

## **Efektivitas Air Buah Lontar dalam Mempertahankan Motilitas, Viabilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi Bali**

*(THE EFFECTIVENESS OF PALMYRA JUICE IN MAINTAINING MOTILITY,  
VIABILITY AND LONGEVITY OF BALI CATTLE SPERM)*

**Thomas MataHine, Burhanuddin, Aloysius Marawali**

Laboratorium Biologi Reproduksi dan Kesehatan Ternak,  
Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana  
Jl. Adisucipto Penfui, Kupang-NTT, 85000  
*Email: thomasmatahine@yahoo.co.id*

### **Abstrak**

Penelitian dilakukan untuk menguji efektivitas pengencer air buah lontar-kuning telur dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali selama penyimpanan *in vitro*. Semen ditampung dari seekor sapi bali jantan berumur sekitar empat tahun yang sebelumnya telah dilatih untuk penampungan semen dengan vagina buatan. Semen yang berkualitas baik dibagi ke dalam empat tabung untuk dikenakan perlakuan: tanpa pengencer (kontrol negatif), sitrat-kuning telur (sitrat-KT) dan air kelapa-kuning telur (AKp-KT) sebagai kontrol positif; dan air buah lontar-kuning telur (AbL-KT) dan selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 3-8°C. Masing-masing perlakuan diulang lima kali sehingga terbentuk 20 unit percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hingga hari keempat penyimpanan, persentase motilitas spermatozoa dalam pengencer AbL-KT yaitu 44%, lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) daripada sitrat-KT, AKp-KT dan tanpa pengencer yaitu masing-masing 30%, 18%, dan 0%. AbL-KT juga memiliki persentase viabilitas spermatozoa 60%, lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) daripada pengencer sitrat-KT, AKp-KT dan tanpa pengencer yaitu masing-masing 50%, 32%, dan 0%. Daya tahan hidup spermatozoa mencapai 11,20 hari pada pengencer AbL-KT, lebih lama ( $P < 0,05$ ) daripada sitrat-KT, AKp-KT dan tanpa pengencer yaitu masing-masing 9,60 hari, 7,60 hari, dan 1,31 hari. Disimpulkan bahwa pengencer air buah lontar-kuning telur efektif untuk mempertahankan viabilitas, motilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali selama preservasi *in vitro*.

Kata Kata Kunci : air buah lontar, kuning telur, motilitas, viabilitas, daya tahan hidup, spermatozoa, sapi bali

### **Abstract**

The objective of this study was to determine the effectiveness of palmyra juice in maintaining motility, viability, and longevity of bali cattle sperm during *in vitro* storage. Semen collected from a four year old bali bull had been trained to serve an artificial vagina. Good quality semen divided into four tubes to be treated with: without extender (negative control), citrate-egg yolk (citrate-EY) and coconut water-egg yolk (CW-EY) as positive control; and palmyra juice-egg yolk (PJ-EY), and then stored in a refrigerator at temperature 3 - 8°C. Each treatment was repeated five times to form 20 experimental units. The results showed that up to the fourth day of storage, sperm preserved in PJ-EY had motility 44%, higher ( $P < 0.05$ ) than citrate-EY, CW-EY, and without extender, i.e 30%, 18%, and 0%, respectively. PJ-EY extender also yield sperm viability 60%, higher ( $P < 0.05$ ) than citrate-EY, CW-EY, and without extender i.e 50%, 32% and 0%, respectively. Sperm livability achieve 11.20 days in PJ-EY, longer ( $P < 0.05$ ) than citrate-EY, CW-EY and without extender, i.e 9.60 days, 7.60 days, and 1.31 days, respectively. In conclusion that palmyra juice-egg yolk extender effective to maintain motility, viability, and longevity of bali cattle sperm during *in vitro* preservation.

Keywords: palmyra juice, egg yolk, motility, viability, longevity, sperm, bali cattle

## PENDAHULUAN

Preservasi semen memiliki arti yang sangat penting dalam penerapan bioteknologi Inseminasi Buatan (IB) pada berbagai jenis hewan khususnya sapi. Dengan melakukan preservasi maka spermatozoa yang terdapat di dalam semen akan bertahan hidup lebih lama sehingga semen dari satu ejakulat dapat digunakan dalam suatu periode waktu yang lebih panjang untuk inseminasi pada sejumlah betina. Preservasi semen hanya dimungkinkan pada suhu yang lebih rendah dari suhu tubuh karena pada suhu yang demikian derajat metabolisme sel menjadi rendah sehingga memperpanjang daya hidup spermatozoa (Lemma, 2011). Penyimpanan pada suhu rendah dalam waktu yang relatif lama memiliki dampak negatif yaitu dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Batellier *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 2002; Watson, 2000), baik yang disebabkan karena kejutan dingin akibat adanya penurunan suhu (Lessard *et al.*, 2000), kehabisan energi, maupun akibat kontaminasi dengan mikroorganisme. Dengan demikian, ke dalam semen perlu ditambahkan berbagai komponen yang berfungsi selain untuk memperbanyak volume semen (pengencer) juga berfungsi untuk melindungi spermatozoa selama penyimpanan *in vitro*.

Beberapa bahan yang sudah umum digunakan untuk mengencerkan semen adalah sitrat (Bohlooli *et al.*, 2012) yang peranan utamanya adalah untuk mempertahankan pH (buffer), dan air kelapa muda yang berperan sebagai sumber energi karena mengandung karbohidrat terutama glukosa, fruktosa, dan sukrosa (Yong *et al.*, 2009). Kedua bahan tersebut diperkaya dengan berbagai komponen tambahan seperti kuning telur, antibiotik, dan berbagai komponen lainnya (Akhter *et al.*, 2007; Kulaksiz *et al.*, 2010; Lemma, 2011) sehingga terbentuk suatu pengencer komplit yang mampu menyuplai semua kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan *in vitro*.

