

PENGARUH MALTOSA SEBAGAI KRIOPROTEKTAN EKSTRASELULER DALAM MENINGKATKAN KUALITAS SEMEN BEKU GUNA MENDUKUNG KEBERHASILAN TEKNOLOGI INSEMINASI BUATAN

Herdis, I Wayan Angga Darmawan

Pusat Teknologi Produksi Pertanian Deputi Bidang TAB BPPT

Gd. BPPT II Lt. 16 Jl. M.H. Thamrin no. 8 Jakarta Pusat

E-mail : kangherdis@yahoo.co.id.

Abstract

The research carried out to observe the effect of maltose addition on the quality of frozen semen of garut rams. Semen was collected once a week using artificial vagina from six mature garut rams. Semen was equilibrated at 5°C for four hours, frozen and stored in liquid nitrogen. The thawing was carried out at the temperature 30°C for 30 seconds. The result showed that percentages of viable sperm for addition of maltose 1,2 g / 100 ml extender ($68,50 \pm 0,84\%$) was significantly difference ($P < 0,05$) than control ($54,83 \pm 1,94\%$) and addition of maltose 0,6 g / 100 ml extender ($65,67 \pm 1,03\%$). The percentages of progressive motile sperm and percentages of plasma membrane for addition of maltose 1,2 g / 100 ml extender (53% and 64,67%) were significantly difference ($P < 0,05$) than control (43% and 53,83%) but were not significantly different ($P > 0,05$) from addition of maltose 0,6 g / 100 ml extender (50,83% and 64,67%) respectively. In conclusion, the addition of maltose 1,2 g / 100 ml extender is optimal dose to improve the quality of frozen semen of garut rams.

Kata kunci: maltosa, semen beku, inseminasi buatan

1. PENDAHULUAN

Keberhasilan aplikasi teknologi inseminasi buatan (IB) dipengaruhi oleh empat faktor penting yakni kualitas semen yang diinseminasikan, reproduksi betina, keterampilan inseminator dan waktu pelaksanaan IB yang tepat. Semen merupakan cairan yang mengandung spermatozoa dan plasma semen yang dihasilkan oleh kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap. Pada proses pembekuan semen, masalah yang sering timbul adalah pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) terhadap sel yang dibekukan dan perubahan kondisi intra-seluler akibat pengeluaran air yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es.

Salah satu usaha untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan cara pemberian zat krioprotektan ke dalam medium pengencer semen sehingga hanya sedikit spermatozoa yang rusak selama proses pembekuan. Krioprotektan merupakan suatu zat kimia non elektrolit yang berfungsi mereduksi letal proses kriopreservasi sel baik yang berupa efek larutan maupun pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler sehingga dapat menjaga

viabilitas sel setelah kriopreservasi. Terdapat dua kelompok krioprotektan yaitu : krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler yaitu krioprotektan yang dapat keluar masuk membran sel dan biasanya memiliki ukuran molekul kecil seperti gliserol, dimethylsulfoside (DMSO), ethylene glikol (EG) dan 2 propanediol. Krioprotektan ekstraseluler biasanya mempunyai ukuran molekul besar sehingga tidak dapat menembus membran sel seperti fruktosa, sukrosa, maltosa, protein, lipoprotein, kuning telur, serum darah dan susu.

Maltosa merupakan gula disakarida yang terbentuk dari dua molekul glukosa. Menurut Mathews dkk., (1999) ikatan kimia antara atom karbon nomor 1 dengan gugus hidroksil atom karbon nomor 4 pada molekul glukosa lainnya membentuk α -D-glukopiranosil- β -D-glukopiranosida. Maltosa sebagai gula disakarida diharapkan dapat mempertahankan kualitas dan kuantitas spermatozoa yang diencerkan dalam pengencer semen cair Tris-kuning telur

Domba garut merupakan plasma nutfah domba Indonesia sangat potensial untuk dikembangkan. Domba garut jantan biasa digunakan sebagai domba laga sehingga mempunyai nilai ekonomis 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 dkk, 2006; Rizal dkk, 2003).

