

INTEGRITAS SPERMATOZOA KERBAU LUMPUR (*BUBALUS BUBALIS*) PADA BERBAGAI METODE PEMBEKUAN SEMEN

HERDIS¹, B. PURWANTARA², I. SUPRIATNA², dan I. G. PUTU³

¹Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gd. BPPT II Lt. 16, Jalan M.H. Thamrin No. 8, Jakarta 10340, Indonesia

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Taman Kencana I No. 3, Bogor 16151, Indonesia

³Balai Penelitian Ternak, P.O. Box 211, Bogor 16002, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 8 Desember 1998)

ABSTRACT

HERDIS, B. PURWANTARA, I. SUPRIATNA, and I. G. PUTU. 1999. Integrity of swamp buffalo sperm on a variety of semen freezing process. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(1): 7-12.

Sperm of swamp buffalo bulls is easily damaged during freezing process. Acrosomal intact and plasma membrane intact is important factors in fertilization process. This experiment was aimed to study the effect of freezing method on sperm integrity. The result of experiment indicated that the mean of intact acrosomal and the intact plasma membrane for 4 hours of equilibration ($52.24 \pm 3.70\%$ and $54.34 \pm 4.80\%$) was significant higher ($P < 0.05$) than 2 hours of equilibration ($39.00 \pm 3.32\%$ and $43.44 \pm 4.91\%$) but was not significantly difference ($P > 0.05$) with 6 hours of equilibration ($47.92 \pm 4.51\%$ and $51.58 \pm 4.25\%$). There were not significance difference between one step and two step of glycerolization. The best sperm integrity was resulted by freezing method with 4 hours of equilibration and two steps glycerolization.

Key words : Swamp buffalo bulls, sperm integrity, freezing process

ABSTRAK

HERDIS, B. PURWANTARA, I. SUPRIATNA, dan I.G. PUTU. 1999. Integritas spermatozoa kerbau lumpur pada berbagai metode pembekuan semen. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(1): 7-12.

Semen kerbau lumpur mudah rusak selama proses pembekuan. Persentase tudung akrosom utuh dan membran plasma utuh sangat penting dalam proses fertilisasi. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh metode pembekuan semen khususnya lama ekuilibrasi dan metode pemberian gliserol terhadap integritas spermatozoa kerbau lumpur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase tudung akrosom utuh dan membran plasma utuh untuk ekuilibrasi 4 jam ($52,24 \pm 3,70\%$ dan $54,34 \pm 4,80\%$) nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan ekuilibrasi 2 jam ($39,00 \pm 3,32\%$ dan $43,44 \pm 4,91\%$) tetapi tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan ekuilibrasi 6 jam ($47,92 \pm 4,51\%$ dan $51,58 \pm 4,25\%$). Tidak terdapat perbedaan antara pemberian gliserol satu tahap dan dua tahap terhadap integritas spermatozoa kerbau lumpur. Integritas spermatozoa terbaik dicapai pada pemberian gliserol dua tahap dengan ekuilibrasi 4 jam.

Kata kunci : Kerbau lumpur, integritas spermatozoa, metode pembekuan

PENDAHULUAN

Keberhasilan teknologi inseminasi buatan (IB) tidak terlepas dari proses pembekuan semen yang dilakukan. Pelaksanaan IB pada kerbau telah dilakukan sejak tahun 1975, namun tingkat kebuntingan yang dicapai masih relatif rendah dengan angka konsepsi 30% sampai 60% untuk aplikasi lapangan dan 60% untuk aplikasi penelitian (PURWANTARA, 1982; SITUMORANG dan SITEPU, 1991). Menurut RAIZADA *et al.* (1988) rendahnya kualitas semen kerbau setelah pencairan kembali (*thawing*) disebabkan karena sperma kerbau mudah rusak selama proses pembekuan.

Persentase tudung akrosom utuh (TAU) dan membran plasma utuh (MPU) merupakan integritas spermatozoa yang sangat berperan dalam proses fertilisasi untuk keberhasilan IB. Rusaknya tudung

akrosom menyebabkan keluarnya enzim-enzim yang diperlukan sehingga mengurangi kemampuan spermatozoa domba pada proses fertilisasi (UPRETI *et al.*, 1996). Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa selama proses pembekuan dan pencairan kembali terjadi kerusakan TAU dan MPU (KHRISNA dan RAO, 1987).

