

Penelitian

## Viabilitas Spermatozoa Cauda Epididymis Kerbau Rawa dalam Berbagai Konsentrasi Pengencer Air Kelapa Muda dan Kuning Telur

*(Viability of Cauda Epididymides Spermatozoa of Swamp Buffalo in Various Concentration Coconut Water and Egg Yolk Extender)*

**Muhammad Riyadhi\*, Muhammad Rizal, Mildawati**

Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Jurusan Peternakan  
Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat,  
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36 Banjarbaru 70714. Telp. 0511-4781551.

\*Penulis untuk korespondensi : mriyadhi@unlam.ac.id

Diterima 21 Juli 2017, Disetujui 14 November 2017

### ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui viabilitas spermatozoa cauda epididymis pada berbagai konsentrasi pengenceran menggunakan air kelapa muda dan kuning telur yang disimpan pada temperatur 3-5°C. Pengencer Tris 80% + 20% kuning telur digunakan sebagai kontrol (P1), selanjutnya perlakuan menggunakan pengencer air kelapa muda 90% + 10% kuning telur (P2), air kelapa muda 85% + 15% kuning telur (P3) dan air kelapa muda 80% + 20% kuning telur (P4). Viabilitas spermatozoa yang diamati setiap hari meliputi persentase motilitas dan persentase hidup sampai mencapai motilitas minimum 30%. Hasil penelitian menunjukkan persentase motilitas tertinggi pada hari ke-4 terdapat pada perlakuan P4 sebesar 31.8 %, berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) dengan P3 sebesar 10.5 % dan P2 sebesar 2.5 % serta dengan P1 sebesar 4.2 %. Pada persentase hidup spermatozoa, perlakuan P4 juga menunjukkan nilai 50.3 %, berbeda sangat nyata ( $P < 0.05$ ) dengan perlakuan P1, P2 serta P3 berturut-turut adalah 27.8 %, 26.4 %, dan 32.9 %. Kesimpulan dari penelitian menunjukkan bahwa pengenceran dengan perlakuan P4 (80% air kelapa dan 20% kuning telur) mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa cauda epididymis kerbau rawa selama proses penyimpanan hingga empat hari di dalam refrigerator dengan suhu 3-5°C.

**Kata kunci :** kerbau rawa, spermatozoa cauda epididymis, air kelapa muda

### ABSTRACT

Young coconut water provides the physical and chemical needs of spermatozoa to sustain the fertility and viability of spermatozoa. However, it is unable to protect the spermatozoa at low temperature. An experiment was conducted using cauda epididymis collected from swamp buffalo under four treatments (coconut water extender 90% with 10% egg yolk (P2), coconut water extender 85% with 15% egg yolk (P3), coconut water extender 80% with 20% egg yolk (P4) and Tris extender 80% with 20% egg yolk as a control (P1)) to examine the viability of spermatozoa cauda epididymis on various concentrations of dilution using young coconut water and egg yolk stored at temperature of 3-5°C. Spermatozoa viability was observed daily included the percentage of motility and live percentage up to a minimum motility of 30%. On the fourth day, percentage of motility for P4 treatment (31.8%) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than P3 (10.5 %), P2 (2.5 %) and P1 (4.2%). Whereas the percentage of live of spermatozoa was 27.8%, 26.4%, 32.9% and 50.3% on P1, P2, P3, and P4 treatment respectively. Coconut water extender 80% with 20% egg yolk could be used for maintain the viability of cauda epididymis of kerbau rawa during storage process up to four days in refrigerator at temperature of 3-5°C.

**Keywords:** swamp buffalo, cauda epididymis spermatozoa, young coconut water

## PENDAHULUAN

Organ kelamin primer jantan atau testes memiliki dua fungsi utama, yaitu sebagai penghasil sel-sel kelamin jantan (spermatozoa) dan hormon kelamin jantan (androgen). Spermatozoa diproduksi di tubuli seminiferi dan selanjutnya dibawa menuju epididimis. Epididimis merupakan saluran eksternal pertama yang keluar dari testis dibagian apeks testis menurun longitudinal pada permukaan testis. Epididimis terbagi menjadi tiga bagian yaitu, *caput* (kepala) epididimis, *corpus* (badan) epididimis, dan *cauda* (ekor) epididimis. Secara umum epididimis berfungsi sebagai tempat transport, konsentrasi, maturasi dan penyimpanan spermatozoa.

