

Efektivitas *Low Density Lipoprotein* dan Kuning Telur Ayam dan Puyuh pada Pengawetan Semen Ayam Merawang

*(EFFECTIVENESS OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND EGG YOLK
FROM CHICKEN AND QUAIL ON MERAWANG SEMEN PRESERVATION)*

**Magfira¹, Raden Iis Arifiantini²,
Ni Wayan Karniani Karja², Sri Darwati³**

Program Studi Biologi Reproduksi,
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Divisi Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, IPB

³Fakultas Peternakan IPB

Telp 0251-8623940; Email: Iis.arifiantinipurna@gmail.com

ABSTRACT

The successful of artificial insemination (AI) depends on the semen quality and extender. To minimize effect of cold shock during storage, extender is added with egg yolk. The objectives of this study were to compare the effectiveness of pure Low Density Lipoprotein (LDL) and egg yolk from domestic chicken and quail on motility and longevity of Merawang chicken sperm. The semen was collected by massage method from three Merawang roosters. Immediately after collection, semen was evaluated macroscopically and microscopically. Only semen demonstrated >70% motility and <20% sperm abnormality were used in this study. Semen divided into four aliquots and diluted with Lactate Ringer (LR) LDL chicken (RL-LDL-C), LR-LDL quail (LR-LDL-Q), LR-chicken Egg Yolk (LR-CEY), Ringer Lactate quail Egg Yolk (RL-QEY). Diluted semen than stored at 5°C. Sperm motility was examined twice a day and the longevity of sperm was determined every day until the sperm reach 0% motility. The motility of spermatozoa in the LR-LDL diluent differed from the sperm motility in the RL-QEY diluent at the 60th and 72th hour ($P < 0.05$) post-storage. However, there was no difference in motility sperm in LR-LDL-C, RL-LDL-Q and RL-CEY. Additionally, there is no difference ($P > 0.05$) in spermatozoa longevity in the four diluents, with a range of longivities between 4.43 to 5.93 days.

Keywords: merawang rooster; spermatozoa; LDL chicken; LDL quail; egg yolk.

ABSTRAK

Keberhasilan inseminasi buatan (IB) salah satunya bergantung pada kualitas semen dan pengencer yang digunakan. Dalam meminimalisir pengaruh *cold shock* saat penyimpanan, pengencer ditambahkan dengan kuning telur. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan efektivitas *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan kuning telur yang berasal dari ayam kampung dan puyuh terhadap motilitas dan longivitas spermatozoa ayam. Koleksi semen dilakukan menggunakan metode pemijatan pada tiga ekor ayam merawang. Setelah semen dikoleksi, selanjutnya semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang menunjukkan motilitas 70% dan abnormalitas kurang dari 20% dibagi empat dan diencerkan menggunakan Ringer Laktat-LDLA (RL-LDLA), Ringer Laktat-(RL-LDLP), Ringer Laktat-kuning telur ayam (RL-KTA), dan RL-kuning telur puyuh (RL-KTP). Semen yang telah diencerkan kemudian disimpan pada suhu 5°C. Motilitas spermatozoa diamati dua kali sehari sampai motilitas mencapai 0%. Motilitas spermatozoa dalam pengencer RL-LDLA berbeda dengan motilitas spermatozoa dalam pengencer RL-KTP pada jam ke-60 dan ke-72 ($P < 0.05$) pascapenyimpanan. Akan tetapi tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa dalam RL-LDLA, RL-LDLP dan RL-KTA. Longivitas spermatozoa dalam empat pengencer tidak terdapat perbedaan ($P > 0.05$) dengan rentang longivitas antara 4,43 sampai 5,93 hari.

