

Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda

Spermatozoa abnormality with different semen collection frequency in ram

FIFI AFIATI¹, YULNAWATI¹, MUHAMMAD RIYADI², RADEN IIS ARIFIANI³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel./Fax. +62-21-8754587/8754588, email:afiati_btk@yahoo.com

²Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat, Jl. A. Yani Km 36, Banjarbaru, Kalimantan Selatan

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Jawa Barat

Manuskrip diterima: 15 Desember 2014. Revisi disetujui: 4 April 2015.

Afiati F, Yulnawati, Riyadi M, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 930-934*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gambaran tingkat abnormalitas spermatozoa dua jenis domba yang ditampung dengan frekuensi berbeda, yaitu terhadap domba Garut dan domba Priangan. Ejakulat ditampung 1 atau 2 kali dalam seminggu menggunakan vagina buatan. Hasil menunjukkan bahwa ditemukan klasifikasi spermatozoa dengan abnormalitas mayor dan abnormalitas minor. Terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada abnormalitas *microcephalus* domba Garut (0,09%) dan domba Priangan (0,88%) pada frekuensi penampungan satu kali. Abnormalitas *nuclear vacuolus* pada domba Priangan (1,33%) berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan domba Garut (0,02%) pada frekuensi penampungan yang sama. Dapat disimpulkan bahwa tingkat abnormalitas spermatozoa domba Garut lebih kecil dibandingkan dengan tingkat abnormalitas spermatozoa domba Priangan, baik pada frekuensi penampungan satu kali atau dua kali dalam seminggu.

Kata kunci: abnormalitas, domba Garut, domba Priangan, frekuensi penampungan

Afiati F, Yulnawati, Riyadi M, Arifiantini RI. 2015. Spermatozoa abnormality with different semen collection frequency in ram. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 930-934*. The objective of this research was to get representation of spermatozoa abnormality level from two types of ram that collected in different frequency, namely Garut and Priangan rams. Ejaculate was collected once or twice in a week using artificial vagina. The result showed that spermatozoa classification with major and minor abnormalities had been found. There was a significant difference ($P < 0.05$) in *microphalus* abnormality of Garut ram (0.09%) and Priangan ram (0.88%) in one time collection. *Nuclear vacuolus* abnormality of Priangan ram (1.33%) had a significant difference ($P < 0.05$) compared to Garut ram (0.02%) in the same collection frequency. It could be concluded that spermatozoa abnormality level of Garut ram was smaller than Priangan ram, whether once or twice collected in a week.

Keywords: abnormality, collected frequency, Garut ram, Priangan ram

PENDAHULUAN

Ternak domba (Genus *Ovis*) merupakan jenis ternak yang sudah lama dikenal dan ditanakkan oleh masyarakat Indonesia. Salah satu keunggulan ternak domba adalah mudah dipelihara, produktivitas cepat, dan harganya relatif murah sehingga sangat berpotensi untuk dikembangkan. Pengembangan dapat melalui peningkatan kualitas pejantan unggul untuk pembibitan. Pejantan unggul yang sehat fisik dan reproduksi akan menghasilkan spermatozoa yang baik untuk menghasilkan anak yang baik (Afiati et al. 2013).

Domba Garut merupakan plasma nutfah domba Indonesia, merupakan hasil persilangan antara domba Merino dengan domba Kapstaar dari Afrika Selatan, serta domba lokal Indonesia yang terbentuk sejak tahun 1880-an sehingga memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan tropis di Indonesia, terutama Jawa Barat

(Herdis 2005). Domba Garut jantan biasa digunakan sebagai domba laga sehingga mempunyai nilai ekonomi yang lebih tinggi dibandingkan domba lokal lainnya. Domba Garut jantan memiliki postur yang gagah, libido yang sangat baik, dan tanduk khas dengan ukuran besar, kokoh, kuat, dan melingkar. Domba Garut tidak mengenal musim kawin dan mempunyai sifat dapat melahirkan anak kembar dua ekor atau lebih (Herdis et al. 2006). 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 (Yulnawati dan Herdis 2009).

