan reaksi akrosom (Pawar dan Kaul, 2011).

Kapasitas dan hiperaktivasi spermatozoa

Spermatozoa menunggu kedatangan ovum pada oviduk selama 20 – 30 jam (babi, kambing dan sapi) sebelum fertilisasi yang terjadi secara *in vivo* dan 6 jam sebelum terjadi fertilisasi, spermatozoa akan mengalami kapasitas (Chang, 1951). Selama berada dibagian oviduk, bagian akrosom spermatozoa akan menempel pada dinding mukosa oviduk dan spermatozoa yang gagal menempel akan mati atau kehilangan daya fertilitasnya (Smith dan Yanagimachi, 1991). Spermatozoa yang menempel pada mukosa oviduk sementara menunggu terjadinya ovulasi akan mengalami proses kapasitas, setelah itu akan membebaskan diri dari dinding mukosa oviduk untuk selanjutnya berenang secara aktif untuk membuahi sel telur (Smith dan Yanagimachi, 1991).

Saat ini kapasitas didefinisikan sebagai sejumlah peristiwa selama beberapa saat sampai beberapa jam bagi spermatozoa untuk mempersiapkan diri sampai mampu melakukan fertilisasi (Aitken, 2011; Breitbart *et al.*, 2005). Hanya spermatozoa yang sudah mengalami kapasitas bisa mengalami reaksi akrosom setelah menempel pada zona pelusida sel telur, sehingga spermatozoa bisa menembus dan membuahi sel telur (Breitbart *et al.*, 2005).

Selama kapasitas akan terjadi proses polimerisasi globular (G)-aktin menjadi filament (F)-aktin. Proses ini dipengaruhi oleh aktivasi protein kinase A, fosforilasi protein tirosin, dan aktivasi fosfolipase D. Pembentukan F-aktin penting untuk translokasi fosfolipase C dari sitosol ke membrane plasma spermatozoa selama kapasitas. Menjelang terjadinya reaksi akrosom, F-aktin harus menjalani depolimerisasi, sebuah proses yang mengakibatkan membrane akrosom bagian luar dan membrane plasma di atasnya untuk berfusi dengan sel telur. Menempelnya spermatozoa yang sudah mengalami kapasitas dengan zona pelusida menginduksi

peningkatan kalsium intraseluler sperma dengan cepat, aktivasi aktin memutuskan protein yang memecah serat aktin, dan memicu terjadinya reaksi akrosom (Breitbart *et al.*, 2005). Tetapi jika spermatozoa gagal fertilisasi, maka generasi lanjutan dari oksidan ini akan merangsang pembentukan oxysterol di membrane mitokondria yang motilitas dan akhirnya kematian sel spermatozoa (Aitken, 2011).

Setelah spermatozoa mengalami kapasitasasi dan reaksi akrosom, spermatozoa mamalia akan mengalami proses transisi di oviduk menjelang ovulasi untuk meningkatkan kapasitasnya dan proses tersebut dikenal dengan istilah hiperaktivasi (Hafez dan Hafez, 2008; Smith dan Yanagimachi, 1991; Yanagimachi, 1994). Hiperaktivasi meliputi perubahan pola gerakan yang sebelumnya simetris dengan amplitudo rendah menjadi gerakan dengan amplitudo tinggi dan tidak simetris sehingga menghasilkan gerak progresif yang lebih bertenaga. Pola gerakan hiperaktivasi akan mengakibatkan spermatozoa akan bergerak lebih progresif melewati lapisan lendir yang terdapat pada oviduk, sehingga sangat membantu spermatozoa merespon *chemoattractant* pada oviduk (Eisenbach, 2004). Motilitas spermatozoa dan pola gerakan hiperaktivasi sampai terjadinya fertilisasi sangat tergantung pada viscoelastisitas lingkungan mikro yang dialami spermatozoa (Ho dan Suarez, 2001).

Walaupun sudah banyak penelitian dilakukan untuk melacak pergerakan sperma di dalam saluran sel telur secara *in vivo*, masih sedikit bukti kuat mengenai bagaimana perubahan metabolisme mempengaruhi kualitas spermatozoa diantara pejantan di dalam lingkungan mikro pada saluran telur (Smith dan Yanagimachi, 1991).

Reaksi akrosom

Reaksi akrosom pertama kali diketahui pada *urchin* dan *starfish* oleh Dan (1952 dan 1954). Akrosom memegang peran

sangat penting dan berpengaruh lebih besar dibanding tingkat motilitas spermatozoa terhadap tingkat fertilitas yang dihasilkan (sacke, 1972). Reaksi akrosom sudah lama diketahui sebagai suatu perubahan yang terjadi pada bagian kepala spermatozoa selama proses kapasitasi dan fertilisasi (Sawada, 2002). Spermatozoa dari berbagai spesies hewan termasuk manusia harus mengalami proses Ca^{2+} -dependent exocytotic yang dikenal sebagai reaksi akrosom sebelum membuahi sel telur. Reaksi akrosom melibatkan berbagai fusi pada membrane akrosom bagian luar yang menyeliputi plasma membrane spermatozoa, sehingga akrosom terlepas dari kepala spermatozoa. Selanjutnya, material akrosom menyatu dengan lapisan glikoprotein oosit membentuk sebuah lubang dimana kepala spermatozoa masuk didalamnya dan akhirnya berfusi dengan oosit. Walaupun diyakini bahwa spermatozoa mengalami reaksi akrosom bersamaan dengan waktu ketika memasuki zona pellucida sebagai akibat dari dorongan flagella, lokasi dimana spermatozoa yang telah membuahi sel telur memulai reaksi akrosom masih menjadi bahan diskusi bagi banyak peneliti (Aketa dan Ohta, 1977).

Reaksi akrosom berperan didalam pelepasan enzim proteolitik yang diperlukan untuk penetrasi sperma melalui zona pellucida pada mamalia. Inisiasi reaksi akrosom dimediasi oleh reseptor yang terdapat pada zona pellucida tetapi identifikasi reseptor spermatozoa tidak mudah dilakukan (Talbot *et al.*, 2003).

Akrosom atau material inti yang mengandung DNA bersenyawa dengan protein, terdapat pada bagian kepala spermatozoa. Informasi genetik yang dibawa spermatozoa disimpan di dalam molekul DNA yang tersusun atas banyak nukleotida (Hafez, 2008). Bagian ekor spermatozoa mengandung aksonema yang terdiri dari 9 pasang mikrotubulus mengelilingi 2 filamen tengah secara radial ("9 + 2"). Susunan rangkap "9 + 2" mikrotubulus dikelilingi lagi oleh 9 fibril kasar dan dibungkus secara perifer oleh sejumlah mitokondria, sehingga membentuk pola "9 + 9 + 2" (Tournaye, 1994).

Selama penyimpanan, baik dalam bentuk cair maupun beku dapat terjadi perubahan struktur dan fungsi spermatozoa karena adanya aktivitas metabolisme dan perlakuan saat pengelolaan dan penyimpanan. Penggunaan pengencer dan pengelolaan secara tidak maksimal akan menyebabkan kerusakan pada spermatozoa kerusakan inidapat emnghasilkan zat-zat yang bisa mengganggu integritas membrane sel, sehingga mempengaruhi struktur dan fungsi spermatozoa (Check *et al.*, 1991), menurunkan motilitas, merusak mitokondria, enzim-enzim dan akrosom (Wheeler, 1996). Reaksi akrosom akan mengakibatkan perubahan mendasar pada struktur bagian kepala spermatozoa, termasuk kehilangan membrane (Roldan dan Gomendio, 1992). Proses dan tempat terjadinya reaksi akrosom spermatozoa pada mamalia masih belum diketahui secara pasti dan menjadi subyek penelitian sampai saat ini (Yanagimachi, 2011).

Penilaian keutuhan akrosom perlu dilakukan karena spermatozoa dengan akrosom tidak utuh akan berkollerasi negative dengan fertilitas spermatozoa (Garner dan Hafez, 2008). Demikian juga pendapat lainnya, bahwa status kapasitasi dan reaksi akrosom adalah prioritas utama untuk mengetahui kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur (Pawar dan Kaul, 2011).

Spermatozoa adalah sel yang sangat special dan diferensiasi status akrosomnya bisa dilakukan mulai dengan metode pewarnaan yang sangat dasar atau sederhana seperti trypan blue sampai metode yang sangat komplek seperti transmission electro microscopy (TEM) (Pawar dan Kaul, 2011). Contoh metode yang sederhana adalah menggunakan pewarnaan dengan *methilin blue* dan pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 - 1000 kali (Bamba, 1988).

Evaluasi status akrosom spermatozoa dengan *dual staining* bisa juga dilakukan dengan teknik pengecatan *Negrosin-Eosin Giesma* (NEG) dan pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *phase contrast* pembesaran 1000 kali setelah diberikan minyak emersi (Ax *et al.*, 2008; Tamuli dan Watson, 1994).

Spermatozoa hidup ditandai dengan warna merah muda dan spermatozoa mati berwarna ungu pada bagian post akrosomnya sementara, status akrosomnya bisa diidentifikasi dengan mudah dari warna ungu yang kentara pada bagian akrosom spermatozoa (Ax *et al.*, 2008; Pawar dan Kaul, 2011; Tamuli dan Watson, 1994).

Teknik pengecatan yang lain adalah dengan metode “*triple stain technique*” yaitu menggunakan 0,2% Trypan Blue, 0,5% *Bismark Brown* dan *Rose Bengal*, pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop phase contrast pembesaran 1000 kali, 5 kategori spermatozoa dan status akrosoma teridentifikasi (Ferrari *et al.*, 2000).

Metode FITC-Con A yang dikembangkan oleh Nishikimi *et al.* (1997) menyimpulkan bahwa teknik pewarnaan FITC-Con A adalah metode yang layak dan dapat diandalkan untuk menilai reaksi akrosom spermatozoa sapi. Metode ini kemudian diadaptasi oleh Susilawati (2011), diamati menggunakan mikroskop fluorescence pembesaran 400 kali.

Metode yang lebih kini adalah dengan Flow Cytometer (FC), yaitu salah satu instrument untuk penilaian spermatozoa yang secara fisik dapat ditampilkan berupa multi warna *fluorescence* sesuai dengan kondisi spermatozoa itu sendiri. *Flow cytometer* dapat juga mendeteksi fluorochromes yang terdapat pada spermatozoa sehingga dapat memprediksi potensi dan daya fertilisasi spermatozoa dengan cepat, juga menghitung konsentrasi, viabilitas, integritas plasma membrane, integritas akrosom dan mengukur permeabilitas dan stabilitas membrane (Hossaini *et al.*, 2011).

Membrane merupakan bagian terluar dari spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi spermatozoa sehingga apabila struktur atau fungsi membrannya tidak normal maka spermatozoa akan mati. Untuk mengetahui ultra struktur membrane secara lebih akurat bisa dilakukan dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) karena harus dilakukan dengan pembesaran 10.000 kali (Susilawati, 2011).