Pada proses pembekuan semen, masalah yang sering timbul pada umumnya disebabkan oleh pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) terhadap sel yang dibekukan dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es. Salah satu usaha untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan cara mencari metode pembekuan yang tepat terutama cara pemberian gliserol ke dalam medium dan mencari waktu ekuilibrasi yang optimal sehingga hanya sedikit

spermatozoa yang rusak selama proses pembekuan. Gliserol akan mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992). Waktu ekuilibrisasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan pengencer, sehingga pada waktu pembekuan, kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dihindari (TOELIHERE, 1985).

Mengetahui pentingnya integritas spermatozoa untuk proses fertilisasi maka dilakukan penelitian tentang pengaruh metode pembekuan semen terhadap integritas spermatozoa, yakni persentase MPU dan TAU. Penelitian dilakukan pada kerbau lumpur yang merupakan jenis kerbau terbanyak di Indonesia. Adapun tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh metode pembekuan semen terutama metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrisasi terhadap integritas spermatozoa kerbau lumpur.

MATERI DAN METODE

Percobaan dilakukan dengan menggunakan semen yang ditampung dari tiga ekor kerbau lumpur jantan berumur tiga sampai empat tahun. Bobot badan kerbau berkisar antara 300-400 kg. Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang individu yang dilengkapi tempat pakan dan air minum. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput Gajah segar ditambah konsentrat sebanyak tiga kg per ekor per hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Sebelum penelitian hewan percobaan diadaptasikan selama dua bulan dan dilakukan penyiraman setiap hari.

Bahan-bahan yang digunakan adalah semen kerbau, pengencer Tris-kuning telur, gliserol 6,4% dan 12,8%, eosin-negrosin, K-Y jelly, NaCl fisiologis, formalin 1%, penisilin, streptomisin, aquades, alkohol dan nitrogen cair. Larutan Tris terdiri atas 3,049 g Tris (*hidroxymethyl amino-methane*), 1,70 g asam sitrat dan 1,25 g fruktosa yang dilarutkan dalam aquades menjadi 100 ml.

Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan yang bertemperatur 40-42°C. Semen hasil penampungan segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, meliputi: volume, warna, kekentalan, pH, gerakan massa, konsentrasi, morfologi, persentase motilitas, persentase hidup dan integritas spermatozoa. Semen segar yang memenuhi syarat dibekukan minimal mempunyai persentase motilitas spermatozoa 65%, persentase hidup 75%, konsentrasi 700 juta spermatozoa/ml dan persentase spermatozoa abnormal kurang dari 20%.

Semen segar yang diperoleh diencerkan dengan pengencer Tris-kuning telur sesuai dengan metode pembekuan yang dilakukan. Komposisi dasar pengencer Tris-kuning telur untuk 100 ml adalah Tris 80%, kuning telur 20% ditambah streptomisin 1.000µg/ml dan penisilin 1.000 IU/ml (DUTTA *et al.*, 1991).

Pada metode pembekuan semen dengan gliserolisasi satu tahap, semen, pengencer Tris-kuning telur dan gliserol 6,4% dicampur langsung secara perlahan-lahan pada suhu kamar (DUTTA *et al.*, 1991). Campuran kemudian didinginkan sampai suhu 5°C selama 2 jam (DHAMI *et al.*, 1995). Setelah pendinginan, dilakukan pengemasan dengan cara memasukkan semen ke dalam straw (0,25 ml) sehingga diperoleh konsentrasi 80 juta spermatozoa/ml. Waktu ekuilibrisasi dibagi menjadi tiga kelompok, yakni 2 jam, 4 jam dan 6 jam yang dibedakan dari warna straw. Pada metode pembekuan dengan gliserolisasi dua tahap, pengencer dibagi menjadi dua bagian yang sama. Pengencer A : terdiri atas Tris-kuning telur tanpa penambahan gliserol. Pengencer B : Tris-kuning telur ditambah gliserol 12,8%. Pengencer A dicampurkan dengan semen pada suhu kamar, kemudian kedua pengencer didinginkan sampai suhu 5°C selama 2 jam (DHAMI *et al.*, 1995). Setelah mencapai suhu 5°C pengencer A dicampur dengan pengencer B secara perlahan-lahan kemudian dimasukkan ke dalam straw. Waktu ekuilibrisasi dibagi menjadi tiga kelompok, yakni 2 jam, 4 jam dan 6 jam yang dibedakan dari warna straw. Pembekuan pada kedua metode dilakukan dengan cara menguapkan straw pada rak, 8 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit, kemudian straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair (IQBAL dan TOMAR, 1989). Pencairan kembali (*thawing*) dilakukan pada suhu 37°C selama 15 detik (DUTTA *et al.*, 1991).

