

Kualitas Semen Cair Domba Garut pada Penambahan Sukrosa dalam Pengencer Tris Kuning Telur

YULNAWATI¹ dan HERDIS²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI,
Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, 16911

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung BPPT II Lt. 16,
Jl. MH. Thamrin 8, Jakarta, 10340

(Diterima dewan redaksi 24 November 2009)

ABSTRACT

YULNAWATI and HERDIS. 2009. The quality of Garut ram liquid semen in Tris egg yolk extender to the sucrose supplementation. *JITV* 14(1): 45-49.

The successful program of artificial insemination in sheep is determined by the quality of sperm that are used. Therefore, it is important to maintain the quality of sperm during and after storage in low temperature. The research was conducted to study the influence of sucrose in the Tris-yolk extender in maintaining the quality of Garut ram sperm during preservation in reaction tube for four days at 5°C. Ejaculated sperm was collected once a week for five weeks using artificial vagina from same ram. Semen was divided into four groups of extenders, i.e. Tris egg yolk 20% (TKT), TKT + 0,1% sucrose, TKT + 0,3% sucrose and TKT + 0,5% w/v sucrose. The results showed that the percentage of motility on day four (D-4) of storage in TKT (41.00 ± 2.0%) was lower (P<0.05) than that in TKT + 0.3% (48.00 ± 2.45%) and TKT + 0.5% (51.00 ± 3.74%), however there was no significant different (P>0.05) from TKT + 0.1% (45.00 ± 3.16%). Whereas the percentage of live cells (%H) on D-4 in TKT, TKT + 0.1%, TKT + 0.3% and TKT + 0.5% were 55.00 ± 2.19%; 57.20 ± 2.79%; 59.20 ± 3.25% and 61.20 ± 3.60%, respectively. Meanwhile, the percentage of membrane integrity (MPU) in TKT (51.80 ± 1.94%) was significantly different (P<0.05) from TKT + 0.3% (57.40 ± 2.65%) and TKT + 0.5% (59.20 ± 3.66%), however there was no significant different (P>0.05) from TKT + 0.1% (54.80 ± 2.86%). In conclusion, the addition of sucrose 0.3% w/v into TKT extender could maintain the quality of Garut ram sperm more efficiently and better than TKT extender.

Key Words: Sucrose, Tris Egg Yolk, Preservation, Garut Sheep

ABSTRAK

YULNAWATI dan HERDIS. 2009. Kualitas semen cair domba Garut pada penambahan sukrosa dalam pengencer Tris kuning telur. *JITV* 14(1): 45-49.

Salah satu penentu keberhasilan inseminasi buatan pada domba garut adalah kualitas spermatozoa yang digunakan. Oleh karena itu, perlu upaya untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama maupun setelah penyimpanan pada suhu rendah. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan sukrosa ke dalam pengencer semen cair Tris-kuning telur terhadap kualitas semen cair domba Garut. Semen dikoleksi sekali seminggu selama lima minggu berturut-turut menggunakan vagina buatan dari pejantan yang sama. Semen dibagi ke dalam empat perlakuan pengencer yaitu Tris kuning telur 20% (TKT), TKT + 0,1% sukrosa, TKT + 0,3% sukrosa dan TKT + 0,5% sukrosa dan selanjutnya disimpan dalam tabung reaksi selama empat hari penyimpanan pada suhu 5°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas (%M) sperma pada hari keempat dalam pengencer TKT (41,00 ± 2,0%) lebih rendah (P<0,05) dibandingkan dengan TKT + 0,3% sukrosa (48,00 ± 2,45%) dan TKT + 0,5% sukrosa (51,00 ± 3,74%), namun tidak berbeda nyata (P>0,05) dibandingkan dengan TKT + 0,1% sukrosa (45,00 ± 3,16%). Sementara itu, persentase hidup (%H) sperma pada hari keempat dalam TKT, TKT + 0,1 % sukrosa, TKT + 0,3% sukrosa dan TKT + 0,5% sukrosa berturut-turut adalah sebesar 55,00 ± 2,19%; 57,20 ± 2,79%; 59,20 ± 3,25% dan 61,20 ± 3,6%. Perbedaan nyata (P<0,05) hanya terdapat diantara kelompok TKT dan TKT + 0,5% sukrosa. Sementara itu, persentase membran plasma utuh (MPU) dalam TKT sebesar 51,80 ± 1,94%, berbeda nyata (P<0,05) dengan kelompok TKT + 0,3% sukrosa (57,40 ± 2,65%) dan TKT + 0,5% sukrosa (59,20 ± 3,66%), namun tidak berbeda dengan TKT + 0,1% sukrosa (54,80 ± 2,86%). Dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan sukrosa 0,3% w/v ke dalam pengencer TKT dapat mempertahankan kualitas spermatozoa domba Garut lebih baik dan efisien daripada pengencer TKT selama penyimpanan pada suhu 5°C.