Kata-kata kunci: ayam merawang; spermatozoa; LDL ayam; LDL puyuh; kuning telur

PENDAHULUAN

Jenis ayam lokal yang terdapat di Indonesia sangat beragam dan umumnya setiap ayam diberi nama sesuai dengan daerah asal ayam tersebut. Salah satunya adalah ayam merawang yang berasal dari Desa Merawang, Kecamatan Merawang, Kabupaten Bangka, Provinsi Bangka Belitung. Ayam merawang tergolong istimewa karena memiliki ukuran telur dan bobot badan yang lebih besar daripada ayam kampung biasa (Abubakar *et al.*, 2005). Keunggulan tersebut tidak didukung dengan manajemen yang baik oleh peternak. Sistem pengawinan masih secara alamiah dan tidak terkontrol sehingga perkembangan ayam merawang masih terbilang lambat. Oleh karena itu, pengembangbiakan melalui teknologi inseminasi buatan (IB) untuk keberlanjutan ayam merawang perlu dilakukan.

Inseminasi buatan adalah proses kawin buatan dengan bantuan manusia menggunakan alat untuk mendeposisikan spermatozoa pada saluran reproduksi betina. Keberhasilan IB sangat bergantung pada kualitas spermatozoa yang akan diinseminasikan. Ridwan, (2008) menyatakan faktor pengencer juga dapat menjadi penentu keberhasilan IB, yaitu bahan dan proses pengenceran semen. Larutan pengencer digunakan untuk memperbanyak volume semen sehingga optimalisasi penggunaan pejantan untuk dapat melayani betina dalam jumlah yang banyak bisa tercapai.

Salah satu bahan yang ditambahkan dalam pengencer semen adalah kuning telur. Kuning telur mengandung lesitin dan *phospholipid* (Aboagla dan Terada, 2004), sangat bermanfaat dalam melindungi membran spermatozoa saat kriopreservasi, karena dapat mencegah spermatozoa dari *cold shock* (Amirat *et al.*, 2004; Akal *et al.*, 2014). Penggunaan kuning telur pada preservasi semen ternak mamalia umumnya adalah 20% (Ducha *et al.* 2013). Pada preservasi semen ayam penggunaan kuning maksimal hanya 5% (Hidayat, 2001), kandungan kuning telur yang tinggi dapat menyebabkan aglutinasi pada spermatozoa. Hal ini disebabkan karena kuning telur memiliki struktur molekul sebagai ovum yang dapat dibuahi oleh spermatozoa ayam sehingga ketika bertemu dengan molekul kuning telur spermatozoa tidak dapat bergerak lagi. Oleh karena itu dipandang perlu untuk mengekstraksi *low density lipoprotein* (LDL) yang berasal dari kuning telur.

Low density lipoprotein pertama kali

dipurifikasi Pace and Graham (1974) dan terbukti fraksi LDL memperlihatkan kemampuan sebagai bahan krioprotektan. Setelah beberapa peneliti melaporkan LDL dapat melindungi pengaruh *cold shock* dan meningkatkan motilitas setelah penyimpanan. Beberapa penelitian mengenai penggantian kuning telur dengan LDL untuk preservasi dan kriopreservasi semen pada berbagai ternak telah dilaporkan. Di antaranya pada pembekuan semen sapi (Manjunath *et al.*, 2002 Bergeron *et al.*, 2004; Amirat *et al.*, 2005; Vera-Munoz *et al.* (2011)), semen kambing (Al-Ahmad *et al.*, 2008), semen babi (Hu *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007) dan anjing (Neves, 2007; Varela *et al.*, 2009; Bencharif *et al.*, 2010).

Penggunaan kuning telur ayam dan puyuh telah dilaporkan, demikian juga penggunaan LDL dari ayam dan LDL dari puyuh dengan hasil yang bervariasi. Pengencer yang mengandung LDL dari telur ayam menunjukkan nilai viabilitas spermatozoa setelah pembekuan dan *thawing* yang tinggi dibandingkan dengan LDL yang berasal dari telur puyuh (Lei *et al.*, 2008). Shahverdi *et al.* (2015), menemukan bahwa penggunaan 4% LDL dalam *Beltsville Poultry Semen Extender* (BPSE) dapat meningkatkan fertilitas spermatozoa ayam, konsentrasi LDL lebih besar dari 4% justru menurunkan kualitas spermatozoa setelah pembekuan dan *thawing*.

