

Efektivitas Penambahan B-Karoten dan Glutathion pada Bahan Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa pada Semen Beku Sapi

INDRA GUNAWAN, DESAK NYOMAN DEWI INDIRA LAKSMI,
I GUSTI NGURAH BAGUS TRILAKSANA

Laboratorium Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.
Jl.P.B.Sudirman Denpasar Bali tlp. 0361-223791,

ABSTRAK

Sapi bali merupakan salah satu sumber daya genetik ternak asli Indonesia dan satu-satunya di dunia. Salah satu upaya untuk meningkatkan populasi sapi bali adalah dengan menerapkan teknologi inseminasi buatan. Salah satu tahapan dalam inseminasi buatan adalah pembekuan semen memungkinkan spermatozoa disimpan dalam waktu yang cukup lama dan dapat digunakan kapan saja untuk pelaksanaan inseminasi buatan pengganti kawin alam. Dalam proses pengolahannya, semen banyak berkontak dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen. Hal ini akan mempercepat metabolisme serta dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipida yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma sel spermatozoa. Untuk mengatasi peroksidasi lemak membran akibat adanya radikal bebas maka dalam bahan pengencer semen perlu ditambahkan antioksidan, diantaranya adalah β -karoten dan glutathion. pada penelitian ini dikaji mengenai efektivitas penambahan β -karoten dan glutathion pada bahan pengencer semen sapi bali yang akan disimpan beku dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa *post thawing*. Pada penelitian ini dilakukan penambahan antioksidan pada bahan pengencer semen sapi bali yaitu β -karoten dan glutathion dengan berbagai konsentrasi. β -karoten 0,001%, 0,002% dan 0,003%, glutathion 0,5mM, 1mM dan 1,5mM serta kontrol yaitu tanpa penambahan antioksidan. Motilitas dan daya hidup spermatozoa pada penambahan β -Karoten yang terbaik terdapat pada konsentrasi 0,002%, sedangkan glutathion terdapat pada konsentrasi 1Mm.

Kata-kata kunci : spermatozoa, B-karoten, Glutathion, Motilitas, Antioksidan

PENDAHULUAN

Salah satu tahapan dalam inseminasi buatan adalah pembekuan semen memungkinkan spermatozoa disimpan dalam waktu yang cukup lama dan dapat digunakan kapan saja untuk pelaksanaan inseminasi buatan pengganti kawin alam (Toelihere, 1985). Dalam proses pengolahannya, semen banyak berhubungan dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen. Hal ini akan mempercepat metabolisme serta dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipida yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma sel spermatozoa. Kerusakan

semacam ini biasanya disebabkan oleh terbentuknya radikal bebas yang merupakan salah satu produk dari metabolisme spermatozoa itu sendiri. Reaksi antara radikal bebas dan lipida terutama asam lemak tak jenuh yang dominan menyusun membran plasma sel akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipida. Apabila reaksi awal ini tidak dikendalikan maka akan terjadi reaksi secara terus menerus (otokatalitik) (Suryohudoyo, 2000) yang pada akhirnya akan merusak sebagian besar atau seluruh membran plasma sel spermatozoa. Rusaknya membran plasma sel akan mengganggu seluruh proses biokemis di dalam sel yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel itu sendiri.

Proses *cooling* (pendinginan), *freezing* (pembekuan) dan *thawing* (pengenceran kembali) menimbulkan stres fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan fertilitasnya (Chatterjee, *et al.*, 2001). Rizal, 2005 melaporkan perubahan komposisi membran plasma sel spermatozoa akibat kejutan dingin (*cold shock*) dan serangan radikal bebas akibat adanya metabolisme spermatozoa selama koleksi, pengolahan dan penyimpanan.

Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, di dalam pengenceran semen perlu ditambahkan senyawa antioksidan. Menurut Pryor, *et al.*, (2002) β -karoten merupakan salah satu senyawa yang memiliki kemampuan kerja sebagai senyawa antioksidan yang baik. β -karoten memiliki kecenderungan tinggi untuk mengoksidasi, lebih dari lemak makanan yang paling jenuh, dan dengan demikian dapat sampai batas tertentu mempercepat oksidasi. β -Karoten mengandung pigmen merah dan oranye yang berwarna sangat berlimpah pada tanaman dan buah-buahan. Berdasarkan hasil penelitian, penambahan sebanyak 0,002% β -karoten di dalam pengencer Tris merupakan dosis optimal dalam meningkatkan kualitas semen beku domba garut. β -Karoten nyata menurunkan konsentrasi MDA semen beku dibandingkan dengan kontrol (Rizal, 2005).

