

## Efek Penyimpanan Epididimis Sapi Bali Pada Suhu 5°C terhadap Kualitas Spermatozoa

### *The Effect of Epididymis Storage at 5°C to Spermatozoa Quality of Bali Cattle*

**Liber Hasudungan Sinurat, Silvia Erina, & Bayu Rosadi\***

Fakultas Peternakan Universitas Jambi, Jl. Jambi – Muara Bulian KM 15 Mendalo Indah, Jambi 36361

\*corresponding email: [bayurosadi@unja.ac.id](mailto:bayurosadi@unja.ac.id)

#### ABSTRAK

Spermatozoa dari epididimis hewan yang sudah mati merupakan pilihan menarik untuk preservasi gamet jantan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penyimpanan epididimis pada suhu 5 °C terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali. Sebanyak 20 buah epididimis sapi Bali disimpan dalam refrigerator dengan suhu 5 °C, dialokasikan pada 4 lama penyimpanan yang berbeda yaitu kontrol, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Peubah yang diamati meliputi motilitas, persentase hidup dan abnormalitas. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa lama penyimpanan pada suhu 5 °C berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap motilitas namun tidak mempengaruhi ( $P > 0,05$ ) persentase hidup dan abnormalitas. Motilitas turun pada 48 jam (62,23%) dan 72 jam (59,46%) dibandingkan kontrol (70,36%), sedangkan 24 jam (67,74%) tidak berbeda dengan kontrol. Dapat disimpulkan bahwa penyimpanan epididimis pada suhu 5 °C selama 72 jam mampu mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Bali yang layak untuk inseminasi.

**Kata kunci:** Preservasi, Spermatozoa, Epididimis, sapi Bali

#### ABSTRACT

*Spermatozoa from epididymis of dead animals is a beneficial option for preserving male gametes. This study aimed to evaluate the effect of epididymis preservation at 5 °C on the quality of Bali cattle spermatozoa. Twenty epididymis of Bali cattle was stored in the refrigerator at 5 °C, allotted into four different storage time: control, 24 h, 48 h, and 72 h. The variables measured were motility, viability, and abnormality of spermatozoa. The results showed that storage period lowered ( $P < 0.05$ ) motility but had no significant effect ( $P > 0.05$ ) on viability and abnormality of spermatozoa. Motility was decreased in 48 h (62.23%) and 72 h (59.46%) compared to control (70.36%), whereas 24 h (67.74%) was similar to control. In conclusion, epididymis storage at 5 °C for up to 72 h maintain the quality of Bali cattle spermatozoa that still suitable for insemination use.*

**Keywords:** preservation, spermatozoa, epididymis, Bali cattle

#### PENDAHULUAN

Sapi Bali adalah hasil domestikasi langsung dari banteng liar, merupakan bangsa sapi asli Indonesia (Martoyo, 2003). Sapi Bali mempunyai kemampuan untuk berkembang

dengan baik pada kondisi lingkungan yang bervariasi dan kemampuan reproduksi yang tinggi (Hikmawaty et al., 2018). Populasi sapi potong di Indonesia adalah 17.050.000 ekor (Ditjen PKH 2018), kurang lebih 30%

diantaranya adalah sapi Bali. Produktivitas sapi Bali dapat ditunjang dengan aplikasi teknologi reproduksi khususnya inseminasi buatan (IB).