Mengingat spermatozoa ayam sangat sensitif terhadap jumlah kuning telur yang tinggi, dan fungsi lipoprotein sangat penting dalam pengawetan/preservasi semen ayam merawang, maka penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kualitas spermatozoa ayam merawang dalam pengencer Ringer laktat dengan sumber lipoprotein dari LDL atau kuning telur yang berasal dari ayam atau puyuh yang disimpan pada suhu 5°C.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2016, di Laboratorium Lapang Ilmu Pemuliaan dan Genetika Ternak, Fakultas Peternakan dan di Unit Rehabilitasi Reproduksi, Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Instiut Pertanian Bogor.

Sumber Semen

Semen berasal dari tiga ekor ayam merawang berumur 1,0-1,5 tahun. Koleksi

semen dilakukan dua hari sekali. Ayam jantan ditempatkan pada kandang individu dengan ukuran 50x50x50 cm. Pemberian pakan sebanyak 100 g ekor⁻¹ hari⁻¹ diberikan dua kali sehari, pagi dan sore.

Ekstraksi *Low density lipoprotein* (LDL) dari Kuning Telur

Ekstraksi LDL mengadopsi metode Moussa *et al.* (2002) dengan sedikit modifikasi dari Rauch (2013). Ekstraksi LDL dilakukan dalam satu kali pengerjaan untuk menghindari faktor perbedaan individu. Kuning telur dipisahkan dari kalaza dan albumin. Kuning telur yang masih memiliki membran vitellin diambil menggunakan spuit, disimpan dalam gelas piala dan direndam dalam air es. Kuning telur ditambahkan dengan NaCl 0,17 M dengan perbandingan 1:2. Larutan dihomogenisasi menggunakan *magnetic stirrer* selama satu jam. Larutan disentrifus kecepatan 10.000 g selama 45 menit pada suhu 4°C. Supernatan ditambahkan amonium sulfat dengan perbandingan 23,3 g dalam 100 g kuning telur (Rauch 2013). Campuran di-*stirrer* kembali selama satu jam, disentrifus kembali kecepatan 10.000 g selama 45 menit, supernatan dipisahkan dari pelet dan dimasukkan ke dalam membran dialisis kemudian direndam selama 17 jam dalam aquades untuk menghilangkan amonium sulfat. Setelah 17 jam larutan disentrifus kembali dengan kecepatan 10.000 g selama 45 menit. Supernatan merupakan LDL yang digunakan untuk penelitian ini, dikoleksi dan dimasukkan dalam tabung kecil dan disimpan dalam suhu -20°C untuk analisis SDS-*Polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE).

Persiapan Pengencer

Pengencer dasar yang digunakan adalah Ringer laktat (RL). Pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah RL Kuning Telur Ayam (RL-KTA), RL LDL Ayam (RL-LDLA) dan RL LDL Puyuh (RL-LDLP), LDL yang digunakan sebanyak 4%.

Pengencer RL-KTA dan RL-KTP dibuat dengan cara menambahkan 5% KT ayam atau puyuh dengan RL. Larutan KT dan RL dihomogenkan dan disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Setelah sentrifugasi, supernatan diambil dan digunakan sebagai pengencer semen. Semua pengencer di-*ajust* menggunakan Tris hingga pH 6,8- 7, ditambah antibiotik penisilin (1.000 IU) dan streptomisin (1 mg) per mL pengencer.

