

**Efektivitas Penambahan berbagai Konsentrasi B-Karoten
terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa
Sapi Bali *Post Thawing***

EVA AGUSTINA SIAHAAN,
DESAK NYOMAN DEWI INDIRA LAKSMI, WAYAN BEBAS

Lab Reproduksi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jl. PB Sudirman Denpasar Fax (0361) 701808.
Email: evaforeva@rocketmail.com

RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi β -karoten pada semen sapi bali yang dibekukan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa *post thawing* sehingga diharapkan dapat meningkatkan kualitas semen beku.

Hasil penelitian penambahan berbagai konsentrasi β -karoten terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa *post thawing* pada perlakuan T_0 , T_{0e} , T_1 , T_2 dan T_3 untuk rata-rata daya hidup secara berturut-turut adalah : $53,00 \pm 6,47$ %, $53,00 \pm 8,24$ %, $56,00 \pm 3,23$ %, $62,00 \pm 3,96$ % dan $55,00 \pm 5,16$ %. Dan untuk motilitas progresif secara berturut-turut adalah : $52,00 \pm 3,96$ %, $52,00 \pm 3,06$ %, $55,00 \pm 4,84$ %, $60,00 \pm 4,40$ % dan $53,00 \pm 3,96$ %. Analisis dan pengujian statistik dilakukan dengan sidik ragam, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa penambahan β -karoten memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing*. Uji lanjutan dengan uji wilayah berganda Duncan diperoleh bahwa penambahan β -karoten dengan konsentrasi 0.002% memberikan hasil rata-rata motilitas dan daya hidup spermatozoa yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, kontrol etanol, penambahan β -karoten 0,001% dan penambahan β -karoten 0,001%.

Kata Kunci : motilitas, daya hidup, spermatozoa, *post thawing*

PENDAHULUAN

Salah satu dari berbagai bangsa sapi yang terdapat di Indonesia adalah sapi bali yang mempunyai potensi yang tinggi untuk dibudidayakan. Sapi bali berasal dari hasil domestikasi banteng liar (*Bibos Banteng Syn Bos Sondaicus*). Sapi bali sangat berpotensi dan strategis dalam penyediaan daging nasional. Selain sebagai penyedia daging untuk sumber protein masyarakat, juga memiliki kontribusi yang besar dalam kehidupan petani sebagai tenaga kerja pertanian dan sebagai tabungan yang sewaktu-waktu dapat dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan hidup (Hidayat, 2010). Peningkatan populasi dan kelestarian sapi bali saat ini terhambat oleh berbagai hal seperti belum maksimalnya pengawasan pemotongan sapi betina produktif (sapi yang melahirkan kurang dari 5 kali atau berumur dibawah 8 tahun) yang mengakibatkan penurunan populasi sapi bibit dan peningkatan pemotongan sapi bali untuk memenuhi kebutuhan protein hewani yang tidak diimbangi dengan peningkatan populasi. Salah satu upaya untuk mengatasi permasalahan di atas dengan cara meningkatkan pembibitan sapi bali (Ditjennak, 2006).

Dalam pembibitan sapi bali, keterbatasan jumlah pejantan unggul dapat diatasi dengan menerapkan program teknologi reproduksi yaitu inseminasi buatan sehingga potensi pejantan unggul dapat dimanfaatkan secara optimal. Inseminasi buatan adalah salah satu bentuk bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak yang memungkinkan untuk mengawinkan ternak betina yang dimilikinya tanpa perlu seekor pejantan utuh, dimana dalam penggunaannya dapat memanfaatkan pejantan yang memiliki potensi genetik unggul. Keuntungan utama inseminasi buatan antara lain perbaikan genetik, mencegah penularan penyakit, menghemat dana pemeliharaan, meningkatkan pemanfaatan pejantan unggul, serta keuntungan yang lain adalah memperpendek *calving* interval dan mengatasi kendala jarak dan waktu (Wuragil, 2008).