Spermatozoa merupakan hasil akhir dari sel kelamin jantan yang telah mengalami pematangan. Proses pembentukan spermatozoa di dalam tubulus seminiferus (spermatogenesis) terbagi dalam dua fase, yaitu

spermatositogenesis, dimana spermatogonia mengalami pembelahan secara mitosis, meiosis, dan spermiogenesis, dimana spermatid akan berubah menjadi spermatozoa. Membran akrosom pada kepala sperma berfungsi untuk kapasitas, reaksi akrosom, dan penembusan ovum pada proses fertilisasi. Membran bagian belakang akrosom (*post acrosomal region*) berfungsi untuk mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema ovum pada proses fertilisasi, sedangkan membran pada bagian tengah (*midpiece*) ekor berfungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantarkan gelombang gerak, serta membran bagian utama (*principle piece*) berfungsi untuk pergerakan spermatozoa (Schatten dan Constantinescu 2007).

Barth dan Oko (1989) menyampaikan bahwa bentuk-bentuk abnormalitas spermatozoa diklasifikasikan menjadi dua yaitu abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi karena adanya kegagalan dalam proses spermatogenesis di tubuli seminiferus. Abnormalitas primer dapat dikarenakan faktor keturunan dan pengaruh lingkungan yang buruk. Bentuk dari abnormalitas primer meliputi kepala besar (*macrocephalus*) atau kepala kecil (*microcephalus*), kepala pendek, lebar, dan ekor ganda. Adapun abnormalitas sekunder terjadi selama proses penyimpanan atau kriopreservasi spermatozoa dan kemungkinan besar disebabkan perlakuan pada saat pewarnaan dalam proses pembuatan preparat ulas (Garner dan Hafez 2000). Bentuk abnormalitas sekunder meliputi bagian ekor yang melipat, adanya butiran-butiran sitoplasmik proksimal atau distal, dan selubung akrosom yang terlepas dari kepala tanpa adanya ekor, dan ekor yang terputus. Abnormalitas yang teramati dalam penelitian ini adalah abnormalitas sekunder yang dapat dilihat bagian dari ekor spermatozoa melingkar atau membengkok.

Semen domba memiliki volume yang rendah namun konsentrasi yang tinggi (Aku et al. 2007). Upaya peningkatan populasi domba 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. Oleh karena itu, sangat perlu dilakukan evaluasi terhadap kualitas spermatozoa seekor pejantan. Umumnya evaluasi spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma, dimana sampai saat ini penilaian terhadap abnormalitas spermatozoa kurang mendapat perhatian, padahal abnormalitas spermatozoa berkaitan erat dengan kemampuan membuahi sel telur dan kemandulan pada berbagai spesies. Struktur sel yang abnormal dapat menyebabkan gangguan dan hambatan pada saat fertilisasi sehingga lebih jauh menyebabkan rendahnya angka implantasi maupun kebuntingan (Yulnawati et al. 2013). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kejadian abnormalitas spermatozoa domba Garut dan domba Priangan dengan frekuensi penampungan yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Semen ditampung sesuai dengan perlakuan, yaitu kelompok yang ditampung satu minggu sekali dan kelompok yang ditampung dua kali dalam seminggu selama 5 minggu menggunakan vagina buatan dari domba Garut dan domba Priangan berumur 1-2 tahun. Ternak dipelihara di kandang percobaan dengan suhu berkisar antara 30-33°C dan kelembaban 70%. Pemberian pakan meliputi hijauan dan konsentrat serta air minum yang selalu tersedia. Kandang percobaan berlokasi di wilayah Kebun Plasma Nutfah Tumbuhan dan Hewan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.

Spermatozoa ejakulat hasil penampungan diencerkan dengan NaCl dengan perbandingan 1:4 untuk selanjutnya dibuat preparat ulas tipis di atas gelas objek bersih. Ulasan spermatozoa tersebut dikering-udarkan dan disimpan dalam kotak penyimpanan preparat sampai saat pewarnaan.

Pewarnaan preparat ulas dilakukan menggunakan pewarna *carbolfuchsin-eosin* (William staining) yang dimodifikasi (Kavak et al. 2004). Tahapan yang dilakukan untuk pewarnaan tersebut adalah preparat ulas yang telah kering-udara difiksasi dengan api bunsen, lalu dicuci dengan alkohol absolut selama 4 menit dan dikering-udarkan kembali. Selanjutnya, preparat dicelupkan dalam larutan chloramin 0,5% selama 2 menit untuk menghilangkan lendir dan menjernihkan sampel. Kemudian preparat dicuci menggunakan *distilled water*, alkohol 95%, dan diwarnai dengan pewarnaan William selama 10 menit. Terakhir, preparat dibersihkan dengan air mengalir dan dikering-udarkan hingga siap untuk diamati.

Pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CH 20) dengan perbesaran 400 kali. Penghitungan jumlah abnormalitas dilakukan minimal 500 sel spermatozoa dari 5-10 lapang pandang yang berbeda. Abnormalitas spermatozoa yang diamati dikelompokkan menjadi *pyriform* (bentuk yang menyempit di bagian *post acrosome*), *detached head* (kepala yang terpisah dari ekor), *pear shaped* (bagian anterior akrosom membulat dan bagian posterior akrosom mengecil dan mengalami elongasi seperti buah pir), *macrocephalus* (kepala lebih besar), *microcephalus* (kepala lebih kecil daripada normal), *double head* (satu sel memiliki dua kepala dan satu ekor), *nuclear vacuolus* (terdapat vacuola di bagian kepala sperma yang menunjukkan abnormalitas inti dan kromatin sel), *underdeveloped* (perkembangan yang tidak sempurna, ukuran yang lebih kecil daripada normal, ekor pendek dengan material sel yang belum sempurna pada pengamatan selanjutnya), *round head* (bentuk kepala yang membulat), *abnormal contour* (bentuk yang abnormal di kepala maupun ekor), *abaxial* (terbentuk fossa perlekatan di bagian tengah ekor), *abnormal decondensation* (abnormalitas kondensasi DNA sperma), *decaposition* (mengalami kapasitas dini), *defect midpiece* (kerusakan pada bagian *midpiece* seperti ekor yang melingkar, patah, dan melipat), dan *distal cytoplasmic droplet* (Barth dan Oko 1989). Anatomi spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan klasifikasi abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 2.

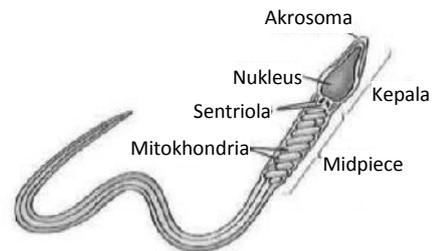
Rataan pengamatan untuk mengetahui perbedaan masing-masing abnormalitas spermatozoa dari dua jenis domba dianalisis menggunakan analisis uji-t. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

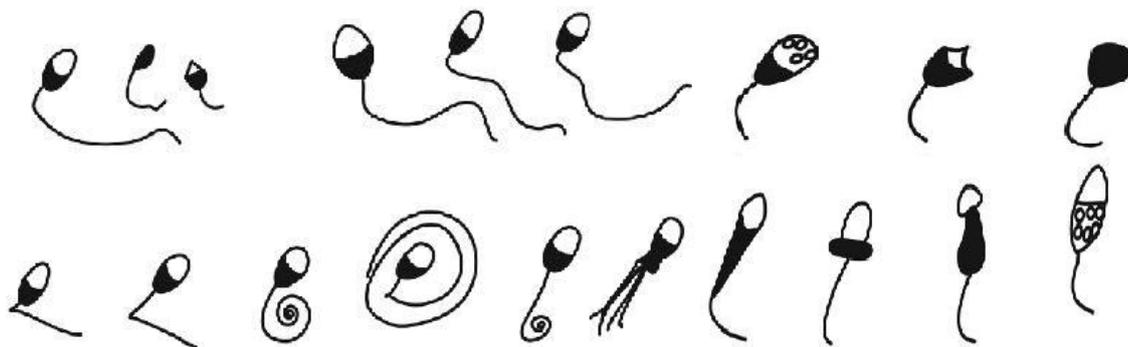
Abnormalitas merupakan salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa, karena struktur sel yang abnormal dapat menyebabkan gangguan dan hambatan pada saat fertilisasi, lebih jauh menyebabkan rendahnya angka implantasi maupun kebuntingan. Selain pengelompokan abnormalitas primer dan sekunder, saat ini pengelompokan abnormalitas dilihat berdasarkan akibat yang ditimbulkannya yaitu abnormalitas mayor dan abnormalitas minor (Yulnawati et al. 2013). Data abnormalitas spermatozoa domba Garut dan domba Priangan yang ditampung 1 dan 2 kali seminggu ditampilkan pada Tabel 1.