Koleksi dan Pengolahan Semen

Semen dikoleksi menggunakan metode massage (pemijatan) dan ditampung menggunakan mikrotub. Semen selanjutnya dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang menunjukkan motilitas lebih dari 70% dengan abnormalitas kurang dari 20% dibagi menjadi empat bagian dan diencerkan masing-masing dengan empat pengencer yaitu RL-LDL-A, RL-LDL-P, RL-KT-A, RL-KT-P dengan perbandingan 1:4 (50 µL semen : 200 µL pengencer). Setelah pengenceran, semen dievaluasi untuk melihat motilitas spermatozoa setelah pengenceran. Semen disimpan ke dalam lemari pendingin suhu 5°C. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam sampai spermatozoa menunjukkan motilitas 0%.

Peubah Uji dan Analisis Data

Kualitas semen segar ayam merawang dan motilitas spermatozoa ayam merawang dalam empat macam bahan pengencer, setelah pengenceran dan setiap 12 jam penyimpanan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Tersarang (RALT). Seluruh data ditransformasi dan dianalisis menggunakan sidik ragam. Jika terdapat perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji banding berganda Least Significant Different dan uji Duncan menggunakan taraf signifikansi 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

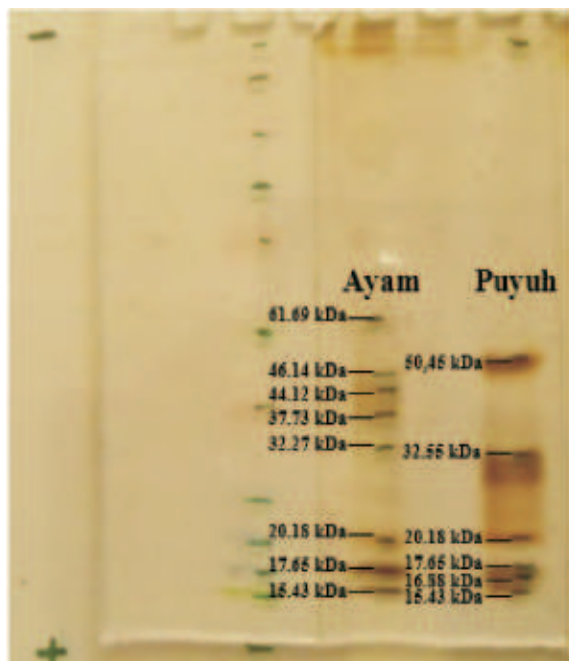
Komponen Protein pada *Low Density Lipoprotein* Ayam dan Puyuh

Komponen protein yang terkandung dalam LDL diidentifikasi menggunakan SDS-PAGE. Protein LDL dari kuning telur ayam dan puyuh menunjukkan jumlah fraksi yang berbeda. Protein pada LDL ayam teridentifikasi ada delapan fraksi dengan bobot molekul (BM) berkisar antara 15,43-61,69 kDa. Hasil ini lebih banyak dibandingkan dengan protein LDL dari telur puyuh yang hanya enam fraksi dengan BM 15,43-50,45 kDa (Gambar 1).

Fraksi protein LDL unggas berbeda-beda. Badry *et al.* (2015) melaporkan fraksi protein LDL ayam hanya tiga, dengan BM 57,72 dan 125 kDa, sementara Mousa *et al.* (2002) menemukan enam fraksi protein dengan BM 15 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 80 kDa, 140 kDa, dan 175 kDa. Jolivet *et al.* (2006) melaporkan sembilan fraksi protein dalam LDL ayam dengan BM 8 kDa, 15 kDa, 55 kDa, 62 kDa, 73 kDa, 96

kDa, 98 kDa, 118 kDa dan 190 kDa. Pada kalkun El-Badry *et al.* (2015) melaporkan terdapat empat fraksi protein LDL dengan BM 42, 57, 125, dan 165 kDa.

Jolivet *et al.* (2006) lebih lanjut melaporkan protein pada LDL Ayam ada dua jenis yaitu apovitellenin I dengan BM 15 kDa dan hen apolipoprotein B dengan BM di atas 55 kDa (Gambar 1). Penelitian ini menemukan dua jenis protein pada LDL ayam dan satu jenis protein pada LDL puyuh.



