

Pengaruh Jenis, Konsentrasi Krioprotektan dan Metode *Thawing* terhadap Kualitas Semen Beku Ayam Arab

SOFJAN ISKANDAR, RUFKA MARDALESTARI, RESMI HERNAWATI, ENOK MARDIAH dan ENDANG WAHYU

Balai Penelitian Ternak Ciawi, PO. Box 221 Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi 4 Oktober 2005)

ABSTRACT

ISKANDAR, S., R. MARDALESTARI, R. HERNAWATI, E. MARDIAH dan E. WAHYU. 2006. The effect of kinds and concentration of cryoprotectant and *thawing* methods on frozen semen of Arab chicken. *JITV* 11(1): 34-38.

The success of freezing chicken semen is the hope for preserving Indonesian native chickens. Semen from twenty Arab roosters were collected using massage technique once in a week. Cryoprotectant DMA (dimethyl acetamide) or DMF (dimethyl formaldeide) of 7 or 9% and thawing A at temperature of 30°C for 30 seconds or in B at 5°C for 5 minutes. The volume of fresh semen was 0.3 ± 0.072 ml/ejaculate, white colour, rather thick to thick, with 2200 ± 372 millions sperms/ml and pH 6.95 ± 0.32 , 4+/3+ mass movement, 80% motility, $84 \pm 4.48\%$ and abnormality of $14.75 \pm 1.28\%$. There were not statistically significant ($P > 0.05$) effect of interaction of treatments (kinds and concentrations of cryoprotectant, and *thawing* methods) on motility and live-sperms. Sperm motility preserved with DMA (34.69%) significantly higher than with DMF (29.84%). Sperm motility was also significantly higher (34.53%) when preserved with 7% cryoprotectant than with 9% (30%). Thawing-A significantly gave higher motility (35.31%) than thawing-B did (29.22%). Live-sperms of semen preserved with DMA (46.75%) was significantly higher than with DMF (41.72%). Cryoprotectant concentration of 7% gave higher live-sperms (46.98%) than of 9% did (41.48%). Thawing-A left live-sperms of 47.14%, which was significantly higher than thawing-B did (41.30%).

Key Words: Frozen Semen, Arab Rooster, Cryoprotectants, Thawing Methods

ABSTRAK

ISKANDAR, S., R. MARDALESTARI, R. HERNAWATI, E. MARDIAH dan E. WAHYU. 2006. Pengaruh jenis, konsentrasi krioprotektan dan metode *thawing* terhadap kualitas semen beku ayam Arab. *JITV* 11(1): 34-38.

Proses pembekuan sperma yang sering dihadapi adalah *cold shock* dan kerusakan sel akibat terbentuknya kristal es. Sebanyak 20 ekor ayam Arab jantan dewasa dipergunakan sebagai sumber semen. Krioprotektan yang dipakai DMA (dimetil asetatamida) atau DMF (dimetil formaldeida) dengan konsentrasi 7 atau 9% dan dua metode *thawing* yaitu A pada suhu 30°C selama 30 detik dan B pada suhu 5°C selama 5 menit. Kualitas semen segar rata-rata per ejakulat per ekor mempunyai volume $0,3 \pm 0,072$ ml, berwarna putih, konsistensi agak kental ke kental, konsentrasi spermatozoa 2200 ± 372 juta/ml, pH $6,95 \pm 0,32$, gerakan massa 4+/3+, motilitas 80%, spermatozoa hidup $84 \pm 4,48\%$ dan abnormalitas $14,75 \pm 1,28\%$. Pengaruh interaksi faktor perlakuan jenis dan konsentrasi krioprotektan serta metode *thawing* tidak nyata ($P > 0,05$) mempengaruhi kualitas semen. Motilitas spermatozoa yang dibekukan dengan DMA (34,69%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi daripada yang dibekukan dengan DMF (29,84%); sementara itu yang dibekukan dengan konsentrasi krioprotektan 7% (34,53%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi daripada yang dibekukan dengan konsentrasi krioprotektan 9% (30,00%). Motilitas spermatozoa yang dicairkan dengan metode *thawing* A nyata lebih tinggi (35,31%) daripada yang dicairkan dengan metode *thawing* B (29,22%). Spermatozoa hidup rata-rata dari semen yang dibekukan dengan DMA (46,75%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi daripada yang dibekukan dengan DMF (41,72%); sementara yang dibekukan pada konsentrasi krioprotektan 7% (46,98%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dari yang dibekukan pada konsentrasi krioprotektan 9% (41,48%). Sementara itu, semen yang dicairkan dengan metode *thawing* A menyisakan sperma hidup 47,14% yang nyata lebih tinggi dari yang dicairkan dengan metode *thawing* B (41,30%).