Malondialdehyde (MDA) dan Superoxide Dismutase (SOD)

Dalam proses metabolisme dihasilkan beberapa oksidan seperti Reaktif Oksigen Spesies (ROS) yang terus menerus dibentuk dalam jumlah besar di dalam sel melalui jalur metabolik yang merupakan proses biologis normal karena berbagai rangsangan, misalnya radiasi, tekanan parsial oksigen (pO_2) tinggi, paparan zat-zat kimia tertentu, infeksi maupun inflamasi. Apabila terjadi ketidak seimbangan antara produksi oksidan dan anti oksidan, maka akan terjadi stres oksidatif. MDA adalah suatu senyawa yang sangat reaktif yang merupakan produk akhir dari peroksidasi.

Peroksidasi lipid dimulai dari membrane, kemudian berlanjut dengan terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa-senyawa antara lain adalah MDA. Demikian pula DNA dan protein (enzim, reseptor, albumin dan lain-lain) juga akan mengalami kerusakan yang cukup berat. Protein secara structural dan enzimatik juga rentan terhadap denaturasi yang dimediasi oleh radikal bebas, metabolit oksigen toksik dapat juga secara langsung menyerang inti sel yang menyebabkan hidrosilasi, cross-linking atau terpotongnya rantai DNA yang berakibat kematian sel atau mutasi (Short, 2004).

Tingginya kadar MDA bisa dijadikan indikasi terjadinya stres oksidatif (Stroncek *et al.*, 2000). Jika radikal bebas meningkat sementara antioksidan menurun akan terjadi stres oksidatif dan selanjutnya diikuti oleh peningkatan kadar MDA sebagai hasil dari peroksidasi lipid yang meningkat pula (Short, 2004).

Superoxide dismutase (SOD) adalah enzymes yang memegang peranan sangat penting untuk melindungi sel dari pengaruh negatif radikal bebas dalam suatu sistim metabolisme makhluk hidup (Kelvin *et al.*, 2005).

Penampungan Semen

Sebelum penampungan semen, kambing jantan dibersihkan seluruh bagian perut dan preputiumnya untuk menghindari kontaminasi yang berdampak negatif bagi spermatozoa. Setelah itu, satu set vagina buatan yang sudah disiapkan diisi air hangat (41 - 45°C) dengan cara membuka keran yang terdapat ditengah selongsong vagina buatan. Pompa tabung vagina buatan menggunakan pompa tangan atau ditiup melalui keran yang terdapat pada tabung vagina buatan sampai lubang vagina buatan mencapai kekenyalan tertentu. Oleskan vaselin secukupnya pada 1/3 bagian atas vagina buatan menggunakan thermometer sambil mengukur suhunya. Setelah vagina buatan siap, dekatkan pejantan ke betina pemancing dan biarkan pejantan menaiki betina pemancing 3 - 4 kali agar libidonya maksimal. Gelas penampung yang berisi semen segar ditutup dengan aluminium foil dimasukkan ke dalam gelas berisi suhu 37°C sebelum diproses lebih lanjut (Toelihere, 1993).

3

EVALUASI SEMEN

Evaluasi semen dilakukan sesuai metode yang dijelaskan oleh Ax *et al.* (2008) dan Evans dan Maxwell (1987). Semen dievaluasi secara makroskopis segera setelah penampungan meliputi : warna, volume, konsistensi, keasaman dan mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas progresif, morfologi, viabilitas, serta konsentrasi spermatozoa. Kemudian dilakukan pemeriksaan lanjutan secara mikroskopis meliputi integritas membrane, status akrosom dan kapasitas.

a. Warna dan volume semen

Warna semen dilihat langsung begitu semen tertampung. Warna semen dibagi menjadi empat kategori yaitu *creamy* (normal), *thick creamy* (kurang normal) *milky* (tidak normal) dan *cloudy* atau *watery* (tidak normal). Volume semen bisa dilihat pada skala yang tertera pada tabung penampung (Ax *et al.*, 2008; Evans dan Maxwell, 1987).

b. Konsistensi

Konsistensi atau tingkat kekentalan semen ditentukan dengan cara mengoyang-goyangkan tabung yang berisi semen. Jika gerakan permukaan semen di dalam tabung lambat berarti konsistensinya kental, sebaliknya jika gerakan semen dipermukaan tabung cepat berarti konsistensinya encer. Semen encer tidak memenuhi syarat untuk proses lebih lanjut (Ax *et al.*, 2008; Evans dan Maxwell, 1987).

c. Keasaman semen

Mengukur keasaman semen dilakukan dengan cara mencelupkan ujung probe pH meter pada semen, skalanya bisa dilihat pada angka yang tertera pada pH meter tersebut. pH semen kambing yang normal adalah 6,8 - 7,2 (Evans dan Maxwell, 1987).

Evaluasi semen secara mikroskopis

a. Motilitas massa

Pengamatan motilitas massa menggunakan mikroskop cahaya tanpa cover glass pembesaran 100x atau 200x pada suhu yang dijaga konstan 37°C. standar penilaian motilitas massa ditentukan berdasarkan penjelasan Hafez (2008). Gerakan spermatozoa dalam satu kelompok yang cenderung bergerak cepat secara bersama atau berkelompok ke satu arah membentuk gelombang tebal atau tipis. Kriteria motilitas massa spermatozoa yaitu 0, + sampai ++++. Standar minimala motilitas massa spermatozoa yang memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut adalah ++ (Hafez, 2008; Susilawati, 2011).

b. Motilitas individu

Motilitas spermatozoa segar yang bisa diproses lebih lanjut adalah jika motilitas individunya minimal 70% (Hafez, 2008; Susilawati, 2011). Motilitas individu spermatozoa diamati segera setelah penampungan dan setelah pengenceran. Pengamatan motilitas individu dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x dengan cara meneteskan satu tetes semen diatas permukaan gelas objek ditutup *cover glass*. Motilitas individu ditentukan berdasarkan kriteria sebagai berikut : 0% jika Spermatozoa imotil atai tidak terlihat gerakan sama sekali, 50% jika spermatozoa bergerak di tempat, atau bergerak melingkar dan kurang dari 50% bergerak progresif, 50% - 80% jika spermatozoa bergerak secara progresif dan membentuk gerakan massal, 90% jika spermatozoa bergerak sangat progresif dan terbentuk gelombang

tebal dan 100% jika gerakan sangat progresif dan terbentuk gelombang seketika terus menerus (Hafez, 2008).

c. Konsentrasi

Konsentrasi spermatozoa per unit volume (ml) dihitung menggunakan *haemocytometer thoma*. Caranya, siapkan larutan NaCl 3% dengan cara melarutkan 1,5 gr NaCl ke dalam 50 ml aquabides (Evans dan Maxwell, 1989) dan dihomogenkan. Gunakan mikro pipet untuk mengambil 10 μ l semen segar dan diteteskan semen tadi ke dalam tabung reaksi. Campur semen segar tadi dengan 1990 μ l larutan NaCl 3% yang berarti bahwa semen sudah diencerkan 200x, homogenkan semen dan larutan NaCl 3% dengan cara menggoyang-goyangkan tabung pelan-pelan beberapa kali. Ambil 2 μ l sampel semen menggunakan mikro pipet dan teteskan disisi gelas penutup haemositometer, kemudian spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x.

Hitung spermatozoa pada 5 kotak besar yang setiap kotaknya terdiri dari 16 kotak kecil sehingga jumlah seluruh kotak yang dihitung adalah 80 kotak kecil. Catat jumlah spermatozoa pada 5 kotak besar. Konsentrasi spermatozoa per ml adalah jumlah spermatozoa terhitung kalikan 10^7 (Evans dan Maxwell, 1987).

Pengenceran Semen

Semen yang layak diproses lebih lanjut adalah : volume yang tertera di skala gelas penampung : 0,8 - 2,5 ml. Aroma sperma kambing spesifik (khas). Warna krem dan agak keruh, seperti segelas susu milk. Konsistensi: tingkat kemoloran \pm 0,5 cm. pH :7,0. Gerakan masal \geq 70% bergerak (++ dan +++). Gerakan individual : \geq 70% bergerak. Konsentrasi spermatozoa : $\geq 1,5 \times 10^9$ /ml, spermatozoa hidup : \geq 70%, spermatozoa abnormal : \leq 20% (Susilawati, 2011).

Setelah semua syarat tersebut terpenuhi, semen diencerkan dengan pengencer perlakuan yang sudah dipersiapkan. Pengenceran dilakukan secara bertahap dengan mencampur semen dengan pengencer sedikit demi sedikit dan digoyangkan pelan-pelan supaya homogen. Konsentrasi spermatozoa untuk setiap perlakuan adalah 100 juta/ml pengencer untuk penelitian pendahuluan 1 dan 300 juta/ml untuk penelitian 2. Direkomendasikan supaya semen encer dibiarkan didalam *water bath* selama 30 menit sebelum dimasukkan ke dalam kulkas supaya antibiotic berfungsi secara maksimal. Untuk mencegah stres dingin, tabung berisi semen dimasukkan ke dalam *water jacket* yang sudah di equilibrasi sehingga suhu semen akan turun sedikit demi sedikit dari 30°C menjadi 5°C dalam waktu 1 jam (Hafez, 2008). Cara lain adalah, tabung berisi semen perlakuan dimasukkan ke dalam beaker glass volume 200 ml yang berisi 50 ml air suhu 18 - 21°C, masukkan ke dalam kulkas sehingga suhu semen di dalam tabung akan turun secara gradual menjadi 5°C dalam waktu 1 jam (Menchaca *et al.*, 2011).

Uji Lanjutan

a. Viabilitas dan abnormalitas spermatozoa

Pengamatan viabilitas dilakukan menggunakan teknik pewarnaan diferensiasi preparat ulas yang diwarnai eosin-negrosin. Caranya adalah : a) Teteskan satu atau dua tetes semen sampel pada pinggir gelas obyek, kemudian teteskan satu atau dua tetes zat warna eosin di atas semen yang sudah di teteskan sebelumnya, homogenkan semen dengan eosin secara hati-hati menggunakan ujung mikro pipet, b) letakkan ujung gelas obyek yang lain di atas campuran semen dan eosin, tarik terdikit ke belakang sehingga campuran semen dan eosin akan menyebar merata pada ujung gelas obyek, miringkan gelas obyek 45° kemudian dorong gelas obyek tadi ke depan sehingga akan menghasilkan preparat oles yang merata pada seluruh permukaan

gelas obyek, kemudian dikeringkan, c) setelah kering, spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan monitor dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna sehingga akan berwarna ungu sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna sehingga tidak berwarna (transparan) (Evans dan Maxwell, 1987; Susilawati, 2011).