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ditemukan 13 kelompok abnormalitas baik mayor ataupun minor pada spermatozoa domba Garut dan domba Priangan yang ditampung satu atau dua kali dalam seminggu. Abnormalitas mayor dapat menyebabkan terjadinya

infertilitas, sedangkan abnormalitas minor menyebabkan gangguan kecil pada fertilitas spermatozoa (Chenoweth 2005). Morfologi spermatozoa seekor pejantan dengan abnormalitas spermatozoa mayor disebabkan karena banyak memiliki DNA yang rusak atau disebabkan gagalnya mekanisme apoptosis (Ensico et al. 2011). Pengamatan morfologi biasanya dilakukan dengan membuat preparat dan pewarnaan melalui pemeriksaan terhadap 200-500 sel spermatozoa sehingga dapat diketahui jumlah spermatozoa abnormal. Abnormalitas *pyriform* merupakan salah satu abnormalitas akibat rusaknya kondensasi kromatin selama proses spermiogenesis (Al-Makhzoomi et al. 2008).



Gambar 1. Anatomi spermatozoa (Abbyramiy dan Shanthi 2010)



Gambar 2. Abnormalitas spermatozoa (Cahill 1989)

Tabel 1. Abnormalitas spermatozoa dua jenis domba dengan frekuensi penampungan ejakulat berbeda

Jenis abnormalitas	Jenis domba dan jumlah penampungan			
	Priangan 1x	Priangan 2x	Garut 1x	Garut 2x
<i>Pyriform head</i>	1,05±0,93 ^a	0,88±0,84 ^a	0,42±0,50 ^a	0,57±0,32 ^a
<i>Detached head</i>	2,47±3,09 ^a	3,28±5,20 ^a	0,59±0,38 ^a	1,41±1,51 ^a
<i>Pear shaped</i>	0,62±0,25 ^{ab}	1,28±1,07 ^a	0,38±0,47 ^b	0,73±0,33 ^{ab}
<i>Macrocephalus</i>	0,15±0,17 ^a	0,19±0,33 ^a	0,07±0,15 ^a	0,05±0,08 ^a
<i>Microcephalus</i>	0,88±0,76 ^a	0,59±0,64 ^{ab}	0,09±0,08 ^b	0,21±0,26 ^a
<i>Double heads</i>	0,01±0,02 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
<i>Nuclear vacuolus</i>	1,33±1,51 ^a	0,00±0,00 ^b	0,02±0,04 ^b	0,06±0,06 ^b
<i>Underdeveloped</i>	0,69±1,09 ^a	0,32±0,19 ^a	0,05±0,06 ^a	0,33±0,41 ^a
<i>Round head</i>	0,15±0,07 ^a	0,24±0,16 ^a	0,27±0,18 ^a	0,21±0,11 ^a
<i>Abnormal countour</i>	0,25±0,18 ^a	0,21±0,18 ^a	0,13±0,11 ^a	0,12±0,09 ^a
<i>Abaxial</i>	0,11±0,20 ^a	0,09±0,15 ^a	0,00±0,00 ^a	0,09±0,22 ^a
<i>Defect midpiece</i>	2,47±3,36 ^a	1,04±0,77 ^a	0,98±0,46 ^a	1,41±1,50 ^a
<i>Abnormal decondensation</i>	10,19±8,24 ^a	8,13±7,35 ^a	5,84±0,10 ^a	5,19±3,85 ^a
Total	20,38±19,87	16,26±16,89	8,85±2,52	10,38±8,75