Air buah lontar (*Borassus flabelliter*) merupakan salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai pengencer semen sapi karena mengandung karbohidrat yang cukup tinggi. Hasil analisis komposisi kimia air buah lontar menunjukkan bahwa kadar karbohidrat mencapai 4,19% lebih tinggi daripada air kelapa yaitu 1,56% (Mata Hine, 1991). Dengan kandungan karbohidrat yang demikian maka air buah lontar berpotensi untuk dijadikan

sebagai salah satu bahan pengencer semen terutama sebagai alternatif pengganti berbagai bahan pengencer seperti susu dan sitrat yang seringkali tidak selalu tersedia dan harganya relatif mahal khususnya di beberapa daerah tertentu. Hingga saat ini belum ada informasi tentang penggunaan air buah lontar sebagai pengencer semen sehingga perlu dilakukan suatu kajian tentang efektivitas bahan tersebut sebagai pengencer semen sapi bali.

Dalam studi ini air buah lontar dikombinasikan dengan kuning telur untuk menghasilkan pengencer yang komplit sehingga dapat memenuhi sebagian besar kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan *in vitro*. Kuning telur merupakan komponen penting dalam pengencer semen hewan domestik, karena berperan melindungi membran plasma dan akrosom selama proses preservasi atau kriopreservasi (Amirat *et al.*, 2004). Fosfolipid, kolesterol, dan *low density lipoprotein* yang terkandung di dalam kuning telur berperan melindungi spermatozoa terhadap *cold shock* selama proses pendinginan (Kulaksiz *et al.*, 2010). Kombinasi karbohidrat yang terkandung di dalam air buah lontar dengan fosfolipid, kolesterol, dan *low density lipoprotein* yang terkandung di dalam kuning telur akan menjadi substrat yang sangat potensial dalam menunjang motilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa. Penelitian ini dilaksanakan untuk menguji efektivitas pengencer air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali selama penyimpanan *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan Bahan Pengencer

Bahan pengencer air buah lontar-kuning telur (AbL-KT) dipersiapkan dengan cara: buah lontar yang masih muda dipotong dengan parang steril pada bagian matanya, hingga pelindung pada setiap mata buah lontar terlihat. Air buah lontar yang terdapat pada setiap mata buah lontar disedot dengan spuit steril dan selanjutnya ditempatkan ke dalam gelas ukur, dan ditutup dengan kertas alumunium steril. Ke dalam air buah lontar tersebut ditambahkan kuning telur 20%; penisilin 1000 IU dan streptomisin 1mg µg per mL pengencer (Bohlooli *et al.*, 2012). Air kelapa-kuning telur (AKp-KT) dibuat dengan memotong kelapa yang masih muda dengan parang pada salah satu ujung yang

tumpul. Setelah bagian isi kelapa terlihat dimasukkan jarum spuit ke dalam kelapa sambil menyedot air kelapa tersebut ke dalam spuit. Masukkan air kelapa ke dalam gelas ukur, tutup dengan kertas *aluminium foil*. Tambahkan kuning telur, penisilin dan streptomisin seperti pada pengencer AbL-KT. Komposisi pengencer sitrat-KT adalah 2,9 g natrium sitrat dalam 100 mL aquades, diaduk hingga homogen, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring. Larutan sitrat yang telah disaring dimasukkan ke dalam gelas ukur. Tambahkan kuning telur, penisilin dan streptomisin seperti pada pengencer AbL-KT.

#### **Penampungan dan Evaluasi Semen Segar**

Seekor sapi bali jantan berumur sekitar empat tahun diseleksi untuk penampungan semen. Semen ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Semen ditempatkan dalam sebuah termos (suhu 35°C), dan kualitas semen dievaluasi baik secara makroskopis: volume, warna, konsistensi, dan pH; maupun secara mikroskopis: konsentrasi, densitas, viabilitas, gerakan massa, gerakan individu, dan abnormalitas spermatozoa. Semen yang berkualitas baik (gerakan individu spermatozoa  $\geq 70\%$ , konsentrasi  $\geq 500 \times 10^6$  dan abnormalitas  $\leq 20\%$ ) dibagi ke dalam empat tabung sesuai dengan jumlah perlakuan. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan (kontrol, AbL-KT, AKp-KT, sitrat-KT) dan lima ulangan (penampungan) sehingga terbentuk 20 unit percobaan.

#### **Pengenceran dan Penyimpanan Semen Cair**

Terhadap semen yang berkualitas baik dilakukan perhitungan kadar pengenceran, dengan catatan bahwa dalam satu milliliter semen cair mengandung  $5 \cdot 10^6$  juta spermatozoa hidup dan motil progresif. Setelah itu, semen diencerkan dengan bahan pengencer yang telah disiapkan yaitu: AbL-KT, AKp-KT, sitrat-KT. Semen cair yang terdapat pada masing-masing perlakuan dibagi lagi menjadi 15 tabung kecil, ditutup rapat dan diberi tanda. Tabung-tabung semen tersebut ditempatkan dalam termos yang diisi dengan balon karet berisi air es, dan setelah dua jam tabung semen dipindahkan ke dalam lemari pendingin pada suhu 3-8°C. Pemeriksaan evaluasi terhadap motilitas, viabilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa dilakukan setiap 24 jam.