Untuk mengetahui pengaruh metode pembekuan terhadap integritas spermatozoa (MPU dan persentase TAU) evaluasi dilakukan sebelum pembekuan (*post equilibration*) dan setelah pembekuan (*post thawing*).

Persentase Tudung Akrosom Utuh (% TAU) adalah persentase keutuhan tudung akrosom spermatozoa, dievaluasi dengan melihat kondisi tudung akrosom, menggunakan mikroskop fase kontras pada pembesaran obyektif 100 kali. Semen dicampur dengan NaCl fisiologis ditambah formalin 1% yang berfungsi untuk mematikan dan memfiksasi spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang dievaluasi 200 ekor, evaluasi dilakukan dengan sistem skor 0% sampai 100%.

Persentase Membran Plasma Utuh (% MPU) adalah persentase keutuhan membran plasma, ditandai oleh ekor spermatozoa yang melingkar setelah dimasukkan ke dalam medium hiposmotik 0,032 M NaCl (NaCl 0,179g dalam 100 aquadestilata). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 1 jam. Evaluasi

dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran obyektif 40 kali. Penilaian dilakukan dengan sistem skor 0% sampai 100%.

Penelitian dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2x3. Jumlah ejakulat sebanyak 6 kali dijadikan sebagai ulangan. Faktor pertama adalah metode pemberian gliserol, sedangkan faktor kedua adalah periode lamanya ekuilibrisasi. Untuk menguji perbedaan rata-rata pada perlakuan lama ekuilibrisasi digunakan Uji jarak wilayah berganda Duncan (STEEL dan TORRIE, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar

Hasil evaluasi menunjukkan bahwa kualitas semen segar yang diperoleh, layak untuk dibekukan karena memenuhi syarat yakni mempunyai konsentrasi minimal 700 juta spermatozoa/ml, mempunyai persentase motilitas spermatozoa 65%, persentase hidup 75%, dan persentase spermatozoa abnormal kurang dari 20%. Tabel 1 menunjukkan kualitas semen segar yang akan dilakukan proses pembekuan.

Hasil evaluasi terhadap integritas spermatozoa pada semen segar menunjukkan persentase TAU 79,67±8,07%, sedangkan persentase MPU 79,67±5,35%. TAU yang diperoleh setara dengan persentase TAU pada kerbau Murrah, yaitu 80,38% dan pada sapi yakni 74,05% (SHARMA *et al.*, 1992).

Tabel 1. Kualitas semen segar kerbau lumpur

Sifat-sifat semen	Rata-rata
Volume per ejakulat (ml)	1,88 ± 0,33
Gerakan massa	2,33 ± 0,52
Konsentrasi (spermatozoa ml ⁻¹)	1.180 ± 18,37 x 10 ⁶
pH	6,83 ± 0,05
Motilitas (%)	70,00 ± 3,16
Persentase hidup (%)	78,67 ± 6,06
Abnormalitas (%)	10,00 ± 2,19

Persentase membran plasma utuh

Persentase MPU spermatozoa semen segar yang diperoleh dalam penelitian (79,67%) tidak berbeda dengan MPU setelah ekuilibrisasi pada semua perlakuan, baik pada ekuilibrisasi 2 jam (77,33%), 4 jam (77,00%) dan 6 jam (76,67%). Tabel 2 menunjukkan pengaruh lama ekuilibrisasi dan metode pemberian gliserol yang berbeda terhadap persentase MPU.

Sebelum pembekuan, lama ekuilibrisasi dan metode pemberian gliserol tidak berpengaruh ($P>0,05$) terhadap persentase MPU spermatozoa kerbau lumpur. Metode pemberian gliserol tidak berinteraksi dengan lama ekuilibrisasi terhadap persentase MPU sperma-tozoa.