Persentase abnormalitas terbesar yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah *abnormal decondensation*, berkisar antara 5,19-5,84% pada domba Garut dan 8,13-10,19% pada domba Priangan. Sementara itu, Yulnawati et al. (2013) hampir tidak menemukan *abnormal decondensation* pada spermatozoa sapi Simmental (0,00%) ataupun pada spermatozoa sapi Hongarian (0,02%). Sitiayu et al. (2005) mengemukakan bahwa pada spermatozoa mencit, dimana status inti spermatozoa berstatus kondensasi apabila kepala spermatozoa masih dalam bentuk kait, seperti bentuk spermatozoa pada mencit dan belum menggelembung atau membesar. Status ini didapatkan pada saat kepala spermatozoa baru saja memasuki sel telur, tetapi ada keadaan dimana kepala spermatozoa sudah masuk ke dalam sel telur tetapi statusnya tidak berubah menjadi decondensasi. Sementara itu, decondensasi terjadi apabila spermatozoa memfertilisasi sel telur dan masuk ke dalam sitoplasma maka intinya harus berdecondensasi sehingga kromosomnya bisa berpasangan dengan kromosom dari pronukleus betina. Selain itu, prasyarat dari decondensasi adalah ikatan disulfid harus direduksi.

Abnormalitas morfologi selalu ditemukan dalam setiap ejakulasi, namun mempunyai dampak yang berbeda terhadap fertilitas. Beberapa abnormal tertentu dapat menghambat pembuahan, sementara yang lain, seperti kelainan kepala spermatozoa *pear shape* dapat mengganggu perkembangan embrio (Rodriguez-Martinez dan Barth 2007), sehingga frekuensi penampungan dan evaluasi spermatozoa dari seekor pejantan harus dilakukan secara rutin. Spermatozoa yang abnormal tidak mampu membuahi sel telur, meliputi *round head*, *pin head*, *very large head*, *double head*, *abnormal midpiece*, *absent tail*, dan *double tails* (Abbiramy dan Shanthi 2010). Namun demikian, persentase abnormalitas *double heads* pada penelitian ini tidak ditemukan pada spermatozoa domba Garut (0,00%) dengan satu dan dua kali penampungan, sedangkan pada domba Priangan tidak ditemukan (0,00%) dengan dua kali penampungan tapi sedikit ditemukan dengan satu kali penampungan (0,01%). Abnormalitas spermatozoa *double heads* juga hampir tidak ditemukan pada sapi Hongarian (0,02%) dan sapi Simmental (0,00%) yang telah diteliti oleh Yulnawati et al. (2013).

Total abnormalitas yang ditemukan dalam penelitian ini berkisar 8,85-10,38% pada domba Garut, serta 16,26-20,38% pada domba Priangan. Nilai abnormalitas yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan beberapa hasil penelitian, yaitu berkisar antara 1,2-3,17%, seperti yang dihasilkan dari penelitian Herdis et al. (2005) (2,67%); 2,92% (Yulnawati dan Herdis 2009); 1,2% dan tidak mendapatkan perbedaan pada abnormalitas spermatozoa domba setelah pengenceran sampai selama 6 jam pasca-*thawing* dan setelah penambahan serta 3,17 (Herdis 2013). Adapun persentase abnormalitas domba Priangan 8,3-8,7% dan meningkat setelah mengalami proses pendinginan dan pembekuan 21,67% pada media SKT dan 19,05% pada media TKT (Herdiawan 2004). Persentase abnormalitas tersebut masih normal karena menurut Garner dan Hafez (2000) bahwa kisaran abnormalitas spermatozoa domba antara 5-20%, sedangkan menurut Toelihere (1985), abnormalitas spermatozoa yang melampaui angka 14%

menunjukkan adanya gejala infertilitas atau ketidaksuburan seekor pejantan, sedangkan menurut Hafez (1987), jumlah spermatozoa abnormal dalam semen hingga mencapai 20% tidak akan menyebabkan penurunan angka fertilitas. Walau bagaimanapun terdapat banyak variasi dalam suatu proses ejakulasi dari seekor pejantan sehingga dalam penentuan kesuburannya membutuhkan analisis dari beberapa ejakulasi (Rodríguez-Martínez 2013).

Hasil penelitian pada domba ekor tipis yang dilakukan Widyaningrum (2006) menunjukkan bahwa frekuensi penampungan satu, dua, dan tiga kali dalam seminggu tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap warna, bau, konsistensi, pH, motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa domba ekor tipis juga tidak berbeda nyata pada frekuensi penampungan satu, dua, dan tiga kali, baik sebelum pembekuan ataupun setelah pembekuan. Terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada abnormalitas *microcephalus* domba Garut (0,09%) dan domba Priangan (0,88%) pada frekuensi penampungan satu kali. Abnormalitas *nuclear vacuolus* pada domba Priangan (1,33%) berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan domba Garut (0,02%) pada frekuensi penampungan yang sama. Abnormalitas spermatozoa pada semen domba yang diamati, secara morfologi tidak menunjukkan adanya abnormalitas primer, namun lebih terlihat sebagai penilaian abnormalitas sekunder seperti kelainan melipatnya ekor, kepala putus, atau ekornya putus.

Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa tingkat abnormalitas spermatozoa domba Garut lebih kecil dibandingkan dengan tingkat abnormalitas spermatozoa domba Priangan, baik pada frekuensi penampungan satu kali atau dua kali dalam seminggu. Jenis abnormalitas yang paling banyak ditemukan adalah *double decondensation*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbiramy VS, Shanthi V. 2010. Spermatozoa segmentation and morphological parameter analysis based detection of teratozoospermia. *Int J Comp Appl* 3 (7): 19-23.
- Adelman MM, Cahil EM. 1989. *Atlas Sperm Morphology*. ASCP Press, Chicago.
- Afiati F, Herdis, Said S. 2013. *Pembibitan Ternak dengan Inseminasi Buatan*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Aku S, Purwantura B, Toelihere MR. 2007. *Preservasi semen domba Garut (Ovis aries) dalam berbagai konsentrasi bahan pengencer berbasis lesitin nabati*. *Agriplus* 17 (1): 44-51.
- Al-Makhzumi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez H. 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70: 682-691.
- Astuti S. 2012. *Karakteristik Spermatozoa Domba Selama Proses Pembekuan dengan Medium Pengencer yang Ditambahkan Glutatin*. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Barth AD, Oko RJ. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa States University Press, Iowa.
- Chenoweth PJ. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64: 457-468.
- Enciso M, Cisale H, Johnston SD et al. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* 76: 23-32.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B, Hafez ESE (eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott William and Wilkins, Philadelphia.
- Herdiawan I. 2004. Pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba Priangan. *JITV* 9 (2): 98-107.

- Herdis, Rizal M, Boediono A et al. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba Garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J Indon Trop Anim Ageuc* 30 (4) :229-236.
- Herdis, Surachman M, Rizal M et al. 2006. Pengaruh penambahan trehalosa dalam pengencer tris terhadap kualitas semen cair domba garut (*Ovis aries*). *Jurl II Biol Biosfer* 23 (1): 24-30.
- Herdis, Darmawan. 2013. Pengaruh maltose sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam meningkatkan kualitas semen beku guna mendukung keberhasilan teknologi inseminasi buatan. *J Sains Tek Indon* 14 (3): 197-202.
- Kavak A, Lundheim N, Aidnik M, Einarsson S. 2004. Sperm morphology in estonian and toi breed stallions. *Act Vet Scan* 45: 11-18.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL et al. 2003. Quality of Garut ram frozen semen in various glycerol concentrations. *JITV* 7 (3): 194-199.
- Rodriguez-Martinez H, Barth AD. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. In: Juengel JI, Murray JF, Smith MF (eds). *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Rodríguez-Martínez H. 2013. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod* 10 (3): 148-159.
- Schatten H, Constantinescu GM. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. Blackwell Pub, USA.
- Sitiayu DR, Sutarno, Said S. 2005. Pembentukan pronukleus jantan dan betina pada mencit (*Mus musculus*) setelah terjadinya fertilisasi. *Bioteknologi* 2 (2): 35-42.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Widyaningrum R, Ismaya, Keman S. 2006. Pengaruh frekuensi penampungan sperma terhadap kualitas sperma domba ekor tipis yang diencerkan dengan tris-glucose-kuning telur dan dibekukan pada suhu -196°C. *Bul Pet* 30 (2): 69-78.
- Yulnawati, Herdis. 2009. Kualitas semen cair domba Garut pada penambahan sukrosa dalam pengencer Tris kuning telur. *Jur II Ter Vet* 14 (1): 45-49.
- Yulnawati, Afiati F, Rizal M, Arifiantini RI. 2013. *Gambaran Abnormalitas Spermatozoa Sapi Subtropis di Lingkungan Tropis*. Forum Komunikasi dan Seminar Nasional Peternakan. Puslit Bioteknologi LIPI, Cibinong.