Gambar 1. Fraksi protein pada *Low Density Lipoprotein* (LDL) ayam dan puyuh, menggunakan *Polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE).

tersebut menentukan kemampuan LDL dalam preservasi spermatozoa.

Kualitas Semen Segar Ayam Merawang

Kualitas semen segar ayam merawang menunjukkan volume semen 0,43 mL, berwarna putih susu, dengan pH 7,0 dan konsistensi yang kental. Kualitas mikroskopis menunjukkan gerakan masa positif tiga (+++), motilitas spermatozoa 81,50%, konsentrasi spermatozoa 5,046.10⁶/mL semen, viabilitas spermatozoa 90,60% dengan abnormalitas spermatozoa hanya 2,58% (Tabel 1).

Motilitas Spermatozoa Ayam Merawang

Penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa ayam merawang dalam pengencer Ringer laktat, yang ditambahkan LDL ayam atau puyuh serta dan kuning telur ayam atau puyuh menunjukkan penurunan sejalan dengan waktu penyimpanan. Sampai dengan jam ke-24 penurunan motilitas setiap pengencer sama. Pada jam ke-36 spermatozoa dalam RL-LDLA dan RL-LDLP menunjukkan penurunan, sedangkan spermatozoa dalam pengencer RL-KTA dan RL-KTP tetap sama dengan jam ke-24 (Gambar 2).

Sampai jam ke-48 belum terlihat perbedaan kualitas antara LDL dengan kuning telur dalam pengencer RL. Motilitas spermatozoa pada masing-masing pengencer antara 41-48%, semuanya masih layak untuk diinseminasikan. Pada jam ke-60, baru terlihat adanya perbedaan karena bahan pengencer yang diberikan. Spermatozoa dalam bahan pengencer RL yang ditambahkan LDL ayam dan puyuh serta RL yang ditambahkan kuning telur ayam lebih baik

Tabel 1 Kualitas semen segar ayam merawang pada 3 individu

Parameter	M1	M2	M3	Rata-rata
Volume	0,28±0,06	0,43±0,07	0,59±0,09	0,43±0,05
Warna	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
pH	6,97±0,10	7,06±0,08	7,04±0,06	7,02±0,05
Konsistensi	Kental	Kental	Kental	Kental
Konsentrasi spermatozoa (juta/mL)	4745,0±750,72	6162,50±1452,54	4232,50±672,30	5046,67±588,47
Gerakan Massa	3,00	3,00	3,00	3,00
Motilitas spermatozoa (%)	81,00±1,45	82,00±2,00	81,50±2,11	81,50±1,05
Viabilitas spermatozoa (%)	89,29±1,66	90,40±1,11	92,11±1,40	90,60±0,82
Abnormalitas spermatozoa (%)	3,03±0,60	2,22±1,11	2,49±0,57	2,58±0,31

($P < 0,05$) dibandingkan spermatozoa dalam RL kuning telur puyuh. Spermatozoa dalam pengencer RL kuning telur meskipun secara statistika tidak berbeda dengan spermatozoa RL-LDL-A dan RL-LDL-P, namun motilitasnya berada di bawah 40%, sehingga tidak layak diinseminasikan.

Salah satu metode preservasi semen adalah dengan menurunkan suhu penyimpanan. Penurunan suhu dari suhu normal (37°C) ke suhu 4°C dapat menurunkan aktivitas metabolik dan mempertahankan daya hidup spermatozoa (Barbas dan Mascarenhas, 2008). Preservasi pada suhu 4°C , spermatozoa masih melakukan metabolisme, sehingga motilitas spermatozoa menurun sejalan dengan waktu penyimpanan. Perubahan suhu dapat menginduksi stres pada membran (Watson, 2000) karena adanya perubahan fase pada lipid dan mengubah struktur membran. Oleh karena itu, hal yang sangat penting pada proses preservasi semen adalah komposisi dari pengencer semen.