Cara menentukan viabilitas spermatozoa adalah menghitung spermatozoa mati dan hidup beberapa lapang pandang di bawah mikroskop menggunakan *hand counter* sampai dibagi $200 \times 100\%$. Demikian juga cara menghitung spermatozoa yang abnormal. Spermatozoa abnormal dibedakan menjadi 5 kategori yaitu : tidak ada ekor, kelainan pada kepala spermatozoa, kelainan bentuk ekor, kelainan bentuk ekor dengan adanya sitoplasmik droplet pada bagian proksimal dan terakhir bentuk abnormal pada ekor dengan distal droplet (Susilawati, 2011).

b. Penilaian integritas plasma membrane spermatozoa

Persiapan dan cara kerja pemeriksaan integritas membrane spermatozoa dilakukan seperti dijelaskan Susilawati (2011) yang merupakan modifikasi dari beberapa referensi sabagai berikut. Pertama, 1 ml larutan hipoosmotik 150 m osmol (7,35 g natrium sitrat, 2H₂O), 13,52 g fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquabides) dan masukkan ke dalam tabung reaksi berisi larutan hipoosmotik tadi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 40 menit. Setelah inkubasi, satu tetes semen sampel diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Perubahan yang akan terjadi adalah adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujungnya. Dua ratus spermatozoa dihitung untuk karakteristik ekornya (melingkar) yang mengidentifikasi keutuhan plasma membrannya (Ahmad *et al.*, 2003; Jeyendran *et al.*, 1987; Susilawati, 2011).

c. Penilaian status akrosom

Penilaian status akrosom dilakukan menggunakan metode pengecatan yang dikembangkan oleh Nishikawa (1997) dan disempurnakan oleh Susilawati (2000) sebagai berikut. Pertama fiksasi spermatozoa dengan 4% formal dehyde kemudian dicuci dengan 3 ml PBS dan disentrifuse selama 10 menit pada 1500 rpm. Buang supernatannya, sedangkan peletnya dicampur (*stain*) dengan 0,1 ml FITC Con A yang mengandung 10 µg/ml dalam PBS dulbeccos. Proses *staining* dilakukan selama 25 menit pada suhu ruangan, kemudiaan dicuci dengan cara disentrifugasi 2 kali 10 menit pada 1500 rpm, setelah proses pencucian selesai, supernatannya dibuang dan pellet atau sedimen yang tersisa dioleskan pada flow labs slide, tetesi dengan gliserol 90%. Flow labs slide diamati menggunakan mikroskop epifluorescence (Cart Zeis Jerman) dengan excitation B (490 nm dengan emisi 525 nm) untuk mengidentifikasi fluorescen pada spermatozoa hasil FITC.

d. Penilaian status kapasitasi

Status kapasitasi, reaksi akrosom dan non kapasitasi semen perlakuan dilakukan setelah pengenceran dan setiap 24 jam berikutnya sampai jam ke 96 atau 4 hari. Teknis penilaian dilakukan sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh Sumitro dan Susilawati (1998) yaitu dengan teknik pewarnaan *Chlortertracyline staining* (CTC) dengan proses sebagai berikut :

- 1) Masukkan 10 µl semen segar atau smen perlakuan kedalam tabung eppendorf yang telah dibungkus aluminium foil, kemudian tambahkan 45 µl pewarna CTC, larutan semen dan CTC divorteks selama 1 menit, setelah itu tambahkan 8 µl CTC fixative dan divorteks lagi selam 1 menit.
- 2) Ambil 10 µl larutan yang sudah dibuat pada pon 1 menggunakan mikro pipet dan teteskan di atas gelas obyek, teteskan 10 µl larutan DABCO diatas larutan tadi dan homogenkan menggunakan ujung mikro pipet, tutup dengan

gelas penutup dan tekan hati-hati menggunakan jempol tangan yang dilapisi tisu secukupnya. Rekatkan pinggir gelas pebutup menggunakan cutex (Fraser dan McDermott, 1992).

- 3) Penilaian status kapasitas dilakukan menggunakan mikroskop epi-fluorescence (Carl Zeis Jerman) menggunakan sumber cahaya ultra violet.
- 4) Ada tiga perbedaan fluorescent yang bisa diidentifikasi dari spermatozoa dengan pewarnaan CTC yaitu a. fluorescence akan terdistribusi secara merata pada seluruh bagian kepala spermatozoa, b. fluorescence akan terkonsentrasi pada daerah *post acrosomal* dan, c. fluorescence akan terkonsentrasi pada daerah akrosomal (Kaul *et al.*, 1997). Jika keseluruhan kepala spermatozoa berwarna terang berarti spermatozoa belum kapasitas, jika setengah bagian atas kepala spermatozoa berwarna terang berarti spermatozoa telah mengalami kapasitas dan jika hanya bagian tengah saja dari kepala spermatozoa berwarna terang berarti spermatozoa telah mengalami reaksi akrosom (Susilawati, 2011).

Pemeriksaan Kadar SOD dan MDA

Pemeriksaan kadar/aktifitas superoxide dismutase (SOD) dilakukan di Laboratorium Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang dengan metode *Xanthine oxidase*. Sampel diperiksa menggunakan *spectrophotometer* pada panjang gelombang nm. Hasil perhitungan dipresentasikan dalam U/ml nitrite unit. Kandungan MDA diukur dengan metode *thibarbituric acid* pada panjang gelombang 532 nm. Hasil pengukurannya dipresentasikan dalam ng/ml protein. Metode dan langkah pelaksanaan dan penggunaan kit assay dilakukan sesuai dengan petunjuk pabrik pembuat kit.

Observasi Morfologi Spermatozoa

Dilakukan untuk menentukan tipe kerusakan struktur spermatozoa secara detil menggunakan scanning electron microscopy (SEM) dengan pembesaran sesuai kebutuhan sehingga dapat memperjelas alasan penyebab kerusakan akibat proses perlakuan. Persiapan pengamatan ultrastruktur spermatozoa dengan SEM dilakukan dengan cara sebagai berikut.

Spermatozoa yang sudah mengalami proses pencucian dimasukkan ke dalam larutan fiksasi glutaraldehyde 2% selama 2 - 3 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan rendah. Kemudian, cuci dengan larutan phosphate buffer pH 7,4 pada suhu 4°C selama 5 menit dan disentrifuse dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Ulangi proses pencucian sebanyak 3 kali. Sedimennya difiksasi dengan larutan osmic acid 1% selama 1 - 2 jam pada suhu 4°C, disentrifuse lagi dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Selanjutnya, ulangi proses pencucian dengan larutan phosphate buffer pH 7,4 seperti dilakukan sebelumnya.

Setelah proses pencucian yang kedua, sampel semen didehidrasi dengan alkohol 30%, 50% dan 70% masing-masing selama 15 - 20 menit pada suhu 4°C, kemudian disentrifuse lagi dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Dehidrasi kedua dilakukan dengan alkohol 80%, 90% dan absolut sebanyak dua kali selama 15 - 20 menit pada suhu ruangan, sentrifuse lagi dengan kecepatan rendah selama 10 - 20 menit. Setelah sentrifuse, alkohol diganti dengan amyl acetate sebagai pengawet spermatozoa sampai menunggu waktu pengeringan.

Sampel spermatozoa yang akan dikeringkan diambil menggunakan pipet Pasteur dan diteteskan pada obyek glas ukuran 16 mm² yang sudah disetrilisasi dengan alkohol 70%. Selanjutnya dikeringkan dengan alat *Critical Point Drying* (CPD). Setelah proses pengeringan selesai, dilakukan penempelan pada stub menggunakan lem khusus, kemudian dilapisi dengan emas

murni atau karbon dengan alat Vacuum Evaporator. Sampel spermatozoa siap diamati menggunakan SEM dengan pembesaran yang diinginkan.

Analisa Intak Acrosome

Pengamatan status reaksi akrosom dengan menggunakan fluorochrome fluoresceine isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) dengan menggunakan filter cubenya : WB - #2, dichroic mirror DM500, excitation filter BP450-480, barrierfilter BA 515.

Uji akrosom reaksi (AR) adalah variable yang stabil untuk melihat fungsi spermatozoa (9,10) akan tetapi tidak dapat digunakan untuk memprediksi keberhasilan fertilisasi, tetapi digunakan untuk penelitian kontrasepsi pria (10) dan efek makanan dan obat terhadap toxic pada ginad (11). Uji ini berdasar pada fisiologi spermatozoa dan melibatkan kapasitas dan reaksi akrosom. Saat kapasitas adalah suatu bagian dari reaksi akrosom yang disertai dengan keluarnya enzyme oflytic dan pemaparan pada reseptor membrane yang akan penetrasi ke zona pelusida dan untuk fusinya oolema (12)

Untuk mengamati status akrosom dan viabilitas, dikembangkan suatu bahan reagen yang dapat mengamati status akrosom pada target bagian akrosom pada kepala spermatozoa yaitu fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin - FITC-PNA. Berdasarkan pewarnaan dengan menggunakan FITC-PNA pada masing-masing perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa pada seen segar terdapat $69,16 \pm 8,85$ spermatozoa yang utuh, hal ini menunjukkan spermatozoa dalam keadaan segar masih banyak utuh tudung akrosomnya. Sedangkan pada semen beku terjadi peningkatan jumlah spermatozoa yang pada $\frac{1}{2}$ ujung kepalanya berpendar, hal ini menunjukkan bahwa pada proses pembekuan

mentrigger terjadinya reaksi akrosom atau tidak intaknya tudung akrosom, walau hanya sedikit yang mengalami reaksi akrosom.

Spermatozoa hasil sexing dengan menggunakan sentrifugasi gradient densitas percoll juga mempunyai trend sama dengan sexing dan pada yang populasi spermatozoa Y yang spermatozoa utuh lebih sedikit dibandingkan yang reaksi akrosom atau tidak adanya tudung akrosom trend yang sama terjadi pula pada perlakuan sexing dengan metode sedimentasi albumin putih telur, hal tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa lebih rentan dalam lepasnya tudung akrosom dibandingkan spermatozoa X, atau kemungkinan efek dari sentrifugasi lebih terasakan pada spermatozoa Y dibandingkan spermatozoa X.

Sexing menggunakan XPT membrane sel spermatozoa memiliki persentase atom Carbon dan Oxygen lebih tinggi dibandingkan control, sexing YPT maupun Y percoll. Diantara ketiga perlakuan (XPT, YPT, dan Kontrol), sexing dengan menggunakan Y percoll menyebabkan membrane sel spermatozoa memiliki persentase atom carbon paling rendah. Atom oxygen pada keempat perlakuan, menunjukkan bahwa perlakuan YPT memiliki atom oxygen lebih rendah. Molekul utama penyusun membrane plasma adalah lipid dan protein, yang penyusun utamanya adalah atom carbon dan oxygen dan hydrogen (Cooper, 2002).