#### **Evaluasi Semen Cair**

Motilitas spermatozoa diestimasi menggunakan mikroskop. Guna mengevaluasi parameter ini, satu tetes semen cair ditempatkan di atas meja pemanas (37°C), dan spermatozoa dengan motilitas progresif dihitung menggunakan lensa objektif dengan pembesaran 40x. Viabilitas spermatozoa diukur menggunakan pewarna eosin. Spermatozoa hidup yang memiliki membran sel yang utuh tidak akan menyerap eosin sehingga warnanya tetap dan tidak berubah sedangkan spermatozoa mati akan menyerap zat warna eosin karena permeabilitas membrannya meningkat sehingga warnanya berubah menjadi merah. Daya tahan hidup diukur berdasarkan lama penyimpanan hingga spermatozoa tidak ada yang bergerak.

#### **Analisis Data**

Data ditampilkan sebagai rata-rata  $\pm$  simpangan baku (rata-rata  $\pm$  SB). Analisis data menggunakan sidik ragam/*analysis of variance* Uji Duncan digunakan untuk mengukur perbedaan secara statistika antara bahan pengencer.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kualitas semen merupakan faktor penentu fertilitas pejantan baik melalui perkawinan alam maupun perkawinan buatan, dan dengan demikian fertilitas seekor pejantan dapat dinilai berdasarkan kualitas semen yang dihasilkan oleh setiap ejakulat. Evaluasi kualitas semen selalu dilaksanakan sebelum semen tersebut diproses selanjutnya, yang pada mamalia parameter semen yang dianalisis adalah konsentrasi, motilitas, morfologis dan viabilitas spermatozoa, volume, konsistensi, warna, dan pH semen (Tabel 1).

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semen yang ditampung selama lima kali penampungan berada pada kisaran kualitas semen yang layak diproses untuk kegiatan inseminasi buatan. Walaupun demikian, karakteristik semen yang diperoleh berbeda antar penampungan. Hal ini diduga akibat adanya perbedaan sensitivitas ternak terhadap rangsangan yang diberikan pada setiap kali penampungan. Rangsangan seksual akan sangat menentukan jumlah dan kualitas semen yang dihasilkan. Semakin tinggi tingkat sensitivitas terhadap rangsangan akan semakin banyak semen yang diejakulasikan dan

Tabel 1. Karakteristik semen sapi bali yang digunakan dalam penelitian

Penilaian	Penampungan				
	I	II	III	IV	V
<b>Makroskopis:</b>					
- Volume (mL)	3,4	2,0	2,8	2,2	3,7
- Konsistensi	Kental	Sedang	Kental	Kental	Kental
- Warna	Krem	Susu	Krem	Krem	Krem
- pH	7	7	7	7	7
<b>Mikroskopis:</b>					
- Gerakan massa	+++	++	+++	+++	+++
- Gerakan Individu (%)	70p	70p	80p	70p	70p
- Densitas	D	SD	D	D	D
- Konsentrasi (10 <sup>6</sup> )	1.760	970	1.800	1.440	1.840
- Viabilitas (%)	80	82	92	85	84
- Abnormalitas (%)	14	11	7	8	10

**Keterangan:**

+++ : gelombang-gelombang tebal, banyak, gelap dan bergerak cepat

++ : gelombang-gelombang tipis, jarang dan lamban

p : bergerak progresif

D : densum (jarak antara dua kepala spermatozoa kurang dari panjang satu kepala

SD : Semi densum (jarak antara dua kepala spermatozoa lebih dari panjang satu kepala

kualitasnya juga akan semakin meningkat. Sebelum semen dicampur dengan bahan pengencer maka dilakukan perhitungan kadar pengenceran sehingga setiap milliliter semen cair mengandung minimal  $5 \cdot 10^6$  spermatozoa. Perhitungan kadar pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{kadar pengenceran} = \frac{\% \text{ gerakan individu} \times \text{konsentrasi}}{\text{dosis IB}}$$

Dengan demikian, untuk menghitung kadar pengenceran semen yang diperoleh pada penampungan I adalah:  $\frac{70\% \times 1.760 \text{ juta}}{5 \text{ juta}}$

= 246,4. Artinya, setiap mL semen ditambahkan pengencer hingga mencapai volume total 246,4 mL. Demikian juga cara perhitungan kadar pengenceran untuk semen pada penampungan lainnya. Dengan menggunakan rumus ini maka setiap milliliter semen cair mengandung  $5 \cdot 10^6$  spermatozoa motil progresif.

**Motilitas Spermatozoa**

Motilitas sangat penting bagi spermatozoa untuk melewati *cervix uteri* dan *uterotubal junction*, dan lebih penting lagi untuk penetrasi sel-sel kumulus dan zona pelusida sel telur. Oleh

karena itu, estimasi motilitas sangat penting dalam mengontrol kualitas semen. Oleh karena tujuan akhir preservasi semen adalah untuk inseminasi buatan maka peneliti menetapkan patokan yaitu hanya spermatozoa yang bergerak progresif aktif maju ke depan yang diperhitungkan sebagai spermatozoa motil sedangkan bagi spermatozoa yang bergerak di tempat, bergerak berputar, atau yang tidak bergerak tidak diperhitungkan sebagai spermatozoa motil, karena spermatozoa yang demikian tidak dapat membuahi sel telur. Motilitas spermatozoa pada keempat perlakuan seperti terlihat pada Tabel 2.

Persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan kontrol terlihat hanya bertahan satu hari dengan persentase yang sudah sangat rendah yaitu 8%, suatu gambaran contoh semen yang sudah tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Memasuki hari kedua penyimpanan spermatozoa pada perlakuan kontrol sudah tidak ada yang bergerak yang mengindikasikan bahwa semua spermatozoa sudah mengalami kematian. Hal ini sesuai dengan pernyataan Johnson *et al.*, (2000) bahwa motilitas spermatozoa bertahan hanya beberapa jam kecuali semen diencerkan dan disimpan pada suhu rendah. Di lain pihak, spermatozoa

Tabel 2. Persentase motilitas spermatozoa sapi bali pada pengencer air buah lontar-kuning telur, sitrat-kuning telur, dan air kelapa-kuning telur selama empat hari penyimpanan

Hari penyimpanan ke-	Kontrol (%)	Sitrat-KT (%)	AKp-KT (%)	AbL-KT (%)
0	72±4,47 <sup>a</sup>	72±4,47 <sup>a</sup>	72±4,47 <sup>a</sup>	72±4,47 <sup>a</sup>
1	8±2,74 <sup>a</sup>	64±5,48 <sup>b</sup>	64±6,52 <sup>b</sup>	70±3,54 <sup>c</sup>
2	0±0,00 <sup>a</sup>	54±8,94 <sup>c</sup>	48±8,37 <sup>b</sup>	60±7,07 <sup>d</sup>
3	0±0,00 <sup>a</sup>	44±11,94 <sup>c</sup>	30±10,00 <sup>b</sup>	54±5,48 <sup>d</sup>
4	0±0,00 <sup>a</sup>	30±7,07 <sup>c</sup>	18±4,47 <sup>b</sup>	44±8,94 <sup>d</sup>

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan

yang dipreservasi dalam ketiga pengencer relatif mengalami sedikit penurunan persentase motilitas sehingga persentase motilitas spermatozoa setelah satu hari penyimpanan pada ketiga pengencer masih berada di atas 60%. Besarnya penurunan persentase motilitas spermatozoa terendah pada hari pertama penyimpanan dihasilkan oleh pengencer AbL-KT yaitu 2%, sedangkan sitrat-KT dan AKp-KT masing-masing menurun 8%. Pada hari kedua penyimpanan, besarnya persentase penurunan motilitas pada spermatozoa yang dipreservasi pada pengencer AbL-KT dan sitrat-KT adalah 10%, lebih rendah daripada spermatozoa yang dipreservasi pada pengencer AKp-KT yaitu 16%. Pada hari ketiga penyimpanan, spermatozoa pada pengencer AbL-KT mengalami penurunan persentase motilitas yang lebih sedikit yaitu 6% dibandingkan dengan sitrat-KT 10% dan AKp-KT 18%. Pada hari keempat penyimpanan, besarnya penurunan persentase motilitas pada spermatozoa yang dipreservasi pada pengencer AbL-KT sebesar 10%, sitrat-KT 14% dan AKp-KT 12%. Dengan demikian, rata-rata penurunan persentase motilitas per hari pada spermatozoa yang dipreservasi dengan AbL-KT adalah 7%, lebih rendah dari sitrat-KT yaitu 10,5%, dan AKp-KT 13,5%. Dengan jumlah penurunan persentase motilitas yang relatif kecil menyebabkan spermatozoa yang dipreservasi dalam pengencer AbL-KT memiliki persentase motilitas yang lebih tinggi dari pengencer sitrat-KT dan AbL-KT. Berdasarkan persentase motilitas minimal yang layak digunakan untuk inseminasi buatan yaitu 40%, maka spermatozoa dalam pengencer AbL-KT masih layak digunakan hingga hari keempat penyimpanan, sedangkan pengencer sitrat-KT dan AKp-KT, masing-masing hanya dapat digunakan hingga hari ketiga dan kedua penyimpanan.

Besarnya penurunan persentase motilitas spermatozoa pada masing-masing perlakuan tidak sama, sehingga terlihat bahwa persentase motilitas spermatozoa setelah empat hari penyimpanan dalam pengencer AbL-KT lebih tinggi daripada kedua pengencer lainnya, sementara pengencer AKp-KT menghasilkan persentase motilitas spermatozoa terendah. Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap persentase motilitas spermatozoa. Hasil uji lanjut pada semua hari penyimpanan menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa pada ketiga pengencer lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) daripada kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi nutrisi dan unsur buffer ke dalam semen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Persentase motilitas spermatozoa pada pengencer AbL-KT mulai hari pertama hingga hari keempat penyimpanan berbeda ( $P < 0,05$ ) dengan pengencer sitrat-KT dan AKp-KT, dengan persentase motilitas spermatozoa tertinggi dihasilkan oleh pengencer AbL-KT, diikuti oleh sitrat-KT, dan terendah pada pengencer AKp-KT.

AbL-KT merupakan suatu pengencer memiliki kandungan substrat energi yang lebih tinggi daripada sitrat-KT atau AKp-KT, karena selain disumbangkan oleh air buah lontar yang kandungan karbohidratnya tiga kali lebih tinggi (4,19%) daripada air kelapa (1,56%), energi juga disumbangkan oleh kuning telur, sedangkan spermatozoa pada pengencer sitrat-KT hanya mendapat sumbangan energi dari glukosa yang terdapat di dalam kuning telur. Karbohidrat yang terkandung di dalam air buah lontar dapat berupa fruktosa, glukosa, sukrosa, atau jenis karbohidrat lainnya yang dapat dimetabolisir oleh spermatozoa menjadi energi yang siap pakai dalam bentuk *adenosine triphosphate* (ATP).

Arifiantini dan Purwantara (2010) melaporkan bahwa penambahan fruktosa ke dalam pengencer sitrat-KT meningkatkan motilitas spermatozoa dibandingkan dengan hanya sitrat-KT sendiri. Fruktosa dan glukosa dikenal sebagai gula sederhana yang memiliki bobot molekul rendah. Molekul-molekul yang memiliki bobot molekul rendah dapat melewati membran plasma spermatozoa dan memberikan energi untuk kehidupan dan pergerakan spermatozoa (Naing *et al.*, 2010).

