

Daya Tahan Spermatozoa Kuda Hasil Sentrifugasi dengan Kadar Plasma Semen yang Berbeda Menggunakan Pengencer Skim

(The Viability of the Stallion Spermatozoa after Centrifugation with Different Level of Seminal Plasma in Skim Milk Extender)

Raden Iis Arifiantini, Tuty Laswardi Yusuf dan B. Purwantara

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga 16680

Abstract

The objective of the research was to evaluate the speed and duration of centrifugation and seminal plasma levels on the viability of stallion spermatozoa. Semen was collected from three stallions twice a week. The collected semen then evaluated macro- and microscopically. Exp I, the semen was diluted 1:1 with skim milk extender and then centrifuged at 2000 and 3000 rpm for 15 and 20 minutes each. The seminal plasma was removed, and the sperm pellet was re-diluted with skim milk extender. The extended semen then divided in two tubes, stored in 5°C and in a room temperature. The semen then was examined every 3 hours for room temperature and 12 hours for 5°C. Exp II, the semen diluted 1:1 with skim milk extender and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The seminal plasma was removed and the pellet was re-diluted with skim milk extender consisted of 0%, 25%, 50% and 75% of the seminal plasma. The extended semen then was stored in 5°C and examined daily. Results showed that speed and duration of centrifugation had no effect on the quality of stallion semen. The liquid semen without seminal plasma showed 47.50% motile sperms and 61.00% life sperms, which were significantly higher ($P < 0.05$) than those with seminal plasma. It was concluded that the speed and duration of centrifugation had no effect on the semen quality and removal of seminal plasma is beneficial for stallion spermatozoa.

Key Words : Centrifugation, stallion semen and seminal plasma

Pendahuluan

Karakteristik semen kuda berbeda dengan semen ternak lainnya. Mempunyai volume ejakulat yang banyak namun dengan konsentrasi spermatozoa yang rendah. Keadaan ini disebabkan oleh karena ejakulasi pada kuda terjadi berulang kali, sehingga semen yang diejakulasikan terdiri atas beberapa fraksi yaitu praspermatzoa, kaya spermatozoa dan pascaspermatzoa. Fraksi praspermatzoa merupakan cairan yang bertindak sebagai pelumas, berasal dari kelenjar bulbouretralis (Koskinen *et al.*, 2002) serta prostat dan ampulla (Morel, 1999) dengan volume sebanyak 10-20 ml, pada fraksi ini umumnya tidak ditemukan spermatozoa. Fraksi kaya spermatozoa mengandung 80-90% spermatozoa dengan volume antara 40-80 mL, cairan ini berasal dari

epididymis dan ampula (Koskinen *et al.*, 2002), yang disertai sekresi dari kelenjar bulbouretralis, prostat dan vesikularis (Morel, 1999). Fraksi pascaspermatzoa disebut juga fraksi jeli. Kandungan spermatozoa pada fraksi ini sedikit sekali, dengan volume berkisar antara 0 hingga 80 ml dan hanya berasal dari sekresi kelenjar vesikularis (Koskinen *et al.*, 2002; Morel, 1999).

Untuk mendapatkan semen dengan jumlah spermatozoa yang banyak, beberapa cara dilakukan diantaranya: (a) penampungan semen menggunakan vagina buatan yang terbuka pada ujungnya (*open ended artificial vagina*), sehingga hanya menampung semen fraksi kaya spermatozoa, (b) koleksi semen dengan vagina buatan, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada semen untuk mendapatkan pellet spermatozoa, atau (c) melakukan penyaringan menggunakan

glass wool shephadex pada semen yang telah diencerkan (Morel, 1999)