Penelitian terhadap pemanfaatan spermatozoa asal epididimis telah dilakukan, mulai dari teknik koleksi spermatozoa asal epididimis (Roels et al., 2014) sampai dengan pemakaian pengencer dan kriopreservasi (Melo et al., 2008; Papa et al., 2008; Guasti et al., 2009; Monteiro, et al., 2011).

Kemampuan *cauda* epididimis dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa sangat ditunjang oleh kondisi di dalam lingkungan *cauda* epididimis (Martins et al., 2009; Bertol et al., 2013). Viabilitas spermatozoa *cauda* epididimis pada temperatur ruang 18-20°C hanya bertahan selama 30 jam (Bertol et al., 2013). Untuk mempertahankan viabilitas serta kemampuan fertilitas yang baik, maka spermatozoa *cauda* epididimis perlu mendapatkan penanganan lebih lanjut (Solihati et al., 2008).

Upaya penanganan spermatozoa *cauda* epididimis dapat dilakukan melalui proses preservasi, yaitu pengenceran dan penyimpanan spermatozoa pada kondisi temperatur yang rendah. Pengenceran bertujuan agar spermatozoa dapat memenuhi kebutuhan kimiawi maupun fisik, sehingga dapat mempertahankan motilitasnya, disamping juga dengan pengenceran terbukti mampu menekan laju penurunan daya tahan spermatozoa (Widjaya, 2011)

Berbagai penelitian penggunaan pengencer terhadap kemampuannya dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa *cauda* epididimis telah dilakukan seperti pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada sapi peranakan ongole (Solihati et al., 2008), pengencer sari wortel pada sapi bali (Parera et al., 2009) dan pengencer laktosa pada kambing peranakan ettawa (Riyadhi et al., 2017).

Pemanfaatan air kelapa muda sebagai pengencer telah dilaporkan dengan hasil yang baik (Rizal et al., 2017), dimana air kelapa muda ternyata dapat menyediakan kebutuhan fisik dan kimiawi spermatozoa seperti unsur makro berupa

karbohidrat dan juga protein asam amino. Jenis karbohidrat fruktosa pada air kelapa muda, merupakan gula yang mudah dirubah menjadi sumber energi sehingga dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa (Anwar et al., 2015). Fruktosa juga merupakan sumber energi utama yang terdapat pada seminal plasma (Stevanov et al., 2015). Namun demikian air kelapa tidak mampu melindungi spermatozoa pada temperatur rendah, sehingga perlu penambahan kuning telur yang berfungsi sebagai anti *cold shock* (Pillet et al., 2011).

Pemanfaatan air kelapa muda sebagai bahan pengencer pada semen kerbau rawa belum banyak dilaporkan, terlebih yang bersumber dari spermatozoa *cauda* epididimis, padahal air kelapa muda memiliki potensi sebagai sumber energi alternatif serta mudah diperoleh. Hasil penelitian bertujuan untuk menguji kemampuan air kelapa muda sebagai pengencer alternatif dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa *cauda* epididimis kerbau rawa yang dipreservasi pada suhu 3-5°C. Selain itu juga diharapkan dapat menjadi informasi tambahan mengenai pemanfaatan bahan-bahan alami sebagai pengencer alternatif yang murah dan mudah diperoleh.

## BAHAN DAN METODE

Epididimis sebanyak 13 buah beserta testis kerbau rawa dikoleksi dari RPH Pemerintah Kabupaten Banjar dan Pemerintah Kota Banjarmasin. Evaluasi dan pengenceran dilakukan di Laboratorium Pemuliaan dan Reproduksi Ternak, Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat. Epididimis dipisahkan dari testis, selanjutnya spermatozoa dikoleksi dengan cara membuat sayatan-sayatan pada *cauda* epididimis kemudian dibilas tekan (Rizal, 2006) dengan larutan NaCl fisiologis 0.9% mencapai volume 4.0 ml. Spermatozoa hasil koleksi dievaluasi kualitasnya secara mikroskopis yang meliputi persentase motilitas, konsentrasi, persentase hidup, dan persentase abnormalitas spermatozoa.

Evaluasi motilitas dilakukan dengan melihat pergerakan progresif (pergerakan ke depan) dari spermatozoa. Menurut Hamdan et al. (2014), evaluasi motilitas dilakukan secara subjektif pada delapan lapangan pandang berbeda menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, dengan penilaian berkisar antara 0 dan 100%.