Melihat peranan maltosa sebagai krioprotektan ekstraseluler pada proses pembekuan semen serta mengetahui potensi domba garut sebagai plasma nutfah domba Indonesia, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mendapatkan dosis maltosa yang optimal pada proses pembekuan semen domba garut. Hasil penelitian diharapkan bermanfaat dalam membantu mengembangkan populasi dan potensi domba garut sebagai plasma nutfah domba Indonesia melalui aplikasi teknologi inseminasi buatan.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan dan Alat

Penelitian menggunakan enam ekor domba garut jantan unggul sebagai sumber penghasil semen. Domba garut jantan berumur sekitar 4 tahun dengan berat badan sekitar 80 kg. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput segar sekitar 8 kg per ekor per hari, sedangkan konsentrat diberikan sekitar 0,8 kg per ekor per hari.

Bahan-bahan yang digunakan terdiri dari semen domba garut, pengencer semen Tris-kuning telur dengan komposisi pengencer : 2,42 g Tris (*hydroxymethyl*) aminomethan (Merck, Germany, cat. K27219882003), 1,28 g asam sitrat monohidrat (Merck, Germany, cat. K22939944632), 2,16 g D(-) fruktosa (Merck, Germany, cat. K27917123038), gliserol 5%, 100.000 IU penisilin-G (Meiji, Japan, cat. APG 0598 J), 50 mg streptomisin sulfat (Meiji, Japan, cat. SSL 1095 A), akuabidestilata ad 100 ml (Supracointra, Indonesia).

Bahan lain yang digunakan adalah kuning telur ayam ras, NaCl (Merck, Germany, cat. 3.9K19690004) fisiologis, NaCl 3%, larutan hipoosmotik, eosin B (Merck, Germany, cat. 509 K5003834), negrosin (Merck, Germany), KY jelly (Johnson and Johnson, Indonesia), nitrogen cair, alkohol dll.

2.2. Metode

Semen ditampung sekali seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Semen segar yang diperoleh kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan

makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna dan kekentalan. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerakan massa, konsentrasi, morfologi spermatozoa, persentase motilitas, persentase hidup, persentase membran plasma utuh (MPU) dan persentase tudung akrosom utuh (TAU).

Setelah dievaluasi, semen segar yang memenuhi syarat diencerkan sesuai dengan perlakuan yang diberikan yakni :

1. Pengencer Tris kuning telur tanpa penambahan maltosa (M_0).
2. Pengencer Tris kuning telur ditambah maltosa 0,6 g/ 100 ml pengencer ($M_{0,6}$).
3. Pengencer Tris kuning telur ditambah maltosa 1,2 g/ 100 ml pengencer ($M_{1,2}$).

Setelah diencerkan secara merata, sampel dikemas kedalam *straw* yang berukuran 0,25 ml. Proses ekuilibrisasi dilakukan dengan menyimpan *straw* yang berisi semen di dalam lemari es dengan suhu mendekati 5⁰ C selama 4 jam. Pembekuan semen dilakukan dengan menempatkan *straw* pada rak di dalam uap nitrogen cair sekitar 10 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 15 menit. Pencairan kembali (*thawing*) dilakukan dengan memasukan *straw* pada air yang bersuhu 37⁰C selama 30 detik.

Guna mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kualitas semen beku, dilakukan evaluasi pada tahap semen segar, tahap setelah pengenceran, tahap setelah ekuilibrisasi dan tahap setelah pencairan kembali (*thawing*). Parameter yang diukur untuk setiap tahap evaluasi terdiri atas persentase motilitas (%M), dan persentase membran plasma utuh (%MPU).

Persentase motilitas merupakan persentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan. Evaluasi dilakukan dengan cara mengamati spermatozoa pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Angka yang diberikan berkisar antara 0% hingga 100% dengan skala 5%.