Pemisahan plasma semen dari spermatozoa kuda tidak semata-mata untuk mendapatkan spermatozoa dengan konsentrasi yang tinggi agar diperoleh jumlah spermatozoa yang cukup untuk setiap dosis inseminasi, tetapi juga untuk menghindarkan pengaruh negatif dari plasma semen (Mottershead, 1999). Efek negatif ini disebabkan oleh tingginya kandungan natrium chlorida, yang dapat menyebabkan perubahan tekanan osmotik pada saat pendinginan dan pembekuan. Palmer *et al.* (1984) dalam Morel (1999) melaporkan bahwa daya tahan hidup spermatozoa yang mengandung plasma semen 50, 20, 10 dan 0% dari total volume semen cair menunjukkan viabilitas berturut-turut 27,30; 44,20; 50,80; dan 55,90%. Dari angka tersebut terlihat bahwa semakin sedikit kandungan plasma semen dalam semen cair semakin tinggi viabilitasnya. Penelitian yang dilakukan oleh Love *et al.* (2002) mengenai kadar plasma semen dan pengaruh bahan pengencer menunjukkan bahwa kromatin spermatozoa akan lebih terlindungi jika plasma semen dihilangkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji daya tahan hidup spermatozoa kuda menggunakan kecepatan dan lama sentrifugasi dan kadar plasma semen yang berbeda pada pengencer skim yang disimpan pada suhu ruang dan 5°C.

Metode Penelitian

Hewan percobaan

Kuda jantan sebanyak tiga ekor yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari satu ekor generasi empat (G4) Thoroughbred, satu ekor *American pinto*, satu ekor *Swedish warmblood* hasil seleksi dengan kriteria sehat, berumur antara lima sampai delapan tahun, dan

teruji menunjukkan kualitas terbaik dari evaluasi produksi spermatozoa harian, milik Athena stable, Cinere-Depok. Kuda-kuda dikandangkan secara individual diberi pakan berupa konsentrat dan brand masing-masing sebanyak 3 kg dan rumput yang telah dilayukan sebanyak 10 kg, air minum diberikan *ad libitum*.

Pengencer Semen

Pengencer semen yang digunakan adalah pengencer dasar skim yang terdiri dari skim 2,40g dan glukosa 4g modifikasi dari Kenney *et al.* (1975). Susu dilarutkan dengan *milli-Q water* dan dipanaskan pada suhu 92°C selama 10 menit. Setelah dingin disaring dan ditambahkan streptomisin 1 mg dan penicillin 1000 IU ml⁻¹ (pH 6,80 dengan tekanan osmotik 349 mosmol)

Koleksi semen

Semen dikoleksi masing-masing menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa (Jepang) dan dimodifikasi dengan tabung penampung semen tipe Missouri (Nasco, Fort Atkinson, WI) (Gambar 1). Pada mulut botol penampung dipasang kain kassa untuk menyaring gel.



Gambar 1. Vagina buatan tipe Nishikawa yang dikombinasi dengan tabung penampung tipe Missouri

Evaluasi Semen

Semen yang diperoleh masing-masing dievaluasi secara individu terhadap makroskopis : volume (ml), warna, konsistensi dan pH menggunakan *pH special indicator paper* (Merck skala 6,40-10,00), sedangkan secara mikroskopis evaluasi dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa motil (%SM) (Sorenson, 1979); spermatozoa hidup (%SH) (Barth dan Oko, 1989; Sorenson, 1979). Konsentrasi spermatozoa per ml dihitung menggunakan *Neubauer chamber* dengan pengenceran 100 X dalam NaCl 3% (Parish's, 2003) dan morfologi (normalitas) dengan pewarnaan Williams (Anonymous, 2004).

Percobaan I

Semen setelah dievaluasi, masing-masing untuk setiap kuda dibagi menjadi empat tabung diencerkan dengan pengencer skim dengan perbandingan 1:1, selanjutnya disentrifugasi menggunakan sentrifus *portable* (Hettich, EBA 3S, Tuttlingen, Germany) dengan kecepatan 2000 rotation per minute (rpm setara dengan 530 x G-Force [G]) dan 3000 rpm (800 x G) masing-masing selama 15 menit dan 20 menit. Setelah selesai sentrifugasi supernatan dibuang dan *pellet* (spermatozoa) dilarutkan dengan pengencer yang sama dengan konsentrasi $200 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, semen dari masing-masing perlakuan dibagi dua kemudian disimpan pada suhu ruang dan suhu 5°C .