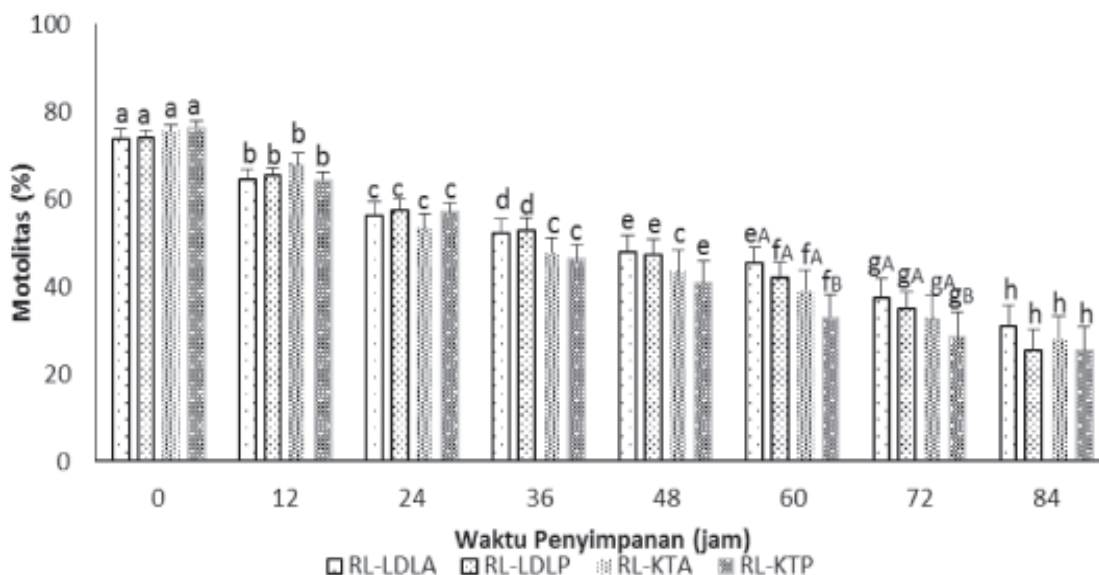
Pengencer yang baik adalah pengencer yang dapat mempertahankan daya tahan spermatozoa sampai saat digunakan untuk inseminasi. Hasil penelitian ini berbeda dengan laporan Vera-munoz *et al.* (2011) yang melaporkan pengaruh LDL dalam preservasi semen sapi dan kerbau terlihat pada hari ke-6 (144 jam) dan ke-8 (192 jam). Vera-Munoz *et al.* (2011) juga melaporkan

bahwa pengencer yang mengandung LDL memiliki keunggulan dalam mempertahankan motilitas, integritas membran plasma, dan integritas akrosom spermatozoa pada suhu 4°C .

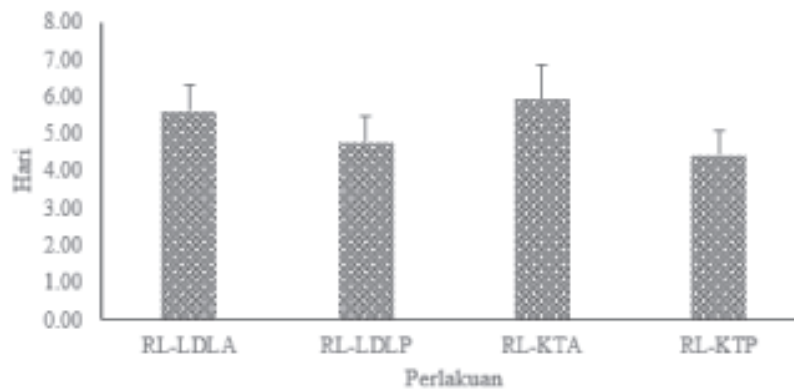
Struktur LDL memiliki inti trigliserida dan dikelilingi oleh lapisan protein dan fosfolipid yang memiliki residu polar di bagian yang bersentuhan langsung dengan air (Trimeche *et al.*, 1997). Lebih lanjut dinyatakan bahwa fosfolipid yang berasal dari kuning telur dapat menyatu dengan membran spermatozoa dan menggantikan sejumlah fosfolipid yang rusak pada saat pembekuan. El-Sharawy *et al.* (2012), melaporkan pengencer yang mengandung 12% LDL, memiliki daya perlindungan akrosom yang lebih baik daripada pengencer yang mengandung 20% kuning telur.