Persentase hidup dievaluasi dengan menggunakan pewarnaan eosin. Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang tidak menyerap zat warna, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah. Evaluasi dilakukan pada minimal 200 spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dievaluasi dengan menggunakan metode *hyposmotic swelling test* (HOS Test). Pengujian dilakukan dengan cara mencampur 0,1 ml semen dengan 9,9 ml medium hipoosmotik. Medium hipoosmotik

dibuat dengan melarutkan 0,3 g fruktosa dan 0,7 g Na Citrat ke dalam 100 ml aquabidestilata. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi dalam *waterbath* bersuhu 37°C selama 30 menit (Rodriquez-gil dkk. 1994). Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Penilaian dilakukan dengan sistim skor 0% sampai 100%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar yang diperoleh sangat menentukan apakah semen tersebut layak untuk dilakukan proses pengenceran atau pembekuan. Banyaknya volume semen yang dihasilkan berpengaruh terhadap jumlah dosis semen yang bisa diinseminasikan, sehingga apabila volume yang dihasilkan sedikit maka jumlah dosis yang dihasilkan juga semakin sedikit. Hasil penelitian menunjukkan volume semen domba garut rata-rata sebesar 1,05 ± 0,49 ml. Hasil yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan penelitian Herdis dkk. (2006) yang menyatakan bahwa volume semen domba rata-rata berkisar antara 0,90 ± 0,09 ml. Menurut Qomariyah dkk. (2001) volume semen domba garut per ejakulat sebesar 1,075 ± 0,139 ml. Variasi volume semen yang diperoleh disebabkan karena adanya perbedaan umur, ukuran tubuh, perubahan kesehatan reproduksi dan frekuensi penampungan. Tabel 1 menunjukkan secara lengkap karakteristik semen segar domba garut yang diperoleh pada penelitian.

Tabel 1. Karakteristik semen segar domba garut usia 4 tahun berat badan 80 kg

Karakteristik Semen	Rata - rata
• Volume per ejakulat (ml)	1,05 ± 0,49
• Warna	Krem
• Konsistensi	Kental
• pH	7,05 ± 0,08
• Gerakan Massa	3,00 ± 0,00
• Konsentrasi (10 ⁶ sperma/ml)	5.092 ± 732
• Persentase Motilitas (%)	74,17 ± 2,04
• Persentase Hidup (%)	87,00 ± 1,55
• Persentase Abnormal (%)	3,17 ± 1,60
• Tudung Akrosom Utuh (%)	85,50 ± 1,22
• Membran Plasma Utuh (%)	84,83 ± 0,92

Seperti pada parameter volume semen, jumlah konsentrasi spermatozoa per mililiter menentukan jumlah dosis semen yang

dihasilkan. Konsentrasi digabung dengan volume dan persentase sperma motil menentukan berapa betina yang dapat diinseminasi dengan ejakulat tersebut. Semakin banyak konsentrasi spermatozoa, semakin banyak dosis IB yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi spermatozoa domba garut yang ditampung adalah 5.092 ± 732 x 10⁶ spermatozoa /ml. Menurut Qomariyah dkk. (2001) pada domba garut yang berumur 1 - 1,5 tahun mempunyai konsentrasi sebesar 3.245 ± 34,96 x 10⁶ spermatozoa /ml. Hasil evaluasi pada semen segar menunjukkan presentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba garut yang diperoleh sebesar 74,17% dan 87%. Hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan hasil yang diperoleh Rizal dkk., (2003) yang mendapatkan persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba garut sebesar 76,67% dan 88,33%.

Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian 3,17% termasuk baik karena berada dibawah 20%. Menurut Ax dkk. (2000), abnormalitas spermatozoa lebih dari 15 % tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Hasil evaluasi terhadap integritas spermatozoa pada semen segar domba garut menunjukkan persentase tudung akrosom utuh spermatozoa sebesar 85,50 % sedangkan persentase membran plasma utuh spermatozoa sebesar 84,83 %. Persentase membran plasma utuh yang diperoleh tidak berbeda dibandingkan hasil penelitian Rizal dkk.(2003) sebesar 87,33% sedangkan tudung akrosom utuhnya sebesar 84,50%.