Konsentrasi spermatozoa dapat dinilai dengan beberapa cara, salah satunya adalah dengan dihitung secara langsung menggunakan *counting*

*chamber* (Arifiantini, 2012). Spermatozoa dihitung pada lima kotak *Neubauer* dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, hasil penghitungan konsentrasi akan dikalikan dengan 10 juta sperma per ml.

Untuk persentase hidup, dilakukan dengan menggunakan pewarnaan eosin 2% (Arifiantini, 2012). Spermatozoa hidup yang diamati tidak menyerap warna, sehingga kepala akan terlihat berwarna putih, sebaliknya yang mati akan menyerap warna dan terlihat berwarna merah. Penghitungan dilakukan dengan jumlah minimum 200 sel dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Persentase abnormalitas dapat diamati dengan melihat keadaan morfologi spermatozoa. (Arifiantini, 2012). Cara pembuatan preparat untuk morfologi spermatozoa sama dengan pemeriksaan spermatozoa hidup dan mati, yaitu bisa menggunakan pewarnaan eosin 2 % atau eosin nigrosin. Penghitungan dilakukan dengan jumlah minimum 200 sel dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Perlakuan selanjutnya adalah pemberian pengencer terhadap spermatozoa *cauda epididimis*. Pengencer yang digunakan adalah 80% tris + 20% kuning telur sebagai kontrol (P1), air kelapa muda-kuning telur dengan beberapa konsentrasi ; 90% air kelapa muda + 10% kuning telur (P2), 85 % air kelapa muda + 15 % kuning telur (P3) dan 80 % air kelapa muda + 20% kuning telur (P4). Selanjutnya pengencer ditambahkan penisilin sebanyak 1.000 IU dan streptomisin sebanyak 1 mg per mililiter pengencer. Setelah semua semen diencerkan kemudian, disimpan dalam lemari es (*refrigerator*) yang bersuhu sekitar 3-5°C dengan cara *water jacket*. Semua perlakuan dievaluasi kualitasnya setiap hari secara mikroskopis meliputi persentase hidup dan motilitas spermatozoa. Khusus untuk persentase motilitas akan diamati hingga persentase mencapai 30%.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan enam kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1993).

## HASIL

### *Karakteristik Spermatozoa Cauda Epididimis Segar Kerbau Rawa*

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh motilitas spermatozoa *cauda epididimis* kerbau rawa adalah 70%, konsentrasi 1427.5 juta/ml, dan persentase

hidup 81.2%. (Tabel 1). Berdasarkan hasil tersebut maka spermatozoa *cauda epididimis* dapat diproses untuk dipreservasi dan dipergunakan dalam program IB.

### *Evaluasi Kualitas Spermatozoa Preservasi*

Evaluasi kualitas spermatozoa setelah pengenceran yang disimpan dalam *refrigerator* (3 – 5°) meliputi pengamatan persentase motilitas dan persentase hidup. Hasil pengamatan terhadap persentase motilitas spermatozoa *cauda epididimis* kerbau rawa dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan untuk persentase hidup spermatozoa tersaji pada Tabel 3.

Hasil pengamatan persentase motilitas dan hidup hari ke-1 spermatozoa *cauda epididimis* tidak berbeda nyata ( $P>0.05$ ) pada semua perlakuan yaitu masing-masing 70% dan 81.2%. Pada Persentase motilitas spermatozoa kerbau rawa asal *cauda epididimis* setelah diencerkan pada perlakuan P4 hari ke-4 penyimpanan, masih mampu mempertahankan motilitas hingga 31.8%, berbeda nyata ( $P<0.05$ ) dengan P1, P2 dan P3, masing-masing sebesar 4.2%, 2.5% dan 10.5%. Selanjutnya persentase hidup, diperoleh rataan tertinggi terdapat pada perlakuan P4 sebesar 50.3%, dan berbeda nyata ( $P<0.05$ ) dengan perlakuan P1, P2 serta P3, berturut-turut adalah 27.8 %, 26.4 %, dan 32.9 %.