Keberhasilan pelaksanaan inseminasi buatan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: pengetahuan dan keterampilan peternak untuk mendeteksi birahi, kondisi betina yang akan diinseminasi buatan, keterampilan inseminator, dan kualitas semen yang digunakan. Kualitas semen sangat dipengaruhi oleh cara pengolahan dan

pengawetan semen dalam bentuk cair dan beku. Pada semen beku kualitas spermatozoa dipengaruhi juga oleh proses penampungan, pengenceran, equilibrasi, pembekuan dan proses pencairan kembali (*thawing*) sebelum diinseminasikan ke hewan betina (Wuragil, 2008).

Spermatozoa dalam semen beku dapat hidup bertahun-tahun. Spermatozoa yang dibekukan dan disimpan pada suhu -79°C di dalam CO_2 padat dan alkohol tahan hidup 3-4 tahun atau lebih, sedangkan pada -196°C di dalam nitrogen cair tahan hidup dalam waktu sampai 10 tahun (Toelihere, 1993).

Proses pembekuan spermatozoa pada suhu -196°C dapat menyebabkan kematian spermatozoa sekitar 30%. Hal ini disebabkan karena kerusakan pada membran plasma spermatozoa yang merupakan bagian dari susunan asam lemak tak jenuh. Kondisi ini terjadi sebagai akibat dari banyaknya kandungan asam lemak tak jenuh pada membran spermatozoa yang sangat mudah mengalami kerusakan peroksidasi (Maxwell dan Watson, 1996). Sikka (1996) mengatakan spermatozoa mamalia kaya akan asam lemak tak jenuh dan mudah terpengaruh oleh kelompok oksigen reaktif atau *reactive oxygen species (ROS)* yang mampu menurunkan motilitas dan meningkatkan kerusakan morfologi spermatozoa. Peroksidasi lipida pada membran plasma merupakan mekanisme kunci dalam *ROS* yang menyebabkan terjadinya kerusakan spermatozoa dan bagian dari ketidakfertilan akibat dampak dari proses peroksidasi yang dapat merusak DNA dan protein (Maneesh dan Jayaleksemi, 2009).

Peningkatan kualitas spermatozoa dengan menambahkan senyawa antioksidan di dalam pengencer semen telah banyak dilaporkan seperti Rizal (2005) meneliti glutathion dan beta karoten dapat meningkatkan fertilitas spermatozoa domba garut hasil kriopreservasi. Penggunaan antioksidan glutathione pada bahan pengencer babi dapat meningkatkan motilitas spermatozoa yang dibekukan (Gadea *et al.*, 2005). Vitamin C pada semen beku sapi (Beconi *et al.*, 1993) dan semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003).

Penambahan antioksidan pada proses pembekuan semen sapi bali sampai saat ini belum ada informasi. Berdasarkan latar belakang di atas maka pada penelitian ini dilakukanlah penelitian untuk mengetahui penambahan β -karoten pada bahan pengencer semen beku sapi bali terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa *post thawing*.

MATERI DAN METODE

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu ekor sapi bali dewasa kelamin dengan performans dan kesehatan yang baik, berat badan berkisar antara 560 kg dengan umur sekitar 4 tahun. Sebagai sumber semen yang diuji kualitasnya. Pejantan dikandangkan secara individu dan diberikan pakan berupa hijauan dan konsentrat.

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah semen segar sapi bali, bahan pengencer androMed®, β -karoten, etanol pro-analitik, aquabidestilata, pewarna eosin, nitrogen cair.

Alat – alat yang digunakan adalah vagina buatan, tabung reaksi, gelas Erlemeyer, pipet tetes, mikro pipet, gelas ukur, mikroskop elektron, gelas objek, gelas penutup, timbangan mikro, pH meter, kontainer N₂ cair, straw mini (0,25 ml), rak straw, *waterbath*, *cold top*, *Styrofoam*, mesin *filling and sealing*.