Konservasi spermatozoa fertil memegang kontribusi utama dalam pengembangan IB pada banyak spesies. Semen umumnya dikoleksi menggunakan vagina buatan pada spesies domestik dan menggunakan elektroejakulasi pada beberapa spesies hewan liar selanjutnya diencerkan dalam medium yang sesuai, dipreservasi pada suhu 5°C sampai 15°C atau dibekukan dan disimpan dalam nitrogen (Abella et al., 2015). Penyelamatan spermatozoa setelah kematian hewan atau spesimen genetik berharga meningkatkan penggunaan potensial gamet jantan (Vieira et al., 2013). Jumlah spermatozoa fertil dalam cauda epididimis mencapai 5-15 kali jumlah spermatozoa yang terdapat dalam ejakulat (Jones, 1998), spermatozoa epididimis dapat menjadi sumber utama spermatozoa hewan ternak bernilai genetik tinggi yang tak terlatih untuk dikoleksi dan hewan liar yang mati. Pada berbagai spesies hewan atau ternak, upaya penyelamatan sumberdaya genetik epididimis melalui pengolahan spermatozoa baik cair maupun beku serta penerapan IB dan fertilisasi in vitro sudah banyak dicoba dengan hasil yang baik, di antaranya pada kerbau belang (Rizal et al., 2007; Herdis et al., 2008), rusa (Hishinuma et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2006), domba (Kaabi et al., 2003), sapi (Foote, 2000), kuda (Vieira et al., 2012), dan bison (Krishnakumar et al., 2011).

Daya fertilisasi spermatozoa pada semua mamalia dipengaruhi proses selama perjalanan melalui epididimis. Lingkungan epididimis

adalah medium penyimpan yang efisien, dan pemahaman mengenai kondisi preservasinya meningkatkan upaya preservasi spermatozoa in vitro. Keuntungan utama penyimpanan spermatozoa epididimis pada suhu dingin adalah mencegah kerusakan terkait dengan pembekuan, memastikan viabilitas semen lebih tinggi (Crespilho et al., 2014). Pada domba, viabilitas sperma dapat diperpanjang sampai 48 jam dengan refrigerasi, motilitas total turun mulai 24 jam setelah penyimpanan (Bergstein-Galan et al., 2018). Penelitian ini bertujuan mempelajari efek penyimpanan epididimis sapi Bali pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Koleksi dan Penyimpanan Epididimis**

Testis diperoleh dari rumah potong hewan dibawa untuk diproses lebih lanjut ke Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Jambi segera setelah disembelih. Epididimis dipisahkan dari testis, dibersihkan dengan aquades dan NaCl fisiologis masing-masing tiga kali. Epididimis dimasukkan kedalam larutan NaCl fisiologis dan disimpan dengan lama penyimpanan sesuai dengan perlakuan yaitu kontrol (tanpa penyimpanan), 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Untuk masing-masing perlakuan digunakan 5 buah epididimis.

### **Koleksi Spermatozoa Epididimis**

Spermatozoa epididimis dikoleksi berdasarkan metode Rizal et al. (2007). Koleksi spermatozoa menggunakan kombinasi teknik penorehan, pembilasan, dan penekanan pada cauda epididimis menggunakan larutan

NaCl fisiologis, kemudian spermatozoa disedot menggunakan pipet eritrosit untuk diamati kualitasnya.

### **Penilaian Kualitas Spermatozoa**

#### **Pengukuran Motilitas**

Motilitas dihitung menggunakan metode estimasi (Junaedi *et al.* 2016) Motilitas spermatozoa diamati dengan cara meletakkan satu tetes semen ditambah 10 tetes NaCl fisiologis. Motilitas spermatozoa dihitung dengan estimasi dari lima lapang pandang, dan dinyatakan dalam persentase.

#### **Persentase hidup**

Penghitungan persentase spermatozoa hidup menggunakan pewarnaan eosin negrosin. Sebanyak 2 tetes larutan eosin negrosin ditempatkan pada gelas objek bersih, satu tetes semen dicampurkan ke dalam larutan eosin nigrosin, selanjutnya diulas memakai gelas objek lainnya. Perhitungan persentase hidup didasarkan atas perbandingan jumlah spermatozoa yang hidup (kepala tidak berwarna) dengan total spermatozoa yang dihitung. Jumlah total spermatozoa yang diamati minimal 200 setiap pengamatan.

