

## Penambahan kandungan rafinosa pada bahan ekstender tris kuning telur itik terhadap performa semen beku kerbau

### *Addition of raffinose content in tris duck egg yolk extender on performance of buffalo frozen semen*

Tinda Afriyani<sup>2</sup>, Rovina Satriyen<sup>1</sup>, Jaswandi<sup>2</sup>, Elly Roza<sup>1</sup>, Adisti Rastosari<sup>1</sup>, dan Anna Farhana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Livestock Production, Faculty of Animal Science, Andalas University, Padang, 25163 West Sumatera, Indonesia.

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Reproduksi, Faculty of Animal Science, Andalas University, Padang, 25163 West Sumatera, Indonesia

\*Email Koresponden: [tindaafriani@ansci.unand.ac.id](mailto:tindaafriani@ansci.unand.ac.id)

**Abstrak.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kandungan rafinosa pada bahan ekstender tris kuning telur itik terhadap performa semen beku kerbau. Metode penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan dan 4 kali penampungan sebagai kelompok. Kandungan rafinosa diberikan dengan berbagai konsentrasi yaitu perlakuan kontrol (KR 0), 1% (KR 1), 1,5% (KR 1,5) dan 2% (KR 2) rafinosa. Variabel yang di amati meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh (MPU). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata motilitas semen pada perlakuan KR 0 adalah  $20,00 \pm 0,00\%$ , KR 1 sebesar  $17,50 \pm 5,00\%$ , KR 1,5 sebesar  $15,00 \pm 5,77\%$ , dan KR 2 sebesar  $17,50 \pm 5,00\%$ ; rata-rata viabilitas untuk perlakuan KR 0, KR 1, KR 1,5 dan KR 2 masing-masing adalah  $25,10 \pm 1,65\%$ ,  $25,50 \pm 2,27\%$ ,  $22,90 \pm 2,02\%$ , dan  $24,40 \pm 1,70\%$ . Rata-rata persentase abnormalitas untuk perlakuan KR 0, KR 1, KR 1,5 dan KR 2 masing-masing adalah  $16,0 \pm 1,47\%$ ,  $16,10 \pm 1,80\%$ ,  $17,10 \pm 2,66\%$ , dan  $17,30 \pm 1,32\%$ , sedangkan rata-rata persentase membran plasma utuh untuk perlakuan KR 0, KR 1, KR 1,5 dan KR 2 masing-masing adalah  $24,30 \pm 0,87\%$ ,  $24,60 \pm 0,75\%$ ,  $22,60 \pm 1,38\%$ , dan  $23,60 \pm 1,80\%$ . Dapat disimpulkan bahwa penambahan kandungan rafinosa pada pengencer tris kuning telur itik tidak memberikan pengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa kerbau.

**Kata kunci:** Kerbau, Rafinosa, Semen beku, Tris kuning telur itik

**Abstract.** This study aims to determine the effect of adding raffinose content to the duck egg yolk tris extender on the performance of frozen buffalo semen. This research method uses a Randomized Block Design (RAK) with 4 treatments and 4 times the shelter as a group. The raffinose content was given in various concentrations, namely control treatment (KR 0), 1% (KR 1), 1.5% (KR 1.5) and 2% (KR 2) raffinose. Parameters measured included motility, viability, abnormalities and intact plasma membrane (MPU). The results of this study showed that the average motility of cement in the treatment of KR 0 was  $20.00 \pm 0.00\%$ , KR1 was  $17.50 \pm 5.00\%$ , KR 1.5 was  $15.00 \pm 5.77\%$ , and KR 2 of  $17.50 \pm 5.00\%$ ; The mean viability for KR 0, KR 1, KR 1.5 and KR 2 treatments were  $25.10 \pm 1.65\%$ ,  $25.50 \pm 2.27\%$ ,  $22.90 \pm 2.02\%$ , respectively. and  $24.40 \pm 1.70\%$ . The average percentage of abnormalities for the

*treatment of KR 0, KR 1, KR 1.5 and KR 2 were  $16.0\pm1.47\%$ ,  $16.10\pm1.80\%$ ,  $17.10\pm2.66\%$ , respectively. , and  $17.30\pm1.32\%$ , while the average percentage of intact plasma membranes for the treatment of KR 0, KR 1, KR 1.5 and KR 2 were  $24.30\pm0.87\%$ ,  $24.60$ , respectively.  $\pm0.75\%$ ,  $22.60\pm1.38\%$ , and  $23.60\pm1.80\%$ . It can be concluded that the addition of raffinose content in the tris diluent of duck egg yolk did not have a significant effect ( $P>0.05$ ) on motility, viability, abnormalities and intact plasma membranes of buffalo spermatozoa.*