Pengamatan kualitas semen cair dilakukan dengan melihat persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup setiap jam untuk suhu ruang dan setiap 12 jam pada suhu 5°C .

Percobaan II

Semen setelah dievaluasi dari ketiga kuda jantan masing-masing dibagi menjadi lima tabung. Empat tabung pertama diencerkan dengan pengencer skim dengan perbandingan 1:1, dan tabung kelima tidak ditambahkan pengencer.

Kelima tabung disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Setelah selesai sentrifugasi supernatan dibuang dan *pellet* (spermatozoa) dilarutkan dengan pengencer skim ditambah plasma semen dari tabung kelima dengan kandungan plasma semen masing-masing adalah 0, 25, 50, dan 75% dengan konsentrasi $200 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, semen cair selanjutnya disimpan pada suhu 5°C .

Pengamatan kualitas semen cair dilakukan dengan melihat persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup setiap 24 jam.

Analisis Data

Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) pola faktorial 2x2 dengan tiga ulangan pada percobaan I dan RAK satu faktor untuk percobaan II (Walpole, 1995).

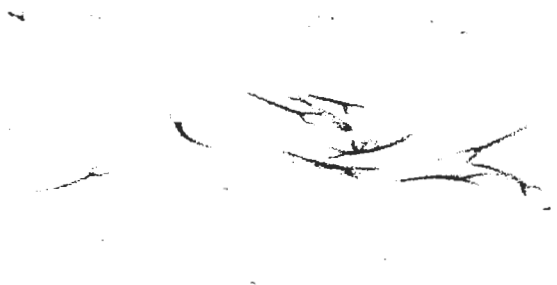
Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Kuda

Untuk percobaan I kualitas semen segar yang didapat adalah volume $40,62 \pm 7,76 \text{ ml}$, pH $6,85 \pm 0,16$; berwarna putih keruh dengan konsistensi encer. Secara mikroskopis spermatozoa motil adalah $61,70 \pm 10,30\%$ dengan spermatozoa hidup $82,50 \pm 5,50\%$. Konsentrasi spermatozoa adalah $279,50 \pm 33,31 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ sedangkan normalitas dari spermatozoa sebanyak $78,63 \pm 8,18\%$. Pada percobaan II, volume semen yang didapat adalah $27,78 \pm 6,18 \text{ ml}$, pH $7,01 \pm 0,11$, berwarna putih keruh dengan konsistensi yang encer. Spermatozoa motil $72,50 \pm 2,70\%$ dengan spermatozoa hidup $80,60 \pm 4,90\%$ dengan normalitas dan konsentrasi spermatozoa masing-masing $71,88 \pm 3,49\%$ dan $219,56 \pm 10,41 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Morfologi spermatozoa kuda berbeda dengan spermatozoa ternak lainnya. Bentuknya lebih langsing dan lebih kecil (Gambar 2).

Volume semen kuda yang dihasilkan dari penelitian ini lebih sedikit dibandingkan pendapat

Garner dan Hafez (1993) yang melaporkan semen kuda dapat menghasilkan volume 60-100 ml. Pada penelitian ini volume tersebut merupakan volume semen tanpa gelatin, sedangkan jika tidak dilakukan penyaringan kemungkinan akan mendapatkan kisaran volume yang hampir sama. Selain volume, pH semen hasil penelitian juga lebih asam terutama pada percobaan I, menurut Garner dan Hafez (1993) pH kuda adalah 7,20-7,80 pH semen dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jarak koleksi semen sebelumnya dan kandungan dari plasma semen yang dihasilkan. Selain volume dan pH semen, hasil evaluasi semen lainnya berada dalam kisaran normal semen seperti konsentrasi normal spermatozoa kuda adalah $150-300 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, spermatozoa motil 40-75% dan normalitas sebesar 60-90% (Garner dan Hafez, 1993).