Dilihat dari semua parameter kualitas semen segar yang dievaluasi, diketahui bahwa semen yang diperoleh disimpulkan memiliki kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk dilakukan proses pembekuan.

Motilitas spermatozoa merupakan salah satu ciri utama yang sering dijadikan patokan paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan. Motilitas atau daya gerak spermatozoa biasanya digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Hasil penelitian menunjukkan, evaluasi pada pada tahap setelah pengenceran dan setelah ekuilibrisasi perlakuan penambahan maltosa tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba garut. Pada tahap setelah *thawing*, penelitian menunjukkan rata-rata persentase motilitas tertinggi dicapai pada perlakuan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer (53,00 ± 2,74%) berbeda nyata (P<0,05) dengan perlakuan kontrol (43,00

± 2,74%) namun tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan perlakuan maltosa 0,6 g/100 ml pengencer ($53,00 \pm 2,74\%$). Hasil ini menunjukkan bahwa maltosa sebagai gula

disakarida terbukti berperan dalam memelihara motilitas sel spermatozoa domba garut selama proses pembekuan dan pencairan kembali.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas dan hidup spermatozoa domba garut pada perlakuan penambahan maltosa

Perlakuan	Motilitas dan Hidup Spermatozoa Domba Garut (%)		
	Setelah Pengenceran	Setelah Ekuilibrasi	Setelah thawing
Persentase Motilitas			
Tris KT – Gliserol 5% (Kontrol)	74,17 ± 2,04	65,83 ± 2,04	43,00 ± 2,74 ^a
Tris KT + Maltosa 0,6 g/100 ml	74,17 ± 2,04	66,67 ± 2,58	50,83 ± 3,76 ^b
Tris KT + Maltosa 1,2 g/100 ml	74,17 ± 2,04	66,67 ± 2,58	53,00 ± 2,74 ^b
Persentase Hidup			
Tris KT – Gliserol 5% (Kontrol)	84,33 ± 1,97	77,17 ± 2,79	54,83 ± 1,94 ^a
Tris KT + Maltosa 0,6 g/100 ml	83,50 ± 2,81	78,83 ± 2,14	65,67 ± 1,03 ^b
Tris KT + Maltosa 1,2 g/100 ml	83,00 ± 2,00	77,83 ± 1,17	68,50 ± 0,84 ^c
Persentase MPU			
Tris KT – Gliserol 5% (Kontrol)	83,33 ± 1,75	78,00 ± 1,79	53,83 ± 2,22 ^a
Tris KT + Maltosa 0,6 g/100 ml	82,33 ± 1,21	79,00 ± 2,28	64,67 ± 4,32 ^b
Tris KT + Maltosa 1,2 g/100 ml	82,83 ± 0,98	77,83 ± 2,93	64,67 ± 3,44 ^b

a,b,c,d dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$).

Tingginya persentase motilitas pada perlakuan maltosa dibandingkan kontrol disebabkan karena maltosa dapat berfungsi sebagai sumber energi. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosin triphosphat* (ATP) hasil metabolisme. Menurut Yulnawati dkk. (2010) maltosa sebagai disakarida dapat digunakan sebagai bahan baku untuk menghasilkan energi melalui glikolisis disamping monosakarida (glukosa, fruktosa dan mannos). Sebelum masuk ke dalam proses glikolisis, disakarida harus dihidrolisis dahulu oleh enzim *disakaridase*.

Disamping oleh enzim maltase, maltosa dapat dihidrolisis oleh asam menjadi dua molekul glukosa. Asam yang memecah maltosa dalam pengencer semen diduga adalah asam laktat yang terbentuk sebagai hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa. Menurut Aisen dkk. (2002), metabolisme spermatozoa dapat berlangsung dengan baik dalam larutan pengencer yang mengandung gula yang sudah dipecah.