**Keywords:** Buffalo, Rafinosa, Frozen semen, Tris duck egg yolk.

## PENDAHULUAN

Kerbau (*Bubalus bubalis*) merupakan hewan memamah biak yang termasuk jenis ternak ruminansia besar yang mempunyai potensi tinggi dalam penyediaan daging, tenaga kerja, dan susu. Kerbau dibedakan menjadi beberapa jenis yaitu kerbau rawa dan kerbau sungai, dan kebanyakan yang berkembang di Indonesia yaitu kerbau rawa/lumpur (Afriani et al., 2018). Ternak kerbau memiliki keunggulan dibandingkan ternak sapi, yaitu ternak kerbau dapat memanfaatkan hijauan yang berkualitas rendah, tahan terhadap musim kering yang panjang, kapasitasnya sebagai tenaga kerja merupakan potensi bagi petani peternak kerbau dan dagingnya memiliki nilai gizi yang tidak kalah dibandingkan sapi (Ihsan, 2011; Ismaya, 2014). Ternak kerbau merupakan pejantan penghasil sperma yang digunakan untuk pelaksanaan IB pada tingkat peternak. Namun kendala dilapangan ditemukan bahwa jumlah semen yang dihasilkan saat penampungan relative sedikit, sehingga perlu dilakukan pengenceran semen dengan menggunakan ekstender yang mampu meningkatkan kualitas sperma pada proses pengenceran sampai pada pembekuan (Ismaya, 2014)

Saat ini banyak beredar berbagai medium ekstender dilapangan dan peternak seperti tris kuning telur itik. Kandungan kuning telur mampu dijadikan sebagai media untuk pengenceran semen kerbau, hanya keterbatasan sampai pada tahap pembekuan semen yang sering terjadi di kalangan peternak. Mengatasi hal tersebut, upaya yang dapat dilakukan dengan penambahan kandungan karbohidrat kedalam medium ekstender yang digunakan. Penggunaan beberapa karbohidrat dalam pengencer seperti disakarida (trehalosa), trisakarida (rafinosa), dan oligosakarida lainnya pada pengencer semen mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (Arifiantini et al., 2009). Rafinosa merupakan trisakarida terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan yaitu galaktosa-glukosa-fruktosa. Rafinosa dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu lama karena penambahan rafinosa didalam pengencer dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak.

Rafinosa mempunyai peranan penting pada penyesuaian pengaruh tekanan osmotik, sumber energi sakarida dengan bobot molekul yang tinggi baik untuk gerakan spermatozoa serta menstabilkan kualitas spermatozoa terhadap pengaruh buruk penyimpanan dan pembekuan dalam nitrogen (N<sub>2</sub>) cair (Fernandez et al., 2007; Munzir et al., 2016). Rafinosa merupakan jenis karbohidrat yang baik digunakan untuk pembekuan semen kambing, karena berfungsi sebagai sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler, dengan adanya perbaikan kualitas semen beku dengan penambahan berbagai jenis gula seperti rafinosa di dalam pengencer menjadi indikator bahwa gula-gula tersebut efektif melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses kriopreservasi semen. Penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, atau sukrosa dengan taraf 0,4% di dalam pengencer tris efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Menurut Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari (2008), bahwa penambahan dosis rafinosa sebesar 2,5% dalam pengencer tris kuning telur berfungsi sebagai sumber energi dan krioprotektan (Rizal et al., 2006)

## MATERI DAN METODE

Koleksi Semen. Materi penelitian ini menggunakan satu ekor terbak kerbau jantan berumur 10 tahun dengan berat badan 750-850 kg. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan dan 4 ulangan. Penampungan semen dilakukan menggunakan vagina buatan. Evaluasi semen segar.

Semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk mengetahui kualitasnya untuk diproses lebih lanjut. Evaluasi makroskopik meliputi; volume, warna, bau, pH, warna dan konsistensi. Sedangkan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas, hidup, kelainan dan integritas membran spermatozoa (Bearden et al., 2004; Hafez, 2008). Gliserolisasi. Sebanyak 6% dihabiskan untuk pengencer kemudian ditambahkan blanko sebanyak 6% gliserol ke dalam pengencer dan dicampur dengan semen. *Filling and sealing* adalah proses pengisian semen yang telah di encerkan dan dijepit dengan menggunakan mesin filling dan sealing otomatis. Sebelum dimasukkan ke dalam cairan N<sub>2</sub>, semen diletakkan di atas permukaan cairan N<sub>2</sub> dengan suhu ±-110 °C selama 9 menit (Swelum et al., 2011; Sukmawati et al., 2014). Setelah semen dapat dibekukan dengan menempatkan semen dalam cairan N<sub>2</sub> dan disimpan dalam wadah (Deichsela et al., 2016). Evaluasi semen pasca pencairan. Motilitas, sperma hidup, kelainan dan integritas membran spermatozoa dinilai setiap hari pasca thawing (Akeel et al., 2012; Kusumawati et al., 2016). Semen beku di simpan dalam container yang telah berisi N<sub>2</sub> cair yang dapat bertahan lama, dengan ketersediaan n<sub>2</sub> cair yang selalu terpenuhi. Pengamatan semen beku dilakukan 2 kali dalam seminggu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Evaluasi Semen Segar Ternak Kerbau

Berikut Tabel hasil penelitian mengenai kualitas semen segar pada ternak Kerbau

Tabel 1. Kualitas semen segar ternak kerbau

Sifat	Hasil pengamatan pada ejakulasi ke-				Rata-rata ± SD
	1	2	3	4	
Volume	5,5ml	3,5ml	1,5ml	3ml	3,38±1,65
Bau	Khas sperma	Khas sperma	Khas sperma	Khas sperma	Khas sperma
Warna	Krem	Krem	Krem	Krem	Krem
Konsistensi	Kental	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang – Kental
Ph	6	7	7	7	6,8±0,5
Motilitas (%)	70	60	60	60	63±5
Gerakan massa	+++	++	++	++	++ sampai +++
Konsentrasi (jt/ml)	1400	1000	1200	1200	1200 163,30

Hasil evaluasi volume semen segar di atas menunjukkan hasil ejakulasi yang ke-1 yaitu 5,5 ml, ejakulasi yang ke-2 yaitu 3,5 ml, ejakulasi yang ke-3 yaitu 1,5 ml, dan ejakulasi yang ke-4 yaitu 3 ml. Rata-rata volume semen segar kerbau yang diperoleh yaitu 3,38±1,65 ml dengan kisaran 1,5 ml sampai 5,5 ml. Bau semen kerbau pada hasil penelitian ini adalah bau amis khas normal, kondisi ini menunjukkan bahwa semen dalam keadaan normal (Ismaya, 2014). Warna semen segar kerbau yang diperoleh pada penelitian ini adalah krem. Hasil menunjukkan semen dalam keadaan normal dan memenuhi syarat kelayakan untuk dilakukan pengolahan selanjutnya menjadi semen beku. Konsistensi semen segar kerbau pada ejakulasi ke-1 bersifat kental, sedangkan ejakulasi ke-2, ke-3 dan ke-4 bersifat sedang (Aboagla et al., 2004).

Sementara pH (Derajat Keasaman) semen diukur dengan kertas lakmus. Evaluasi semen segar kerbau menunjukkan bahwa pH pada ejakulasi ke-1 didapatkan hasil pH 6, sedangkan pada ejakulasi ke-2, ke-3, dan ke-4 didapatkan hasil pH 7. Motilitas Spermatozoa didapatkan hasil 70%, sedangkan pada ejakulasi ke-2, ke-3, dan ke-4 didapatkan hasil 60%. Konsentrasi semen segar kerbau pada penelitian ini menunjukkan hasil pada ejakulasi ke-1 didapatkan hasil  $1400 \times 10^6$ , pada ejakulasi-2 didapatkan hasil  $1000 \times 10^6$  dan pada ejakulasi ke-3 dan ejakulasi-4 didapatkan hasil  $1200 \times 10^6$ . Gerakan Massa Spermatozoa pada ejakulasi ke-1 mendapatkan hasil (+++), sedangkan ejakulasi ke-2, ke-3 dan ke-4 yang mendapatkan hasil (++) (Alghamdia et al., 2010).