Gambar 2. Spermatozoa kuda dengan pewarnaan Williams

Percobaan I

Kecepatan sentrifugasi 2000 dan 3000 rpm dengan kecepatan selama 15 dan 20 menit yang digunakan dalam penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan kualitas ($P > 0,05$), baik pada penyimpanan pada suhu ruang ataupun pada suhu 5°C . Ada kecenderungan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit menunjukkan persentase spermatozoa motil yang lebih tinggi dari perlakuan lainnya pada kedua suhu penyimpanan, tetapi karena pengaruh antara individu yang tinggi maka secara statistik angka tersebut tidak berbeda.

Kecepatan dan lama sentrifugasi yang digunakan untuk memisahkan plasma semen kuda

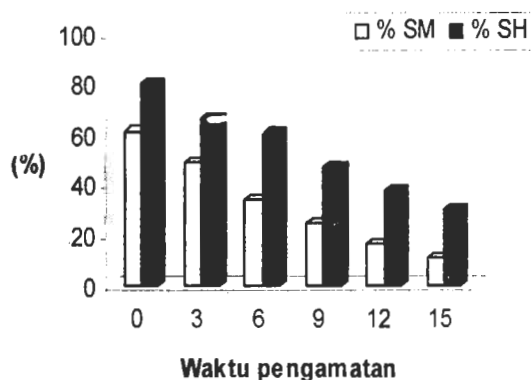
berbeda-beda tergantung pada alat, termasuk ukuran tabung yang digunakan serta dari kebiasaan masing-masing laboratorium. Mulai dari $400 \times G$ selama 15 menit (Cochran *et al.*, 1984; Håård *et al.*, 1991) sampai $1000 \times G$ (Martin *et al.*, 1979; Wöckener *et al.*, 1992). Sebagai contoh Squires *et al.*, (1999) pada *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University*, dengan tabung sentrifus 50 ml menggunakan kecepatan $400 \times G$ selama 12 menit. Kecepatan sentrifugasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antara 2000-3000 rpm atau setara dengan 530-800 $\times G$, masih dalam kisaran kecepatan sentrifugasi yang dilakukan oleh laboratorium-laboratorium untuk pengolahan semen kuda yaitu antara $400 \times G$ sampai $1000 \times G$.

Kualitas semen cair secara sangat nyata ($P < 0,01$) menurun sejalan waktu pengamatan. Pada suhu ruang spermatozoa motil juga menunjukkan persentase penurunan yang cukup tinggi pada 9 jam awal pengamatan yang dilakukan antara pukul 13.00 sampai dengan 19.00 WIB, yaitu turun sebesar 10,00-14,80%, pada saat tersebut suhu di laboratorium berkisar antara $27-29^{\circ}\text{C}$, suhu ini merupakan suhu yang cukup baik dan mendekati suhu optimal spermatozoa untuk bergerak. Penurunan spermatozoa motil yang diamati mulai jam 22.00 turun 8% dan 4-5% pada pukul 1.00 sampai 4.00 pagi, pada saat tersebut suhu ruang di laboratorium berkisar antara $24-25^{\circ}\text{C}$, sehingga kemungkinan pergerakan spermatozoa sedikit menurun sehingga dapat memperpanjang viabilitasnya (Gambar 3).

Parlevliet *et al.* (1992) melaporkan penyimpanan semen cair pada suhu 20°C selama 18 jam menggunakan pengencer skim masih menunjukkan spermatozoa motil yang cukup tinggi yaitu $47,00 \pm 1,80\%$, sedangkan dalam penelitian ini pada pengamatan jam yang sama tetapi suhu penyimpanan $24-29^{\circ}\text{C}$ hanya

menunjukkan motilitas 6,05%, hal ini membuktikan bahwa suhu penyimpanan sangat berperan dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa.