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan. T₀ : Semen + Pengencer androMed®, T_{0e} : Semen + Pengencer androMed® + etanol 0.05 mL, T₁ : Semen + Pengencer androMed® + 0,001% β -karoten, T₂ : Semen + Pengencer androMed® + 0,002% β -karoten, T₃ : Semen + Pengencer androMed® + 0,003% β -karoten. Masing-masing kelompok diulang sebanyak 5 kali.

Variabel bebas : Motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali yang baru ditampung. Variabel tergantung : Motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing* yang telah diencerkan dengan androMed® dengan penambahan berbagai konsentrasi β -karoten. Variabel kendali : Konsentrasi spermatozoa dalam

pengencer androMed®. Konsentrasi β -karoten yang ditambahkan dalam pengencer androMed®.

Untuk pengumpulan data dilakukan dengan cara mengambil semen dari straw yang sudah *dithawing* selanjutnya diteteskan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop. Data daya hidup spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung dibawah mikroskop jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna (transparan) saat dilakukan pewarnaan spermatozoa dengan menggunakan pewarnaan eosin negrosin sedangkan data motilitas spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung dibawah mikroskop jumlah spermatozoa yang mempunyai gerakan progresif. Daya hidup dan motilitas spermatozoa dinyatakan dalam persen (%).

Ternak jantan yang akan dijadikan sumber semen harus memenuhi persyaratan yaitu umur, silsilah keturunan, kondisi badan dan nafsu seksual. Pejantan yang ditampung semennya yakni bernama banuarsa, umur 4 tahun dan memiliki berat badan 500 kg. Penampungan semen dilakukan di kandang jepit. Satu orang operator memegang vagina tiruan untuk menampung semen, dan satu atau dua orang lagi bertugas mengendalikan pejantan yang akan ditampung semennya. Semen yang keluar kemudian ditampung pada tabung reaksi dihindarkan dari kontaminasi dengan kotoran. Pengencer androMed® dibuat dengan cara mencampurkan aquabidestilata dengan pengencer androMed® dengan perbandingan 1:4 (Pengencer androMed® : aquabidestilata). Sebelum ditambahkan dalam pengencer androMed®, β -karoten dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol pro analitik 0,05 ml. Konsentrasi β -karoten 0,001% dibuat dengan melarutkan 0,001 gr β -karoten ke dalam 1 ml pengencer androMed® kemudian diaduk hingga homogen. Untuk larutan β -karoten 0,002% dibuat dengan melarutkan 0,002 gr β -karoten ke dalam 1 ml androMed® kemudian diaduk hingga homogen sedangkan untuk larutan β -karoten 0,003% dibuat dengan melarutkan 0,003 gr β -karoten ke dalam 1 ml androMed® kemudian diaduk hingga homogen. Kemudian masing-masing β -karoten perlakuan diambil sebanyak 0,05 ml dan diencerkan kembali ke dalam 5 ml pengencer androMed®.

Semen ditampung menggunakan vagina buatan. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopis dan mikroskopis. Penelitian makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan derajat keasaman (pH) dengan menggunakan pH *indicator*. Penilaian mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, jumlah spermatozoa hidup, dan konsentrasi yang dilakukan dengan pengamatan dibawah mikroskop elektron. Proses pengenceran semen dilakukan dengan cara menambahkan semen sebanyak 0,5 ml sedikit demi sedikit ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah diisi pengencer sesuai perlakuan, kemudian tabung reaksi digoyang perlahan agar semen tercampur homogen dengan pengencer. Semen yang telah diencerkan dikemas di dalam straw mini (0,25 ml). Proses selanjutnya adalah ekuilibrasi di dalam *cold top* pada suhu 3-5 °C selama 3 jam. Pembekuan semen diawali dengan meletakkan straw yang telah diekuilibrasi 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -135 °C) selama 15 menit di dalam Styrofoam yang ditutup rapat. Kemudian straw dimasukkan ke dalam kontainer nitrogen cair (suhu sekitar -196°C). Penyimpanan semen beku dilakukan di dalam kontainer nitrogen cair (suhu sekitar -196°C). selama 7 hari. Setelah disimpan tujuh hari, setiap sampel straw masing-masing perlakuan dicairkan kembali untuk dinilai kualitasnya. Semen beku dicairkan kembali dengan cara memasukkan straw kembali ke dalam air bersuhu 37°C (didalam *waterbath*) selama 30 detik. Evaluasi terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin dengan cara semen diambil dengan batang gelas dan diletakkan pada *object glass* kemudian ditetaskan pewarna eosin negrosin pada semen dan aduk perlahan sampai homogen selanjutnya dibuat preparat hapusan dan dianginkan sampai kering, selanjutnya preparat diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna (transparan) sebagai tanda spermatozoa masih hidup sedangkan pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan mengambil semen dari tempat penyimpanan dan ditetaskan diatas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif.