### Evaluasi Semen Beku Kerbau Pasca Thawing

Data persentase motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa kerbau pasca *thawing* pada pengencer tris kuning teluritik dengan penambahan rafinosa, dimana konsentrasi rafinosa yang digunakan berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan Presentase Motilitas, Presentase Hidup, Abnormalitas, dan MPU spermatozoa semen Kerbau pasca *Thawing*

Variabel yang diukur	Perlakuan Rafinosa			
	KR 0	KR 1	KR 1,5	KR 2
Motilitas Spermatozoa(%)	20,00±0,00	17,50 ± 5,00	15,00 ± 5,77	17,50 ± 5,00
Presentase Hidup Spermatozoa(%)	25,10 ± 1,65	25,50 ± 2,27	22,90 ± 2,02	24,40 ± 1,70
Abnormalitas spermatozoa (%)	16,00 ± 1,47	16,10 ± 1,80	17,10 ± 2,66	17,30 ± 1,32
MPU spermatozoa(%)	24,30 ± 0,87	24,60 ± 0,75	22,60 ± 1,38	23,60 ± 1,80

Keterangan: KR= Konsentrasi Rafinosa

### Presentase Motilitas Spermatozoa Pasca Thawing

Hasil rata-rata persentase motilitas pada kerbau di setiap ejakulasi dengan konsentrasi rafinosa (KR) yang berbeda bisa dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2. dapat dilihat rata-rata motilitas spermatozoa semen beku tertinggi 20,00±0,00% pada konsentrasi control dan yang terendah pada perlakuan konsentrasi rafinosa 1,5% yaitu 15,00±5,77% . Hal ini sesuai pada pendapat Arifiantini *et al.* (2004) menyatakan bahwa, motilitas spermatozoa setelah *thawing* minimal 40% jika kurang dari 40 % maka semen beku tersebut tidak layak diinseminasikan (Afriani et al., 2018).

Rafinosa tidak dapat digunakan secara sempurna oleh spermatozoa sebagai energi dan krioprotektan. Rafinosa tidak dapat berperan sebagai krioprotektan menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan. Ketika membran spermatozoa mengalami kerusakan, enzim aspartat aminotransferase (AspAT) yang memproduksi ATP akan dilepaskan dari sel dan masuk ke seminal plasma. Kehilangan AspAT akan mengganggu produksi ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa (Afriantini et al., 2009; Arifiantini dan purwantara, 2010).

### Presentase Hidup Spermatozoa Pasca Thawing

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata presentase spermatozoa semen kerbau setelah pembekuan yang tertinggi pada perlakuan konsentrasi rafinosa 1% yaitu 25,50±2,27% dan yang terendah pada perlakuan konsentrasi rafinosa 1,5% yaitu 22,9±2,02%. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan rafinosa dengan berbagai konsentrasi pada tris kuning telur itik tidak berpengaruh nyata ( $P \geq 0,05$ ) terhadap persentase hidup spermatozoa hal ini disebabkan karena perubahan ke suhu pembekuan dalam  $N_2$  cair ( $-196^\circ C$ ) sampai ke suhu setelah *thawing*  $37^\circ C$  menyebabkan stres osmotik. Rafinosa yang berfungsi krioprotektan menyebabkan tingginya osmolaritas didalam laurat sehingga menyebabkan stres osmotik pada spermatozoa (Mughal et al., 2017).

### Persentase Abnormalitas Spermatozoa Pasca Thawing

Hasil Penelitian menunjukkan rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa semen kerbau setelah pembekuan tertinggi pada perlakuan konsentrasi rafinosa 2% yaitu 17,30±1,32% dan yang terendah pada kontrol yaitu 16,00±1,47%. Hasil penelitian ini masih dalam batas normal abnormalitas spermatozoa untuk IB, sesuai dengan pernyataan Garner dan Hafez (2000) bahwa persentase abnormalitas spermatozoa yang baik untuk IB yaitu abnormalitas spermatozoa 5-20%. Membran plasma hanya menyebabkan kematian pada spermatozoa tetapi sebagian besar spermatozoa yang mati masih memiliki bentuk normal (Ismaya, 2014).

### **Presentase Membran Plasma Utuh Pasca Thawing**

Hasil MPU pada penelitian ini menunjukkan rata-rata persentase MPU spermatozoa kerbau setelah pembekuan dengan pengencer tris kuning telur itik dengan perlakuan rafinosa berbagai konsentrasi tertinggi terdapat pada penambahan konsentrasi rafinosa 1% yaitu  $24,60 \pm 0,75\%$  dan yang terendah pada konsentrasi rafinosa 1,5% yaitu  $22,60 \pm 1,38\%$ . Analisis statistik terhadap membran plasma utuh spermatozoa pasca *thawing* menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P \geq 0,05$ ) disebabkan karena rafinosa tidak dapat digunakan secara sempurna oleh spermatozoa sebagai energi dan krioprotektan. Rafinosa tidak dapat berperan sebagai krioprotektan menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan (Afriantini et al., 2009).