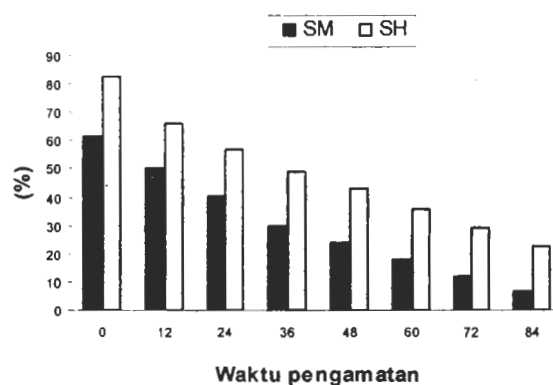
Penyimpanan semen pada suhu 5°C, pada pengamatan 36 jam pertama spermatozoa motil turun antara 9,40 -11,70%, selanjutnya penurunan motilitas terjadi antara 5-6% pada setiap dua belas jam pengamatan (Gambar 4). Hal ini dapat dimengerti, karena awal penyimpanan suhu berubah drastis dari suhu ruang ke suhu 5°C melewati suhu kritis antara 20°C dan 5°C (McKinnon 1999) sehingga spermatozoa mengalami kerusakan seluler akibat kejutan dingin (*cold shock*). Kecilnya penurunan motilitas spermatozoa pada jam-jam pengamatan selanjutnya disebabkan metabolisme spermatozoa terhambat sehingga memperpanjang viabilitasnya. Hal ini sesuai dengan pendapat McKinnon (1999) yang menyatakan bahwa pada penyimpanan suhu 5°C akan menurunkan metabolisme spermatozoa sampai hanya 10% saja, sehingga viabilitasnya dapat dipertahankan.



Gambar 3. Penurunan persentase sperma motil dan sperma hidup pada semen cair kuda menggunakan pengencer skim yang disimpan pada suhu ruang

Percobaan II

Plasma semen mempunyai peranan penting dalam kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom, tetapi beberapa penelitian menunjukkan plasma semen memberikan efek negatif terhadap spermatozoa in vitro (Pickett *et al.*, 1975). Kadar plasma semen dalam semen cair hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh yang sangat nyata dalam mempertahankan kualitas semen cair kuda ($P < 0.01$). Tanpa kandungan plasma semen (0%), pada pengamatan jam ke 24, menunjukkan spermatozoa motil dan spermatozoa hidup masing-masing $41,50 \pm 16,40\%$ dan $61,00 \pm 7,60\%$ lebih tinggi dibandingkan kadar 25% ($20,00 \pm 14,50$; $52,90 \pm 6,40\%$); kadar 50% ($10,00 \pm 8,40$; $51,30 \pm 4,10\%$) ataupun 75% ($4,20 \pm 4,90$; $45,10 \pm 8,00\%$). Dari data tersebut terlihat bahwa semakin tinggi kandungan plasma semen dalam semen cair, semakin rendah kualitasnya (Tabel 1).



Gambar 4. Penurunan persentase sperma motil dan sperma hidup pada semen cair kuda menggunakan pengencer skim yang disimpan pada suhu 5°C

Tabel 1. Persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup semen cair kuda pada pengencer skim dengan kadar plasma semen yang berbeda pada penyimpanan 5°C

Parameter	Waktu pengamatan (jam)	Kadar plasma semen (%)			
		0	25	50	75
Spermatozoa motil (%)	0	72,50 ± 2,70 ^a	72,50 ± 2,70 ^a	72,50 ± 2,70 ^a	72,50 ± 2,70 ^a
	24	47,50 ± 16,40 ^b	20,00 ± 14,50 ^d	10,00 ± 8,40 ^{efg}	4,20 ± 4,90 ^{efgh}
	48	33,30 ± 9,80 ^c	11,70 ± 10,80 ^c	3,30 ± 5,20 ^{efgh}	0,80 ± 2,00 ^{gh}
	72	20,80 ± 9,70 ^d	10,00 ± 8,40 ^{efg}	1,70 ± 2,60 ^{efgh}	0,00 ± 0,00 ^h
	96	10,80 ± 8,00 ^{ef}	2,50 ± 4,20 ^{efgh}	0,00 ± 0,00 ^h	0,00 ± 0,00 ^h
Spermatozoa hidup (%)	0	80,60 ± 4,90 ^a	80,60 ± 4,90 ^a	80,60 ± 4,90 ^a	80,60 ± 4,90 ^a
	24	61,00 ± 7,60 ^b	52,90 ± 6,40 ^{cd}	51,30 ± 4,10 ^{cde}	45,10 ± 8,00 ^{de}
	48	55,40 ± 4,40 ^{bc}	47,50 ± 4,60 ^{def}	44,50 ± 3,70 ^{def}	34,20 ± 3,20 ^f
	72	52,20 ± 60,00 ^{bc}	44,00 ± 5,10 ^{ef}	31,80 ± 9,90 ^f	22,80 ± 1,90 ^{gh}
	96	37,80 ± 7,80 ^{def}	29,90 ± 4,80 ^g	19,30 ± 4,50 ^{gh}	15,70 ± 2,10 ^h

