

Kualitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Penambahan Raffinosa sebagai Krioprotektan Ekstraseluler

YULNAWATI¹, HERDIS², H. MAHESHWARI³ dan M. RIZAL⁴

¹Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, 16911

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT)
Jl. MH. Thamrin kav. 8, Jakarta Pusat

³Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor, 16680

⁴Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura
Jl. Ir. M. Putuhena Kampus Pokka Ambon

(Diterima dewan redaksi 15 Januari 2008)

ABSTRACT

YULNAWATI, HERDIS, H. MAHESHWARI and M. RIZAL. 2008. The quality of spotted buffalo epididymal sperm with addition of raffinose as external cryoprotectant. *JITV* 13(1): 30-34.

The aims of this research was to obtain the quality of Spotted buffalo epididymal sperm in different kind of extender in the three stages of cryopreservation (after dilution, post equilibration and post thawing). Spermatozoa was collected with combination of slicing and pressure method into the epididymal tissue in Andromed[®] extender. Soon after diluted and equilibrated, epididymal spermatozoa was cryopreserved in liquid nitrogen (-196°C). The result showed that the percentage of motility after thawing in Andromed[®] + raffinose 0.4% ($47.0 \pm 2.4\%$), was significantly different ($P < 0.05$) from that of control ($41.0 \pm 2.0\%$), but there was no significantly different ($P > 0.05$) from that of Andromed[®] + raffinose 0.2% ($46.0 \pm 2.0\%$). The percentage of live sperm after thawing in control ($52.2 \pm 2.5\%$), was the lowest and significantly different ($P < 0.05$) from that of Andromed[®] + raffinose 0.2% ($59.2 \pm 2.6\%$) and Andromed[®] + raffinose 0.4% ($58.8 \pm 3.1\%$). Moreover, the percentage of membrane integrity after thawing in control, Andromed[®] + raffinose 0.2% and Andromed[®] + raffinose 0.4% was $68.0 \pm 1.1\%$; $67.2 \pm 1.6\%$ and $67.6 \pm 1.2\%$, respectively. There was no significantly different ($P > 0.05$) in the percentage of membrane integrity from all treatments. In conclusion, the addition of 0.2 and 0.4% raffinose into Andromed[®] extender could improve the percentage of motility and viability of post thawing spotted buffalo epididymal spermatozoa.

Key Words: Epididymal Sperm, Cryopreservation, Raffinose, Spotted Buffalo

ABSTRAK

YULNAWATI, HERDIS, H. MAHESHWARI dan M. RIZAL. 2008. Kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan raffinosa sebagai krioprotektan ekstraseluler. *JITV* 13(1): 30-34.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang dalam beberapa kombinasi bahan pengencer pada tiga tahap proses pembekuan (setelah pengenceran, ekuilibrasi dan *thawing*). Spermatozoa dikoleksi dengan kombinasi metode *slicing* dan penekanan pada jaringan epididimis menggunakan medium pengencer Andromed[®]. Selanjutnya spermatozoa epididimis yang telah diencerkan, diekuilibrasi dan dibekukan serta disimpan dalam nitrogen cair (-196°C). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan Andromed[®] + raffinosa 0,4% setelah *thawing*, persentase motilitas yang dihasilkan adalah sebesar $47,0 \pm 2,4\%$, berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol ($41,0 \pm 2,0\%$), namun tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan Andromed[®] + raffinosa 0,2% ($46,0 \pm 2,0\%$). Persentase hidup spermatozoa setelah *thawing* pada perlakuan kontrol diperoleh hasil sebesar $52,2 \pm 2,5\%$, paling rendah dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan Andromed[®] + raffinosa 0,2% ($59,2 \pm 2,6\%$), serta Andromed[®] + raffinosa 0,4% ($58,8 \pm 3,1\%$). Persentase MPU pasca *thawing* dalam bahan pengencer kontrol, Andromed[®] + raffinosa 0,2% dan Andromed[®] + raffinosa 0,4% berturut-turut sebesar $68,0 \pm 1,1\%$; $67,2 \pm 1,6\%$ dan $67,6 \pm 1,2\%$, tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) dari ketiga bahan pengencer tersebut. Dapat disimpulkan bahwa penambahan raffinosa dengan konsentrasi 0,2 dan 0,4% ke dalam medium pengencer Andromed[®] dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pasca *thawing*.