Glutathion dapat berfungsi sebagai antioksidan melalui berbagai mekanisme. Senyawa tersebut secara kimia dapat bereaksi dengan oksigen singlet, radikal superoksida dan hidroksil, dan secara langsung dapat berperan sebagai *scavenger* radikal bebas. Glutathion juga dapat menstabilkan struktur membran dengan cara menghilangkan atau meminimalkan pembentukan asil peroksida dalam reaksi peroksidasi lipid (Price, *et al.*, 1990). Glutathion ditemukan dalam berbagai jaringan, sel dan kompartemen subseluler tanaman tingkat tinggi. Peneliti menyatakan bahwa penambahan glutathion sebanyak 0,5 mM ke dalam pengencer Tris sitrat buffer cukup efektif memperbaiki kondisi membran plasma semen cair yang disimpan pada suhu 5°C, sehingga dapat meningkatkan presentase motilitas, presentase hidup, ketahanan membran dan tudung akrosom utuh (Triwulaningsih, *et al.*, 2003).

Dalam penelitian ini ingin diketahui perbedaan efektivitas antara β -karoten dengan glutathion dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*.

MATERI DAN METODE

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah sapi jantan yang digunakan sebagai sumber semen untuk penyediaan semen beku di UPT Baturiti. Sapi yang digunakan berumur 8 tahun dengan berat 560 kg.

Pembuatan bahan pengencer androMed® yang akan digunakan sebagai pengencer semen yang akan menjadi perlakuan. Pengencer androMed® dibuat dengan cara mencampurkan

aquabidestilata dengan pengencer androMed® dengan perbandingan 1:4 (Pengencer androMed® : aquabidestilata). Bahan pengencer androMed® masing-masing dicampur dengan konsentrasi β -karoten 0,001 %, 0,002 % dan 0,003% yang sebelumnya telah dilarutkan ke dalam etanol 0,05 ml, serta andromed yang dicampur dengan glutathion 0,5 mM, 1 mM dan 1,5 mM.

Cara melarutkan β -karoten ke dalam andrMed® yaitu dengan melarutkan β -karoten 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®.

Melarutkan glutathion ke dalam pengencer androMed® dapat dilakukan secara langsung tanpa harus emlarutkan terlebih dahulu ke dalam ethanol. Glutathion dengan konsentrasi 0,5mM dibuat dengan melarutkan 15,3665 mg glutathion ke dalam 1 ml androMed® kemudian diaduk hingga homogen. Untuk glutathion 1mM dibuat dengan melarutkan 30,733 mg glutathion ke dalam 1 ml androMed® kemudian diaduk hingga homogen. Untuk glutathion dengan konsentrasi 1,5mM dibuat dengan melarutkan 40,0995 mg glutathion ke dalam 1 ml androMed® kemudian diaduk hingga homogen. Kemudian masing-masing perlakuan glutathion diambil sebanyak 0,05 ml dan diencerkan kembali ke dalam 5 ml pengencer androMed®.

Ternak jantan yang akan dijadikan pejantan 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. Setelah menyiapkan pejantan, hal selanjutnya yang dipersiapkan adalah vagina tiruan yang digunakan untuk penampungan semen. Vagina tiruan merupakan alat yang menyerupai vagina yang sebenarnya sehingga mendapatkan hasil yang maksimal karena merupakan modifikasi dari perkawinan alam. Vagina tiruan diisi air hangat dengan suhu 38°C dan selubung vagina diolesi dengan vaselin.

Penampungan semen dilakukan oleh minimal dua orang. 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. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopis dan mikroskopis. Penilaian makroskopis meliputi warna, volume, konsistinsi, dan derajat keasaman(pH). Penilaian mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, jumlah spermatozoa hidup, konsentrasi.