^{a,o,c,d,e,f,g,h} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan ada perbedaan pada P<0,01

Hasil ini hampir sama dengan laporan Palmer *et al.* (1984) dalam Morel (1999) bahwa daya tahan hidup spermatozoa dengan kandungan plasma semen 50; 20; 10 dan 0% dari total volume semen cair menunjukkan viabilitas berturut-turut 27,30; 44,20; 50,80 dan 55,90%. Rendahnya kualitas semen cair kuda yang mengandung plasma semen disebabkan efek negatif akibat tingginya kandungan natrium chlorida, yang dapat menyebabkan perubahan tekanan osmotik pada saat pendinginan dan pembekuan (Mottershead, 1999). Pendapat ini juga didukung oleh Brinsko *et al.* (2000), yang melaporkan bahwa pemisahan plasma semen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa progresif dibandingkan tanpa pemisahan plasma terutama pada penyimpanan semen cair lebih dari 24 jam.

Penelitian yang lebih jauh, jika dilakukan inseminasi menggunakan semen cair atau semen beku tanpa dilakukan pemisahan plasma semen kemungkinan terjadi fertilisasi sangat kecil, hal ini disebabkan tanpa dilakukan pemisahan plasma semen kemampuan untuk melindungi kromatin dari spermatozoa akan berkurang (Love *et al.*, 2002).

Di dalam plasma semen mengandung komponen-komponen yang akan melindungi spermatozoa, sehingga harus disisakan 20% pada saat pembekuan agar mendapatkan kualitas semen beku yang lebih baik. Komponen yang terdapat dalam plasma semen berbeda antar individu. Penambahan 20% plasma semen dari kuda jantan yang dikenal mempunyai kualitas semen beku yang baik, ke dalam semen dari kuda dengan kualitas semen beku yang rendah ternyata dapat meningkatkan kualitasnya. Plasma semen mengandung dua faktor dekapasitasi sehingga dapat mencegah terjadinya kapasitasi dini. Untuk membuktikan hal tersebut diadakan penelitian untuk mengembalikan plasma semen ke dalam semen yang telah disentrifugasi dan telah dibuang plasmanya masing-masing 0, 5, 10, 20, 40 dan 80% dan diinkubasi selama 10 dan 90 menit ternyata penambahan kembali plasma semen sebanyak 5% menunjukkan vital motil dan progresif motil tertinggi dibandingkan penambahan plasma semen yang lain. Setelah diinkubasi selama 90 menit ternyata plasma semen sebanyak 0, 5 dan 20% menunjukkan hasil yang

sama lebih baik dibandingkan persentase yang lain.

Kualitas semen beku kuda yang diinkubasi dengan plasma semen 5 dan 20% menunjukkan total motil dan progresif motil yang sama pada 10 menit setelah *pascathawing*. Setelah 90 menit ternyata plasma semen 5% menunjukkan total motil dan progresif motil yang lebih tinggi dari pada 20%.

Pada penelitian yang telah dilakukan, sebetulnya plasma semen tidak bisa dibuang seluruhnya, karena akan menyentuh *pellet* sperma dan akan tercampur kembali dengan plasma semen. Pada kenyataannya sekitar 5-10% akan tertinggal satu lapis di atas *pellet* sperma. Sehingga daya tahan hidup spermatozoa dalam 0% plasma semen hasil penelitian ini yang terbaik karena masih meninggalkan sebagian kecil dari plasma semen.

Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kecepatan sentrifugasi untuk pemisahan plasma semen dapat dilakukan pada 2000 atau 3000 rpm selama 15 sampai 20 menit tanpa menunjukkan perbedaan kualitas pada semen cair kuda. Kualitas semen cair kuda pada penyimpanan 5°C, lebih baik tanpa kandungan plasma semen dibandingkan dengan plasma semen. Semen cair yang disimpan pada suhu ruang dapat digunakan untuk inseminasi sampai jam ketiga dan pada suhu 5°C sampai jam ke-24 penyimpanan.

Ucapan Terimakasih

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih pada keluarga Winson Mola pemilik Athena *stable* beserta seluruh staf yang telah memberikan bantuan moril dan material dalam mendukung penelitian ini serta kepada Prof. Dr.

Mozes R. Toelihere MSc (Alm) yang selalu memberikan semangat, kepercayaan dan bimbingannya.

Daftar Pustaka

- Anonymous, 2004. *Bahan Kursus Asialink RSH-FKH-IPB*, September 8-22. Bogor.
- Barth, A.D., and R.J. Oko, 1989. *Abnormal Morfology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames. Iowa.
- Brinsko, S.P., E.C. Crockett and E.L. Squires, 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54 (1): 129-136.
- Cochran, J.D., R.P. Aman, D.F. Froman and B.W. Pickett, 1984. Effect of centrifugation, glycerol level and cooling to 5°C. Freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22: 25-38.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez, 1993. Spermatozoa and seminal plasma. *Dalam* : Reproduction in Farm Animals. E.S.E. Hafez (Editor). Lea and Febiger. Philadelphia.
- Håård, M.C., and M.G.H. Håård, 1991. Successful commercial use of frozen stallion semen abroad. *J Reprod. Fertil. Suppl* 44: 647-648.
- Kenny, R.M., R.V. Bergman, W.L. Cooper and G.W. Morse, 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and Preliminary Findings. *Proceeding. Am. Assoc. Equine Practnr* Pp. 327-336.
- Koskinen, E, M. Karlsson, T. Reilas, S. Sankari, A.L. Esela and T. Katila, 2002. Catalase activity and total protein in fractioned stallion seminal plasma. *Theriogenology* 58: 337-340.
- Love, C.C., J.A. Thompson, S.P. Brinsko, S.L. Rigby, T.L. Blanchard and D.D. Varner, 2002. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 58: 221-224.
- Martin, J.C., E. Klug and A.R. Grünzel, 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod Fertil Suppl* 27: 47-51.

- Mottershead, J., 1999. <http://www.Equinereproduction.com/articles/index.htm> (4 September 2004).
- Morel, D.M.C., 1999. *Equine Artificial Insemination*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon.
- Parish's, J., 2003. Website University of Wisconsin Department of Animal Science for his Animal Sciences Reproductive Physiology class http://www.wisc.edu/ansci_repro/ (25 juli 2003).
- Parlevliet, J., L. Malmgren, M. Boyle, A. Wöckener, H. Bader and B. Colenbrander, 1992. Influence of conservation methods on the motility and morphology of stallion semen (An international Project). *Acta Vet. Scand. Suppl* 88: 153-162.
- Pickett, B.W., J.J. Sullivan, W.W. Byers, M.M. Pace and E.E. Remmenga, 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil. Steril* 26: 167-174.
- Sorenson, Jr.A.M., 1979. *Laboratory Manual for Animal Reproduction*. 4th American Press. Boston.
- Squires, E.L., E.C. Crockett, J.K. Graham and J.E. Bruemmer, 1999. Effect of Centrifugation and Cooling Prior to Freezing on Post-thaw Motility of Equine Spermatozoa. *AAEP Proceedings* 9 Vol. 45. Pp. 219-220.
- Walpole, R.E., 1995. *Pengantar Statistika*. 3rd ed. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wöckener, A., L. Malmgren, B. Op den Kamp, M. Boyle, H. Bader and B. Colenbrander 1992. Freezing of stallion semen – Effect on sperm motility and morphology. *Proceedings*. 12th Int Congr Anim Reprod, 1992. The Hague, Vol 4. Pp. 1903-1905.