Kata Kunci: Semen Beku, Ayam Arab, Krioprotektan, Metode *Thawing*

PENDAHULUAN

Pembekuan semen merupakan salah satu cara melestarikan plasma nutfah. Namun dalam proses pembekuan yang sering dihadapi adalah *cold shock* dan kerusakan sel akibat terbentuknya kristal es. Berbeda dengan spesies lain, unggas, khususnya *Galiformis*, mempunyai karakter fisiologi unik yang dapat mempengaruhi preservasi semen. Kepala spermatozoa

unggas berbentuk silindrik dan tidak begitu panjang dibandingkan dengan ekornya, sekitar $0,5 \mu\text{m}$ (THURSTON dan HESS, 1987). Untuk mengatasi *cold shock* dan terbentuknya kristal es, maka dalam proses pembekuan semen ditambahkan zat pelindung yang biasa disebut sebagai krioprotektan yang dapat mencegah terbentuknya kristal es dan menstabilkan membran plasma spermatozoa selama proses pembekuan (LEIBO, 1992). Volume sitoplasma yang

rendah menyebabkan rendahnya penyebaran krioprotektan di dalam kepala spermatozoa. Keadaan tersebut besar kemungkinan menyebabkan spermatozoa unggas tidak begitu tahan pada saat proses pembekuan yang diperburuk lagi dengan ekor spermatozoa yang cukup panjang, antara 90–100 μm . Panjang ekor spermatozoa unggas delapan kali panjang dari kepalanya (THURSTON dan HESS, 1987). Sementara untuk spermatozoa sapi, hanya 5 kali lebih panjang dari ekornya (SALISBURY dan VANDEMARK, 1961)

Upaya kriopreservasi semen ayam di Indonesia belum banyak dilaporkan, sementara pada sapi, domba, dan hewan ruminansia lain serta entog dan itik sudah dilakukan (SETIOKO *et al.*, 2000). Krioprotektan yang umum digunakan pada semen ayam di negara maju adalah DMA (dimetil asetamida), DMF (dimetil formamida), DMSO (dimetil sulfoksida), etilen glikol, propilen glikol dan gliserol (HAMMERSTEDT dan GRAHAM, 1992; SURAI dan WISHART, 1996). Gliserol banyak digunakan sebagai krioprotektan karena kemampuannya memproteksi sangat baik, namun cara kerjanya bersifat kontraseptif secara *in vivo* saat berlangsung inseminasi (HAMMERSTEDT dan GRAHAM, 1992). GAZALI (2001) menyarankan krioprotektan yang cocok digunakan untuk pembekuan semen ayam adalah DMA dan DMF. Penambahan krioprotektan DMA pada konsentrasi 7% dan metode *thawing* air es menghasilkan motilitas 35,13% (GAZALI, 2001), sementara pemberian krioprotektan DMF 6% menghasilkan motilitas 40%, pada semen angsa tanpa dijelaskan metode *thawing* yang digunakan (LUKASZEWICZ, 2002).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kualitas semen ayam Arab (sebagai model untuk preservasi semen ayam lokal), yang dibekukan setelah diberi krioprotektan DMA atau DMF dan di-*thawing* pada suhu yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Sebanyak 20 ekor ayam Arab jantan dewasa berumur antara 1–2 tahun dipelihara dalam kandang individu. Ransum mengandung protein kasar 15% dengan energi 2850 kkal/kg, yang terdiri dari campuran bahan pakan utama jagung, bungkil kedelai, tepung ikan dan dedak. Ransum dan air untuk minum yang berasal dari sumur bor diberikan *ad lib*. Pencegahan kesehatan seperti imunisasi terhadap ND, dan snot diberikan sesuai dengan aturan yang dianjurkan dan tertera pada kemasan. Kandang individu ditempatkan dalam bangunan kandang berdekatan dengan ayam betina, sebagai pengarah. Koleksi semen dilakukan satu minggu satu kali dengan satu kali ejakulasi pada setiap ekor tanpa dipuasakan terlebih dahulu. Koleksi semen dilakukan dengan cara urut, kemudian ditampung dalam tabung *eppendorf* 1,5 ml, untuk