Kata Kunci: Sukrosa, Tris Kuning Telur, Penyimpanan, Domba Garut

PENDAHULUAN

Upaya peningkatan populasi domba Garut dengan Inseminasi Buatan (IB) menggunakan spermatozoa pejantan kualitas unggul sangat perlu dilakukan. Hal tersebut menjadi penting karena terbatasnya jumlah pejantan berkualitas dan harga pejantan unggul domba Garut yang relatif lebih mahal dibandingkan dengan bangsa domba lainnya. Domba Garut memiliki beberapa kelebihan, seperti bobot tubuh yang lebih berat, baik pada ternak jantan maupun betina dibandingkan dengan domba lokal, manajemen pemeliharaan yang relatif mudah dan daya adaptasi yang lebih baik terhadap lingkungan. Di daerah Jawa Barat, untuk pejantan domba Garut yang telah teruji kualitasnya melalui ajang domba tangkas akan memiliki nilai jual yang sangat tinggi. Hal itu sekaligus menjadi faktor pembatas dalam mendapatkan keturunan domba Garut kualitas unggul.

Masalah keterbatasan pejantan unggul dapat diupayakan dengan penyediaan spermatozoa yang telah diawetkan, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku. Penggunaan semen cair dengan bahan pengencer yang berkualitas merupakan salah satu alternatif yang cocok untuk menerapkan teknologi IB. Selain itu kelebihan IB dengan menggunakan semen cair adalah biaya yang dikeluarkan lebih murah jika dibandingkan dengan menggunakan semen beku.

Keberhasilan semen cair yang digunakan dalam program IB tergantung pada kemampuan pengencer dalam mempertahankan kualitas spermatozoa untuk jangka waktu tertentu. Komponen-komponen yang ada dalam pengencer semen harus mengandung energi yang cukup untuk pergerakan spermatozoa, *buffer* atau penyangga untuk mempertahankan pH larutan agar tetap netral bagi kehidupan spermatozoa serta melindunginya dari pengaruh cekaman dingin/*cold shock* (TOELIHERE, 1993).

Karbohidrat yang terkandung dalam bahan pengencer mempunyai beberapa fungsi, yaitu sebagai sumber energi, mengatur tekanan osmotik dan sebagai krioprotektan ekstraseluler (YILDIZ *et al.*, 2000). Sukrosa merupakan salah satu gula disakarida yang dapat ditambahkan ke dalam pengencer semen. Pada penelitian ini akan dilakukan penambahan sukrosa ke dalam pengencer Tris kuning telur dengan konsentrasi 0,1 - 0,5% w/v. Konsentrasi yang dicobakan relatif rendah dengan asumsi bahwa di dalam bahan pengencer Tris kuning telur juga telah terdapat fruktosa yang merupakan monosakarida. Sukrosa diharapkan berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler untuk melindungi membran sel spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin akibat penyimpanan spermatozoa pada suhu rendah dan sebagai sumber substrat tambahan bagi sel selama penyimpanan.