### **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan dosis rafinosa pada pengencer tris kuning telur itik tidak memberikan pengaruh nyata ( $P \geq 0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas spermatozoa dan membran plasma utuh spermatozoa kerbau pasca *thawing*. Namun penggunaan rafinosa mampu meningkatkan motilitas spermatozoa kerbau, sehingga bisa di tambahkan kedalam medium ekstender semen kerbau.

### **UCAPAN TERIMAKASIH**

Peneliti mengucapkan terima kasih yang disampaikan kepada Rektor Universitas Andalas Padang Indonesia dan LPPM Universitas Andalas yang telah mendanai penelitian ini dengan nomor hibah 1868/E4/AK.04/2021 dan Perjanjian atau Kontrak Induk Nomor: 266/E4.1/AK.04.PT/2021.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Aboagla, E. M. E. and T. Terada. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6):1160-1172.
- Afriani, T.; James, H.; Purwanti, E.; Ferdinal, R.; Arif, R.; Jaswandi and Mangku, M. (2018). *Reproductive Technology in Buffalo*. Andalas University Press, Padang. pp.8-16.
- Afriantini, R. I., T. L. Yusuf dan N. Graha. (2005). Recover rate dan longivitas pasca thawing semen beku sapi FH menggunakan berbagai bahan pengencer. *Bulletin peternakan*. 29(2) :53-61.
- Arifantini, B. Purwantara, T. L Yusuf dan D. Sajuthi. (2009). Peranan Fruktosa, Raftnosa, dan Trehalosa pada Kriopreservasi Semen Kuda.. *Media Peternakan*. 32(3):23-35.
- Arifantini, R. I, and B. Purwantara. 2010. Motility and viability of Fresian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *Jurnal Indonesian Trop Anim Agric*. 35(4) : 222-226.
- Akeel, A.M., H. Wahid, Y. Rosnina, Y.M. Goh, M. Ebrahimi, and F.M. Nadia. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in tris egg yolk glycerol extender. *Anim. Reprod. Sci*. 136: 55–60.
- Alghamdia, S.A., J. Bethany, Funnellb, L. Scott-Birdb, G. Cliff Lambc, K. Aaron Rendahld, Patrick, C. Taubee, Douglas, and N. Foster. (2010). Comparative studies on bull and stallion seminal DNase activity and interaction with semen extender and spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*. 121: 249–258.
- Bearden, H.J., J.W. Fuquy, and S.T. Willard. (2004). *Applied animal reproduction*. 6th ed. New Jersey, Prentice Hall, Upper Sadlle River. pp. 44–207.
- Deichsela, K., N. Schrammelb, J. Auricha, and C. Aurich. (2016). Effects of a long day light programme on the motility and membrane integrity of cooled- stored and cyropreserved semen in Shetland pony stallions. *Anim. Reprod. Sci*. 167: 68–73.
- Fernandez, S. M. R., F. Martínez-Pastor, V. García-Macías, M. C. Esteso, A. J. Soler, P. de Paz, L . Anel and J. J. Garde. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 67(4) : 738-753.

- Hafez, E.S.E. (2008). Preservation and cryopreservation of gamet and embryos in reproduction farm animal. Hafez ESE, and B. Hafez (eds) 7th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Marryland, USA. pp. 82–95.
- Ihsan, M.N. (2011). Ilmu Reproduksi Ternak Dasar. Universitas Brawajaya Press (UB Press). Hal. 139–171.
- Ismaya. (2014). Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 60–85.
- Kusumawati, E. D., A. T. N. Krisnaningsih, dan R. R. Romadhon. (2016). Kualitas spermatozoa semen beku sapi Semental dengan suhu dan lama *thawing* yang berbeda. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, 26(3): 38-41.
- Mughal, D. H., A. Ijaz, M. S. Yousaf, F. Wadood, and U. Farooq. (2017). Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen-limitations and protections. Buffalo Bulletin. 36:1-14.
- Munzir, I.I, Sri, S, dan Madi, H. (2016). Pengaruh Penambahan Dosis Rafinosa Dalam Pengencer Susu Skim Terhadap Motilitas, Persentase Hidup Dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole. Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu Vol. 4(4): 284- 291.
- Rizal, M., B. Herdis., S. Arief., A. Achmad dan Yulnawati. (2006). Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. JITV. 11: 123-130.
- Sukmawati, E., R.I. Arifiantini dan B. Purwantara. (2014). Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. IPB. Bogor.
- Swelum, A.A., H.A. Mansour, A.A. Elsayed, and H.A. Amer. (2011). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. Theriogenology. 76: 833–842.