dievaluasi volume dan kualitas sebelum dicampurkan menjadi satu pool untuk diproses pembekuan selanjutnya.

Pembekuan semen dilakukan berdasarkan prosedur yang dianjurkan BLANCO *et al.* (2000) dan SETIOKO *et al.* (2002). Setelah dilakukan evaluasi pada individual semen dalam setiap tabung penampung, semen-semen yang kualitasnya baik kemudian dijadikan satu dalam tabung reaksi steril. Larutan pengencer semen tersusun dari campuran kuning telur 1,5 ml, glukosa 0,57 g, antibiotika penstrep 0,1 ml dan krioprotektan DMA (dimetil asetamida), atau DMF (dimetil formalamida), dengan konsentrasi 7 atau 9%. Kemudian pada setiap botol larutan pengencer ditambahkan air steril sebanyak 7,8 ml, sehingga volume pengencer mencapai 10 ml. Pengenceran kemudian dilakukan dengan mencampurkan larutan pengencer secukupnya untuk mendapatkan konsentrasi spermatozoa 100 juta/0,25 ml (satu *straw*). Porsi volume larutan pengencer ditentukan oleh konsentrasi spermatozoa yang diperoleh setiap pemerahan. Kualitas semen encer kemudian dievaluasi untuk motilitas, daya hidup, dan abnormalitasnya.

Semen yang diencerkan dengan larutan perlakuan, yang terdiri dari jenis krioprotektan (DMA vs DMF) dan konsentrasi (7 vs 9%), dimasukkan ke dalam *straw* (volume 0,25 ml/*straw*) dan ujung *straw* ditutup dengan serbuk PVC (poli fenil klorida). Selanjutnya *straw* yang sudah diisi dengan semen ditempatkan dalam lemari pendingin untuk proses ekuilibrisasi, pada suhu 5°C selama 60 menit. Kemudian evaluasi dilakukan untuk motilitas dan daya hidup spermatozoa dari masing-masing *straw* per perlakuan secara acak.

Straw yang sudah diekuilibrisasi kemudian ditempatkan pada sebuah rak kawat, yang ditempatkan 5 cm di atas permukaan nitrogen cair untuk didinginkan dengan uap nitrogen cair pada suhu –110°C selama 4 menit sebelum dibenamkan ke dalam nitrogen cair pada suhu –196°C untuk selanjutnya disimpan beku. Semen beku disimpan dalam nitrogen cair selama satu minggu sebelum dilakukan evaluasi untuk motilitas dan daya hidup. *Thawing* dilakukan dengan dua metode yaitu *thawing* cepat (A) selama 30 detik pada suhu 35°C dan *thawing* lambat (B) selama 5 menit pada suhu 5°C.

Pelaksanaan proses mulai dari pemerahan, evaluasi, pembekuan dan *thawing* dilakukan 8 kali, satu kali dalam satu minggu. Data setelah pengenceran dan ekuilibrisasi dianalisa dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 2 (2 jenis krioprotektan x 2 konsentrasi krioprotektan). Data setelah *thawing* dianalisa dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 2 x 2 (2 jenis krioprotektan x 2 konsentrasi krioprotektan x 2 perlakuan *thawing*). Sementara itu, frekuensi proses evaluasi dijadikan sebagai ulangan (8 ulangan). Model matematis (STEEL dan TORIE, 1993) yang dipakai untuk menganalisis data

kinerja sperma setelah pengenceran dan ekuilibrasi adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

keterangan:

- Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan jenis dan konsentrasi krioprotektan dan interaksinya
- μ = Nilai rata-rata umum
- α_i = Pengaruh perlakuan jenis krioprotektan
- β_j = Perlakuan konsentrasi krioprotektan
- (αβ)_{ij} = Pengaruh interaksi jenis dan konsentrasi krioprotektan
- ε_{ijk} = Galat

Adapun model matematis yang dipakai untuk menganalisis kinerja sperma setelah perlakuan *thawing* adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

keterangan:

- Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan jenis dan konsentrasi krioprotektan dan interaksinya
- μ = nilai rata-rata umum
- α_i = Pengaruh perlakuan jenis krioprotektan,
- β_j = Perlakuan konsentrasi krioprotektan
- γ_k = Perlakuan *thawing*
- (αβ)_{ij} = Pengaruh interaksi jenis dan konsentrasi krioprotektan
- (αγ)_{ik} = Pengaruh interaksi jenis krioprotektan dan metode *thawing*
- (βγ)_{jk} = Pengaruh interaksi konsentrasi krioprotektan dan metoda *thawing*
- (αβγ)_{ijk} = Pengaruh interaksi jenis dan konsentrasi krioprotektan dan metode *thawing*
- ε_{ijkl} = Galat

Pengujian selanjutnya dilakukan terhadap nilai rata-rata perlakuan pada tingkat P<0,05 (STEEL dan TORIE, 1993). Pengolahan statistik dilakukan dengan menggunakan program MSUSTAT (LUND, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil evaluasi makroskopis dan mikroskopis yang dilakukan pada semen segar (Tabel 1) menunjukkan bahwa secara umum, semen segar yang diperoleh layak untuk dibekukan. Volume semen per ejakulasi 0,30 ml ternyata lebih banyak dibandingkan dengan yang dilaporkan ISNAINI (2000) pada ayam Arab, yang hanya mencapai 0,24 ml atau pada ayam kampung 0,27 ml (ABDILLAH, 1996). Warna dan konsistensi semen yang putih, kental ke agak kental terlihat lebih baik dibandingkan dengan hasil pada kedua laporan di atas. Derajat keasaman pH yang hanya mencapai 6,95 ternyata lebih rendah dibanding dengan yang dilaporkan sekitar 7,3 (ABDILLAH, 1996) dan 7,4 (ISNAINI, 2000).

Tabel 1. Kualitas semen segar ayam Arab

Peubah	Rata-rata (± standar deviasi)
Volume (ml/ejakulasi)	0,30 ± 0,072
Warna	Putih
Konsistensi	Agak kental → kental
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	2200 ±372
pH (derajat keasaman)	6,95 ± 0,32
Gerakan massa	(++++/+++)
Motilitas (%)	80,00
Persentase spermatozoa hidup (%)	84 ± 4,48
Abnormalitas spermatozoa (%)	14,75 ± 1,28

Gerakan massa mencerminkan gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka semen ini mempunyai kualitas yang semakin baik (semakin tebal dan pergerakannya semakin cepat). Tingkat motilitas 80%, masih dapat dinilai baik sebagaimana dilaporkan GARNER dan HAFEZ (2000) yakni berkisar antara 60–80%. Abnormalitas yang dilihat dari banyaknya spermatozoa tidak normal seperti kepala patah, kepala rusak, kepala berkait, kepala pecah, ekor melingkar, ekor patah dan ekor putus, yang mencapai 14,75% dapat dikatakan cukup kritis. Semen segar unggas pada umumnya yang memenuhi syarat berada pada tingkat abnormalitas kurang dari 15%. Abnormalitas yang relatif tinggi ini, besar kemungkinan disebabkan oleh teknik koleksi yang kurang sempurna, misalnya pemijitan kloaka yang kadang-kadang tidak disadari terlalu kuat, sehingga semen terkontaminasi cairan kuning feces dan atau darah, yang kadang-kadang tidak tampak dengan jelas. Oleh karena itu suatu prosedur koleksi semen yang hati-hati perlu dilakukan, misalnya dengan memuasakan ayam jago 12 jam sebelum dilakukan koleksi, kemudian dengan penerangan yang cukup sehingga kondisi semen yang terkontaminasi dapat terlihat dengan jelas.