Proses pengenceran semen dilakukan dengan cara menambahkan semen 0,5 ml ke dalam tabung reaksi yang telah diisi sesuai perlakuan, kemudian tabung reaksi digoyang perlahan agar semen tercampur homogen dengan pengencer semen yang telah diencerkan. Semen diisi ke dalam straw mini (0,25 ml) yang telah diberi identitas sesuai perlakuan. Pemberian identitas dengan menggunakan spidol permanen.

Equilibrasi merupakan tahap persiapan sperma untuk menjalani penurunan suhu agar kematian sperma akibat penurunan suhu dapat diminimalkan. Equilibrasi dilakukan dalam waktu 3 jam dengan suhu 3-5°C. Pembekuan semen diawali dengan meletakkan straw yang telah

diekuilibrasi 10 cm diatas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -110°C) selama 15 menit di dalam styrofoam yang ditutup rapat. Kemudian straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan di dalam container nitrogen cair.

Setelah disimpan satu minggu, setiap sampel straw masing-masing perlakuan dicairkan kembali untuk dinilai kualitasnya. Semen beku dicairkan kembali dengan cara memasukkan straw ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam waterbath) selama 30 detik.

Pemeriksaan semen pada masing masing konsentrasi perlakuan dilakukan segera sesaat setelah *thawing* (0 jam), 15 menit *post thawing* dan 30 menit *post thawing*. Evaluasi terhadap motilitas dilakukan dengan mengambil semen dengan pipet dan diteteskan pada gelas objek dan ditutup dengan *cover glass*. Masing-masing perlakuan diamati motilitasnya di bawah mikroskop cahaya. Evaluasi terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin dengan cara semen diambil dengan batang gelas dan diletakkan pada *object glass* kemudian diteteskan 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 diteteskan diatas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif.

Data yang diperoleh dianalisis dengan GLM (*General Linear Model*). Semua proses pengolahan data dilakukan dengan program SPSS 15.0. Uji lanjutan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil penelitian efektivitas penambahan β -karoten dan glutathion pada bahan pengencer dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa pada semen beku sapi bali *post thawing* dapat di lihat pada tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Rata-rata \pm Standar deviasi Persentase Spermatozoa yang motil akibat penambahan β -karoten dan Glutathion pada bahan pengencer semen beku sapi bali *post thawing*

Konsentrasi	Motilitas (%)		
	0 Menit	15 Menit	30 Menit
Kontrol	43,33 \pm 5,77	31,67 \pm 7,64	16,67 \pm 2,89
Glutathion 0,5mM	46,67 \pm 5,77	38,33 \pm 2,89	28,33 \pm 2,89
Glutathion 1mM	61,67 \pm 2,89	61,67 \pm 2,89	61,67 \pm 2,89
Glutathion 1,5mM	51,67 \pm 2,89	48,33 \pm 2,89	43,33 \pm 2,89
β -Karoten 0,001%	48,33 \pm 2,89	41,67 \pm 2,89	31,67 \pm 2,89
β -Karoten 0,002%	60,00 \pm 5,00	60,00 \pm 5,00	56,67 \pm 5,77
β -Karoten 0,003%	53,33 \pm 2,89	48,33 \pm 2,89	43,33 \pm 2,89

Analisis dan pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa penambahan baik β -karoten maupun glutathion memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing*.

Uji lanjutan dengan *Least Significant Difference (LSD)* menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa dengan perlakuan glutathion 1 mM memberikan hasil terbaik, sedangkan untuk β -karoten hasil yang terbaik diperoleh dari β -karoten 0,002%. Antara glutathion 1mM dengan β -karoten 0,002% secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). (Lampiran 2).

Waktu pengamatan memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas. Semakin lama waktu pengamatan menyebabkan penurunan motilitas. (Lampiran 4).