Tabel 2. Rataan persentase membran plasma utuh spermatozoa kerbau lumpur sebelum pembekuan, setelah pembekuan dan penurunan

Pemberian gliserol	Lama ekuilibrisasi			Rataan
	2 jam	4 jam	6 jam	
Sebelum pembekuan				
1 tahap	77,00 ± 4,51	76,67 ± 5,41	76,50 ± 3,50	76,72 ± 4,28
2 tahap	77,67 ± 4,57	77,33 ± 4,57	76,83 ± 3,62	77,28 ± 4,29
Rataan	77,33 ± 4,55	77,00 ± 5,02	76,67 ± 3,04	
Setelah pembekuan				
1 tahap	40,17 ± 2,41	51,67 ± 3,64	50,17 ± 5,15	47,34 ± 6,42 ^a
2 tahap 2	46,67 ± 4,61	57,00 ± 4,32	53,00 ± 2,38	52,23 ± 5,77 ^b
Rataan	43,44 ± 4,91 ^b	54,34 ± 4,80 ^a	51,58 ± 4,25 ^a	
Penurunan				
Tahap 1	36,67 ± 2,69	25,00 ± 3,56	26,33 ± 4,42	29,38 ± 6,43 ^a
Tahap 2	31,00 ± 5,86	20,33 ± 4,23	23,83 ± 3,24	25,05 ± 6,37 ^b
Rataan	33,84 ± 5,37 ^a	22,67 ± 4,55	25,08 ± 4,25 ^b	

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (DMRT)

Data menunjukkan semakin lama ekuilibrisasi yang dilakukan, persentase MPU yang diperoleh semakin kecil. Keadaan ini diduga terjadi karena semakin lama perlakuan ekuilibrisasi, asam laktat yang tertimbun

semakin banyak sehingga akan merusak struktur membran plasma spermatozoa.

Setelah pembekuan, persentase MPU tertinggi dicapai pada lama ekuilibrisasi 4 jam (54,34%). Hasil ini berbeda sangat nyata ($P<0,01$) dengan lama ekuilibrisasi

2 jam (43,44%), tetapi tidak berbeda dengan lama ekuilibrasi 6 jam (51,58%). Metode pemberian gliserol dua tahap menghasilkan persentase MPU (52,23%) lebih tinggi, berbeda nyata ($P<0,05$) dengan metode pemberian gliserol satu tahap (47,34%).

Pada semua tahap pembekuan, metode pemberian gliserol dua tahap cenderung menghasilkan persentase MPU lebih tinggi dibandingkan metode satu tahap. Hal ini diduga berhubungan dengan sifat toksik dari gliserol dan lamanya kontak antara gliserol dengan spermatozoa. Gliserol berfungsi memberikan perlindungan, tetapi dapat menyebabkan kerusakan pada struktur spermatozoa selama proses pembekuan. Perlindungan efektif diperoleh setelah kontak yang singkat dengan spermatozoa (SALAMON dan MAXWELL, 1995).

Lama ekuilibrasi 4 jam menghasilkan persentase MPU paling tinggi (54,34%). Hasil ini menunjukkan bahwa, pada ekuilibrasi 4 jam dicapai keseimbangan yang optimal antara spermatozoa kerbau lumpur dengan pengencernya. Keunggulan ini didukung oleh data yang menunjukkan bahwa penurunan persentase MPU terendah dicapai pada lama ekuilibrasi 4 jam (22,67%), berbeda nyata ($P<0,05$) dengan ekuilibrasi 2 jam (33,84%). Pada ekuilibrasi 2 jam, keseimbangan antara spermatozoa dan pengencer diduga belum tercapai, sehingga kerusakan membran plasma pada proses pembekuan, lebih banyak dibandingkan ekuilibrasi 4 jam. Penurunan persentase MPU terendah dicapai pada

lama ekuilibrasi 4 jam (22,67%) berbeda sangat nyata ($P<0,01$) dengan ekuilibrasi 2 jam (33,84%) tetapi tidak berbeda dengan ekuilibrasi 6 jam (25,08%). Persentase MPU tertinggi dicapai pada metode pemberian gliserol dua tahap dengan lama ekuilibrasi 4 jam (57%). Keunggulan metode ini didukung oleh data yang menunjukkan penurunan persentase MPU terendah dicapai oleh metode pemberian gliserol dua tahap dengan lama ekuilibrasi 4 jam (20,33%).

Terdapat korelasi yang nyata antara *hypo osmotic swelling* (HOS) *test* dengan keberhasilan IB. Sebagai perbandingan, indikator infertilitas pada manusia ditentukan apabila memiliki keutuhan membran plasma di bawah 50% (REVELL dan MRODE, 1994).