## PEMBAHASAN

### *Karakteristik Spermatozoa Cauda Epididimis Segar Kerbau Rawa*

Penelitian lain yang dilakukan pada beberapa jenis kerbau menemukan variasi persentase motilitas berturut-turut adalah 69%, 71-73%, 70% pada kerbau belang (Surachman *et al.*, 2009; Yulnawati *et al.*, 2013; Rizal *et al.*, 2014) dan 69.17% pada kerbau rawa (Rizal & Riyadhi, 2017), konsentrasi sebesar 1044.50 juta/ml, 10533.3 juta/ml, 2276-2544 juta/ml pada kerbau belang (Herdis *et al.*, 2008; Surachman *et al.*, 2009; Yulnawati *et al.*, 2013) dan hidup sebesar 76%, 82.8-85.8%, 76-79% pada kerbau belang (Surachman *et al.*, 2009; Yulnawati *et al.*, 2013; Rizal *et al.*, 2014) dan 77.67% pada kerbau rawa (Rizal & Riyadhi, 2017). Perbedaan yang ditemukan dari beberapa peneliti dapat saja terjadi karena perbedaan teknik koleksi spermatozoa, individu ternaknya sendiri serta keadaan lingkungan pemeliharaan.

Menurut Akhter *et al.* (2007), menyatakan bahwa semen segar kerbau yang dapat diproses dan digunakan dalam program IB harus memiliki

Tabel 1 Karakteristik spermatozoa *cauda* epididimis kerbau rawa

Variabel	Rataan $\pm$ SD
Persentase motilitas (%)	70.0 $\pm$ 0.00
Konsentrasi spermatozoa* (jt/ml)	1427.5 $\pm$ 238.64
Persentase hidup (%)	81.2 $\pm$ 1.52

\*Konsentrasi spermatozoa setelah ditambahkan NaCl fisiologis hingga mencapai volume 4,0 ml.

Tabel 2 Rataan persentase motilitas spermatozoa kerbau rawa

Perlakuan	Rataan persentase motilitas hari ke – (%) $\pm$ SD			
	1	2	3	4
P1	70.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	62.17 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	28.00 $\pm$ 3.95 <sup>b</sup>	4.17 $\pm$ 2.32 <sup>c</sup>
P2	70.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	31.50 $\pm$ 4.76 <sup>c</sup>	12.50 $\pm$ 2.74 <sup>d</sup>	2.50 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>
P3	70.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	42.83 $\pm$ 4.07 <sup>b</sup>	22.33 $\pm$ 5.82 <sup>c</sup>	10.50 $\pm$ 3.83 <sup>b</sup>
P4	70.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	63.33 $\pm$ 2.73 <sup>a</sup>	43.67 $\pm$ 4.93 <sup>a</sup>	31.83 $\pm$ 3.66 <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

Tabel 3 Rataan persentase hidup spermatozoa kerbau rawa

Perlakuan	Rataan persentase hidup hari ke – (%) + SD			
	1	2	3	4
P1	81.22 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	74.87 $\pm$ 2.91 <sup>a</sup>	47.10 $\pm$ 3.47 <sup>b</sup>	27.77 $\pm$ 2.24 <sup>c</sup>
P2	81.22 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	50.00 $\pm$ 4,64 <sup>c</sup>	34.57 $\pm$ 2.86 <sup>c</sup>	26.40 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>
P3	81.22 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	59.17 $\pm$ 3.32 <sup>b</sup>	42.47 $\pm$ 4.30 <sup>b</sup>	32.88 $\pm$ 2.77 <sup>b</sup>
P4	81.22 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	75.83 $\pm$ 3.59 <sup>a</sup>	59.90 $\pm$ 5.02 <sup>a</sup>	50.27 $\pm$ 3.77 <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

persentase spermatozoa motil di atas 65%. Di Indonesia, Peraturan Direktur Jenderal Peternakan Nomor : 12207/HK.060/F/12/2007 menetapkan standar untuk motilitas semen kerbau adalah 50%, hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa *cauda* epididimis yang diperoleh pada penelitian ini layak dijadikan sebagai sumber spermatozoa untuk keperluan IB.

#### Evaluasi Kualitas Spermatozoa Preservasi

Kemampuan pengencer yang digunakan pada hari ke-1 tidak berpengaruh terhadap penurunan kualitas spermatozoa. Dengan kata lain pengencer tris (*hydroxymethyl- aminometan*) dan kuning telur serta air kelapa dan kuning telur masih mengandung zat makanan yang berlimpah untuk spermatozoa, dimana ketersediaan nutrisi dari suatu pengencer sangat penting untuk sumber energi bagi spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Herdis dan Angga (2012), bahwa motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosine triphosphat* (ATP) hasil metabolisme.