Tabel2. Rata-rata \pm Standar deviasi Persentase Spermatozoa yang hidup akibat penambahan β -karoten dan Glutathion pada bahan pengencer semen beku sapi bali *post thawing*

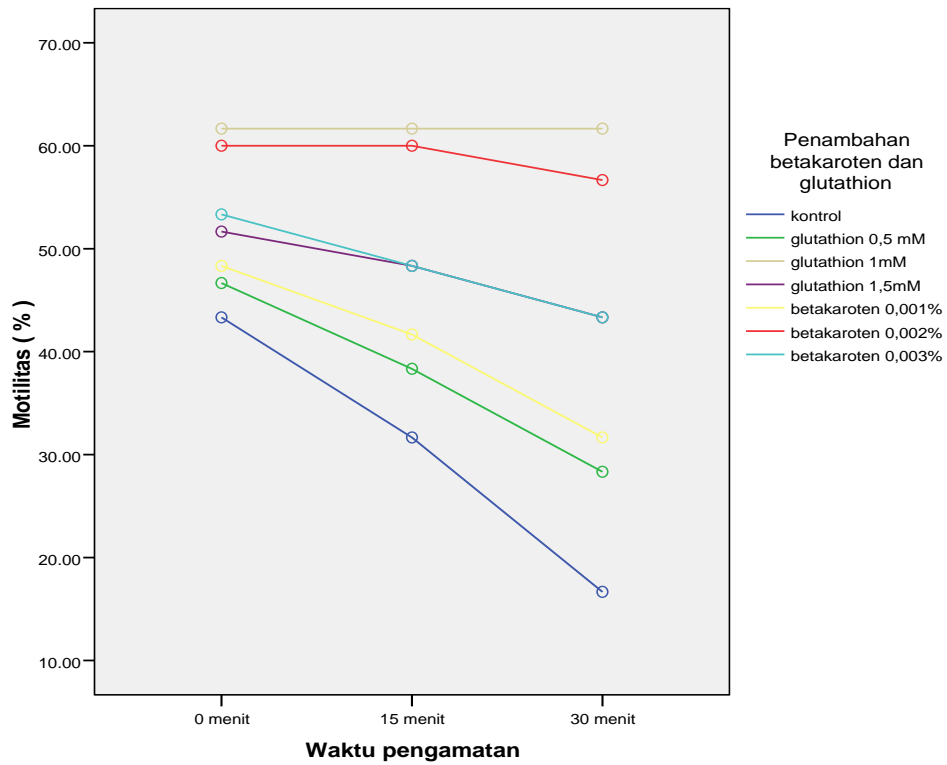
Konsentrasi	Daya Hidup (%)		
	0 Menit	15 Menit	30 Menit
Kontrol	51,67 \pm 2,89	36,67 \pm 7,64	21,67 \pm 2,89
Glutathion 0,5mM	53,33 \pm 2,89	46,67 \pm 2,89	38,33 \pm 10,41
Glutathion 1mM	68,33 \pm 2,89	68,33 \pm 2,89	68,33 \pm 2,89
Glutathion 1,5mM	58,33 \pm 2,89	53,33 \pm 2,89	48,33 \pm 2,88
β -Karoten 0,001%	58,33 \pm 2,89	51,67 \pm 2,89	41,67 \pm 2,89
β -Karoten 0,002%	68,33 \pm 2,89	68,33 \pm 2,89	63,66 \pm 2,89
β -Karoten 0,003%	63,33 \pm 2,89	58,33 \pm 2,89	53,33 \pm 2,89

Analisis dan pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa penambahan baik β -karoten maupun glutathion memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*.