MATERI DAN METODE

Semen dikoleksi dari pejantan domba Garut yang sama menggunakan vagina buatan. Semen dikoleksi satu kali per minggu selama 5 minggu. Evaluasi semen segar dilakukan segera setelah semen ditampung, yang meliputi pemeriksaan makroskopis (volume, warna, konsistensi, pH) dan mikroskopis (gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas progresif / % M, persentase hidup / % H, persentase abnormalitas dan persentase membran plasma utuh / % MPU). Semen segar yang memenuhi syarat (motilitas > 70%, konsentrasi > 2000 juta sel setiap ml, abnormalitas < 15%) selanjutnya diencerkan dengan beberapa jenis bahan pengencer, sebagai berikut:

- 1 Perlakuan A = pengencer Tris kuning telur 20% (kontrol)
- 2 Perlakuan B = pengencer Tris kuning telur 20% + sukrosa 0,1% w/v
- 3 Perlakuan C = pengencer Tris kuning telur 20% + sukrosa 0,3% w/v
- 4 Perlakuan D = pengencer Tris kuning telur 20% + sukrosa 0,5% w/v

Tingkat pengenceran yang dilakukan tergantung dari persentase motilitas dan konsentrasi sperma dalam ejakulat serta konsentrasi akhir yang diinginkan, yaitu sekitar 100 juta sel/ml. Volume pengencer yang digunakan ditentukan menggunakan formula sebagai berikut:

$$\text{Volume pengencer} = \left\{ (\text{Vol. ejakulat} \times \% M) \times \left(\frac{\text{sperma ejakulat}}{\text{sperma yang diinginkan}} \right) \right\} - \text{Vol. ejakulat}$$

Komposisi pengencer dasar Tris yang digunakan terdiri atas: 3,32 g Tris (hidroksimetil) aminometana, 1,86 g asam sitrat, 1,37 g fruktosa, penisilin 1.000 µg/ml dan streptomisin 1.000 µg/ml yang dilarutkan dengan akuabidestilata steril hingga mencapai volume 100 ml. Pengenceran semen dilakukan pada suhu kamar. Setelah diencerkan sesuai dengan perlakuan, semen cair dalam tabung reaksi yang direndam dalam gelas piala berisi air disimpan dalam lemari es dengan temperatur ± 5°C dan dievaluasi secara mikroskopis setiap hari hingga persentase motilitas masih berada diatas 40%.

Peubah yang diamati selama penyimpanan semen cair adalah persentase motilitas progresif, persentase hidup dan persentase MPU. Persentase motilitas progresif adalah persentase spermatozoa yang bergerak aktif ke depan. Motilitas spermatozoa ditentukan secara subyektif pada beberapa lapang pandang yang berbeda terhadap preparat spermatozoa yang telah ditetaskan

pada gelas obyek dengan mempergunakan mikroskop perbesaran obyektif 10 x dan 40 x. Penilaian diberikan dalam kisaran angka 0 – 100% dengan skala 5%.

Persentase hidup merupakan persentase spermatozoa yang hidup dengan metode pewarnaan *eosin* 2%. Spermatozoa yang hidup yaitu kepala tidak berwarna karena tidak atau sangat sedikit menghisap zat warna sedangkan spermatozoa yang mati yaitu kepala berwarna merah karena permeabilitas dinding sel tinggi. Jumlah spermatozoa yang dihitung minimal sebanyak 200 ekor dari lapang pandang yang berbeda.

Persentase MPU adalah persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma yang masih utuh. Pengujian dilakukan dengan cara mencampur 0,25 ml larutan hiposmotik dengan 1 tetes semen dalam tabung reaksi. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi dalam *water bath* bersuhu 37°C selama 30 menit. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran obyektif 40 x (JEYENDRAN *et al.*, 1994). Ekor spermatozoa yang membengkok menunjukkan bahwa membran sel masih utuh, sedangkan spermatozoa dengan membran plasma yang rusak ditandai dengan ekor yang tetap lurus.