Spermatozoa memerlukan suplai energi yang konstan untuk mempertahankan fungsi seluler yang dibutuhkan untuk hidup dan menyelesaikan tugasnya. Kebutuhan energi meningkat secara signifikan dengan permulaan motilitas aktif dan menjadi lebih besar lagi ketika motilitas hiperaktif dimulai (Varner dan Johnson, 2007). Banyak energi yang berasal dari luar sel diperlukan oleh spermatozoa untuk menambah tenaga yang dibutuhkan untuk perjalanan yang panjang dari epididimis ke sel telur dalam saluran reproduksi betina.

Nutrisi-nutrisi ini dimetabolisir secara intraseluler untuk menghasilkan energi siap pakai untuk proses-proses seluler terutama dalam bentuk ATP. Seperti kebanyakan sel-sel tubuh, spermatozoa memiliki perlengkapan metabolisme yang diperlukan untuk glikolisis, siklus asam sitrat, dan fosforilasi oksidatif. Senyawa ATP untuk spermatozoa terutama dihasilkan oleh glikolisis di dalam sitoplasma atau melalui fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria (Dziekonska *et al.*, 2009). ATP yang dihasilkan oleh fosforilasi oksidatif di dalam membran dalam mitokondria ditransfer ke mikrotubulus untuk menghasilkan motilitas. Produksi ATP dapat melalui jalur glikolisis atau siklus asam sitrat. Glikolisis selain sangat penting untuk fosforilasi protein dan fertilisasi juga berperan dalam produksi energi untuk pergerakan flagella. Pergerakan flagella adalah produk aktivitas *dynein* ATPase yang terlokalisir sepanjang flagellum dan tergantung pada suplai ATP yang berasal dari substrat metabolit seperti fruktosa atau glukosa (Mukai dan Okuno, 2004).

Senyawa ATP spermatozoa sapi berhubungan erat dengan motilitas spermatozoa (Reiger, 1997). Konsentrasi ATP spermatozoa berhubungan dengan kandungan energetik dan dengan demikian memengaruhi potensi fertilisasi (Mahmoud *et al.*, 1994). Beberapa peneliti menemukan korelasi positif antara

kandungan ATP spermatozoa manusia dengan konsentrasi, viabilitas, dan motilitas spermatozoa (Orlando *et al.*, 1994). Energi yang dihasilkan dari hasil metabolisme karbohidrat adalah berupa ATP (Yi *et al.*, 2008), yang selanjutnya akan dirombak menjadi *adenosine diphosphate* (ADP) dan *adenosine monophosphate* (AMP) (Ford, 2006) sehingga dihasilkan energi yang selanjutnya digunakan untuk pergerakan dan kelangsungan hidup spermatozoa. Kehabisan ATP dapat menyebabkan terhentinya pergerakan spermatozoa. Pembentukan kembali ATP dapat dilakukan dengan penambahan gugus fosforil yang berasal dari karbohidrat atau lemak yang terdapat di dalam pengencer. Dengan demikian, semakin tinggi kandungan karbohidrat atau lemak hingga taraf tertentu dalam pengencer, semakin tinggi pula energi yang dihasilkan untuk kehidupan dan motilitas spermatozoa.

Selain memiliki kandungan karbohidrat yang lebih tinggi yang dapat dijadikan sebagai substrat energi bagi motilitas spermatozoa, pengencer AbL-KT juga memiliki kapasitas *buffering* yang juga cukup tinggi, walaupun belum dilakukan identifikasi tentang unsur apa yang terkandung di dalam air buah lontar yang berperan dalam mempertahankan pH. Namun, berdasarkan hasil pengukuran pH pada hari keempat penyimpanan, pH AbL-KT hampir sama dengan sitrat-KT, dan pH keduanya masih lebih tinggi daripada pengencer AKp-KT. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pH pengencer AbL-KT mengalami penurunan yang relatif sedikit yaitu dari 6,50 pada hari ke-0 menjadi 5,51 pada hari keempat penyimpanan, dibandingkan dengan pengencer AKp-KT yaitu dari 6,04 menjadi 4,60. Pengencer AbL-KT pH-nya relatif tidak berbeda dengan pH sitrat-KT yaitu 5,70 pada hari keempat penyimpanan. Kondisi pH yang relatif rendah pada pengencer air kelapa mengakibatkan kerusakan dan kematian spermatozoa.

Secara umum, semakin lama waktu penyimpanan maka pH semen yang diencerkan akan semakin menurun yang menciptakan kondisi asam bagi spermatozoa yang disebabkan oleh metabolisme anaerobik dari berbagai substrat energi yang menghasilkan asam laktat (Junianto *et al.*, 2002). Derajat penurunan pH akan sangat tergantung pada kapasitas *buffering* pengencer yang digunakan. Semakin tinggi kapasitas *buffering* suatu pengencer maka semakin baik dalam mempertahankan pH, begitu pula sebaliknya.

Pada prinsipnya substrat energi berupa karbohidrat akan dimetabolisir oleh spermatozoa melalui jalur glikolisis, yang dalam kondisi anaerob selain menghasilkan sedikit energi juga menghasilkan asam laktat sebagai produk sampingan. Konsentrasi asam laktat akan semakin meningkat seiring dengan lama penyimpanan yang menyebabkan pH pengencer akan semakin menurun. Penurunan pH melampaui pH yang kondusif bagi kehidupan spermatozoa (pH 6,4-6,7 untuk spermatozoa sapi) akan menyebabkan kerusakan spermatozoa dan berlanjut pada kematian.