Adanya perbedaan persentase atom yang terdapat pada membrane sel masing-masing perlakuan bisa disebabkan karena adanya kerusakan molekul-molekul penyusun membrane plasma. Pada penelitian terdahulu didapatkan bahwa sexing spermatozoa dapat meningkatkan kapasitas dan reaksi akrosom. Bronson *et al* (2000) dalam penelitiannya menemukan bahwa Vibronectin merupakan salah satu protein yang diekspresikan lebih tinggi pada membrane plasma spermatozoa manusia ketika reaksi ekspersi protein 33 kD ketika terjadi kapasitas. Pengaruh fisik pada spermatozoa sebagai contohnya pembekuan dapat menyebabkan

relokasi beberapa protein antara lain protein GLUT 3 (Sancho, 2007) pada babi Iberian.

Berdasarkan uraian di atas dapat dikatakan bahwa perbedaan persentase Carbon dan Oxygen bisa disebabkan karena adanya reaksi akrosom ataupun kapasitas selama proses sexing.

4

SEMEN CAIR

Semen Cair

Inseminasi Buatan (IB) dikembangkan untuk dapat menghasilkan keturunan dalam jumlah yang banyak dari seekor pejantan unggul, dan untuk memudahkan pelaksanaan IB maka dikembangkan metode penyimpanan semen (Hafez, 2008). Industry IB menggunakan semen beku telah berlangsung lebih dari 30 tahun di Amerika, begitu juga di Indonesia bahwa semen beku merupakan semen yang paling banyak digunakan untuk teknik IB. dewasa ini banyak peneliti yang mengembangkan semen cair dikarenakan semen beku memiliki kekurangan antara lain rendahnya fertilitas semen beku serta membutuhkan container dan N₂ cair dalam penyimpanan dan pendistribusian semen beku (Vishwanath And Shannon, 2000).

Semen cair adalah semen segar yang telah ditambahkan pengencer kemudian disimpan pada suhu 4-5°C dan dapat digunakan dalam jangka waktu 3-4 hari. Prinsip utama penyimpanan semen cair adalah menekan dan menghambat metabolisme spermatozoa agar dapat mempertahankan motilitas selama beberapa hari (Priastomo dkk., 2009). Bearden, Fuquay, Willard (2004) menyatakan untuk mendapatkan angka kebuntingan yang optimal membutuhkan 10×10^6 sperma motil pada semen cair sedangkan untuk semen beku membutuhkan 15×10^6 sperma motil. Diperkuat Vishwanath and Shannon (2000) menyatakan salah satu keuntungan penggunaan semen cair yaitu satu juta spermatozoa pada semen cair yang digunakan dalam IB

sebanding dengan 15 juta spermatozoa pada semen beku dengan fertilitas yang sama.

Semen cair juga memiliki kekurangan antara lain terjadinya efek kejut dingin sehingga menurunkan kualitas semen cair. Kejut dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak yang akan menurunkan viabilitas sel. Tindakan untuk mengurangi kejutan dingin dengan cara menambahkan krioprotektan seperti gliserol, kuning telur, skim, dan air kelapa (Gazali dan Tambing, 2002).

Prinsip dasar pengembangan penyimpanan sperma-tozoa adalah bahwa daya hidup spermatozoa selama perpanjangan waktu penyimpanan berkorelasi terbalik dengan aktivitas metabolismenya, maka dikembangkan teknik penyimpanan semen pada suhu rendah yaitu suhu 4-5°C dalam refrigerator, dan pada suhu beku dalam nitrogen cair (Vishwanath And Shannon, 2000).

Keuntungan penyimpanan semen beku diantaranya yaitu waktu penyimpanan tidak terbatas dengan suplai nitrogen cair yang baik (Hafez, 2008), memungkinkan untuk distribusi semen ke seluruh dunia (Foote and Parks, 1993). Penyimpanan semen beku dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa, disebabkan karena cold shock dan pembentukan Kristal es. Pengaruh utama cold shock terhadap spermatozoa adalah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komposisi komponen lipid seperti fosfolipid dan kolesterol yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktur membrane plasma (Weitze & Petzoldt 1992, White 1993). Proses pembekuan yang tidak sempurna dapat menyebabkan pembentukan Kristal es pada sel spermatozoa sehingga terjadi penumpukan elektrolit di dalam sel dan menyebabkan sel mengalami kerusakan secara mekanik (Watson, 2000). Penyimpanan semen beku juga menjadi kendala bagi Negara-negara yang keberadaan nitrogen cairnya tidak

kontinyu. Dalam hal ini penggunaan semen cair dapat dijadikan sebagai alternative untuk pelaksanaan IB.

Keuntungan semen cair diantaranya yaitu adalah prosesnya lebih mudah tanpa memerlukan nitrogen cair, transportasinya lebih mudah dan dapat digunakan pada lokasi yang cukup jauh karena spermatozoanya bisa bertahan 2-4 hari. Keuntungan yang utama dari teknologi penyimpanan semen cair adalah jika kejadian penurunan fertilitas pada penyimpanan 5°C atau suhu kamar dapat dihindari atau direduksi (Vishwanath And Shannon, 2000).

Syarat Pengencer Semen

Pengencer yang baik adalah pengencer yang mampu mempertahankan kualitas semen. Syarat pengencer yang baik adalah (1) bahan tidak bersifat toxic terhadap spermatozoa, (2) mengandung sumber energy, (3) Bersifat isotonis, (4) Mengandung buffer untuk mencegah perubahan pH akibat pembentukan asam laktat pada metabolisme spermatozoa, (5) melindungi dari pengaruh pendinginan secara cepat (6) menghambat pertumbuhan bakteri (7) meningkatkan volume (8) melindungi spermatozoa dari suhu beku (Sussilawati, 2011). Selain itu Feradis (2010) pengencer yang baik hendaknya murah, sederhana dan praktis tetapi mempunyai daya preservasi yang tinggi, pengencer harus memiliki sifat fisik dan kimia yang hamper sama dengan semen, pengencer harus tetap mempertahankan dan tidak membatasi daya fertilisasi spermatozoa dan pengencer harus memberi kemungkinan penilaian spermatozoa sesudah pengenceran.

Jenis pengencer mempengaruhi kualitas spermatozoa Umiasih, Affandy, Wijono (1999) melaporkan bahwa jenis pengencer yang berbeda mempengaruhi motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Perbedaan ini didasarkan atas kekuatan pengencer untuk mempertahankan kualitas spermatozoa. Widjaya (2011) spermatozoa supaya dapat bertahan hidup, pengencer harus

memiliki kandungan penyangga yang dapat menetralkan hasil metabolisme seperti asam laktat. Metabolisme ini mengakibatkan penimbunan sisa metabolisme, penurunan pH dan kehabisan bahan kegunaan metabolisme. Spermatozoa mati akibat meningkatnya suhu semen yang mengakibatkan kecepatan metabolisme dan aktifitas spermatozoa. Motilitas yang cenderung menurun diduga kondisi ini terjadi perubahan pH oleh karena itu pengencer harus memiliki sifat sebagai penyangga. Penyangga yang digunakan antara lain penyangga sitrat dan tris yang mampu mempertahankan pH dari kejutan dingin sehingga pH tidak mengalami penurunan akibat asam laktat yang berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa.

Pengencer Cauda Epididymal Plasma 2 (CEP-2)

Pengencer Cauda Epididymal Plasma 2 (CEP-2) dikembangkan karena adanya fakta bahwa spermatozoa dapat disimpan selama 30-45 hari didalam kauda Epididymis tanpa efek negative terhadap kemampuan memfertilisasi sel telur (Asmarinah, 2010). Kauda epididymis dicirikan dengan pH yang rendah, tekanan hiperosmotik cairan, konsentrasi spermatozoa yang tinggi, tegangan oksigen yang rendah dan perbandingan ion Na^+/K^+ yang rendah. Komposisi kimia yang terdapat dalam pengencer CEP-2 berupa NaCl , KCl , $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Fruktosa, Sorbitol, BSA, Tris, Gentamicin dan asam sitrat, dengan osmolaritas sebesar 320 mOsm dan pH 6,6 (Verberckmoes *et al*, 2004).

Ekstrak fruktosa dan tris dalam CEP-2 berperan untuk menjaga suplai energy, sebagai buffering capacity. Asam sitrat dan fruktosa pada pengencer CEP-2 menggantikan glukosa sebagai substrat energy bagi spermatozoa. Sorbitol berperan untuk meningkatkan osmolaritas agar sama seperti osmolaritas pada plasma kauda epididymis dan menyediakan substrat alami sebagai energy cadangan bagi sperma-tozoa pada kondisi aerob. BSA

dalam CEP-2 berperan sebagai komponen makromolekul berfungsi untuk mencegah masuknya ion Ca^{2+} ke dalam spermatozoa (Verberckmoes *et al*, 2004).

Albumin yang terkandung dalam BSA mampu mengikat ion Ca^{2+} pada membrane plasma memungkinkan membrane untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan ion Ca^{2+} melewati membrane dan menghambat akumulasi Ca^{2+} intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas dan motilitas spermatozoa dapat dipertahankan (Landim-Alvarenga dkk., 2004). Penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa Limousin selama penyimpanan pada suhu 4-5°C. Konsentrasi kuning telur terbaik adalah 20% dalam mempertahankan motilitas (44,25±3,92%) dan viabilitas (87,46±5,40%) spermatozoa sapi Limousin setelah penyimpanan pada hari ke-8 pada suhu 4-5°C (Nurducha dkk, 2013).

Kuning Telur di Dalam Pengencer

Kuning telur mengandung 68% low density lipoprotein (LDL), 16% high density lipoprotein (HDL), 10% livetins dan 4% fosvitins. LDL memiliki berat jenis 0,98 dengan 83-89% lipid dan 11-17% neutral lipid (trigliserida dan kolesterol) dan 26% fosfolipid. Kuning telur mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein. Lesitin secara alamiah ditemukan pada telur dalam jumlah 0,39% (Permatasari, Samsiadin, dan Permatadewa, 2013)

Lesitin dan lipoprotein yang dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membrane spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002). CEP-2 dengan suplementasi 20% kuning telur sebagai pengencer semen cair, menunjukkan dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur dapat melindungi spermatozoa

terhadap serangan ROS, melindungi integritas membrane dan mempertahankan spermatozoa non kapasitasi, mempertahankan keutuhan ultras struktur, dan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi oosit (Ducha, 2012). Afiati, B. Tappa, dan Djuarsawidjaja (2003) menyatakan bahwa nutrisi yang lengkap serta kandungan kuning telur dapat menunjang motilitas spermatozoa dan melindungi spermatozoa dari efek cold shock selama penyimpanan.