Persentase tudung akrosom utuh

Persentase tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa semen segar kerbau lumpur yang diteliti adalah 79,67%. Hasil ini berbeda sangat nyata ($P<0,01$) dengan persentase TAU setelah pencairan kembali, yakni ekuilibrasi 2 jam (39,00%), 4 jam (52,24%) dan 6 jam (47,92%). Keadaan ini diduga karena selama proses pembekuan dan pencairan kembali terjadi kerusakan tudung akrosom (KRISNA dan RAO, 1987). Tabel 3 menunjukkan pengaruh lama ekuilibrasi dan metode pemberian gliserol terhadap persentase TAU spermatozoa kerbau lumpur.

Tabel 3. Rataan persentase tudung akrosom utuh spermatozoa kerbau lumpur sebelum pembekuan, setelah pembekuan dan penurunan

Pemberian gliserol	Lama ekuilibrasi			Rataan
	2 jam	4 jam	6 jam	
Sebelum pembekuan				
1 tahap	75,67 ± 3,86	75,00 ± 4,00	73,17 ± 4,26	74,61 ± 4,18
2 tahap	75,83 ± 3,29	75,67 ± 3,40	73,50 ± 4,82	75,00 ± 4,04
Rataan	75,75 ± 3,55	75,34 ± 3,73	73,34 ± 4,55	
Setelah pembekuan				
1 tahap	38,50 ± 3,73	49,67 ± 1,83	47,17 ± 4,13	45,11 ± 5,85
2 tahap	39,50 ± 2,75	54,80 ± 3,34	48,67 ± 4,75	47,66 ± 7,31
Rataan	39,00 ± 3,32 ^b	52,24 ± 3,70 ^a	47,92 ± 4,51 ^a	
Penurunan				
1 tahap	37,17 ± 3,24	25,33 ± 4,46	26,00 ± 4,47	29,50 ± 6,71
2 tahap	36,33 ± 3,40	20,83 ± 2,79	24,83 ± 3,53	27,33 ± 7,33
Rataan	36,75 ± 3,34 ^a	23,08 ± 4,35 ^b	25,42 ± 6,86 ^b	

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (DMRT)

Sebelum pembekuan, lama ekuilibrasi dan metode pemberian gliserol tidak berpengaruh terhadap persentase TAU spermatozoa kerbau lumpur. Metode pemberian gliserol tidak berinteraksi dengan lama ekuilibrasi terhadap persentase TAU. Semakin lama ekuilibrasi dilakukan, data menunjukkan semakin rendah persentase TAU yang dihasilkan.

Setelah pembekuan, lama ekuilibrasi berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$) terhadap persentase TAU spermatozoa kerbau lumpur. Metode pemberian gliserol tidak berpengaruh terhadap persentase TAU dan tidak terdapat interaksi antara metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrasi. Hasil serupa dilaporkan pada kerbau

Murrah dan kambing oleh BHOSREKAR *et al.* (1994) dan SINHA *et al.* (1992).

Persentase TAU tertinggi diperoleh pada ekuilibrasi 4 jam (52,24%) berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dengan ekuilibrasi 2 jam (39,00%). Hasil ini menunjukkan bahwa lama ekuilibrasi 4 jam merupakan ekuilibrasi optimal untuk pembekuan spermatozoa kerbau lumpur. Pada ekuilibrasi 6 jam, persentase TAU yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan ekuilibrasi 4 jam. Hal ini terjadi karena pada ekuilibrasi 6 jam, asam laktat yang terbentuk lebih banyak sehingga menurunkan pH dan menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa (LEHNINGER, 1982).

Rusaknya membran plasma akan mempercepat kerusakan tudung akrosom. Peningkatan abnormalitas akrosom mengindikasikan kerusakan membran plasma sel selama pembekuan. Untuk mendapatkan persentase TAU yang baik diperlukan kecepatan pencairan yang tinggi yakni $60^{\circ}\text{C}/15$ detik.

Metode pemberian gliserol tidak berpengaruh terhadap penurunan persentase TAU spermatozoa kerbau lumpur dan tidak terdapat interaksi antara metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrasi. Uji Duncan terhadap lama ekuilibrasi menunjukkan penurunan persentase TAU terendah dicapai pada lama ekuilibrasi 4 jam (23,08%) berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dengan ekuilibrasi 2 jam (36,75%) tapi tidak berbeda dengan ekuilibrasi 6 jam (25,42%).