Secara umum tanpa melihat jenis bahan pengencer yang digunakan, persentase motilitas spermatozoa menurun seiring dengan lama penyimpanan. Hal ini mungkin disebabkan oleh semakin bertambahnya jumlah spermatozoa yang rusak akibat suhu dingin, berkurangnya energi yang tersedia di dalam medium (Hunter *et al.*, 2011; Shum *et al.*, 2011), serta umur spermatozoa yang semakin tua. Suhu dingin dapat mengganggu keutuhan membran sel. Arifiantini dan Purwantara (2010) mengemukakan bahwa viabilitas dan motilitas spermatozoa dihubungkan dengan keutuhan membran plasma spermatozoa. Jika membran plasma pada bagian tengah spermatozoa mengalami kerusakan, maka enzim aspartat aminotransferase (AspAT), yang merupakan enzim mitokondria utama dalam produksi ATP, dikeluarkan dari dalam sel dan bercampur dengan pengencer atau plasma semen. Ketidakterdapatannya AspAT mengganggu produksi ATP dan menghambat motilitas spermatozoa (Colenbrander *et al.*, 1992). Selain itu, penurunan motilitas juga dapat disebabkan terpengaruhnya kerja enzim *ATP-ase-linked sodium-potassium pump* akibat suhu dingin yang selanjutnya akan menyebabkan kebocoran ion. Suhu dingin juga dapat menginduksi terjadinya kapasitasasi

prematur pada spermatozoa yang selanjutnya berdampak pada penurunan daya tahan hidup spermatozoa.

Kejutatan dingin dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel yang disebabkan oleh penurunan temperatur (Ejarah, 2007). Spermatozoa yang didinginkan ke suhu 5°C dapat mengalami *cold shock*, yang mengakibatkan kerusakan struktur dan biokimiawi. Khususnya, membran akan kehilangan permeabilitas selektifnya dan berdampak pada banyak komponen seluler seperti lipid, protein, dan ion yang dilepaskan. Untuk mencegah *cold shock* maka dapat digunakan kuning telur. Aksi protektif dari kuning telur terutama disumbangkan oleh *low density lipoprotein* (LDL). Senyawa LDL dapat menempel pada membran sel selama proses pendinginan atau pembekuan (Graham dan Foote, 1987). Kerusakan fosfolipid membran spermatozoa juga terjadi selama *cold shock* dan kuning telur dapat mencegah atau memodulasi efek yang merusak tersebut. Senyawa LDL adalah molekul dengan *lipid core* trigliserida dan kolesterol ester yang dikelilingi oleh fosfolipid dan protein. Fosfolipid esensial dalam stabilisasi struktur senyawa LDL, karena fosfolipid ini mengandung 83-89% lipid dan 11-17% protein. Lipid dari senyawa LDL tersusun atas sekitar 69% trigliserida, 26% fosfolipid, dan 5% kolesterol (Moussa *et al.*, 2002).

**Viabilitas Spermatozoa**

Persentase viabilitas spermatozoa pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3. Dari data tersebut terlihat adanya penurunan persentase viabilitas spermatozoa selama empat hari penyimpanan. Namun, penurunan persentase viabilitas spermatozoa pada masing-masing perlakuan tidak sama sehingga nampak bahwa rataan persentase viabilitas spermatozoa setelah

Tabel 3. Persentase viabilitas spermatozoa sapi bali pada air buah lontar-kuning telur, sitrat-kuning telur, dan air kelapa-kuning telur selama empat hari penyimpanan

Hari penyimpanan ke-	Kontrol (%)	Sitrat-KT (%)	AKp-KT (%)	AbL-KT (%)
0	85±4,56 <sup>a</sup>	85±4,56 <sup>a</sup>	85±4,56 <sup>a</sup>	85±4,56 <sup>a</sup>
1	14±5,48 <sup>a</sup>	80±3,54 <sup>b</sup>	80±7,07 <sup>b</sup>	82±2,74 <sup>b</sup>
2	0±0,00 <sup>a</sup>	70±9,35 <sup>c</sup>	66±8,22 <sup>b</sup>	72±5,70 <sup>c</sup>
3	0±0,00 <sup>a</sup>	64±14,32 <sup>c</sup>	50±10,00 <sup>b</sup>	68±4,47 <sup>d</sup>
4	0±0,00 <sup>a</sup>	50±6,12 <sup>c</sup>	32±10,95 <sup>b</sup>	60±7,07 <sup>d</sup>

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

disimpan selama empat hari pada pengencer AbL-KT lebih tinggi dari perlakuan lainnya.

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap viabilitas spermatozoa. Uji lanjut pada hari pertama penyimpanan menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan yang mendapat tambahan pengencer dengan yang tidak mendapat tambahan pengencer (kontrol); sedangkan antara perlakuan yang mendapat tambahan pengencer tidak ada perbedaan ( $P > 0,05$ ). Pada hari kedua penyimpanan, semua spermatozoa pada perlakuan kontrol tidak ada lagi yang bergerak (mati), sedangkan pada perlakuan yang mendapat tambahan pengencer mengalami penurunan persentase viabilitas yang tidak besar sehingga nampak dari uji lanjut bahwa antara pengencer AbL-KT dan sitrat-KT, sitrat-KT dan AKp-KT tidak ada perbedaan ( $P > 0,05$ ), sedangkan antara pengencer AbL-KT dan AKp-KT berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Pada hari ketiga dan keempat penyimpanan, persentase viabilitas spermatozoa pada pengencer AbL-KT berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan pengencer sitrat-KT dan AKp-KT; dan sitrat-KT berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan AKp-KT.