Preparasi Pengencer Semen

Pengencer CEP-2 dikembangkan oleh Verberckmoes *et al.* (2004) komposisi CEP-2 terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi penyusun pengencer CEP-2 (Verberckmoes *et al.*, 2004)

BAHAN	Unit
NaCL	15 mmol/l
KCL	7 mmol/l
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	3 mmol/l
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	4 mmol/l
NaHCO ₄	11,9 mmol/l
NaH ₂ PO ₄	8 mmol/l
KH ₂ PO ₄	20 mmol/l
Fruktosa	55 mmol/l
Sorbitol	1 g/l
Tris	133,7 mmol/l
Gentamicin	0,05 g/l
Asam sitrat	42,9 mmol/l
pH 6,6	

Proses pembuatan dilakukan dengan cara mencampur bahan-bahan yang terdapat pada tabel dengan deionize water (DI) menggunakan magnetic stirrer, kecuali BSA ditambahkan ketika CEP-2 akan digunakan dengan perhitungan tiap 250 ml ditambahkan 0,59 g BSA. Kemudian dilakukan adjust pH menggunakan NAOH agar CEP-2 memiliki pH 6,6.

5

SEXING

Penggunaan pengencer semen menggunakan kuning telur mempunyai resiko higienis dan sulit distandarisasikan. Walaupun pengencer semen tanpa kuning telur sudah tersedia tetapi pengencer dengan kuning telur masih secara luas digunakan untuk pembukaan semen (Nehring dan Rothe, 2003).

Menurut Hafez (2008) terdapat metode yang tepat untuk memisahkan spermatozoa X dan Y pada hewan dan manusia yang cukup valid untuk diterakan dan diaplikasikan, yaitu separasi dengan albumin yang menghasilkan 75-80% spermatozoa Y. Saili *et al*, (2000) menambahkan, pemisahan spermatozoa menggunakan kolom albumin pada putih telur merupakan metode yang mudah diterapkan di lapang, mudah diperoleh dan terjangkau. Albumin pada putih telur juga berfungsi efektif terhadap upaya pengubahan rasio alamiah spermatozoa X dan Y serta mempertahankan dan mengurangi penurunan kualitas dan kuantitas spermatozoa selama proses pemisahan.

Susilawati *et al*, (2002) melaporkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y. Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda keonsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi (Spermatozoa Y) akan mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada medium yang mempunyai konsentrasi rendah. Putih telur mengandung avidin

dan lysozyme yang merupakan agen anti bakteri, sehingga spermatozoa hasil pemisahan menggunakan gradient putih telur mampu mempertahankan motilitas (38% pada lapisan atas dan 40% pada lapisan bawah) dan viabilitas. Albumin juga mampu mencegah menurunnya motilitas spermatozoa hasil sexing, yaitu dengan menghambat peroksidasi lipid pada membrane spermatozoa (Armstrong *et al.*, 1998).

Pemisahan spermatozoa menggunakan albumin putih telur mudah diaplikasikan, akan tetapi diisi lain menggunakan metode ini memiliki kelemahan yaitu menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi membrane spermatozoa. Kerusakan membrane plasma spermatozoa setelah proses sexing menggunakan albumin (putih telur) telah dilaporkan oleh Sails *et al.*, (2000) dan Afiati (2004). Hasil pengamatan integritas membrane spermatozoa menggunakan hypoosmotic swelling test (HOST) memperlihatkan adanya penurunan persentase membrane plasma utuh spermatozoa yang diakibatkan oleh proses pemisahan dan pencucian. Kerusakan membrane plasma spermatozoa pada proses sentrifugasi saat pencucian lebih disebabkan oleh faktor fisik, sedangkan pada proses pemisahan lebih disebabkan oleh faktor kimiawi (Sails *et al.*, 2000 dan Sianturi *et al.*, 2007).

Menurut Susilawati (2005), proses sentrifugasi menyebabkan gesekan antar spermatozoa dan antara spermatozoa dengan medium pemisah yang mengakibatkan kerusakan struktur membrane dan gangguan metabolisme. Dow dan Bavister (1989) menambahkan, serum albumin mampu mengikat dan menghilangkan kolesterol dan ion zink yang berfungsi menstabilkan membrane plasma spermatozoa. Hilangnya kolesterol dari membrane plasma spermatozoa dan terjadinya kerusakan membrane akibat sentrifugasi dapat mempengaruhi integritas membrane yang menyebabkan perubahan system regulasi ion pada membrane. Keadaan ini mengakibatkan transport ion kalsium kedalam dan ke luar sel tidak normal, sehingga konsentrasi ion

kalsium intraseluler meningkat (Berg, 2005). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler ini dapat menginduksi kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa lebih awal (Sonjaya *et al.*, 2005). Pengamatan kapasitas dan evaluasi status akrosom pada spermatozoa dilakukan menggunakan pewarnaan Chlorotetracycline (CTC) dan FITC Concanavalin A (Susilawati, 2011).

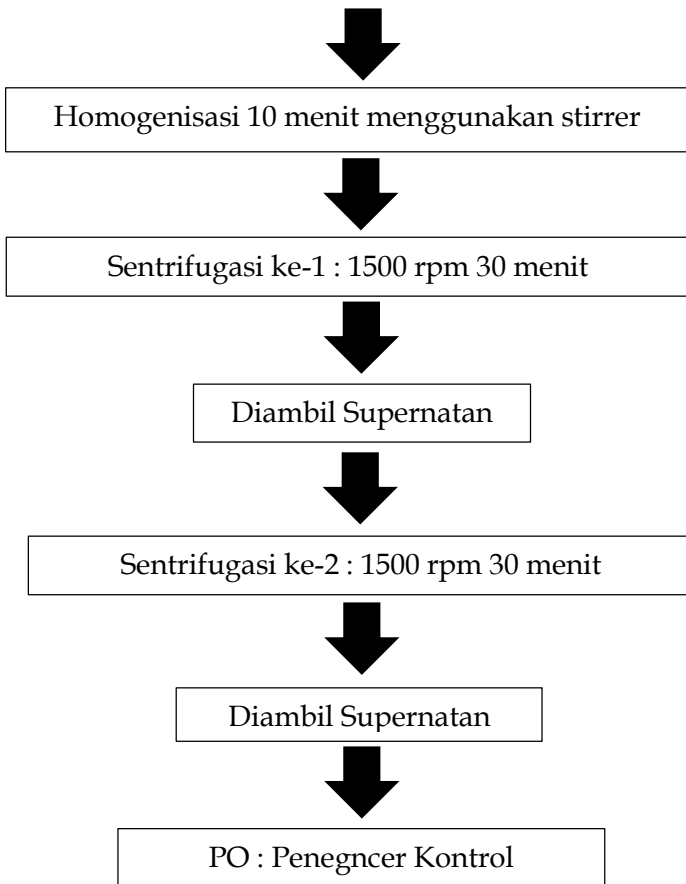
Beberapa penelitian pemisahan spermatozoa pada sapi menggunakan kolom albumin putih telur yang telah dilakukan dengan bahan pengencer bracket and Oliphant (BO) (Saili *et al.*, 2000 dan Afiati, 2004), tris aminomethan dan tris aminomethan kuning telur (Susilawati *et al.*, 2002 dan Pratiwi *et al.*, 2005). Hasilnya menunjukkan bahwa spermatozoa yang dipisahkan menggunakan media BO mengalami penurunan persentase motilitas akibat proses pencucian yang berakibat pada pengurangan konsentrasi plasma semen dan menggantinya dengan media BO. Glukosa yang terdapat dalam media BO kurang mampu menyediakan sumber energy bagi spermatozoa. Pengencer tris aminomethan kuning telur mampu mempertahankan kualitas spermatozoa hasil pemisahan dibandingkan tris aminomethan. Hal ini dikarenakan dalam kuning telur mengandung sumber-sumber nutrisi bagi spermatozoa. Kuning juga mengandung lipoprotein dan lecithin yang mampu melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa.

Bahan pengencer yang ditambahkan dalam semen bertujuan untuk memperbanyak volume semen, menyediakan nutrisi, bersifat buffer dan sebagai pelindung spermatozoa. Proses pemisahan spermatozoa X dan Y membutuhkan bahan pengencer semen yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa (Susilawati *et al.*, 2002). Andromed® merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar tris yang tidak menggunakan sumber protein asal hewan, sehingga tidak mempunyai resiko kontaminasi mikroorganisme (Setiadi *et al.*, 2006). Andromed® mengandung tris hydraxyaminomethane sebagai buffer, gula

sebagai sumber energy, gliserol sebagai krioprotektan untuk melindungi spermatozoa dari cold shock dan antibiotic untuk mencegah pertumbuhan bakteri (Yulnawati *et al.*, 2008). Pengencer Andromed® dapat menghasilkan motilitas dan ketahanan spermatozoa yang lebih baik jika dibandingkan dengan pengencer tris kuning telur (Susilawati, 2011).

Prosedur pembuatan pengencer :

1. Pengencer control (PO)



Persentase motilitas spermatozoa di bawah 40 % menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan berhubungan dengan infertilitas karena kebanyakan pejantan fertile mempunyai 50-80% spermatozoa yang motil aktif progresif (Toelihere, 1993). Belum ada standar nasional yang mengatur mengenai standar motilitas semen segar untuk semen cair, namun Susilawati (2000) menyatakan semen yang mempunyai persentase motilitas di atas 70% lebih tahan hidup dibandingkan bila lebih rendah dari 70%. Rataan konsentrasi semen segar $1004 \pm 218,71$ juta/ml sudah sesuai dengan standar yaitu di atas 1000 juta/ml (Susilawati, 2000).

Rataan viabilitas spermatozoa adalah $77,71 \pm 3,11\%$, viabilitas semen tersebut termasuk kedalam kategori sangat baik karena viabilitas di atas 70% dan masih dianggap baik jika memiliki kisaran nilai antara 50-69% (Lopes, 2002). Rata-rata nilai abnormalitas $8,76 \pm 2,16\%$ masih tergolong baik dan memenuhi kriteria semen yang baik. Tambing dkk (2000) menyatakan persentase abnormal tidak boleh lebih dari 15%, sedangkan Garner dan Hafez (2008) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak boleh melebihi 20%.

Kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein (Aku *et al.*, 2005). Lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membrane sel spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membrane spermatozoa (Susilawati, 2002; Yamashiro *et al.*, 2006) dan melindungi spermatozoa dari cold shock (Pangestu, 2002). Keberadaan 20% kuning telur dalam pengencer CEP-2 dapat melindungi spermatozoa dan mempertahankan kualitas spermatozoa selama 8 hari penyimpanan dan mempengaruhi kemampuan memfertilisasi (Ducha *et al.*, 2012). Komponen utama yang mampu memberikan perlindungan bagi spermatozoa adalah low density lipoprotein (Bergeron dan Manjunath, 2006; Briand-

Amirat *et al.*, 2007; Vera-Munoz *et al.*, 2010 dalam Ducha *et al.*, 2012), fosfolipid (Evan dan Setchell, 1978; Graham dan Foote, 1987 dalam Duv=cha *et al.*, 2012) dan kolesterol (Parks *et al.*, 1981 dalam Ducha *et al.*, 2012). Low Debsity Lipoprotein (LDL) terikat pada membrane sel melindungi spermatozoa dari cold shock (Vera-Munoz *et al.*, 2011) dan lesitin (Fosfatidilkolin) terdapat pada bagian ekstraselular membrane spermatozoa, memiliki fungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001).