#### **Abnormalitas Spermatozoa**

Abnormalitas adalah penyimpangan dari bentuk morfologi normal spermatozoa yang dapat menyebabkan penurunan daya fertilitasnya. Penghitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan pewarnaan yang sama dengan spermatozoa hidup, didasarkan atas perbandingan jumlah spermatozoa abnormal dengan total spermatozoa yang dihitung. Jumlah

spermatozoa yang dihitung minimal 200 setiap pengamatan.

### **Analisis Data**

Data yang didapatkan dari setiap peubah yang diamati analisis dengan sidik ragam, Bila perlakuan berpengaruh nyata, dilakukan uji lanjut Duncan (Steel & Torrie, 1993). Proses penghitungan data menggunakan program SPSS.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil penilaian rata-rata peubah yang diamati dalam pemeriksaan kualitas spermatozoa epididymis sapi Bali ditampilkan dalam Tabel. 1.

### **Motilitas Spermatozoa**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin lama penyimpanan epididymis menurunkan ( $P < 0,05$ ) motilitas spermatozoa. Penurunan motilitas spermatozoa epididymis dari 70,36% pada 0 jam pemeriksaan sampai 59,46% pada penyimpanan 72 jam (Tabel 1). Penurunan motilitas secara signifikan terjadi setelah penyimpanan selama 48 jam, pada penyimpanan 24 jam belum terjadi penurunan. Studi pada domba menunjukkan bahwa refrigerasi mempertahankan viabilitas spermatozoa domba selama 48 jam tetapi motilitas menurun setelah 24 jam (Bergstein-Galan *et al.*, 2018), dapat digunakan untuk IB sampai 3 hari penyimpanan walaupun fertilitasnya juga menurun setelah penyimpanan selama 24 jam (O'Hara *et al.* 2010). Keuntungan utama dari penyimpanan sperma dalam suhu dingin dan kondisi cair mencegah kerusakan akibat pembekuan menjamin viabilitas yang lebih tinggi (Crespilho *et al.*, 2014).

Tabel 1. Rataan hasil lama penyimpanan terhadap kualitas spermatozoa epididimis

| Peubah               | Lama Penyimpanan Epididimis (jam) |                           |                           |                          |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                      | 0                                 | 24                        | 48                        | 72                       |
| Motilitas (%)        | 70,36 <sup>a</sup> ±4,13          | 67,74 <sup>ab</sup> ±2,02 | 62,23 <sup>bc</sup> ±4,73 | 59,46 <sup>c</sup> ±5,19 |
| Persentase Hidup (%) | 72,00±4,54                        | 71,26±4,17                | 69,30±3,68                | 67,30±3,75               |
| Abnormalitas (%)     | 11,72±3,14                        | 12,90±2,18                | 14,52±2,39                | 14,90±4,01               |

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0.05$ )

Rizal *et al.* (2009) melaporkan persentase motilitas spermatozoa epididimis sapi Bali yaitu 75,00% pada hari pertama dan mengalami penurunan mengikuti lama penyimpanan pada suhu 3-5°C, pada hari ketiga penyimpanan motilitasnya adalah 53,00%. Pada penelitian ini motilitas spermatozoa hari ketiga sebesar 59,46% dengan motilitas awal 70,36%. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan metode penyimpanan yang digunakan. Pada penelitian Rizal (2009) spermatozoa terlebih dahulu dikoleksi dan semen diencerkan sebelum penyimpanan, sedangkan pada penelitian ini spermatozoa dikoleksi setelah dilakukan penyimpanan pada epididimis. Penyimpanan spermatozoa dalam epididimis menghasilkan motilitas yang lebih tinggi diduga karena efek preservasi dari cairan epididimis yang lebih baik dibandingkan larutan pengencer. Semen epididimis yang disimpan tanpa pengenceran mempunyai motilitas lebih tinggi dibandingkan menggunakan pengencer susu skim dan pengencer sintetik Bel24 yang dibuat untuk meningkatkan daya tahan spermatozoa domba pasca ejakulasi (Abella *et al.*, 2015). Daya preservasi cairan epididimis juga dilaporkan pada mencit (Songasen *et al.* 1998), domba (Tamayo-Canul *et al.*, 2011), kuda (Viera *et al.*, 2013) dan rusa (Hishinuma *et al.*, 2003; Fernandes-Santos *et al.*, 2009).