Sama seperti motilitas, pada parameter persentase hidup, penelitian menunjukkan rata-

rata persentase hidup tertinggi setelah *thawing* dicapai pada perlakuan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer ($68,50 \pm 0,84\%$) berbeda nyata ($P<0,05$) dengan perlakuan kontrol ($54,83 \pm 1,94\%$) dan perlakuan maltosa 0,6 g/100 ml pengencer ($65,67 \pm 1,03\%$). Herdis dkk. (2008) mengungkapkan pemberian Maltosa 0,2 g/100 ml memberikan hasil persentase hidup setelah *thawing* tidak berbeda namun lebih baik dan berbeda nyata dibandingkan kontrol. Rizal dkk. (2003) melaporkan penambahan laktosa sebanyak 60 mM pada pengencer Tris menghasilkan persentase hidup spermatozoa domba garut lebih baik ($56,83\%$) dibandingkan kontrol ($50,50\%$).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa penambahan maltosa pada pengencer Tris-kuning telur dapat mempertahankan persentase hidup spermatozoa domba garut selama proses pembekuan semen. Pada pengencer semen yang ditambahkan gula, pengaruh krioprotektif gula disebabkan karena terbentuknya ikatan hidrogen antara bagian hidroksil gula dan bagian kepala polar fosfolipida membran plasma. Gula tersebut menggantikan posisi

molekul air selama proses dehidrasi berlangsung. Karena gula mampu berasosiasi dengan fosfolipida menyebabkan gula dapat mengatur fluiditas membran plasma sel spermatozoa (Yulnawati dkk.2009)

Rusaknya membran plasma utuh biasanya disertai rusaknya tudung akrosom, sehingga menyebabkan keluarnya enzim-enzim yang diperlukan selama proses fertilisasi. Rusaknya bagian ini menyebabkan kegagalan program inseminasi buatan karena tidak terjadi fertilisasi dan akhirnya tak terjadi kebuntingan.

Hasil penelitian menunjukkan, evaluasi pada tahap setelah pengenceran dan setelah ekuilibrisasi perlakuan penambahan maltosa tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap membran plasma spermatozoa domba garut. Setelah *thawing*, penelitian menunjukkan rata-rata persentase membran plasma utuh pada perlakuan maltosa 1,2 g/ 100 ml pengencer (64,67%) nyata lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan perlakuan kontrol (53,83%) namun tidak berbeda ($P>0,05$) dibandingkan perlakuan maltosa 0,6 g/ 100 ml (64,67%). Hasil ini menunjukkan bahwa maltosa sebagai gula disakarida terbukti berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler yang bekerja melindungi integritas sel spermatozoa selama proses pembekuan dan pencairan kembali semen domba garut.

Nilai integritas spermatozoa setelah *thawing* yang diperoleh pada penelitian lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan Feradis (1999) pada semen beku domba *St. Croix* yakni persentase MPU sebesar 52.30%. Menurut Tambing dkk. (2001) persentase MPU pada semen beku kambing peranakan adalah 38.84%.

Hasil yang diperoleh pada penelitian sejalan dengan pendapat Yildiz dkk. (2000) yang menyimpulkan kombinasi monosakarida dan disakarida dengan konsentrasi yang sesuai, dapat memberikan perlindungan terhadap spermatozoa yang lebih baik dibandingkan penggunaan monosakarida atau disakarida secara tersendiri. Dalam penelitian yang dilakukan monosakarida yang digunakan adalah fruktosa sedangkan disakarida yang digunakan adalah maltosa.

Menurut Leboeuf dkk. (2000) disakarida berperan melindungi spermatozoa pada proses pembekuan semen terutama periode kritis saat pembekuan dan pencairan kembali. Disakarida membuat struktur membran plasma sel spermatozoa menjadi lentur dan mengatur sedemikian rupa proses pengeluaran gliserol sehingga membran sel spermatozoa tidak mengalami tekanan yang terlalu berat pada kedua tahap kritis tersebut (Rizal dkk.2003).