Pada kuning telur mengandung karbohidrat 0,6% (Manjunath *et al.*, 2002 dalam Arifiantini *et al.*, 2010). Karbohidrat dapat dimetabolisir menjadi energy berupa adenosine triphosphate (ATP). Adenosine triphosphate tersebut selanjutnya dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam proses pergerakannya (Parera dkk., 2009). Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energy berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik apabila membrane plasma sel berada dalam keadaan utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme (Rizal, 2006). Penurunan motilitas disebabkan oleh semakin sedikitnya spermatozoa yang memiliki cadangan energy yang cukup untuk digunakan bergerak, karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin (suhu rendah) dapat mengalami destabilisasi membrane (Ihsan, 2008).

Viabilitas spermatozoa tergantung pada keutuhan membrane spermatozoa. Kerusakan membrane spermatozoa akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme intraseluler spermatozoa sehingga spermatozoa akan melemah dan bahkan bisa menyebabkan kematian (Ihsan, 2008). Tingginya persentase viabilitas pada pengencer dengan kuning telur disebabkan karena kandungan lipoprotein dan fosfolipid yang terdapat pada kuning telur mampu melindungi membrane plasma spermatozoa

karena terjadi peningkatan proporsi kolesterol dan fosfolipid yang melindungi spermatozoa dari cold shock (Crespilho *et al.*, 2012). Kuning telur dilaporkan memiliki beberapa faktor yang dapat mengganggu kestabilan membrane plasma spermatozoa dan menyebabkan kapasitas. Hormone steroid dan prekursor yang terdapat dalam kuning telur berhubungan dengan rendahnya kemampuan fertilisasi spermatozoa (Akhter *et al.*, 2010). Penggunaan lesitin kedelai perlu dipertimbangkan manfaatnya karena dapat memberikan dampak positif bagi kualitas spermatozoa, lesitin kedelai selain mampu melindungi spermatozoa dari cold shock (Rehman *et al.*, 2014), menghambat terjadinya kapasitas (Crespilho *et al.*, 2012; Papa *et al.*, 2011) dan mampu menghambat terjadinya reaksi akrosom (Udrayana, 2008).

Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Pola peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa selama penyimpanan pada gambar 9. Pola peningkatan abnormalitas semakin lama penyimpanan semakin meningkat. Abnormalitas selama penyimpanan yang meningkat adalah abnormalitas sekunder yaitu ekor yang melingkar atau ekor yang terputus, hal ini disebabkan oleh perbedaan osmosis saat melakukan pengenceran, cold shock pada saat pendinginan dan putusnya ekor spermatozoa disebabkan oleh proses preparasi sampel pada saat membuat ulasan.

Peningkatan abnormalitas selama proses pendinginan dan pembekuan dapat diakibatkan pengenceran, perubahan suhu, adanya cekaman, kecepatan pendinginan dan proses pembuatan preparat ulas. Peningkatan abnormalitas selama proses pendinginan adalah akibat adanya perubahan tekanan osmosis karena adanya pengeluaran ion-ion, dehidrasi yang hebat menyebabkan sel mengerut dan akan merusak membrane sel. Pencampuran dengan pengencer atau pembuatan preparat yang

kasar akan meningkatkan kerusakan pada kepala spermatozoa (Ihsan, 2008).

Spermatozoa yang memiliki persentase abnormalitas dibawah 20% dan tidak melebihinya, maka semen tersebut masih bisa dipakai untuk inseminasi (Alawiyah dan Hartono, 2006). Angka morfologi abnormal 8-10% tidak memberi pengaruh yang cukup berarti bagi fertilitas, tetapi jika abnormalitas lebih dari 25% dari satu ejakulat maka penurunan fertilitas tidak dapat diantisipasi (Parera dkk., 2009). Pendinginan menyebabkan peningkatan abnormalitas dan kerusakan sel namun masih dapat teratasi dengan adanya pengencer yang mengandung kuning telur yang didalamnya mengandung lesitin dan lipoprotein dari sel dan mencegah cekaman dingin (Ihsan, 2008).

Total Spermatozoa Motil

Peluang terjadinya fertilisasi sangat ditentukan oleh jumlah spermatozoa motil progresif yang ada dalam suatu ejakulat. Suatu ejakulat ataupun semen cair dan semen beku yang digunakan harus memiliki total spermatozoa motil yang optimal untuk terjadinya fertilisasi (Salim, 2012).

Total spermatozoa motil yang lebih tinggi dari nilai harapan 40 juta/ml spermatozoa motil. Penentuan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil per milliliter ditetapkan berdasarkan ketentuan SNI semen beku sapi yaitu semen yang akan diinseminasikan memiliki konsentrasi spermatozoa 100 juta/ml.

PENGENCER CEP-2

Perbedaan persentase motilitas spermatozoa yang signifikan pada pengencer CEP2 dengan penambahan kuning telur pada konsentrasi yang berbeda mulai terlihat pada hari ke lima sampai dengan hari ke delapan penyimpanan, yang mana pada pengencer CEP2 yang mengandung kuning telur 10% berbeda

signifikan dengan pengencer CEP2 yang mengandung kuning telur 15% dan 20%. Persentase motilitas spermatozoa pada pengencer CEP2-KT 10% sesuai dengan standar SNI untuk IB yaitu motilitas minimal 40% hanya bertahan pada hari ke 7 penyimpanan, sedangkan pada hari kedelapan sudah berkurang dari 40% ($38,50 \pm 6,99\%$). Persentase motilitas spermatozoa pada pengencer CEP2 dengan suplementasi kuning telur 15% dan 20% dapat bertahan minimal 40% sesuai dengan standar SNI untuk IB sampai dengan hari ke delapan penyimpanan.

Persentase viabilitas spermatozoa pada pengencer CEP2 tanpa kuning telur mengalami penurunan yang sangat drastic selama penyimpanan 8 hari, sedangkan pada pengencer CEP2 yang mengandung kuning telur persentase viabilitas spermatozoa dapat bertahan $\geq 80\%$ sampai hari ke delapan penyimpanan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kuning telur dalam pengencer CEP2 mampu memberikan perlindungan terhadap daya hidup spermatozoa sapi limousine selama penyimpanan pada suhu $4^{\circ}\text{-}5^{\circ}\text{C}$. perubahan temperature yang cepat selama penyimpanan dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa. Viabilitas spermatozoa mengalami penurunan yang disebabkan terjadinya kerusakan membrane plasma dan membrane akrosom akibat pengaruh cold shock selama penyimpanan pada suhu rendah dan susu beku (Pereira *et al.*, 2010).

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, B. Tappa, dan Djuarsawidjaja. 2003. Pengaruh Perbandingan Kuning Telur dan Air Kelapa terhadap Daya Tahan Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Sapi Hasil Pemisahan. *Media Peternakan* 26(3): 82-87.
- Afiati, F. 2004. Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. *Jurnal Media Peternakan*. 27(1): 16-20.
- Ahmad, Z., M. Anzar, M. Shahab, N. Ahmad and S.M.H. Andrabi. 2003. Sephadex and sephadex ionexchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology*. 59: 1189-1202.
- Aketa, K. and T. Ohta. 1977. When do sperm of the sea urchin. *Pseudocentrotus depresses*, undergo the acrosome reaction at fertilization?. *Dev Bio*. 61: 366-372.
- Akhter, S., M.S. Ansari, B.A. Rakha, S.M.H. Andrabi., S. Iqbal and N. Ullah. 2010. Cryopreservation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*. 74: 951-955.
- Alvarez, J.G. and B.T. Storey. 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J. Androl*. 14: 199-209.

- Arifiantini, R.I., B. Purwantara dan W.W. Putra. 1999. Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. IPB Bogor, 16 September 1999. 18-37.
- Artken, J.R.. 2011. The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. BOR Papers in Press. Biolreprod. 111: 25-28.
- Ax, R.L., M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love. D.D. Varner, B. Hafez and M.E. Bellin. 2008. Artificial Insemination. In: Reproduction In Farm Animal. E.S.E Hafez and B. Hafez. (Edit). 7th ed. Blackwell Publishing. Australia: 376-389.
- Bahmanpour, S., T. Talaei, Z. Vodjani, M.R. Panjehshahin, I. A. Poostpasand and Zareei. 2006. Gaeminia Date palm pollen seems to cure male infertility by improving the quality of sperm parameters. However, further studies are needed to see its beneficial effects in man. Iran J. Med. Sci 31(4): 208-212.
- Bamba, K. 1988. Evalation of acrosomal integrityof boar spermatozoa by bright field microscopy using an Eosin-Negrosin stain. Theriogenology. 29(6): 1245-1251.
- Barker, J.S.F. 1994. Animal breeding for tolerance to adverse environment. In Sustainable Animal Production and the Evironment. Proc. Of the 7th AAAP Animal Science Congress. Bali, Indonesia. 1: 29-39.
- Bearden, I.J. and J.W. Fuquay. 2000. Applied Animal Reproduction. 5th ed. Mississippi State University: 24-143.

- Berg, Gabriele, Zachow, Christin, Lottmann, Jana, Gotz, Monika, Costa, Rodrigo, Smalla, and Kornelia. 2005. Impact Of Plant Species and Site on Rhizosphere-Associated Fungi Antagonistic to *Verticillium Dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(8): 4203-4213
- Brackett, B.G.E., J.R. George, J.R. Seidel and M.S. Sarah. 1981. *New Technologies in Animal Breeding*. Academy Press. 222-241.
- Breitbart, H., G. Cohen and S. Rubinstein. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Society for Reproduction and Fertility*. 129: 263-268. Online version via www.reproduction-online.org.
- Bronson R., Tatyana, P., Marc, G., Klaus P. 2000. Vibronectin is sequestered within human spermatozoa and liberated following the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 6(11) : 977-982.
- Campbell, N.A., J.B. Reece and L.G. Mitchel. 2002. *Biology*. 5th ed. Alih bahasa oleh Lestari R., E.I.M. Adil dan Anita. Erlangga. Jakarta.
- Chang, M. C. 1951. Fertilizing capacity of sperm deposited in the Fallopian tube. *Nature*. 68: 697-698.
- Check, M.T., J.H. Check and R. Long. 1991. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Archeves of andrology*. 27: 155-150.