Adanya perbedaan antara pengencer AbL-KT dengan AKp-KT dan sitrat-KT mulai hari kedua hingga hari keempat penyimpanan mungkin disebabkan oleh adanya perbedaan kemampuan dalam mempertahankan pH serta kandungan zat-zat nutrisi terutama karbohidrat. Analisis komposisi nutrisi pada air buah lontar dan air kelapa menunjukkan bahwa kandungan karbohidrat pada air buah lontar lebih tinggi daripada yang dikandung air kelapa (MataHine, 1991).

Selain itu, rendahnya pH pengencer air kelapa menyebabkan gangguan fisik dan

biokimiawi terhadap sel spermatozoa. Beberapa studi menunjukkan bahwa pH memengaruhi motilitas spermatozoa, dan penurunan pH dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa sapi (Jones dan Bavister, 2000). Hubungan antara pH intraseluler dan motilitas berkenaan dengan fosforilasi protein (Carr dan Acott, 1989)- Inkubasi spermatozoa dalam medium yang mengandung asam laktat lemah menyebabkan perubahan pH internal spermatozoa sebagai akibat perubahan pH ekstraseluler. Penurunan atau peningkatan pH eksternal yang selanjutnya memodifikasi pH intraseluler dapat memengaruhi motilitas spermatozoa (Contri *et al.*, 2013).

Spermatozoa yang imobil oleh kondisi asam akan dapat bergerak kembali setelah pH dikembalikan ke normal, tetapi pengaruh kondisi alkali bersifat irreversible (Makler *et al.*, 1981). Namun, hasil penelitian tersebut bertentangan dengan hasil penelitian Contri *et al.* (2013) karena pada sapi, penggunaan asam laktat menyebabkan kerusakan membran, tetapi spermatozoa masih dapat bergerak untuk beberapa menit. Kemampuan spermatozoa untuk bergerak kembali setelah netralisasi pH tidak diamati, namun ada kemungkinan tidak dapat terjadi karena kehilangan integritas membran spermatozoa. Hasil penelitian tersebut juga mengindikasikan bahwa kondisi alkalin dapat mengurangi fungsi spermatozoa dan kerusakan ini umumnya terjadi pada mitokondria yang merupakan pengatur motilitas spermatozoa. Pada pH yang tinggi (8 dan 8,5) spermatozoa sapi tetap hidup tetapi tidak motil, dan ketidak-mampuan spermatozoa untuk bergerak disebabkan karena adanya reduksi fungsi mitokondria, karena perubahan struktur dan fungsi mitokondria memengaruhi motilitas (Piomboni *et al.*, 2012). Penyimpanan

Tabel 4. Daya tahan hidup spermatozoa sapi bali (hari) yang dipreservasi pada pengencer air buah lontar-kuning telur, sitrat-kuning telur, dan air kelapa-kuning telur

Perlakuan	Ulangan					Rataan
	I	II	III	IV	V	
Kontrol	0,46	1,41	1,50	1,66	1,50	1,31 ± 0,48 <sup>a</sup>
Sitrat – KT	9,00	9,00	10,00	10,00	10,00	9,60 ± 0,55 <sup>b</sup>
AKp – KT	6,00	8,00	8,00	8,00	8,00	7,60 ± 0,89 <sup>c</sup>
AbL-KT	10,00	10,00	12,00	12,00	12,00	11,20 ± 1,10 <sup>d</sup>

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan

pada pH rendah (5,5) juga dapat menghambat motilitas dan merubah integritas membran spermatozoa (Contri *et al.*, 2013).

#### Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Daya tahan hidup spermatozoa yang dimaksud adalah kemampuan spermatozoa untuk tetap bergerak dalam kurun waktu tertentu setelah penyimpanan *in vitro*. Daya tahan hidup spermatozoa pada masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 4.

Spermatozoa sapi bali yang dipreservasi dalam pengencer AbL-KT memiliki daya tahan hidup yang lebih lama daripada kontrol atau yang dipreservasi pada kedua pengencer lainnya (Tabel 4). Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa daya tahan hidup spermatozoa yang dipreservasi dalam ketiga pengencer berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kontrol. Hal ini semakin memperkuat fakta bahwa begitu pentingnya pengencer dalam memperpanjang kehidupan spermatozoa *in vitro*.

Dalam kondisi spermatozoa tidak mendapat suplementasi zat nutrisi dan bahan pelindung terhadap kejutan dingin seperti pada perlakuan kontrol, maka spermatozoa akan cepat mengalami kematian yang disebabkan oleh kehabisan substrat energi, karena hanya mengandalkan bahan-bahan yang terdapat di dalam plasma semen maupun di dalam sel spermatozoa, seperti fruktosa dan plasmalogen yang ketersediaannya sangat terbatas. Selain itu, adanya keterbatasan jumlah penyangga di dalam plasma semen ikut berkontribusi terhadap percepatan kematian spermatozoa akibat terjadinya penurunan pH karena penimbunan asam laktat yang terjadi dalam keadaan respirasi anaerob. Hal lain yang juga berpengaruh adalah ketiadaan unsur pelindung di dalam plasma semen sehingga ketika spermatozoa disimpan pada suhu yang rendah maka terjadi kerusakan membran sel dan berakibat pada kematian.

Daya tahan hidup spermatozoa pada pengencer AbL-KT lebih lama ( $P < 0,05$ ) dari pada pengencer sitrat-KT dan AKp-kuning telur, begitu pula terdapat perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) sitrat-KT dan AKp-kuning telur. Beberapa hal yang menjadi penyebab perbedaan tersebut adalah ketersediaan energi yang berbeda. Pengencer AbL-KT memiliki kandungan

substrat energi yang lebih banyak daripada sitrat-KT dan AKp-KT. Pada pengencer AbL-KT energi bagi spermatozoa berasal dari karbohidrat yang dikandung air buah lontar dan glukosa yang dikandung kuning telur, sedangkan pada pengencer sitrat-KT, sumber energi hanya berasal dari glukosa yang dikandung kuning telur sehingga berdampak pada cepat habisnya energi yang dibutuhkan untuk mempertahankan daya hidup dan pergerakan spermatozoa. Kandungan substrat energi dalam pengencer air buah lontar juga lebih tinggi daripada air kelapa (Mata Hine, 1991).