Kualitas spermatozoa setelah pengenceran dan ekuilibrasi disajikan dalam Tabel 2. Setelah diencerkan dengan media yang mengandung krioprotektan, hasilnya menunjukkan bahwa jenis dan tingkat konsentrasi krioprotektan menurunkan motilitas sampai tingkat 71,25% dan daya hidup sampai tingkat 79,25%, dari tingkat motilitas 80% dan daya hidup 84% semen segar. Namun baik motilitas maupun daya hidup spermatozoa yang dibandingkan dengan di antara perlakuan, secara statistik tidak nyata berbeda (P>0,05).

Tabel 2. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam Arab setelah pengenceran dan ekuilibrasi

Perlakuan	Setelah pengenceran		Setelah ekuilibrasi	
	Motilitas (%)	Daya hidup (%)	Motilitas (%)	Daya hidup (%)
Krioprotektan (P)				
DMA (dimetil asetamida)	73,75 ^a	81,34 ^a	67,50 ^a	78,06 ^a
DMF (dimetil formalimida)	72,50 ^a	79,31 ^a	62,50 ^b	75,56 ^a
Galat	8,34	4,37	6,75	4,23
Konsentrasi krioprotektan (K)				
7%	75,00 ^a	82,00 ^a	66,88 ^a	77,88 ^a
9%	71,25 ^a	79,25 ^a	63,13 ^a	75,75 ^a
Galat	8,34	4,37	6,75	4,23
Interaksi (PxK)	ns	Ns	Ns	ns

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom dan kelompok perlakuan sama, menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Kualitas semen setelah disimpan dalam nitrogen cair, disajikan pada Tabel 3. Motilitas setelah beku-*thawing* untuk semen yang diberi krioprotektan DMA nyata (P<0,05) lebih tinggi (34,69%) daripada semen yang diberi krioprotektan DMF (29,84%). Demikian pula dengan pengaruh konsentrasi krioprotektan 7% masih menunjukkan motilitas yang lebih tinggi (35,31%) dari pengaruh konsentrasi yang 9% (30,00%). Hasil yang ditunjukkan pada ayam Arab ini, ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan SETIOKO *et al.* (2002) yang hanya mencapai 23,76% pada itik, namun lebih rendah dari entog (34,76%), pada lama ekuilibrasi yang sama selama 60 menit. Perbedaan ini tentunya disebabkan oleh perbedaan spesies, bahkan strain (BUSS, 1993).

Thawing cepat memberikan tingkat motilitas yang lebih tinggi (35,31%) dari *thawing* lambat (29,22%). Indikasi ini juga disampaikan oleh TSELUTIN *et al.* (1999), yang melaporkan bahwa fertilitas yang dihasilkan dari *thawing* cepat lebih baik dibandingkan dengan *thawing* lambat. Respon pada pola daya hidup menunjukkan pola seperti pada respon motilitas, meskipun nilainya relatif lebih tinggi dari nilai yang ditunjukkan pada tingkat motilitas. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan teknik pengukuran.

Evaluasi kualitas semen sebelum dilakukan inseminasi, merupakan ukuran kualitas yang sebenarnya, dan dapat memberikan gambaran tingkat fertilitas yang akan dicapai. Namun demikian banyak faktor yang mempengaruhi tingkat fertilitas sperma beku-*thawing*, diantaranya adalah jenis krioprotektan (DONOGHUE dan WISHART, 2000), tingkat sensitifitas terhadap proses beku-*thawing* disamping fungsi sistem transportasi dan penyimpanan dalam saluran reproduksi betina (BAKS *et al.*, 1994).

Tabel 3. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam Arab setelah dibekukan dengan menggunakan krioprotektan DMA atau DMF dan teknik *thawing*

Perlakuan	Motilitas (%)	Daya hidup (%)
Krioprotektan (P)		
DMA (dimetil asetamida)	34,69 ^a	46,75 ^a
DMF (dimetil formalimida)	29,84 ^b	41,72 ^b
Galat	7,14	6,23
Konsentrasi krioprotektan (K)		
7%	34,53 ^a	46,98 ^a
9%	30,00 ^b	41,48 ^b
Galat	7,14	6,23
<i>Thawing</i> (T)		
Cepat (35°C/30 detik)	35,31 ^a	47,17 ^a
Lambat (5°C/5 menit)	29,22 ^b	41,30 ^b
Galat	7,14	6,23
Interaksi		
PxK	ns	ns
PxT	ns	ns
KxT	ns	ns
PxKxT	ns	ns