- Cooper G.M. 2000. *The Cell : A Molecullar Approach*. Second Ed. ASM Press. Washington.
- Corteel, J.M. 1974. Effect du glucose (viability of goat spermatozo deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect:. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 14: 741-745.
- Cummins, J. 2009. Sperm motility and energetics. Chap.5. In: *Sperm Biology*. 1st ed. Scott Pitnick, Tim R. Bikhead, David Hosken (Edit). Elsevier. The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1 GB, UK.
- Cunningham, E.P. 1991. Breeding program for improved dairy production in tropical climates, In: *Animal Husbandry in Warm Cilmates. Proceedings of the International Symposium on Animal Husbandry in Warm Climates*. Viterbo, Italy. Pudoc Wageningen: 39-47.
- Dan, J. C. 1952. Studies on the acrosome. Reaction to egg-water and other stimuli. *Biol. Bull.* 103: 54-66.
- Dan, J. C. 1954. Studies on the acrosome. II. Acrosome reaction in starfish spermatozoa. *Biol. Bull.* 107: 203-218.
- De Pauw, I. 2003. Bovine semen preservation under epididymal conditions and assessment of sperm quality by means of a sperm-oviduct binding assay. *Pharmacia Animal Health. Theriogenology.* 56: 1719-1728.
- Ditjen Peternakan. 2007. *Statistik Peternakan*. Direktorat jenderal Peternakan Departemen Pertanian RI.CV. Desindo Catur Pratama. Jakarta.

- Ducha, N.T. Susilawati, Aulanni'am, S. Wahyuningsih dan M. Pangestu. 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm after Storage in CEP-2 Extender With and Without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Science* 15 (20):979-985
- Ducha, N.T. Susilawati, Aulanni'am, dan S. Wahyuningsih. 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7 (1): 5-8 ISSN : 1978-225X
- Eisenbach, M, 2004. Towards Understanding the Moiecular Mechanism of sperm chemotaxis. *J. General Physiology.* 124: 105-108.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. A987. *Salomon's Artivicial insemination of Sheep and Goats.* Butterworth, Sydney, NSW, Australia: University Press.
- Evans, G. 1991. Aplication of reproductive technology to the Australian livestock industries. *Repord. Fertil. Dev.* 3: 627-650. *Proc. Aust Soc. Reprod. Biol. Ann. Conf., Perth, WA.* 1990.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak.* Alfabeta. Jakarta
- Ferrari, S., V.H. Barnabe, R.M. Zuge and M.A. Zagno. 2000. Effect of ram sperm capacitating media on acrosome reaction and zona-free hamster oocyte penetration test. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37(3): 1-6.

- Flesch, F.M. and B.M. Gadelia. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilitation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 197-235.
- Fonseca, J.F., C.A.A. Torres, V.V. Mafili., A.M. Borges, A.D.F. Santos, M.T. Rodriues and R.F.M. Oliveira. 2005. The hypoosmotic sweeling test in fresh goat spermatozoa. *J. Anim. Repord.* 2. 139-144.
- Foote, R.H. 2003. Fertility Estimation: a review of past experience and future prospect. *Animal. Rep. Sci.* 75: 119-139.
- Foote, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science.* 1-10.
- Foote, R.H., Y. Chen, C.C. Brockett and M.T. Kaproth. 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in the whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J Dairy Sci.* 76: 1908-1913.
- Foote, R.H. 1980. Artificial Insemination. In reproduction in farm nimals. 4th ed. E.S.E. Hafez (Ed). Lea and Fabiger Philadelphia. 521-545.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and seminal plasma. In: Reproduction in farm animal. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. Blackwell Publishing. Australia. 96-109.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and seminal plasma. In: Reproduction in farm animal. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. By Hafez.ESE, Lea and Febiger. Philadelphia: 440-443.

- Gazali, M. dan S.N. Tambing. 2002. Kriopreservasi sell spermatozoa. *Hayati*. 9 (1): 27-32.
- Gill, J., N. Lundeheim, L. Soderquist and H. Rodrigues-Martinez. 2003a. influence of extender, temperature and addition of glycerol on post thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 50: 1241-55.
- Gill, J. and F. Laurerio. 2001. Fertility of Frozen-thawed Ram Semen: with special reference to influence of extender and freezing procedures. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. Thesis.
- Gordon, I. 1983. Fixe-time sheep artificial insemination. In: *Controlled breeding in farm animals*. Oxford, UK: Pergamon. 197-208.
- Grace K.S., Richard A.B., Berhane G. 2002. Surface Expression of Complement Receptor gC1q-R/p33 Is Increased on the Plasma Membrane of Human Spermatozoa after Capatitation. *Biology of Reproduction*. 66 : 823-829.
- Graham, E. F. 1978. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: *The integrity of frozen spermatozoa*. Proc. Conf. Nafl. Acad. Sci. Washington, DC. 4-44.
- Greyling, J.P.C. and M. van der Nest. 2000. Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progesterone. *Small Ruminant Research*, 36: 201-207.
- Griggers, S., D.L. Paccamonti., R.A. Thomson and B.E. Elts. 2001. The effect of pH, Osmololity and urine contamination on equine spermatozoa motility. *Teriogenology*. 56: 723-733.

- Hafez, E.S.E. 2008. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In: Reproduction in farm animals. Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia: 431-442.
- Hafez, E.S.E., and B. Hafez. 2008. Transport and survival of gametes. In: Reproduction in farm animals. Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia: 84-95.
- Hasida, N.H, R.B. Abdulloh, M.H. Rajikin and M. Mat Noor. 2005. Utrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. Biomedical Reserch. 16 (2): 119-123.
- Hecht, N.B. 1990. Regullation of haploid expressed genes in mamale germ cells. J. Repord. Fert. 88: 679-693.
- Herdis, Yulanawati dan M. A. Setiadi. 2003. Pemanfaatan sari buah melon sebagai media pengencer semen cair alternative spermatozoa domba garut. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia, 5 (5): 126-131.
- Hinting, A., dan A. Marlinata. 1981. Beberapa obat yang meningkatkan energy spermatozoa. Dalam : Spermotogenesis. Prosiding Seminar (K.M.Arsyad ^{ed}). Surabaya.
- Ho. H. C. and S.S. Suarez. 2001. An Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca²⁺ Store is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility. Biol. Repord. 65: 1606-1615.

- Hossaini, Md. S., A. Johannison, M. Wallgren, S. Nagy, A. P. Siqueira and H. Rodriguez-Martinez. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology*. 13 (3): 406-419.
- Hu, J.H., Q.W. Li, Y.L. Chen, Z.L. Jiang, Y.H. Jia, L.Q. Wang and B.B. ou. 2009. Effect of addition of vitamin B12 to the extender on post thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(5): 379-384.
- Isnaini, N., 2006. Peran Trehalosa Dalam Pendinginan dan Pembekuan Semen Kambing Boer. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Jainuddeen, M.R., H. Wahid and E.S.E. Hafez. 2008. Sheep and Goat. In: *Reproduction in Farm Animal*. Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia:172-181.
- Jeyendran, R.S., V.K. Gunawandra, D. Baristic and A.c. Wentz. 1995. TEST-Yolk media on sperm quality. *Human Reproduction*. 73-78.
- Jeyendran, R.S., H.H. Van Der Ven, M. P. Pelaez, B. G. Crabo and L.J.D. Zaneveld. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Repord. Fertil.* 70: 219-228.
- Jeyendran, R.S. and E.F. Graham 1980. An evaluation of cryopreservative compounds on bovine spermatozoa. *Cryobiology*. 17: 458:464.

- Johsnon, L.A., W.M.C. Maxwell, J.R. Oberinsky and G.R. Weich. 1996. Staining sperm for viability assessment. *Repornd Anim.* 31: 37-47.
- Joshi, A., A.K. Mathur, S. M. K. Naqvi and J. P. Mittal. 2006. Influence of Osmolality of Complete Semen Extender on Motion Characteristics of frozen-thawed Ram Spermatozoa. *Asia-Aust. J. Anim. Sci.* 19. (12): 1716-1721.
- Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli and S., Brikas. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the non breeding season. *Theriogenology.* 48: 1049-1059.
- Kaul, G., S. Singhs, K.K. Gandhi and S.R. Anand. 1997. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assested by clourtetracycline assay. *J. Androl.* 29 (5): 243-251.
- Kelvin, J, A. Davias and William A. Prayor. 2005. The evolution of free radikal biology & medicine a 20-years history. *Free radikal biology & medicine.* 39 (10): 1263-1290.
- Kukovics, S., E. Gyoker, T. Nemeth and . Gergatz. 2011. Artificial insemination of Sheep-Possibilities, Realities and Techiques at the Farm Level. In: *Artifial Insemination in Farm Animals.* Manafi., M (ed). In Tech. India. A free on line edition at www.intechhopen.com. 27-50.
- Lebeouf, B., J.A. Delgadillo, E. Manfredi, A. Piacere, V. Clement, P. Martin, M. Pellicer, P. Bou and R. de Cremoux. 2008. Management of Goat Reproduction and Insemination for Genetic Improvement in France. *Repornd Dom Anim.* 43: 379.

- Lebeouf, B., B. Restallb and S. Salamon. 2006. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Small Ruminant Research*. 64: 29-42.
- Matsuoka, T., H. Imai, H. Kohno and Y. Fukui. 2006. Effect of Bovine Serum Albumin and Trehalose in Semen Diluents for Improvement of Frozen-thawed Ram Spermatozoa. *J. Repord. Dev.* 52: 675-83.
- Maxwell, W.M.C. and G. Evans. 1999. Current status and future prospects for reproductive technologies in small ruminant. *Proc. Assoc. advmt. Anim. Breed. Genet.* 18: 287-295.
- Maxwell, W.M.C. and T. Stojanov. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of semen antioxidant. *Repord. Fertile. Dev.* 8: 1013-1020.
- Maxwell, W.M.C. and L.J. Hewitt. 1986. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *J. agric. Sci. Camb.* 106-191.
- Maxwell, W.M.C. and L.G. Butler. 1984. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Proc Aust Ass Anim Breed Genetics, Adeleide.* 4: 192.
- Memon, M.A. and R.S. Ott. 1981. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goat. *World Review of Animal Production.* XVII (1): 19-25.
- Menchaca, A., A. Pinnezak and D. Queirolo, 2011. Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim. Repord.* 2 (3): 195-198.

- Moce, E. and J.K. Graham. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 104-118.
- Nehring, H. and L., Rothe. 2003. Insemination of Cryopreserved Bull Semen Portions With Reduced Sperm Number After Dilution With Two Egg Yolk-Free Extenders. *Proc. 15th Europ. Ai. Vets Meet., Budapest, Hungary*: 14-23
- Nicholas, F.W. 1996. Genetic improvements through reproductive technology. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 205-214.
- Nishikima, A., M. Yamada, N. Minami and K. Utsumi. 1997. Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin A lectin. *Theriogenology*. 48:1007-1016.
- O'hara, L., J.P. Hanrahan, L. Richardson, A. Donovan, S. Fair, A.C. Evans and P. Lonergan. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*. 73 (4): 541-549.
- Papa, F.O., G.B. Felicio, C.M. Melo, M.A. Alvarenga, B. De Vita, B.R. Avanzi and J.A. Dell'Aqua Jr. 2010. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 121S: S171-S172.
- Paulenz, H., L. Soderquist, T. Adnoy, K. Soltun, P.A. Saether, K.R. Fjellsoy and K.A. Berg. 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 86 (1): 109-117.