Data yang diperoleh ditabulasikan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam (*Analysis of Variance/ANOVA*). Bila terjadi perbedaan yang bermakna pada perlakuan maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji Wilayah Duncan . Penghitungan statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 15.0 *for windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi terhadap kualitas dan kuantitas semen segar yang dimaksudkan untuk mengetahui kadar pengenceran yang dibutuhkan serta untuk menentukan apakah semen tersebut layak atau tidak diproses lebih lanjut. Kualitas dan kuantitas semen yang diperoleh menunjukkan karakteristik semen segar sapi bali (tabel 4.1).

Tabel 4.1. Karakteristik semen segar sapi bali

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	8
Warna	Putih susu
Derajat keasaman (pH)	$\pm 6,8$
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi ($\times 10^6$ / ml)	1310
Motilitas (%)	75%
Daya hidup (%)	85%

Hasil penelitian penambahan berbagai konsentrasi β -karoten terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa *post thawing* pada perlakuan T_0 , T_{0e} , T_1 , T_2 dan T_3 untuk rata-rata daya hidup secara berturut-turut adalah : $53,00 \pm 6,47$ %, $53,00 \pm 8,24$ %, $56,00 \pm 3,23$ %, $62,00 \pm 3,96$ % dan $55,00 \pm 5,16$ %. Dan untuk motilitas progresif secara berturut-turut adalah : $52,00 \pm 3,96$ %, $52,00 \pm 3,06$ %, $55,00 \pm 4,84$ %, $60,00 \pm 4,40$ % dan $53,00 \pm 3,96$ % (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Rata-Rata ± Standar deviasi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Akibat Penambahan β-karoten pada Semen Sapi Bali *post thawing*.

Parameter	Perlakuan				
	T ₀	T _{0e}	T ₁	T ₂	T ₃
Motilitas (%)	52,00±3,96	52,00±3,06	55,00±4,84	60,00±4,40	53,00±3,96
Daya Hidup (%)	53,00±6,47	53,00±8,24	56,00±3,23	62,00±3,96	55,00±5,16
n	5	5	5	5	5

Keterangan : T₀ : Kelompok kontrol
 T_{0e}: Kelompok kontrol etanol
 T₁ : Kelompok Penambahan β-karoten 0.001%
 T₂ : Kelompok Penambahan β-karoten 0.002%
 T₃ : Kelompok Penambahan β-karoten 0.003%
 n : Ulangan

Analisis dan pengujian statistik dilakukan dengan sidik ragam, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa penambahan β-karoten memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing*.

Uji lanjutan dengan Uji Wilayah Duncan menunjukkan bahwa motilitas dan daya hidup spermatozoa T₀ tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap T_{0e}, T₁ dan T₃ namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan T₂. Serta menunjukkan bahwa penambahan β-karoten dengan konsentrasi 0.002% (T₂) memberikan hasil yang terbaik untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing* (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 Uji Duncan Perlakuan β -karoten terhadap Daya Hidup Spermatozoa Sapi Bali *Post Thawing*

Perlakuan	Subset	
	1	2
T ₀	53,00	
T _{0e}	53,00	
T ₃	55,00	
T ₁	56,00	
T ₂		62,00
Sig.	.283	1.000