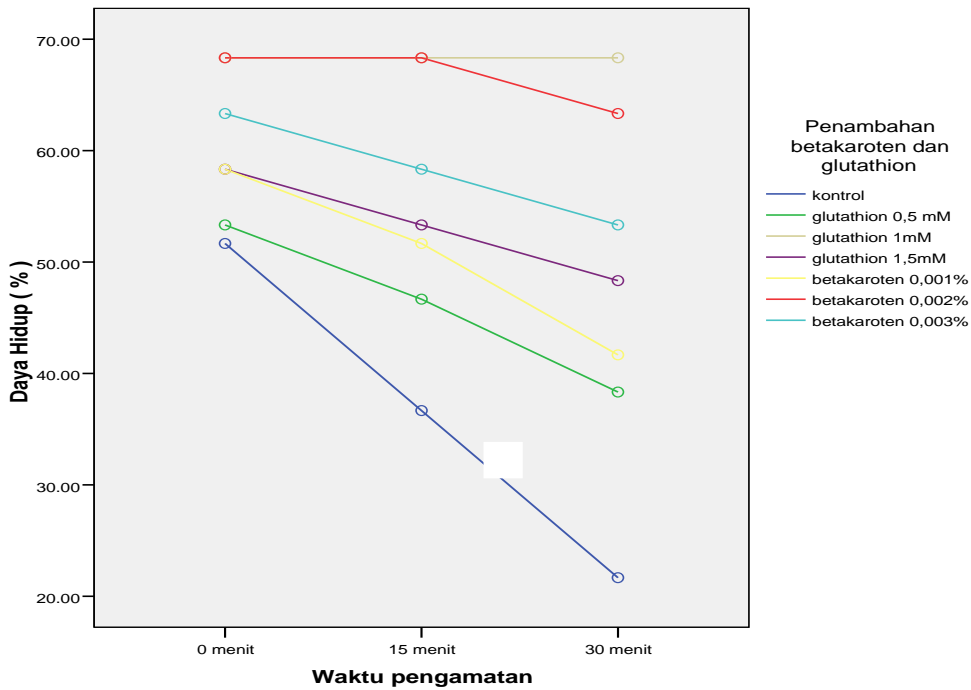
Uji lanjutan dengan *Least Significant Difference (LSD)* menunjukkan bahwa daya hidup spermatozoa dengan perlakuan glutathion 1 mM memberikan hasil terbaik, sedangkan untuk β -karoten hasil yang terbaik diperoleh dari β -karoten 0,002%. Antara glutathion 1mM dengan β -karoten 0,002% secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). (Lampiran 2).

Waktu pengamatan memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap daya hidup. Semakin lama waktu pengamatan menyebabkan penurunan daya hidup. (Lampiran 4).

Grafik motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing* dengan perlakuan penambahan glutathion 0,5 mM, glutathion 1 mM, glutathion 1,5 mM dan β -karoten 0,001%, β -karoten 0,002%, β -karoten 0,003% pada bahan pengencer (kontrol) disajikan pada gambar di bawah ini:



Gambar 1: Grafik Motilitas Spermatozoa Sapi Bali



Gambar 2. Grafik Daya Hidup Spermatozoa Sapi Bali.

Pembahasan

Penambahan baik β -karoten maupun glutathion secara nyata ($p < 0,05$) dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing* bila dibandingkan dengan kontrol. Dalam proses pengolahannya, semen banyak berkontak dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen sehingga akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas. Hal ini akan mempercepat metabolisme serta dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipida yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma sel spermatozoa (Suryohudoyo, 2000). β -karoten dan glutathion merupakan senyawa antioksidan yang dapat mengikat radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipida pada membran plasma sel, sehingga memungkinkan digunakan dalam pengencer semen beku (Sikka 1996, Suryohudoyo 2000, Tuminah 2000).

Untuk penambahan β -karoten hasil terbaik diperoleh dari konsentrasi 0,002%. Pada konsentrasi β -karoten 0,001% terjadi penurunan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal ini kemungkinan disebabkan karena antioksidan pada konsentrasi tersebut belum mencukupi untuk mencegah terjadinya peroksidasi lemak. Sedangkan pada konsentrasi β -karoten 0,003% juga terjadi penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal ini diduga karena penambahan senyawa antioksidan dalam jumlah banyak akan semakin meningkatkan tekanan osmotik larutan pengencer dan kurang dapat diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa sehingga berakibat buruk terhadap berlangsungnya proses metabolisme spermatozoa. Menurut Schweigert dan Zucker (1988) yang menyatakan bahwa kandungan β -karoten di dalam sel cukup rendah, dan dapat bersifat toksik jika konsentrasinya berlebihan.

Untuk penambahan glutathion hasil terbaik diperoleh dari konsentrasi 1mM. Pada konsentrasi 1,5 mM terjadi penurunan daya hidup dan motilitas spermatozoa, hal ini terjadi kemungkinan karena pada konsentrasi glutathion yang berlebih dapat menimbulkan efek negatif dari glutathion. Hal yang sama dinyatakan oleh Uysal and Bucak, (2007) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi glutathion yang berlebih dapat menimbulkan efek toksik yang menyebabkan kematian spermatozoa. Sedangkan pada konsentrasi glutathion 0,5 mM terjadi penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal tersebut kemungkinan disebabkan karena konsentrasi antioksidan belum mampu mencegah timbulnya dan sekaligus memutus reaksi rantai peroksidasi lipida. Menurut Agarwal *et al.* (2005) bahwa dalam metabolisme sel diperlukan keseimbangan antara prooksidan dengan antioksidan dan keseimbangan dapat berubah apabila terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species* yang sangat besar.