Kata Kunci: Sperma Epididimis, Pembekuan, Raffinosa, Kerbau Belang

PENDAHULUAN

Kerbau belang (*Bubalus bubalis*) merupakan salah satu jenis ternak *exotic* dengan populasi terbanyak

hidup di Tana Toraja, Sulawesi Selatan. Kerbau ini memiliki keunikan dari segi penampilan fisik yang relatif lebih besar daripada jenis kerbau lain dan memiliki nilai ekonomis tinggi karena digunakan

sebagai persembahan pada berbagai upacara adat masyarakat Toraja. Harga seekor kerbau belang dengan tipe belang terbaik dapat mencapai nilai ratusan juta rupiah. Keadaan ini menyebabkan sistem pemeliharaan kerbau belang oleh masyarakat Toraja menjadi sangat istimewa dan mendapat perhatian khusus dari pemilik. Namun sistem pemeliharaan seperti ini dapat menjadi ancaman bagi kelestarian kerbau belang di masa datang karena kerbau belang jantan yang bernilai tinggi tersebut tidak diperkenankan untuk melakukan aktivitas reproduksi baik secara alami maupun dengan bantuan manusia. Disamping itu, masyarakat Toraja memiliki kepercayaan bahwa kerbau belang tidak dapat hidup di luar Tana Toraja sebagai habitat aslinya. Hal ini menjadi masalah, mengingat kebutuhan terhadap kerbau belang yang tinggi setiap tahun tanpa ada upaya perkembangbiakan untuk mempertahankan populasinya.

Kesulitan akan upaya perkembangbiakan kerbau belang ini dapat diatasi dengan pendekatan dan aplikasi teknologi reproduksi. Setiap pasangan testis dan epididimis dari kerbau belang kualitas baik yang dipotong sebagai hewan persembahan merupakan sumber material genetik berharga yang dapat digunakan untuk melestarikan kerbau jenis ini. Seperti diketahui bahwa epididimis hewan jantan adalah sumber material genetik yang dapat disimpan dalam jangka waktu tak terbatas (AXNER *et al.*, 1998; SANKAI *et al.*, 2001; TSUTSUI *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2004; NAZLIE 2004; RIZAL *et al.*, 2004; YULNAWATI dan SETIADI 2005). Hal tersebut dikarenakan pada bagian epididimis, terutama cauda, merupakan sumber spermatozoa potensial yang memiliki kemampuan membuahi seperti halnya spermatozoa yang berasal dari ejakulasi (HAFEZ dan HAFEZ 2000). Selanjutnya spermatozoa epididimis tersebut dapat disimpan, baik dalam bentuk cair maupun beku, sampai digunakan lebih lanjut untuk tujuan inseminasi buatan (IB), *in vitro embryo production* (IVEP) maupun *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) untuk memperoleh keturunan yang membawa sifat belang dari pejantan.

Kombinasi bahan pengencer yang tepat adalah salah satu strategi dalam upaya penyimpanan spermatozoa epididimis kerbau belang dalam bentuk beku untuk kurun waktu yang lama. Penelitian mengenai jenis bahan pengencer yang sesuai dengan kondisi fisiologis spermatozoa asal cauda epididimis sangat perlu dilakukan agar penyimpanan material genetik berharga tersebut dapat diupayakan secara maksimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang disimpan menggunakan medium Andromed[®] dan kombinasi raffinosa sebagai krioprotektan ekstraseluler pada tiap tahap proses pembekuan (setelah pengenceran, ekuilibrisasi dan *thawing* / pencairan kembali).