Kehabisan substrat energi yang terjadi selama penyimpanan dapat menyebabkan proses glikolisis untuk menghasilkan energi tidak dapat berlangsung. Dalam kondisi tanpa oksigen, suplai energi bagi spermatozoa terutama disumbangkan melalui jalur glikolisis (Barbonetti *et al.*, 2010). Suatu eksperimen menunjukkan bahwa glikolisis dapat mengimbangi kekurangan produksi ATP oleh mitokondria dalam mempertahankan motilitas sperma mencit, dan gangguan terhadap mitokondria dapat menekan motilitas sperma hanya ketika proses glikolisis terhambat (Mukai dan Okuno, 2004). Dengan demikian, penghambatan proses glikolisis akan menyebabkan kematian spermatozoa.

#### SIMPULAN

Pengencer air buah lontar-kuning telur lebih efektif dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali selama penyimpanan *in vitro*.

Hingga hari keempat penyimpanan, pengencer air buah lontar-kuning telur menghasilkan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa yang tinggi yakni masing-masing 44% dan 60%; dengan daya tahan hidup yang lebih lama yaitu mencapai 11,20 hari

#### SARAN

Identifikasi golongan sakarida dan berbagai senyawa lainnya yang terkandung di dalam air buah lontar.

Penelitian lanjutan tentang uji fertilitas pada induk sapi bali yang diinseminasi menggunakan semen yang diencerkan dengan air buah lontar-kuning telur.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Ir. Upik S. Rosnah, MP dan Ir. Amin Nurdi yang telah banyak memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian teristimewa pada saat penampungan semen di kandang percobaan Fakultas Peternakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- 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(1):13-16.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M, 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.
- Arifiantini RI Purwantara B. 2010. Motility and viability of friesian holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *J Indonesian Trop Anim Agric* 35(4):222-226.
- Barbonetti A, Vassallo MRC, Fortunato D, Francavilla S, Maccarrone M, Francavilla F. 2010. Energetic metabolism and human sperm motility: impact of CB1 receptor activation. *Endocrinology* 151: 5882–5892.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, and Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 68:181-190.
- Bohlooli S, Cedden F, PishJang J, Razzaghzadeh S, Bozodlu S. 2012. The effect of different extenders on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity in cryopreserved semen of zandiram. *J Basic Appl Sci Res* 2(2):1120-1123.
- Carr DW, Acott TS, 1989. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod* 41: 907-920.
- Colenbrander B. Fazeli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. 1992. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. *Acta Vet Scand (Suppl)* 88:49-58.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci* 136:252-259.
- Dziekońska A, Fraser L, Strzeżek J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim and Feed Sci* 18:638-649.
- Eljarah AH. 2007. Effects of cryopreservation and constituents of semen extenders on mitochondrial function of bull spermatozoa. *Dissertation*. Lousiana State University.
- Ford WCL. 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update* 12(3):269-274.
- Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 1987:24:42-52.
- Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D. 2011. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet* 28:191-197.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
- Jones JM, Bavister BD, 2000. Acidiûcation of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J Androl* 21:616-624.
- Junianto L, Setiono B, Kismiati S. 2002. Pengaruh pengenceran semen dengan berbagai kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup sperma ayam kampung. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis* 27(1):30-35.
- Kulaksiz R, Cebi C, Akcay E, Daskin A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*, 88:12–15.
- Lemma A. 2011. Effect of cryopreservation on sperma quality and fertility. In: M. Manafi (editor). *Artificial Insemination in Farm Animals*, pp:191-216.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* 21:700-707

- Mahmoud AM, Comhaire FH, Vermeulen L, Andreou E. 1994. Comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen, and various sperm parameters. *Hum Reprod* 9:1688-1693.
- Makler A, David R, Blumenfeld Z, Better OS. 1981. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril* 36:507-511.
- MataHine T. 1991. Pengaruh penambahan beberapa pengencer terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. Kupang. Fakultas Peternakan Universitas Nusa Cendana.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveria ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57:327-344.
- 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* 57:1695-1706.
- Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction* 71:540-547.
- Naing SW, Wahid H, Mohd AK, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122(1-2):23-28.
- Orlando C, Krausz C, Fortli G, Casano R. 1994. Simultaneous measurement of sperm LDH, LDH-X, CPK activities and ATP content in normospermic and oligospermic men. *Int J Androl* 17:13-18.
- Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 35:109-124.
- Reiger D. 1997. Batch analysis of the ATP content of bovine sperm, oocytes, and early embryos using a scintillation counter to measure the chemiluminescence produced by the luciferin-luciferase reaction. *Anal Biochem* 246:67-70.
- Shum WWC, Ruan YC, Da Silva N, Breton S. 2011. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J Androl* 32: 576-586.
- Varner DD, Johnson L. 2007. From a sperm's eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP Proceedings* 53:104-177
- Watson PF, 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481-92.
- Yi YJ, Li ZH, Kim ES, Song ES, Kim HB, Cong PQ, Lee JM, Park CS. 2008. Comparison of motility, acrosome, viability and atp of boar sperm with or without cold shock resistance in liquid semen at 17°C and 4°C, and frozen-thawed semen. *Asian-Aust J Anim Sci* 21(2):190-197.
- Yong JW, Ge L, Ng YF, Tan SN. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14:5144-5164.