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan pengencer dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Kuantitas dan kualitas semen segar domba Garut yang diperoleh pada penelitian ini tertera pada Tabel 1. Dari sebanyak lima kali ulangan yang dilakukan, terlihat bahwa rata-rata %M adalah sebesar $73 \pm 2,45\%$. Sebagai bagian dari faktor utama dalam menentukan kualitas semen, maka nilai %M tersebut memenuhi salah satu syarat bagi spermatozoa untuk diproses lebih lanjut.

Persentase hidup spermatozoa (% H) pada penelitian ini adalah $83,6 \pm 0,49\%$. Hasil ini mendekati hasil yang diperoleh HERDIS *et al.* (2005) yaitu $84,80 \pm 0,84\%$. Nilai % H ini sedikit lebih tinggi daripada persentase motilitas dikarenakan spermatozoa yang hidup tetapi tidak motil progresif tidak terpapar pada pewarnaan.

Kualitas semen yang dinilai berdasarkan membran plasma utuh (MPU) yaitu sebesar $81 \pm 1,1\%$. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang diperoleh RIZAL *et al.* (2003) sebesar 87,33%. Perbedaan ini dikarenakan adanya perbedaan individu, umur dan kondisi reproduksi domba yang digunakan. Secara umum, hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas semen domba Garut yang ditampung layak dan

memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut menjadi semen cair maupun semen beku.

Tabel 1. Rata-rata hasil evaluasi semen segar domba Garut

Parameter	Nilai
Volume (ml/ejakulat)	$0,79 \pm 0,04$
pH	$7,18 \pm 0,07$
Warna	krem
Konsistensi	kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi (juta/ml)	$4146,00 \pm 872,89$
Motilitas progresif (% M)	$73,00 \pm 2,45$
Spermatozoa hidup (% H)	$83,60 \pm 0,49$
Abnormalitas spermatozoa (% Abn)	$2,92 \pm 0,10$
Membran plasma utuh (% MPU)	$81,00 \pm 1,10$

Kualitas spermatozoa selama penyimpanan

Berdasarkan hasil penelitian, %M pada hari keempat untuk perlakuan A, B, C dan D secara berurutan adalah $41,00 \pm 2,00\%$; $45,00 \pm 3,16\%$; $48,00 \pm 2,45\%$ dan $51,00 \pm 3,74\%$. Keadaan ini menunjukkan bahwa semen yang diencerkan dengan Tris-kuning telur 20% baik yang ditambahkan sukrosa maupun tidak sampai hari keempat masih layak digunakan untuk IB. BEARDEN dan FUQUAY (1997) melaporkan bahwa persentase motilitas diatas 40%, layak digunakan untuk IB. Tabel 2 menunjukkan kualitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C.

Penambahan sukrosa dalam pengencer Tris-kuning telur 20% selama pengamatan menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Penambahan 0,5% w/v sukrosa dalam pengencer menghasilkan motilitas terbaik dan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol, tetapi tidak berbeda nyata dengan penambahan sukrosa 0,3% w/v. Hal ini dapat dikatakan bahwa penambahan 0,3% w/v sukrosa cenderung mampu mempertahankan motilitas spermatozoa dan lebih efisien selama penyimpanan pada suhu 5°C.

Sukrosa merupakan gula disakarida yang dapat menghasilkan satu molekul glukosa dan satu molekul fruktosa. Spermatozoa memanfaatkan sukrosa sebagai bahan baku untuk menghasilkan energi melalui jalur glikolisis. Pemanfaatan energi tersebut lebih banyak digunakan untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan (MURRAY *et al.*, 1999). Menurut RIZAL *et al.* (2003), motilitas spermatozoa sangat tergantung pada sumber energi berupa ATP hasil metabolisme. AISEN *et al.* (2002) berpendapat bahwa proses metabolisme spermatozoa

dapat berlangsung dengan baik dalam pengencer yang mengandung gula yang sudah didegradasi.

Persentase spermatozoa hidup setelah pengenceran sampai hari keempat pengamatan pada perlakuan A, B, C dan D secara berurutan yaitu $55,00 \pm 2,19\%$; $57,20 \pm 2,79\%$; $59,20 \pm 3,25\%$ dan $61,20 \pm 3,60\%$. Penambahan 0,5% w/v dalam pengencer Tris-kuning telur 20% dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C paling baik dan lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada kontrol (Tabel 2).