Longivitas Spermatozoa Ayam Merawang pada Suhu 5°C

Longivitas spermatozoa diamati sampai spermatozoa tidak mampu bergerak. Hasil penelitian menunjukkan spermatozoa yang diencerkan menggunakan empat jenis pengencer yaitu RL-LDLA, RL-LDLP, RL-KTA, dan RL-KTP tidak menunjukkan perbedaan ($P > 0,05$). Longivitas spermatozoa dalam empat pengencer tidak berbeda, tetapi terdapat variasi longivitas diantara tiga ekor yang digunakan dalam penelitian ini. Longivitas spermatozoa ayam



Gambar 2. Motilitas spermatozoa ayam Merawang pada 5°C selama 84 jam dalam pengencer RL-LDL ayam (RL-LDLA), RL-LDL puyuh (RL-LDLP), RL- kuning telur ayam (RL-KTA) dan RL-kuning telur puyuh (RL-KTP). Huruf berbeda pada bar yang sama menunjukkan perbedaan motilitas pada setiap waktu pengamatan ($P < 0,05$) dan huruf ^{A,B} menunjukkan perbedaan motilitas pada setiap perlakuan ($P < 0,05$).



Gambar 3 Longevitas spermatozoa merawang dalam 4 pengencer

Keterangan : RL-LDL-A (Ringer Laktat – Low Density Lipoprotein Ayam); RL-LDL-P (Ringer Laktat – Low Density Lipoprotein Puyuh); RL-KT-A (Ringer Laktat – Kuning Telur Ayam); RL-KT-P (Ringer Laktat – Kuning Telur Puyuh)

merawang dalam empat pengencer adalah 4,43-5,93 hari (Gambar 3).

Laporan perihal longivitas spermatozoa pada ayam belum banyak tersedia. Wicaksono dan Arifiantini (2008), melaporkan longivitas pada spermatozoa anjing selama 84 jam (3,5 hari). Bozkurt *et al.* (2007) melaporkan longivitas spermatozoa kuda yang disimpan pada suhu 5°C bergantung pada konsentrasi spermatozoa dan medium pengencer. Semakin tinggi konsentrasi spermatozoa semakin pendek longivitasnya. Selain itu Helfenstein *et al.* (2009) melaporkan bahwa panjang ekor spermatozoa memengaruhi motilitas dan longivitas spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki ekor yang panjang memiliki motilitas yang tinggi tetapi longivitasnya rendah. Sebaliknya spermatozoa yang pendek memiliki motilitas rendah tetapi longivitasnya tinggi. Ayam memiliki ekor spermatozoa yang lebih panjang dibandingkan spermatozoa lainnya, sehingga kemungkinan longivitasnya pendek.