Nilai dengan tanda superskrip beda pada kolom dan kelompok perlakuan sama, menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

KESIMPULAN

Kualitas spermatozoa mulai dari segar, setelah pengenceran, setelah ekuilibrisasi dan setelah beku *thawing* mengalami penurunan, namun penurunan ini masih dalam rentang kualitas normal spermatozoa ayam pada umumnya. Kualitas semen ayam Arab pada percobaan ini ditunjukkan dengan volume per ejakulasi sebesar 0,30 ml/ekor dan konsentrasi rata-rata 2200 juta spermatozoa per ml semen. Krioprotektan DMA maupun DMF masih memberikan proteksi pada spermatozoa ayam Arab pasca beku-*thawing*. Sementara itu krioprotektan DMA lebih baik dari DMF dan dengan konsentrasi 7% lebih baik dari 9%. *Thawing* cepat (30 detik dalam suhu 35°C) lebih baik daripada *thawing* lambat (5 menit dalam suhu 5°C).

DAFTAR PUSTAKA

- ABDILLAH. 1996. Pengaruh Beberapa Pengencer Semen, Lama penyimpanan Semen dan Waktu Inseminasi terhadap Fertilitas Spermatozoa Ayam Buras. Thesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. hlm. 7-13.
- BAKS, M.R., G.J. WISHART and J.P. BRILLARD. 1994. Oviduct sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5: 117-143.
- BLANCO, J.M., G. GEE, D.E. WILDT and A.M. DONOGHUE. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Bio. Reprod.* 63: 1164-1171.
- BUSS, E.G. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. *Poult. Sci.* 72: 944-954.
- DONOGHUE, A.M. and G.J. WISHART. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213-232.
- GARNER, D.L. and E.S.E. HAFEZ. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: *Reproduction in Farm Animal*, 7th Edition. E.S.E. HAFEZ (Ed.). Lea and Febiger, Philadelphia. p. 1930.
- GAZALI, M. 2001. Kriopreservasi Semen Entog Dalam Upaya Produksi Itik Serati Menggunakan Teknologi Inseminasi Buatan. Thesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. hlm. 12-20.
- HAMMERSTEDT, R. and J.K. GRAHAM. 1992. Cryopreservation of poultry semen: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26-38.
- ISNAINI, N. 2000. Kualitas semen ayam Arab dalam pengencer NaCl fisiologis dan Ringers pada suhu kamar. *J. Habitat* 11: 233-237.
- LEIBO, S.P. 1992. A one step method for direct non surgical transfer of frozen thawed bovine embryo. *Theriogenology* 21: 767-787.
- LUKASZEWICZ, E. 2002. An effective method for freezing white Italian Gander semen. *Theriogenology* 57: 227-235.
- LUND, R.E. 1983. MSUSTAT, An interactive Statistical Analysis Package. Montana State University, Bozeman, USA.
- SALISBURY, G.W. and N.L. VANDEMARK. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Freeman, San Fransisco.
- SETIOKO, A.R., P. SITUMORANG dan E. TRIWULANNINGSIH. 2000. Pengaruh diluent, krioprotektan dan waktu ekuilibrisasi serta temperatur pra-pembekuan terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa itik dan entog. Kumpulan Hasil Penelitian. Balai Penelitian Ternak. hlm. 157-163.
- SETIOKO, A.R., P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2002. Pengaruh krioprotektan dan waktu ekuilibrisasi terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa itik dan entog. *JITV*: 237-243.
- STEEL, R.G.D. dan J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. hlm. 455-470.
- SURAI, P.F. and G.J. WISHART. 1996. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World Poult. Sci.* 52: 27-43.
- TSELUTIN, K., F. SEIGEURIN and E. BLESBOIS. 1999. Comparison of cryoprotectant and method of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci.* 78: 586-590.
- THURSTON, R.J. and B.L. HESS. 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. *Scanning Microse* 1: 1829-1838.