MATERI DAN METODE

Epididimis beserta testis dari seekor kerbau belang yang dipotong pada saat upacara pemakaman keluarga dikoleksi di desa Pangli, Kecamatan Rante Pao, Tana Toraja. Epididimis berasal dari satu individu yang sama agar dapat menjaga homogenitas (keseragaman) kualitas spermatozoa yang digunakan. Epididimis dipisahkan dari testis dan dibilas dengan larutan NaCl fisiologis (0,9%). Selanjutnya spermatozoa dari bagian cauda epididimis dikoleksi dengan kombinasi teknik *slicing* / pembilasan dan penekanan pada setiap jaringan cauda (RIZAL *et al.*, 2004) menggunakan larutan Andromed[®] sebagai medium pengencer. Spermatozoa segar hasil koleksi dievaluasi kualitasnya meliputi persentase motilitas, persentase spermatozoa hidup, konsentrasi, persentase abnormalitas dan persentase membran plasma utuh (MPU). Spermatozoa hasil koleksi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk dibuang dan sedimen yang mengandung spermatozoa diencerkan kembali dengan medium pengencer Andromed[®]. Jumlah pengencer yang digunakan disesuaikan berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi yang telah dilakukan sebelumnya.

Spermatozoa epididimis diencerkan dengan medium pengencer dasar komersial Andromed[®] yang telah mengandung gliserol sebagai krioprotektan intraseluler. Sebagai kontrol, digunakan Andromed[®] yang diencerkan dengan aquabidestilata dengan perbandingan 1 : 4. Sementara itu, sebagai perlakuan dilakukan penambahan raffinosa yang berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler dengan dosis 0,2 dan 0,4% ke dalam medium pengencer Andromed[®] seperti pada kontrol.

Spermatozoa epididimis yang telah diencerkan dikemas di dalam *straw* mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 200 juta sperma motil per *straw* dan kemudian diekuilibrisasi di dalam lemari es bersuhu 5°C selama 3 jam. Pembekuan spermatozoa epididimis diawali dengan meletakkan *straw* yang telah diekuilibrisasi 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit. Selanjutnya *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu -196°C) dan disimpan dalam kontainer. Setelah disimpan, masing-masing sampel spermatozoa epididimis beku dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing* dilakukan dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

Peubah kualitas spermatozoa epididimis yang diamati adalah: persentase motilitas, persentase sperma hidup, dan persentase MPU masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrisasi, dan *thawing*.

Persentase motilitas progresif spermatozoa dihitung secara subjektif pada sepuluh lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Sementara itu, untuk menghitung persentase hidup menggunakan pewarnaan eosin B. Spermatozoa hidup tidak menyerap warna sehingga akan berwarna putih pada bagian kepala, sedangkan yang mati akan menyerap warna dan ditandai dengan kepala yang berwarna merah (TOELIHERE, 1993). Membran plasma utuh (MPU) ditandai oleh ekor sperma yang melingkar atau menggebu, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit (REVELL dan MRODE, 1994). Sebanyak minimum 200 sperma dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x untuk masing-masing peubah yang dievaluasi.

Ketiga perlakuan diulang sebanyak 5 kali ulangan dan data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap (RAL). Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata konsentrasi spermatozoa epididimis kerbau belang adalah sebesar $1044,5 \times 10^9$ spermatozoa/ml. Nilai ini cukup besar mengingat padatnya populasi spermatozoa di bagian cauda epididimis sebagai tempat penyimpanan spermatozoa sebelum diejakulasikan.

Persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang diperoleh dari penelitian ini (65,0%) lebih tinggi nilainya daripada hasil penelitian HERRICK *et al.* (2004), dan HEROLD *et al.* (2004; 2006) terhadap spermatozoa epididimis kerbau Afrika (*Syncerus caffer*), yakni berturut-turut sebesar $60,0 \pm 3,82\%$; $58,0 \pm 17,0\%$ serta $53,0 \pm 12,51\%$. Perbedaan ini diduga akibat perbedaan jenis kerbau dan kondisi individu masing-masing pejantan yang digunakan dalam penelitian tersebut. Sementara itu, publikasi lainnya mengenai kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang belum pernah dilaporkan sampai saat ini. Persentase hidup spermatozoa epididimis kerbau belang yang diperoleh pada penelitian ini juga berbeda dengan data yang dipublikasikan oleh HERRICK *et al.* (2004) pada kerbau Afrika yakni sebesar $92,75 \pm 2,25\%$. Secara keseluruhan, data spermatozoa epididimis kerbau belang segar terlihat pada Tabel 1. Berdasarkan hasil tersebut, selanjutnya spermatozoa epididimis kerbau belang diproses untuk disimpan dalam bentuk beku.

Persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah pencairan kembali (*thawing*) berturut-

turut dalam media Andromed[®] (kontrol), Andromed[®] + raffinosa 0,2% dan Andromed[®] + raffinosa 0,4% adalah sebesar 41,0%; 46,0% dan 47,0% (Tabel 2). Hasil ini hampir sama dengan yang dilaporkan oleh HEROLD *et al.* (2006) menggunakan spermatozoa epididimis kerbau Afrika yang diekuilibrasikan selama tiga jam dalam media Andromed[®] pada suhu 4°C, yakni sebesar $44 \pm 17\%$. Sementara itu, menurut laporan HEROLD *et al.* (2004), persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau Afrika dalam media pengencer Andromed[®] dengan penambahan 10% plasma semen sapi sebesar $28,1 \pm 17,57\%$ dan dalam media Andromed[®] tanpa penambahan plasma semen sebesar $53,0 \pm 12,51\%$. Hal tersebut membuktikan bahwa Andromed[®] merupakan media pengencer yang dapat mempertahankan persentase motilitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing*.

Tabel 1. Kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang (segar)

Parameter	Hasil
Konsentrasi ($\times 10^9$ sperma/ml)	$1044,5 \pm 43,6$
Motilitas progresif (%)	$65,0 \pm 0,0$
Hidup (%)	$79,3 \pm 1,3$
Abnormalitas (%)	$15,0 \pm 2,2$
Membran Plasma Utuh (MPU; %)	$80,8 \pm 0,4$

Persentase hidup dan membran plasma utuh spermatozoa epididimis kerbau belang yang diperoleh dari penelitian ini secara umum menunjukkan kecenderungan penurunan pada tiap tahap pembekuan. Namun, secara keseluruhan kualitas spermatozoa epididimis *post thawing* dalam ketiga kombinasi bahan pengencer tersebut masih layak digunakan untuk aplikasi teknologi reproduksi bantuan seperti IB, IVEP dan ICSI.

Andromed[®] merupakan media pengencer komersial yang bebas protein hewani (MINITUB 2001), sehingga dapat menghindari kemungkinan penularan penyakit melalui bahan pengencer dari produk asal hewan. Komposisi Andromed[®] sendiri terdiri dari Tris *hydroxy-aminomethane* sebagai *buffer*, gula sebagai sumber energi, gliserol sebagai krioprotektan dan antibiotik untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Andromed[®] sebenarnya lebih diperuntukkan sebagai media pengencer bagi semen beku sapi. Namun demikian, dalam penelitian ini diketahui bahwa Andromed[®] ternyata dapat mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis beku dari kerbau belang seperti halnya sapi sehingga masih layak serta memenuhi kriteria untuk tujuan IB.

Tabel 2. Rataan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pada tiga tahapan proses pembekuan

Perlakuan	Kontrol	Raffinosa 0,2%	Raffinosa 0,4%
Pengenceran			
% M	65,0 ± 0,0 ^a	65,0 ± 0,0 ^a	65,0 ± 0,0 ^a
% H-M	76,0 ± 2,8 ^a	79,3 ± 1,7 ^a	76,0 ± 1,6 ^a
% MPU	78,7 ± 0,5 ^a	79,7 ± 0,5 ^a	81,0 ± 0,0 ^a
Ekuilibrasi			
% M	50,0 ± 0,0 ^a	55,0 ± 4,1 ^a	55,0 ± 4,1 ^a
% H-M	70,3 ± 0,5 ^a	73,0 ± 1,4 ^a	72,3 ± 1,2 ^a
% MPU	72,0 ± 0,8 ^a	73,7 ± 0,5 ^a	73,0 ± 0,8 ^a
Thawing			
% M	41,0 ± 2,0 ^a	46,0 ± 2,0 ^b	47,0 ± 2,4 ^b
% H-M	52,2 ± 2,5 ^a	59,2 ± 2,6 ^b	58,8 ± 3,1 ^b
% MPU	68,0 ± 1,1 ^a	67,2 ± 1,6 ^a	67,6 ± 1,2 ^a

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

Dari hasil penelitian diketahui bahwa kombinasi media Andromed[®] dengan raffinosa sebagai salah satu jenis gula dapat mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang. Raffinosa digunakan untuk melindungi membran sel spermatozoa dari kerusakan selama proses pembekuan berlangsung. Gula merupakan krioprotektan ekstraseluler yang diketahui dapat melindungi bagian luar membran plasma sel spermatozoa karena dapat berasosiasi dengan karbohidrat yang terdapat pada bagian tersebut. Membran plasma sel terdiri dari karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) dan protein (glikoprotein) atau yang disebut dengan selubung sel (glikokaliks) (SUBOWO 1995).