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

Pada parameter persentase membran plasma utuh yang diamati hingga hari keempat penyimpanan dalam pengencer A, B, C dan D secara berurutan adalah $51,80 \pm 1,94\%$; $54,80 \pm 2,86\%$; $57,40 \pm 2,65\%$ dan $59,20 \pm 3,66\%$ (Tabel 2). Seperti halnya pada kedua parameter

sebelumnya, nilai % MPU terbaik juga dihasilkan oleh bahan pengencer dasar yang mendapat suplementasi sukrosa dengan konsentrasi 0,5% w/v ($P < 0,05$).

Penambahan sukrosa selain berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa juga melindungi membran sel spermatozoa secara ekstraseluler selama penyimpanan pada suhu 5°C. Karbohidrat dari golongan disakarida seperti sukrosa dan laktosa lebih baik dalam mempertahankan fungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler dibandingkan dengan monosakarida seperti glukosa dan fruktosa (AISEN *et al.*, 2002). Proses metabolisme yang menghasilkan ATP dapat berlangsung dengan baik jika membran sel tetap terlindungi, sehingga spermatozoa tetap mampu mempertahankan motilitas dan daya hidupnya.

Sebagai krioprotektan ekstraseluler, gula akan melindungi membran plasma sel sperma dari kerusakan secara mekanik yang mungkin terjadi saat proses kriopreservasi semen. Hal ini ditandai dengan lebih tingginya nilai persentase MPU semen beku perlakuan penambahan gula dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Menurut SALAMON dan MAXWELL (2000) gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (*glass*) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel sperma secara mekanik.

Tabel 2. Persentase motilitas, daya hidup dan membrane plasma utuh spermatozoa selama empat hari penyimpanan pada suhu 5°C

Perlakuan	Kontrol (A)	Sukrosa 0,1% (B)	Sukrosa 0,3% (C)	Sukrosa 0,5% (D)
Hari-1				
% Motilitas (M)	73,00 ± 2,45 ^a	73,00 ± 2,45 ^a	73,00 ± 2,45 ^a	73,00 ± 2,45 ^a
% Hidup (H)	80,80 ± 0,75 ^a	82,00 ± 0,00 ^b	82,20 ± 0,40 ^b	82,60 ± 0,80 ^b
% Membran Plasma Utuh (MPU)	79,00 ± 1,10 ^a	79,80 ± 0,75 ^a	79,80 ± 0,75 ^a	80,20 ± 0,98 ^a
Hari-2				
% M	60,00 ± 0,00 ^a	64,00 ± 2,00 ^b	66,00 ± 2,00 ^{bc}	68,00 ± 2,45 ^c
% H	72,40 ± 0,49 ^a	72,80 ± 0,40 ^a	74,40 ± 0,49 ^b	76,00 ± 0,63 ^c
% MPU	68,80 ± 2,23 ^a	70,80 ± 1,72 ^{ab}	71,00 ± 3,03 ^{ab}	72,40 ± 0,80 ^b
Hari-3				
% M	50,00 ± 0,00 ^a	50,00 ± 3,16 ^a	53,00 ± 2,45 ^b	60,00 ± 0,00 ^c
% H	65,00 ± 2,28 ^a	64,80 ± 0,98 ^{ab}	67,00 ± 0,89 ^{ab}	65,00 ± 0,89 ^b
% MPU	58,80 ± 1,47 ^a	61,60 ± 3,44 ^{ab}	63,40 ± 2,15 ^{bc}	65,80 ± 2,03 ^c
Hari-4				
% M	41,00 ± 2,00 ^a	45,00 ± 3,16 ^{ab}	48,00 ± 2,45 ^{bc}	51,00 ± 3,74 ^c
% H	55,00 ± 2,19 ^a	57,20 ± 2,79 ^{ab}	59,20 ± 3,25 ^{ab}	61,20 ± 3,60 ^b
% MPU	51,80 ± 1,94 ^a	54,80 ± 2,86 ^{ab}	57,40 ± 2,65 ^{bc}	59,20 ± 3,66 ^c