SIMPULAN

Spermatozoa yang diencerkan menggunakan ringer laktat yang ditambahkan dengan LDL memiliki masa layak IB lebih lama jika dibandingkan dengan penambahan telur ayam. Spermatozoa dalam pengencer Ringer laktat yang diberi LDL ayam dan puyuh, serta kuning telur ayam dan kuning telur puyuh pada suhu 5°C memiliki longevitas yang sama.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh LDL terhadap daya tahan spermatozoa di saluran reproduksi ayam betina. Proses ekstraksi LDL masih mahal sehingga masih belum layak untuk dikomersialkan, oleh karena itu disarankan untuk mencari alternatif biaya ekstraksi yang lebih murah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, Pambudi GT, Sunarto. 2005. Performans ayam buras dan biosekurita di balai pembibitan ternak unggul sapi dwiguna dan ayam. Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Pengembangan Ayam Lokal
- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effect of egg yolk during freezing strep of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.
- Al-Ahmad MZA, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Dom Anim* 43: 429-436
- Akal E, Kocyigit A, Selcuk M. 2014. Role of low density lipoproteins in semen Preservation. *J Kocatepe Vet* 7(1): 69-74

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneua J. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907
- Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129: 535-543.
- Badry DAE, Rawaz ZM, Elaal MBA, Ali AH. 2015. The effect of LDL from different bird's eggs on the freezability of buffalo spermatozoa. *Global Vet* 14(2): 158-165
- Barbas J, Mascarenhas RD. 2008. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10: 49-62
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D. 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex (R) and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci* 119: 305-313.
- Bergeron A, Crête MA, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-Density Lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol of Reprod* 70: 708-717.
- Bozkurt T, Türk G, Gür S. 2007. The time-dependent motility and longevity of stallion spermatozoa diluted in different spermatozoal concentrations and extenders during cool-storage. *Revue Med Vet* 158(02): 67-72
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer cep-2 dengan suplementasi kuning telur. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(1): 5-8
- El-Sharawy ME, El-Shamaa IS, Ibrahim MAR, Abd El-Razek IM, El-Seify EM. 2012. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of egyptian buffalo bull semen. *Scientific Papers Ani Sci Series D Vol. LV*
- Gazali M, Tambing SN. 2002. Kriopreservasi sel spermatozoa. *Hayati* 9(1): 27-32
- Helfenstein F, Murielle Podevin M, Richner H. 2009. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behav Ecol Sociobiol* 64: 557-565
- Hidayat T. 2001. Pengaruh bahan pengencer laktat ringer kuning telur dan lama penyimpanan semen terhadap fertilitas telur ayam buras. Bogor. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
- Jiang Z, Li Q, Li W, Hu JH, Zhao HW, Zhang SS. 2007. Effect of low density lipoproteins on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim Reprod Sci* 99: 401-407.
- Hu J, Li QW, Li G, Xiao, Chen XY, Yang H, Zhang SS, Li-Qiang Wang LQ. 2006. The Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. *Asian-Aust J Anim Sci* 19(4): 486-494
- Jolivet P, Boulard C, Beaumal V, Chardot T, Anton M. 2006. Protein Components of Low-Density Lipoproteins Purified from Hen Egg Yolk. *J Agric Food Chem* 54: 4424-4429
- Lei S, Xilong L, Jiexia Q, Shihua Y, Yahui L, Xiechao H, Xianghui. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 104: 212-219.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol of Reprod* 67: 1250-1258.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-706.
- Neves MM. 2007. Low density lipoproteins extraction from *Gallus domesticus* egg yolk and its application in canine sperm cryopreservation. *PhD Thesis*. Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

- Rauch A. 2013. Cryopreservation of bovine semen in egg yolk based extenders. *Thesis*. Saskatoon. University of Saskatchewan.
- Ridwan, 2008. Jenis Pengencer semen terhadap motilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa ayam buras pada penyimpanan suhu 5°C. *J Agroland* 15(3): 229-235.
- Shahverdi A, Sharaû A, Gourabi H, Yekta A A, Esmacili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M, Mostafayi F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawing rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology* 83: 78-85
- Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34: 385-93
- Varela-Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MV, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia T, Deschamps JC. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci* 115: 323-327.
- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Shmitt, Thorin C, Tainturier. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4°C. *Asian J of Androl* 13: 281-286
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492
- Wicaksono A, Arifiantini RI. 2008. Uji banding empat bahan pengencer untuk preservasi semen anjing retriever. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 14(1): 50-57.