Selanjutnya, pengaruh penambahan β -karoten terhadap motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing* juga diperoleh bahwa penambahan β -karoten dengan konsentrasi 0.002% (T₂) memberikan hasil yang terbaik untuk mempertahankan motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing* (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Uji Duncan Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Bali *Post Thawing*

Perlakuan	Subset	
	1	2
T ₀	52,00	
T _{0e}	52,00	
T ₃	53,00	
T ₁	55,00	
T ₂		60,00
Sig.	.173	1.000

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan β -karoten secara nyata ($P < 0,05$) dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*. Pada saat proses pengenceran dan penyimpanan semen berlangsung akan terjadi reaksi antara spermatozoa dengan oksigen yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas yang terbentuk akan memicu terjadinya peroksidasi lemak membran sehingga akan menurunkan daya hidup dan motilitas spermatozoa (Sikka, 1996). Sedangkan pada saat *thawing* semen juga mengalami tekanan yang berat akibat peningkatan suhu yang drastis dan kontak dengan oksigen yang memungkinkan terbentuknya senyawa-senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil dan singlet oksigen serta mengakibatkan tingginya aktivitas metabolisme yang sekaligus meningkatkan konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme (Rizal, 2005). Pada kondisi kurang menguntungkan inilah β -karoten sebagai senyawa antioksidan memainkan peranan mencegah timbulnya peroksidasi lipid yang berlebihan pada membran plasma sel yang ditimbulkan oleh radikal bebas atau senyawa oksidan lainnya. Menurut Suryohudoyo (2000) β -karoten merupakan salah satu senyawa antioksidan yang larut dalam lemak dan bekerja memutus reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel. Sedangkan Oshima *et al.*, (1993) mengatakan bahwa β -karoten memiliki kemampuan memproteksi liposom (suatu vesikel yang memiliki fosfolipida bilayer tunggal) dari kerusakan akibat serangan singlet oksigen.

Setelah dilanjutkan dengan Uji Wilayah Duncan, perlakuan T_2 (penambahan β -karoten 0,002%) menunjukkan motilitas dan daya hidup spermatozoa *post thawing* nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok T_0 (kontrol), T_{0e} (kontrol etanol), T_1 (penambahan β -karoten 0,001%) dan T_3 (penambahan β -karoten 0,003%). Kelompok T_0 (kontrol) tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap kelompok T_{0e} (kontrol etanol), Hal ini membuktikan bahwa dosis etanol sebanyak 0.05 ml tidak memberikan pengaruh yang buruk terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa dan dapat diadaptasi oleh spermatozoa.

Pada konsentrasi 0.002% β -karoten merupakan dosis yang tepat untuk mempertahankan motilitas dibandingkan dengan kelompok kontrol, kontrol etanol, perlakuan penambahan β -karoten 0,001% dan perlakuan penambahan 0,003% dikarenakan pada dosis ini β -karoten sudah dapat bekerja secara optimal memberikan perlindungan spermatozoa dengan cara mencegah atau memutus reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel, sehingga mampu mencegah atau mengurangi kerusakan yang terjadi pada membran plasma sel spermatozoa selama proses pengolahan semen terutama pada tahap pembekuan dan *thawing*. Membran plasma yang utuh akan menyebabkan proses metabolisme dapat berjalan dengan baik, sehingga produksi energi berupa ATP tidak terganggu yang berakibat dapat dipertahkannya motilitas dan daya hidup spermatozoa (Rizal,2005).