^{a,b} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Gula dapat menjadikan membran plasma sel lebih stabil selama proses kriopreservasi, seperti yang dilaporkan pada berbagai jenis sel lain yang telah dibekukan (BAKAS dan DISALVO, 1991). Gula juga memegang peranan penting dalam menurunkan kandungan garam larutan pengencer, sehingga dapat mengurangi efek solusi (*solution effect*). Ini menyebabkan gula dapat mencegah kerusakan terhadap sel akibat meningkatnya kadar garam selama proses pembekuan (NICOLLAJSEN dan HVIDT, 1994).

Efek krioprotektif gula dihasilkan dari terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil gula dan bagian kepala polar fosfolipida membran plasma sel, sehingga gula menggantikan posisi molekul air selama proses dehidrasi berlangsung saat pembekuan (AISEN *et al.*, 2002). Dengan demikian, gula dapat mengatur fluiditas membran plasma sel sperma.

Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian pada berbagai jenis hewan dan ternak yang menggunakan gula sebagai krioprotektan ekstraseluler dan substrat energi alternatif. Persentase motilitas semen beku domba sebesar 64 dan 52,10% masing-masing untuk semen yang diencerkan dengan penambahan trehalosa dan EDTA (AISEN *et al.*, 2000; 2002). Hal yang sama juga dilaporkan bahwa penambahan gula berupa sukrosa atau trehalosa di dalam pengencer nyata meningkatkan motilitas sperma semen beku sapi (WOELDERS *et al.*, 1997). Penambahan gula di dalam pengencer Tris berupa 60 mM laktosa (RIZAL *et al.*, 2003) dan 1,2% maltosa (HERDIS, 2005) nyata meningkatkan kualitas semen beku domba Garut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa secara umum penambahan sukrosa ke dalam pengencer Tris-kuning telur 20% dapat mempertahankan kualitas spermatozoa lebih baik daripada dalam media pengencer kontrol (Tris kuning telur 20%) selama empat hari penyimpanan pada suhu 5°C. Penambahan 0,3% w/v sukrosa dalam pengencer TKT merupakan dosis optimal penambahan sukrosa untuk dapat mempertahankan kualitas spermatozoa secara umum selama penyimpanan pada suhu 5°C.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada saudara Dwi Eddy Yustinawati yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AISEN, E.G., H.L. ALVAREZ, A. VENTURINO and J.J. GARDE. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- AISEN, E.G., V.H. MEDINA and A. VENTURINO. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801 – 1808.
- BAKAS, L.S. and E.A. DISALVO. 1991. Effects of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28: 347-353.
- BEARDEN, H.J. and J.W. FUQUAY. 1997. Applied animal reproduction. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall. Upper Saddle, New Jersey.
- HERDIS, M.R. TOELIHERE, I. SUPRIYATNA, B. PURWANTARA dan R.T.S. ADIKARA. 2005. Optimalisasi waktu ekuilibrasi dan metode pencairan kembali pada proses pembekuan semen domba Garut (*Ovis aries*). *J. Prod. Ternak*. 7: 81-88.
- JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER VAN, M. PEREZ-PALAEZ, B.G. CRABO and L.J.D. ZANEVELD. 1994. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristic. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219 – 28.
- MURRAY, R.K., D.K. GARDNER, P.A. MAYER and V.W. RODWELL. 1999. Biokimia Harper. Ed-24. Alih bahasa oleh Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- NICOLLAJSEN, H. and A. HVIDT. 1994. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. *Cryobiology* 31: 199-205.
- RIZAL, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2003. Kualitas semen beku domba Garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *JITV*. 7: 194-199.
- SALAMON, S. and W.M.C., MAXWELL. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- WOELDERS, H., A. MATTHIJ and B. ENGEL. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.
- YILDIZ, C., A. KAYA, M. AKSOY and T. TEKELI. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.