Menurut Viswanath dan Shannon (2000) gula memiliki kemampuan menggantikan molekul air dan membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas.

Dari semua parameter yang dievaluasi, penelitian menunjukkan bahwa perlakuan maltosa menghasilkan kualitas semen beku domba garut lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Maltosa bekerja melindungi membran plasma spermatozoa selama proses pembekuan. Kondisi membran plasma yang baik menyebabkan tudung akrosom lebih terlindungi dan proses metabolisme dapat berjalan dengan lancar sehingga dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa.

4. KESIMPULAN

Dilihat dari kualitas semen beku yang dihasilkan, penelitian menyimpulkan bahwa penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer dalam pengencer semen beku Tris-kuning telur gliserol 5% menghasilkan kualitas semen domba garut tertinggi berbeda nyata ($P<0,05$) dibandingkan kontrol. Keadaan ini menunjukkan bahwa maltosa terbukti berfungsi sebagai krioprotektan eksternal yang berperan dalam melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan semen domba garut.

Guna mendapatkan kualitas semen beku domba garut yang optimal disarankan menambahkan maltosa dengan dosis 1,2 g/100 ml pengencer dalam pengencer semen beku Tris-kuning telur gliserol 5%

DAFTAR PUSTAKA

- Aisen EG, VH Mediana and A Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 57 : 1801-1808.
- Aisen EG, VH Mediana and A Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 57 : 1801-1808.
- Feradis. 1999, Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba *St. Croix*.

Disertasi. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Herdis, M. Surachman, M. Rizal, A. Budiono dan Yulnawati. 2006. Pengaruh Penambahan Trehalosa dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) Jurnal Ilmiah Biologi Biosfera Vol. 23 No. 1. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto. 24 – 30.
- Herdis, M. Surachman, Yulnawati, M. Rizal dan H. Maheshwari. 2008. Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang Pada Penambahan Maltosa dalam Pengencer Andromed. Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis. Vol. 33 No. 2 June 2008. Universitas Diponegoro. Semarang. 101-106.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim. Repro. Sci., 62:113-114.
- Mathews CK, KE Van Holde, Kevin GA. 1999. Biochemistry. 3th Ed. An Imprint of Addison Wesley Longman, San Francisco.
- Qomariyah, Mihardja S, Idi R. 2001. Pengaruh Kombinasi Kuning Telur dengan Air Kelapa Terhadap Daya Tahan Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Domba Priangan Pada Penyimpanan 5°C. Di dalam : Haryanto B, dkk. Prosiding. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 17-18 September 2001. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. pp 172-177.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, .T.L. Yusuf, B. Purwantara, P. Situmorang. 2003. Kriopreservasi Semen Domba Garut dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang berbeda. Media Kedokteran Hewan. 19: 79-83.
- Rodriquez-gil JE, Montserrat A, Rigau T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine sperms. Theriogenology 42 :815-830.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Sutama IK, Situmorang PZ. 2003. Kualitas semen beku kambing saanen pada berbagai jenis pengencer semen. Hayati 10:146-150.
- Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. Anim Reprod Sci 62:23-53.
- Yildiz C, A Kaya, M Aksoy, T Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology. 54 : 579-585.
- Yulnawati, H. Maheshwari, M. Rizal dan Herdis. 2010. Maltosa Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang yang Disimpan dalam Bentuk Cair. Jurnal Veteriner Volume 11 Nomor 2. Universitas Udayana Bali. 126-132.
- Yulnawati, M. Gunawan, Herdis, Hera Maheshwari dan Muhammad Rizal. 2009. Peranan Gula sebagai Krioprotektan Ekstraseluler dalam Mempertahankan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur. Prosiding Seminar Nasional Potensi dan Pengembangan Peternakan Maluku Dalam Mendukung Ketahanan Pangan Nasional. Ambon 2 Maret 2009. Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura Ambon. Hlm.236-250.