Antara β -karoten 0,002% dan glutathion 1mM hasil yang lebih baik diperoleh dari glutathion 1mM namun secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,005$). Menurut Suryohudoyo (2000) glutathion dapat berfungsi sebagai senyawa antioksidan yang mencegah timbulnya dan sekaligus memutus reaksi rantai peroksidasi lipida, sedangkan β -karoten berfungsi hanya sebagai senyawa antioksidan pemutus reaksi rantai, bukan sebagai pecegah timbulnya reaksi peroksidasi lipida. Selanjutnya dinyatakan bahwa glutathion bekerja secara optimum pada tekanan oksigen tinggi, sedangkan β -karoten pada tekanan oksigen rendah. Dalam proses penampungan dan pengolahan semen sebelum dikemas di dalam straw terjadi ontak antara semen dengan udara luar yang mengandung oksigen, sehingga terdapat tekanan oksigen yang tinggi di dalam semen. Pada kondisi seperti ini glutathion akan bekerja secara efektif sebagai senyawa antioksidan dibandingkan dengan β -karoten.

Lamanya waktu pengamatan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa *post thawing* karena lamanya kontak dengan oksigen sehingga akan mempercepat metabolisme spermatozoa.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: penambahan β -karoten dan glutathion pada bahan pengencer semen sapi bali memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*. Motilitas dan daya hidup spermatozoa pada penambahan β -Karoten yang terbaik terdapat pada konsentrasi 0,002%, sedangkan glutathion terdapat pada konsentrasi 1mM. Antara glutathion 1mM dengan β -karoten 0,002%, nampak lebih baik pada glutathion 1mM namun secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) hingga pengamatan 30 menit *post thawing*. Lama waktu pengamatan *post thawing* menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali dengan penambahan β -karoten dan glutathion pada bahan pengencer semen.

SARAN

Dalam program Inseminasi Buatan (IB), pelaksanaan inseminasi hendaknya dilakukan sesegera mungkin setelah dilakukan *thawing*. Perlu penelitian keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku yang ditambahkan antioksidan baik berupa β -karoten maupun glutathion.

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

- Agarwal S., Gupta S., and Sharma RK. 2005. *Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod. Biol. and Endocrin.* 3:28.
- Chatterjee I., Richmond A., Putiri E., Shakes DC., and Singson A. (2001). *The Caenorhabditis elegans spe-38 gene encodes a novel four-pass integral membrane protein required for sperm function at fertilization. Development* 132, 2795–2.
- Price A., Lucas PW., Lea PJ,. 1990. *Age Dependent Damage and Glutathione Metabolism in Ozone Fumigated Barley: a Leaf Section Approach.* Dalam *Journal of Experimental Botany.* 41: 1309-1317.
- Pryor WA., Stahl W., Roch CL. 2000. *B-carotene From Biochemistry to Clinical Trials.* *Nutr.Rev.*58:39-53.

- Rizal M. 2005. *Efektivitas Berbagai Konsentrasi β -Karoten terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut*. *Animal Production*, Vol.7, No. 1 Januari 2005:6-13.
- 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 SC. 1996. *Oxidative Stress and Role of Antioxidant in Normal and Abnormal Sperm Function*. *Frontiers in Bioscience* 1, e 78-86 August 1, 1996.
- Suryohudoyo P. 2000. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta. C.V Sagung Seto, hal : 31 – 47.
- Toelihere MR. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Triwulanningsih E., Situmorang P., Sugiarti T., Sianturi RG., Kusumaningrum DA. 2003. *Pengaruh Penambahan Glutathione pada Medium Pengencer Spermaterhadap Kualitas Semen Cair (Chilled semen)*. *JITV* Vol.8 No.2 th. 2003.
- Tuminah S. 2000. *Radikal Bebas dan Antioksidan, kaitannya dengan nutrisi dan penyakit kronis*. *Cermin Dunia Kedokteran* 128:49-51.
- Uysal O., Bucak MN. 2007. *Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen*. *ACTA VET. BRNO* 2007, 76: 383-390; doi:10.2754/avb200776030383.