- Pawar, K. and G. Kaul. 2011. Assesment of buffalo (bubalus bubalis) sperm DNA fragmentation using a sperm chromation dispersion (SCD) test. *Reproduction in Domestic Animals*. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01766.x.
- Permatasari, W.D., E.T. Setiatin, D. Samsudewa. 2013. Studi Tentang Pengencer Kuning Telur dan Pengaruhnya Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Brebes. *Animal Agriculture Journal*, Vol. 2. No.1, 2013, P 143-151
- Pratiwi, W.C., L., Affandhy dan D., Pamungkas. 2005. Observasi Kualitas Spermatozoa Pejantan Simental dan PO dalam Straw Dingin Setelah Penyimpanan Selama 7 Hari Pada Suhu 5°C. *Cibinong. Pusat Penelitian Bioteknologi. Lipi*: 200-205.
- Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63: 215-225.
- Ratnawati, D., L. Affandy, W.C. Pratiwi dan P.W. Prihandini. 2008. Pengaruh pemberian suplemen tradisional terhadap kualitas semen pejantan sapi bali. *Proc. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*.
- Rijnders, P., P. M. Verveld, M.H. Piedrriet, M. Brass, J.W. Lens and G.H. Jeilmaker. 1994. Laboratory aspect on in vitro fertilization. *IVF Laboratory. N.V. Organon*. 21-48.
- Ritar, A.j., P.D. Ball and P.J. O'May. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fertile. Dev.* 2: 27-34.
- Roca, J., J.A. Carrizossa, I. Canpos, A. Lafuente, J.M. Varques and E. Martines. 2004. Viability and fertility of unwashed

Muriciano-Granadina goat spermatozoa diluted in tris egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rumin. Res.* 25: 147-153.

Rodriguez-Martinez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim.* 38: 312-8.

Roldan, E.R.S. and M. Gomendio. 1992. Morphological and biological changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa "in vivo". *Anim. Rep. Sci.* 28: 69-78.

Sacke, R.G. 1972. semen quality test and their relationship to fertility. *NAAB proc 4th Tech. Conf. anim. Reprod. Insem.* 22-28.

Saili, T/, M.R. Toelihere, A., Boediono, dan B., Tappa. 2000. Keaktifan Albumin Sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y. *Jurnal Hayati.* 7(4): 106-109.

Salam, A., A. Ghani, N. Dabdoub, R. Muhammad, R.A. Ghani and M. Qazzaz. 2008. Effect of Palestinian Honey on Spermatogenesis in Rats. *Journal of Medicinal Food.* 11(4):799-802.

Salamon, S., W.M.C. Maxwell and J.H. Firth. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Anim. Rep. Sci.* 2: 373-385.

Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38:1-36.

- Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim Repord Sci.* 62: 77-111.
- Sancho S., I Casas I., Ekwall H., Saravia F., Rodriguez M., JE Rodriguez-Gill J.E., Flores E, Pinart E., Briz M., Garcia Gil N., Bassols J., Pruneda A., Bussalleu E, Yeste M. and Bonet S. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction.* 134 : 111-121.
- Sawada, H., 2002. Ascidian sperm lysine system. *Zool. Sci.* 19: 139-151.
- Setiadi, M. A., A., Suprayogi, dan Yulnawati. 2006. Viabilitas dan Integritas Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Anjing Selama Penyimpanan pada Pengancer Yang Berbeda. *J. Media Kedokteran Hewan.* 22(2):118-123.
- Short, M.A. 2004. Linking the Spesis Triad of Inflammation, Coagulation, and Suppressed Fibrinolysis to Infants. *Adv. Neonatal Care.* 5: 258-73.
- Sianturi, R.G., P., Siturnorang, E., E., Triwulaningsih, dan D.A., Kusumaningrum, 2007. Pengaruh Penambahan Glutathione dan Kolesterol pada Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Metode Kolom Albumin Telur. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Semarang:* 207-213.
- Smith, T.T. and R. Yanagimachi. 1991. Attachment and release of spermatozoa stored from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Repord. Fertil.* 91: 567-573.

- Smith, M.C. 1980. Caprine Reproduction. In current Therapy and Theriogenology. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. D.A. Morrow (edit). WB. Sander Company. Philadepphia.
- Sohney, B and W. Holtz. 2005. Technical Note: Transcervical deep comual insemination of goats. J. Anim. Sci. 83: 1543-1548.
- Stroncek, D., J.L. Procter and J. Jhonson. 2000. Drug Induced Hemolysis: Cefotetan-dependent hemoltyc anemia. An Acute Intravascular Immune Transfusion Reaction. Am. J. Hematol. 64 (1): 67-70.
- Sule, W.F., M.O. Oyeyemi and M.O. Akusu. 2007. Coconut milk-citrate as extender for west African dwarf buck spermatozoa at room Temperature. Nigerian Society for Experimental Biology. 19 (2): 65-73.
- Sum, A.K., R. Faller and J.J. de Pablo. 2003. Molecular simulation study of phospholipid bilayer and insights of the interaction with disaccharides. J. Biophys. 85: 1839-2844.
- Sumitro, S.B., dan T. Susilawati. 1998. Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistim dan Inverted. Laboratorium Biologi. Fak. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya Malang.
- Sumadisa, I.W.L., dan L.A. Zaenuri. 2011. Antioksidan nabati sebagai agen preservative terhadap itegritas strukrural dan fungsional serta peningkatan kapasitas pembuahan spermatozoa kambing Peranakan Etawa. J. Vet. 13 (4): 312-321.

- Sunarma, A., D. Hastuti dan Y. Sistina. 2009. Penggunaan extender madu yang dikombinasikan dengan krioprotektan berbeda pada pengawetan sperma ikan Nilem Indonesia *Sharkmonnov, Osteohitus hasellti, Valenciennes, 1842*). Laporan peneliiian. BBPBAT. Sukabumi.
- Susilawati., T. 2000. Analisa Membran Spermatozoa Sapi pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Susilawati., T., Hermanto, P. Srianto, dan Yuliani, E. 2002. Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Brahman Menggunakan Gradien Putih Telur pada Pengencer Tris dan Tris Kuning Telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati* 14(2): 176-181.
- Susilawati., T. 2011. *Spermatology*. Penerbit Universitas Brawijaya Press. Malang. ISBN: 978-602-8960-04-5.
- Susilawati, T. 2013. *Spermatology*. Universitas Brawijaya Press. Malang
- Sutovsky, P and G. Munandhar. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure : Anatomoccal and Compartment Analysis in the sperm cell production, maturation, fertilization, regenerations. Edited by C.J. De Jonge and C.L.R Barrat. Cambridge University Press.
- Talbot, P., B.D. Shur and D.G. Myles. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Repord.* 68: 1-9.
- Tambing, S.N., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf dan I.K. Utama. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas

semen beku kambing peranakan etawa. Tesis. Bogor. Program pascasarjana, Institut pertanian Bogor.

Tamuli, M.K. and P.F. Watson. 1994. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *J. Repord. Sci.* 35: 247-254.

Toelihere, M.R. 1993. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Angkasa. Bandung.

Tournaye, H. 1994. The effect of pentoxifilin on sperm function and embryonic development and its use in the treatment of male factor infertility. Thesis. Vrije Universiteit Brussel, Belgium.

Tuli, R.K. and W. Holtz. 1992. The effect of zwitterions buffer on the freezability of Boer goat semen, *theriogenology*. 37: 947-951.

Umiyasih, U. A Lukman, W.B. Didi. 1999. Pengaruh Beberapa Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Madura Pada Berbagai Tingkatan Konsentrasi Spermatozoa. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner.

Uysal, O., T. Korkmaz, I. Yavas and N.M. Bucak. 2006. Evaluation by hypoosmotic selling-eosine test of cryopreserved bovine spermatozoa. *Indian Vet. J.* 83: 557-559.

Uysal, O. and T. Korkmaz. 2004 Evaluation of membrane integrity by hypo-osmotic selling eosine test ini canine spermatozoa. *Indian Vet. J.* 81: 1229-1231.

Valente, S.S., R.M. Pereiram, M.C. Baptista, C.C Marques, M.I. Vasques, S. Pereira, M.V. Chota and J.P. Barbas. 2010. In

vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different Extenders. *Anim. Rep. Sci.* 117-77.

Verberckmoes S., Van Soom A., de Kruif A. 2004. Storage of Fresh Bovine Semen in Diluent Based on The Ionic Composition of Cauda Epididymal Plasma. *J. Reproduction in Domestic Animal* (39) 1-7.

Vishwanath, R. and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Repord. Sci.* 62: 23-53.

Watson, P.F. 2000. The Causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repord. Sci.* 60-61: 481-492.

Weitze, K.F. and R. Petzoldt. 1992. Preservation of semen. *Anim. Repord. Sci.* 28: 229-235.

Wheeler, M. 1996. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. *Int. Outline. Dec.'09.*

White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.

Widjaja, N. 2011. Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi pada Suhu Penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan Vol. 9 (2): 72-76 ISSN 1693-8828.*

Xu, C.L., J.B. Zhou, B.T. Zhao, G.C. Lan, M.J. Luo, Z.L. Chang, H.S. Sui and J.H. Tan. 2009. Liquid Storage of Goat Semen in Chemically Defined Extenders. *Reprod. In Domestic Animal.* 44 (5): 771-778.

- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: The physiology of Reproduction. Vol 1. Raven Press. New York, NY, USA. 1: 189-317.
- Yulnawati, H., Herdis, Maheshwari dan M., Rizal. 2008. Kulaitas Spermatozoa Epididimas Kerbau Belang pada Penambahan Raffinosa Sebagai Krioprotektan Eksiraseluler. *Jitv* 13: 30-34.
- Yusuf, T.L., R.I. Arifianti dan N. Rahmawati. 2005. Daya tahan semen cair kambing peranakan etawa dalam pengencer kuning telur dengan kemasan dan konsentrasi spermatozoa yang berbeda. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 30 (4): 218-223.
- Zaenuri, L.A. dan Rodiah. 2003. Efisiensi penggunaan progesterone untuk induksi birahi ternak kambing local (*capra sp*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan.Fak. Peternakan, Universitas Mataram.* 2 (1): 149-155.
- Zamfirescu, S., D. Nadolu, V. Ciupina and D. Coprean. 2003. The biochemical and electronmicroscopis research or ram semen before and after freezing various extender. National Congres of Biotechnology present and outlook in the third millennium. Bucharest-Roumania: 2-6.



Media Nusa Creative
Anggota IKAPI (162/JTI/2015)
Bukit Cemara Tidar H5 No. 34 Malang
Telp : 0341 - 563 149 / 08223 2121 888
Email : mnc.publishing.malang@gmail.com