Penambahan β -karoten 0.001% memberikan hasil spermatozoa yang motil dan hidup nyata lebih sedikit terhadap β -karoten 0.002% ($P<0.05$) hal ini diduga karena pada dosis 0.001% β -karoten belum mampu memberikan perlindungan yang optimal terhadap spermatozoa. Sedangkan pada konsentrasi 0.003% β -karoten memberikan hasil motilitas dan daya hidup nyata lebih sedikit ($P<0.05$) dibandingkan dengan β -karoten 0.002% hal ini diduga pada dosis ini β -karoten berlebih sehingga menyebabkan efek negatif bagi spermatozoa hal ini didukung oleh pendapat Schweigert dan Zucker (1988) yang menyatakan bahwa kandungan β -karoten di dalam sel cukup rendah, dan dapat bersifat toksik jika konsentrasinya berlebihan dan Rizal (2005) bahwa β -karoten yang berlebihan dapat meningkatkan tekanan osmotik pengencer yang berakibat buruk terhadap jalannya metabolisme spermatozoa. Proses metabolisme yang terganggu berakibat menurunnya produksi energi berupa ATP, sehingga menurunkan motilitas dan daya hidup spermatozoa.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi β -karoten berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*. β -karoten 0.002% merupakan dosis yang paling tepat untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut lagi terhadap keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku yang ditambahkan antioksidan β -karoten.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Dinas dan *staff* UPTD Peternakan Propinsi desa Baturiti, atas bantuannya selama penelitian, sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Beconi, MT., CR. Francia., NG. Mora & MA Affrancio.1993. Effect of Natural Antioxidant of Frozen Bovine Semen Preservation. *Theriogenology* 40:841-851.
- Direktorat Jenderal Peternakan.2006. Permasalahan dan Strategi Dalam Menghasilkan Bibit Sapi Bali Berkualitas. Availbale from [Http://www.ditjennak.go.id/regulasi%255c.Permentan54_2006.go.id/publi kasi/eksporsapibali.pdf](http://www.ditjennak.go.id/regulasi%255c.Permentan54_2006.go.id/publi%20kasi/eksporsapibali.pdf) (Accessed 2011 Januari 2)
- Gadea J., Selle's, E., Marco, MA. 2005. Effect of the presence of glutathione in the thawing diluent on the penetrability capacity of porcine oocytes *in vit*. Di dalam : *Proceedings 14 ICAR* : Stockholm, 2-6 Jul 2000. Abstract Vol 2, 17:11. Gazali M., Surya Natal., Tambing, 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Journal Hayati*, Maret 2002, hlm. 27-32 Vol. 9, No. 1

- Maneesh dan Jayalekshmi, 2009. Role of reaction oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. Available from: <http://www.melakamanipalmedicalcollege.com>. (Accessed 2011 Januari 2).
- Maxwell WMC and Watson PF. 1996. Recent Progress in the Preservation of Ram Semen. *Anim Reprod Sci* 42:55-65.
- Oshima, S., F.Ojima., H. Sakamoto., Y. Ishiguro and J. Terao,1993. Inhibitory Effect of B-Carotene and Asthaxanthin on Photosensitized Oxidation of Phospholipid Bilayers. *J.Nur.Sci Vitaminol.*, 39:607-615.
- Rizal, Muhammad, 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi β -karoten Terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. Skripsi program sarjana, Universitas Pattimura, Ambon.
- Schweigert FJ., Zucker H. 1988. Concentration of Vitamin A, β -Carotene and Vitamin E in Individual Bovine Follicles of Different Quality. *J Reprod Fertil* 82:575-579.
- Sikka, Suresh C. 1996. Oxidative Stress and Role of Antioxidants In Normal and Abnormal Sperm Function. Available from :www.bioscience.org. (Accessed 2010 Nov. 2).
- Surjohudojo, P. 2000. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. C.V Sagung Seto, Jakarta. hal : 31 – 47.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Wuragil, Lia. 2008. Pemeriksaan Kualitas Semen Sapi an Domba Dengan Menggunakan Beberapa Bahan Pengencer Dengan Sistem Pool dan Pengaruh Metode Penyimpanan Straw Semen Cair Sapi Serta Pengaruh Suhu Thawing Pada Semen Beku Sapi. Laporan kegiatan PPDH, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Yousef, M.I., G.A. Abdallah and K.I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim.Reprod. Sci.* 76:99-111.