Efek protektif cairan epididimis berkaitan dengan keberadaan beberapa sistem antioksidan

(thioredoxin peroxidase, GPX5, glutathione S-transferase P, and superoxide dismutase) serta inhibitor protease ( $\alpha$ -1-antitrypsin, cystatin, eppin, macroglobulin (Dacheux *et al.*, 2009). Di dalam cairan epididimis juga terdapat senyawa antimikroba aktif seperti lactoferrin (Jin *et al.*, 1997) dan beberapa  $\beta$ -defensins (Hall *et al.*, 2007).

Penurunan motilitas spermatozoa setelah penyimpanan selama 48 jam pada penelitian ini diduga disebabkan oleh proses degenerasi tubuli epididimis. Degenerasi tubuli dimulai 18 jam setelah kematian pada tikus (Songasen *et al.*, 1998). Degenerasi jaringan dan autolisis sel menyebabkan peningkatan reactive oxygen species (ROS) di lingkungan epididimis. Konsentrasi ROS yang tinggi berkaitan dengan peningkatan peroksidasi lipid yang meningkat di membran plasma spermatozoa dan menurunkan viabilitas spermatozoa (Scherle *et al.*, 2011). Diduga kerusakan pada tubuli epididimis akibat proses degenerasi yang mulai terjadi setelah 48 jam berdampak penurunan fungsi membran plasma yang mengganggu fungsi motilitas sebagian spermatozoa yang hidup. Kerusakan membran plasma menyebabkan kemampuan gerak spermatozoa menurun karena keberadaan membran plasma sangat penting dalam motilitas. Membran ini memisahkan lingkungan intraseluler dan ekstraseluler, memediasi interaksi sel motil dengan lingkungannya. Membran

plasma merupakan platform dinamis untuk lokalisasi macam-macam komponen yang secara aktif berpartisipasi dalam seluruh aspek proses motilitas mencakup pembentukan tenaga, perlekatan, signaling dan regulasi (Keren, 2011).

Motilitas spermatozoa setelah penyimpanan epididimis selama 72 jam adalah 56,46%. Angka ini lebih tinggi dari nilai minimum motilitas yang disyaratkan untuk IB sebesar 40% (Arifiantini, 2004). Dengan demikian, spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis ini masih layak digunakan untuk aplikasi IB atau fertilisasi in vitro.

### **Persentase Hidup Spermatozoa**

Penentuan spermatozoa hidup atau mati didasarkan pada pengamatan bagian kepala spermatozoa, pada spermatozoa yang hidup (membran utuh) kepala tidak menyerap warna, spermatozoa yang mati (membran tak utuh) menyerap warna. Persentase spermatozoa hidup epididimis sapi Bali pada perlakuan 0, 24, 48, dan 72 jam masing-masing adalah 67,00%; 66,00%; 63,30%; dan 61,30% (Tabel). Penyimpanan epididimis selama 72 jam pada suhu 5°C tidak berpengaruh nyata terhadap persentase hidup spermatozoa ( $P>0,05$ ). Hasil senada dilaporkan peneliti lain pada mencit (Kaneko et al. 2009), sapi PO (Solihati et al. 2007), sapi Bali (Rizal, 2009), kambing (Hamdan et al. 2010), dan domba (Bergstein-Galan et al. 2018).