Sifat krioprotektif gula berasal dari ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus hidroksil gula dan bagian kepala polar fosfolipida membran plasma sel, sehingga gula dapat menggantikan posisi air yang dikeluarkan selama proses dehidrasi saat pembekuan berlangsung (AISEN *et al.*, 2002). Oleh karenanya, gula diketahui dapat mengatur fluiditas membran plasma sel sperma. Persentase motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah *thawing* dapat ditingkatkan jika fluiditas membran plasma sel tinggi sebelum pembekuan (GIRAUD *et al.*, 2000).

Pengaruh yang ditimbulkan oleh keberadaan gula sebagai krioprotektan ekstraseluler terlihat jelas pada persentase motilitas dan hidup spermatozoa setelah pencairan kembali (*post thawing*). Hal ini diduga akibat perubahan suhu yang drastis selama proses pembekuan dan pencairan kembali (*thawing*) sehingga menyebabkan terjadinya perubahan tekanan terhadap sel spermatozoa. Sebagai krioprotektan ekstraseluler,

diduga gula dapat memberikan perlindungan terhadap integritas membran plasma pada kondisi tersebut. Disamping itu, gula dari golongan disakarida dan polisakarida juga dapat berguna sebagai substrat sumber energi jika di dalam plasma semen atau bahan pengencer tersedia enzim yang memecahnya menjadi beberapa unit monosakarida.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa medium pengencer Andromed[®] dengan penambahan raffinosa 0,2 dan 0,4% dapat mempertahankan persentase motilitas progresif dan hidup spermatozoa epididimis kerbau belang pasca *thawing*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA BIOTROP 2008 dengan nomor kontrak No. 047.1/PSRP-SP/III/2008. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja, Keluarga dr. Yulius dan Bapak Slamet Sumitro yang telah membantu dalam penyediaan peralatan laboratorium, pengadaan dan pengambilan sampel epididimis kerbau belang.

DAFTAR PUSTAKA

AISEN, E.G., V.H. MEDINA and A. VENTURINO. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram

- frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- AXNER, E., B. SORMHOLST and C. LINDE-FORSBERG. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50: 973-979.
- GIRAUD, M.N., C. MOTTE, D. BOUCHER and G. GRIZARD. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15:2160-2164.
- HAFEZ, E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. Reproduction in farm animals. 7th Edition. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins.
- HEROLD, F.C., J.E. AURICH and D. GERBER. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed[®] and Trilady1[™] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- HEROLD, F.C., K. DE HAAS, B. COLENBRANDER and D. GERBER. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Trilady1[™] or Andromed[®]. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
- HORI, T., M. ICHIKAWA, E. KAWAKAMI and T. TSUTSUI. 2004. Artificial insemination with frozen epididymal sperm beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 37-41.
- HERRICK, J.R., P. BARTELS and R.L. KRISHER. 2004. Postthaw evaluation of in vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovids. *Biol. Reprod.* 71: 948-958.
- MINITUB. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfull und Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- NAZLIE, C. S. 2004. Kajian kualitas spermatozoa kucing asal epididimis dan ductus deferens setelah proses preservasi selama 7 hari pada suhu 4°C. Thesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- RIZAL, M., HERDIS dan A. BOEDIONO. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *J. Anim. Prod.* 6: 30-36.
- SANKAI, T., H. TSUCHIA and N. Ogonuki. 2001. Short term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55: 1759-1768.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- SUBOWO. 1995. *Biologi Sel*. Angkasa, Bandung.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung
- TSUTSUI, T., M. WADA, M. ANZAI and T. HORI. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 397-399.
- YULNAWATI dan M. A. SETIADI. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *J. Med. Vet.* 21: 100-104.