Menurut Yohana et al. (2014) pengencer tris memiliki kemampuan mencegah perubahan pH, mengandung nutrisi dan konsentrasi yang cukup dalam melindungi spermatozoa dari *cold shock* serta dapat mempertahankan daya hidup sel spermatozoa selama proses pengawetan.

Pengencer air kelapa memiliki unsur karbohidrat berupa glukosa dan fruktosa yang mempunyai peranan penting sebagai sumber energi dalam mempertahankan motilitas (Herdis et al., 2016). Namun demikian air kelapa tidak mampu melindungi spermatozoa pada suhu rendah, sehingga perlu ditambahkan kuning telur sebagai agen krioprotektan (Pillet et al., 2011).

Kombinasi dengan kuning telur selanjutnya akan melengkapi fungsi pengencer sebagai pelindung dan mempertahankan motilitas sel spermatozoa lebih baik pada saat terjadinya perubahan penurunan suhu dari 5 hingga  $-196^{\circ}\text{C}$ . Pernyataan ini dikuatkan oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan pentingnya kandungan nutrisi lengkap serta kandungan kuning telur akan dapat menunjang

motilitas spermatozoa dan melindungi spermatozoa dari efek *cold shock* (Anwar *et al.*, 2015)

Kemampuan dalam mempertahankan motilitas pada kombinasi pengencer perlakuan (P<sub>4</sub>), kemungkinan karena air kelapa cukup menyediakan zat makanan serta sesuai bagi spermatozoa kerbau. Penelitian sebelumnya menunjukkan penggunaan 80% air kelapa dengan penambahan 20% kuning telur memperlihatkan hasil yang baik (Rizal *et al.*, 2017).

Kandungan air kelapa muda dapat menyediakan kebutuhan fisik dan kimiawi spermatozoa sehingga dapat mempertahankan fertilitas dan daya hidup spermatozoa. Kandungan karbohidrat yang terkandung dalam air kelapa muda selain berfungsi sebagai pelindung bagi spermatozoa juga dapat menjadi sumber energy (Herdis *et al.*, 2016). Lebih jauh ditegaskan oleh Aisen *et al.* (2002), bahwa metabolisme spermatozoa dapat berlangsung dengan baik dalam larutan pengencer yang mengandung gula yang sudah diuraikan.

Pada perlakuan pengencer air kelapa yang lebih tinggi dari 80%, persentase motilitasnya rendah diduga oleh adanya faktor kecenderungan berlimpahnya fruktosa dan perbedaan kapasitas penyanggah dari pengencer semen. Salisbury dan Van Demark (1985), menyatakan bahwa kondisi fruktosa yang kurang maupun berlebihan serta ketidakstabilan penyanggah yang mencegah penurunan pH secara berlebihan menjadi kadar ion hidrogen akan bersifat racun bagi spermatozoa.

Dari penelitian yang dilakukan, disimpulkan bahwa air kelapa mampu menjadi pengencer alternative bagi spermatozoa kerbau rawa asal *cauda* epididimis serta dapat mempertahankan penurunan persentase motilitas dan daya hidup spermatozoa. Terdapat kombinasi pengencer terbaik pada perlakuan 80% air kelapa dan 20% kuning telur yang disimpan dalam *refrigerator* (3–5°C) selama empat hari dengan persentase motilitas  $\geq$  30% dan persentase hidup  $\geq$  50%.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

#### DAPTAR PUSTAKA

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801- 1808.

Akhter S, Sajjad M, Andrabi SMH, Ullah N, Qayyum M. 2007. Effect of antibiotics in extender on

fertility of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.* 27: 13-16.

Anwar, Febretrisiana A, Rosartio R. 2015. Kualitas semen cair kambing boer dalam pengencer tris kuning telur dengan fruktosan dan laktosa. *Pros. Seminar Nasional Tek. Peternakan dan Vet.p.* 349-356

Arifiantini RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan. IPB Press. Bogor. p48-77.

Bertol MAF, Romildo RW, Vanete TS, Luiz EK, Aline SF, Renata AA, Kerriel TG. 2013. Viability of Bull Spermatozoa Collected from the Epididymis Stored at 18-20°C. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56 : 777-783.

Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RR, Martin I, Avanzi BR, Dellaqua Jr JA, Papa F.O. 2013. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 33: 1153-1156.