Pada penelitian ini terjadi penurunan motilitas secara signifikan setelah penyimpanan selama 48 jam, sedangkan persentase hidup tidak berbeda. Artinya, terdapat sebagian spermatozoa yang hidup tetapi tidak motil yang jumlahnya cenderung meningkat seiring lama penyimpanan. Penelitian lain menyimpulkan bahwa penyimpanan spermatozoa pada suhu 5°C

meningkatkan daya tahan dan mempertahankan fertilitas spermatozoa (Kaneko et al., 2009) tetapi lama penyimpanan mempengaruhi motilitas dan viabilitas spermatozoa (Sariozkan et al., 2014).

Fungsi motilitas tergantung pada cAMP intraseluler yang dihasilkan adenyl cyclase, dan pada fosforilasi protein berikutnya mencakup protein kinase A serta banyak protein terfosforilasi lainnya (Esseltine & Scott, 2013; Perino et al., 2012). Xia et al. (2007) melaporkan bahwa dalam cairan epididimis terdapat  $[HCO_3^-]$  and  $[Ca^{2+}]$  yang dapat secara langsung mengontrol konsentrasi cAMP intraseluler dalam spermatozoa yang mengaktifasi fosforilasi protein dan motilitas. Proses biologi molekuler untuk menimbulkan motilitas spermatozoa tersebut melibatkan lingkungan intraseluler dan ekstraseluler yang dimediasi oleh membran plasma.

### **Abnormalitas Spermatozoa**

Tolok ukur abnormalitas spermatozoa didasarkan pada morfologinya. Abnormalitas spermatozoa pada kontrol, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam adalah 11,72%, 12,90%, 14,52%, dan 14,90%. Penyimpanan epididimis pada suhu 5 °C tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi Bali ( $P>0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu 5°C selama 72 jam tidak berdampak terhadap kerusakan morfologi spermatozoa. Kerusakan struktur spermatozoa yang diduga terjadi selama proses penyimpanan tidak mengubah morfologi spermatozoa, sehingga persentase abnormalitas tidak terpengaruh.

Tingkat abnormalitas morfologi 8–10% tidak mempunyai pengaruh yang berarti bagi fertilitas, tetapi abnormalitas lebih dari 25% dari satu ejakulat menyebabkan penurunan fertilitas

(Bearden & Fuquay, 1997). Standar mutu semen untuk IB, abnormalitas spermatozoa maksimum 20% (Arifiantini, 2004), sehingga spermatozoa ini memenuhi syarat untuk IB dilihat dari sisi abnormalitasnya.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penyimpanan epididimis pada suhu 5°C selama 72 jam mampu mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Bali yang masih layak digunakan untuk inseminasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abella D.F, Da Costa M, Y Guérin Y, Dacheux J.L. 2015. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. *Animal* 9, 313–319.
- Arifiantini I. 2004. Proses Produksi Semen Beku Kerbau dengan Sistem Minitub. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arifiantini I, Yusuf T.L dan Graham N. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Fresian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. *Buletin Peternakan* 29, 53-61.
- Bearden H.J & Fuguay J.W. 1980. *Applied Animal Reproduction*. Reston Publishing Company Inc. Printice Hall Company, Reston Virginia.
- Bergstein-Galan T.G, Weiss R.R., Barbosa T.S.R, Kozicki L.E, Bicudo S.D. 2018. Ovine epididymal spermatozoa preservation in liquid state with or without seminal plasma. *Ciência Rural* 48.
- Crespilho A.M, Nichi M., Guasti P.N, Dell'Aqua C.P.F, Sa Filho M.F, Maziero R.R, Dell'Aqua J.A, Papa F.O. 2014. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim Reprod Science* 146, 126–133.
- Dacheux J.L, Belleanne C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti J.L, Dacheux F. 2009. Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 306, 45–50.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan. <http://ditjenpkh.kementan.go.id>
- Esseltine J.L & Scott J.D. 2013. AKAP signaling complexes: pointing towards the next generation of therapeutic targets? *Trends Pharmacology Science* 34, 648-655
- Fernandez-Santos M.R, Martinez-Pastor F, Matias D, Dominguez-Rebolledo A.E, Estes M.C, Montoro V, Garde J.J. 2009. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 111, 93–104.
- Foote R.H. 2000. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. *Journal of Andrology* 21: 355.
- Hall SH, Yenugu S, Radhakrishnan Y, Avellar MC, Petrusz P and French FS. 2007. Characterization and functions of beta defensins in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 9: 453–462.
- Herdis, Surachman M, Yulnawati, Rizal M dan Maheshwari H. 2008. Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan maltosa dalam pengencer AndroMed®. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis* 33, 101-106.
- Hikmawaty, A Gunawan, RR Noor, Jakaria. 2014. Identifikasi ukuran tubuh dan bentuk tubuh sapi bali di beberapa pusat pembibitan melalui pendekatan analisis komponen utama. *Jurnal produksi dan teknologi hasil peternakan* 02, 231-237.

- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymies stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 59, 813–820.
- Jin Y.Z, Bannai S, Dacheux F, Dacheux J.L, Okamura N. 1997. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. *Molecular Reproduction and Development* 47, 490–496.
- Jones R.C 1998. Evolution of the vertebrate epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 53, 163–181.
- Junaedi, Arifiantini I, Sumantri C, Gunawan A. 2016. Penggunaan dimethyl sulfoxide sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam kampung. *Jurnal Veteriner* 17, 300-308.
- Kaabi, M. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60,1249-1259.
- Kaneko T, Fukumoto K, Haruguchi Y, Kondo T, Machida H, Koga M, Nakagawa Y, Tsuchiyama S, Saiki K, Noshiha S, Nakagata N. 2009. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymies after preservation or transportation at 4°C using laser-microdissected oocytes. *Cryobiology* 59, 59–62.
- Keren K. 2011. Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *European Biophysics Journal*. 40, 1013–1027.
- Krishnakumar S, Whiteside D.P, Elkin B, Thundathil J.C. 2011. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 76: 252–260.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, Paz P.D, Rodriguez LA. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471–485.
- Martojo H. 2003. A Simple selection program for smallholder Bali cattle farmers. In: *Strategies to Improve Bali Cattle in Eastern Indonesia*. Entwistle K and Lindsay DR (Eds). ACIAR Proc. No. 110. Canberra
- O'Hara L, Hanrahan J.P, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73, 541–549.
- Perino A, Ghigo A, Scott J.D, Hirsch E. 2012. Anchoring proteins as regulators of signaling pathways. *Circulation Research* 111, 482-492.
- Rizal, M., Herdis, Yulnawati dan H. Maheswari. 2007. Peningkatan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang dikriopreservasi dengan beberapa konsentrasi sukrosa. *Jurnal Veteriner* 8, 188-193.
- Rizal, M. 2009. Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3 – 5 0C dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 14, 142-149.
- Sariozkan S, Ozdamar S, Turk G, Canturk F, Yay A. 2014. In vitro effects of l-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 68, 349–353.
- Sicherle C.C, Maia M.S, Bicudo S, Rodello L, Azevedo H. 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research* 95, 144–149.
- Solihati N, Adikarta E.W, Setiawan R, Yani D.A, Rizal M. 2007. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi Peranakan ongole (PO) setelah penyimpanan epididimis pada 5°C.

Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.

- Songsasen N, Tong J, Leibo S. 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *Journal of Experimental Zoology* 280,189–196.
- Steel, R.G.D dan Torrie J.H. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Tamayo-Canul J, Alvarez M, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, de Paz P, Anel L, Martinez-Pastor F 2011. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 129, 188–199.
- Vieira L.A, Gadea J, Garcia-Vazquez F.A, Aviles-Lopez K, Matas C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4 degrees C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science* 136, 280–288.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. 2007. CATSPER channel-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology Reproduction* 77, 551-559.