Pada semua tahap pembekuan, data menunjukkan metode penambahan gliserol dua tahap menghasilkan persentase TAU lebih tinggi dibandingkan dengan satu tahap. Hal ini diduga berhubungan dengan sifat toksik gliserol dan lamanya kontak antara gliserol dengan spermatozoa (SALAMON dan MAXWELL, 1995).

Persentase TAU paling tinggi pada penelitian ini dicapai pada metode pemberian gliserol dua tahap dengan lama ekuilibrasi 4 jam (54,80%). Hasil ini didukung oleh data yang menunjukkan pada metode pemberian gliserol dua tahap dengan lama ekuilibrasi 4 jam dihasilkan penurunan persentase TAU terendah (20,83%) dibandingkan metode lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pada pembekuan semen kerbau lumpur, waktu ekuilibrasi 4 jam menghasilkan integritas spermatozoa lebih baik dibandingkan ekuilibrasi 2 jam dan 6 jam. Integritas spermatozoa paling baik diperoleh dari kombinasi metode pemberian gliserol dua tahap dengan lama ekuilibrasi 4 jam. Untuk mendapatkan integritas spermatozoa kerbau lumpur yang lebih baik, sebaiknya semen diekuilibrasikan selama 4 jam. Perlu penelitian lanjutan untuk mengaplikasikan hasil semen beku kerbau lumpur di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan penghargaan dan terima kasih pada Proyek PPKP BPPT yang telah bersedia membiayai penelitian ini. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Balai Penelitian Ternak Ciawi Bogor yang telah mengizinkan penulis memanfaatkan fasilitas yang ada selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- BHOSREKAR, M. R., S. P. MOKASHI, J. R. PUROKIT, S. B. GOKHALE, and B. R. MANGUNKAR. 1994. Morphological changes in cattle and buffalo sperm on glucerolation and deep freezing. *Indian Vet. J.* 71: 189-190.
- DHAMI, A. J., K. L. SAHNI, G. MOHAN, and V. R. JANI. 1995. Effects of differents variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology.* 46: 109-120.
- DUTTA, G. C., B. C. DEKA, B. N. BORGHAIN, and K. AHMED. 1991. Effect of glycerolization methods on the quality of frozen buffalo semen. *Indian Vet. J.* 68: 1080-1081.
- IQBAL, M. J. and N. S. TOMAR. 1989. Studies on efficiency of certain additives and methods of glycerolization for deep-freezing of zebu and buffalo bull semen. *Indian Vet. J.* 66: 237-242.
- KRISHNA, M. K. and A. R. RAO. 1987. Acrosomal morphology in fresh and freeze-thawed buffalo sperm. *Indian Vet. J.* 64: 248-249.
- LEHNINGER, A. L. 1982. *Principles of Biochemistry.* Worth Publisher. Inc., California.
- PURWANTARA, B. 1982. Penampilan Reproduksi dan Hasil-hasil Inseminasi Buatan pada Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) di Kabupaten Brebes Jawa Tengah. Skripsi Dokter Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- RAIZADA, B. C., A. SATOR, and M. O. PANDEY. 1988. A comparative study of freezing buffalo semen in two dilutors. Proceeding of II world Buffalo Congress. New Delhi.
- REVELL, S. G. and R. A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 1995. Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 85-99.
- SHARMA, M.L., G. MOHAN, and K.L. SAHNI. 1992. A study on acrosomal damage on cryopresevation of crossbred bull semen. *Indian Vet. J.* 69: 962-964.
- SINHA, S., B.C. DEKA, M.K. TAMULU, and B.N. BORGHAIN. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in Tris extender on quality of frozen goat semen. *Indian Vet. J.* 69: 1107-1110.

- SITUMORANG, B. and P. SITEPU. 1991. Comparative performance, semen quality and draught capacity of Indonesia swamp buffalo and its crosses. ACTAR Proceeding, 34: 102.
- STEEL, R. G. D. and J. H. TORRIE. 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill, Inc., Philadelphia.
- SUPRIATNA, I. dan PASARIBU. 1992. *Invitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHERE, M.R. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa. Bandung.
- UPRETI, G.C., S.R. PAYNE, D.M. DUGANZICH, J.E. OLIVER, and J.F. SMITH. 1996. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 41:27-36.