Hamdan, Budianto, Sutriana A, Aliza D, Rahmi E, Dalimunthe AR. 2014. Pengaruh lama penyimpanan epididimis pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa kambing local aceh. *J Ked. Hewan* 4:81-86.

Herdis, Surachman M, Yulnawati, Rizal M, Maheshwari H. 2008. Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan maltosa dalam pengencer andromed®. *J.indon.trop.anim.agric.* 32:101-106.

Herdis, Angga D. 2012. Pengaruh maltosa sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam meningkatkan kualitas semen beku guna mendukung keberhasilan teknologi inseminasi buatan. *J. Sains dan Teknologi Indonesia* 14: 197-202.

Herdis, Dawmawan IWA, Rizal M. 2016. Penambahan beberapa jenis gula dapat meningkatkan kualitas sperma beku asal epididimis ternak domba. *J Ked Hewan* 10: 200-204

Martins CF, Driessen K, Melo Costa P, Carvalho-Neto JO, De Sousa RV, Rumpf R, Dodec MN. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Anim Reprod Sci.* 116: 50-57.

Melo CM, Melo FO, Papa EG, Fioratti AISB, Villaverde BR, Avanzi G, Monteiro JA, Dellaqua DF, Pasquini, Alvarenga MA. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 107: 331.

Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua Jr JA, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA,

- Guasti PN. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 127: 197-201.
- Papa FO, Melo C, Fioratti E. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 107: 293-301.
- Parera F, Prihatiny Z, Souhoka DF, Rizal M. 2009. Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternative spermatozoa epididymis sapi bali. *J.Indon.Trop.Anim.Agric.* 34: 50-56.
- Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2011. Egg Yolk Plasma Can Replace Egg Yolk in Stallion Freezing Extenders. *Theriogenology* 75: 105-114.
- Riyadhi M, Setiawan A, Herdis, Rizal M. 2017. Epididymal spermatozoa quality of etawa crossbreed goat in tris extender supplemented with various lactose concentrations. *J. Ked. Hewan* 11: 15-18.
- Rizal M, Yusnizar Y, Maheswari H, Herdis. 2014. Preservation of spotted buffalo epididymal spermatozoa in andromed with raffinose addition. *Int. J. Biosci.* 5: 244-249.
- Rizal M, Riyadhi M. 2017. Fertilitas semen kerbau rawa (*Bubalus bubalis carabanensis*) yang diencerkan dengan pengencer nira aren. *J. Vet.* 17:457-467.
- Rizal M, Riyadhi M, Irawan B, Wahdi A, Habibah, Herdis. 2017. Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Persilangan Yang Dipreservasi dengan Air Kelapa Muda pada Suhu 5°C. *J Vet.* 18: 571-579
- Roels K, Leemans B, Ververs C, Govaere J, Hoogewijs M, Van Soom A. 2014. Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 83: 321-325.
- Salisbury GW, Van Demark NL. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi (Physiologi and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar R. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. p274-586.
- Solihati N, Ruhijat I, Siti DR, Muhammad R, Maya F. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididymis sapi peranakan ongole (PO) dalam pengencer susu, tris, sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Anim. Prod.* 10: 22-29.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Diterjemahkan oleh B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. p210-215.
- Stevanov RG, Anev G, Abadjieva DV. 2015. Effect of different extenders and storage periods on motility and fertility of ram sperm. *Maced Vet Rev.* 38: 85-89
- Surachman M, Herdis, Yulnawati, Rizal M, Maheswari H. 2009. Kualitas semen cair asal epididimis kerbau belang dalam bahan pengencer andromed yang mendapat penambahan sukrosa. *Media Peternakan* 32: 88-94
- Widjaya N. 2011. Pengaruh pemberian susu skim dengan pengencer tris kuning telur terhadap daya tahan hidup spermtozoa sapi pada suhu penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan* 9:72-76
- Yohana T, Ducha N, Rahardjo. 2014. Pengaruh pengencer sintetik dan alami terhadap motilitas spermatozoa sapi brahman selama penyimpanan dalam suhu dingin. *LenteraBio* 3: 261-265
- Yulnawati Y, Rizal M, Maheswari H, Noor RR, Sumantri C, Boediono A. 2013. Epididymal sperm quality of buffaloes with different spotted types. *J. Ilmu Ternak dan Vet.* 18: 202-207.