

Glukosa-Astaxanthin Meningkatkan Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Kampung yang Disimpan pada Suhu 3-5°C

(GLUKOSA-ASTAXANTHIN INCREASING MOTILITY AND VIABILITY SPERMATOZOA OF CHICKEN STORED AT A TEMPERATURE OF 3-5°C)

I Gusti Ngurah Agung Dolly Octa¹, I Gusti Ngurah Bagus Trilaksana¹, Wayan Bebas¹

¹Laboratorium Reproduksi Veteriner

Jl. P.B.Sudirman Denpasar Bali tlp, 0361-223791

Email : agung_oyik@yahoo.com

ABSTRAK

Dalam penelitian ini ingin diketahui penambahan glukosa, astaxanthin dan kombinasi glukosa dengan astaxanthin pada pengencer kuning telur fosfat dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5°C C. Pada penelitian ini dilakukan penambahan glukosa 0,6 % w/v, astaxanthin 0,004 % w/v dan kombinasi glukosa 0,6% w/v, dengan astaxanthin 0,004 % w/v serta kontrol tanpa glukosa dan astaxanthin pada pengencer kuning telur fosfat. Pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)* menunjukkan bahwa penambahan glukosa, astaxanthin, dan kombinasi glukosa dengan astaxanthin secara nyata ($p < 0,05$) dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 3-5°C. Uji lanjutan dengan menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa penambahan kombinasi glukosa 0,6 % w/v dengan astaxanthin 0,004 % w/v memberikan hasil yang paling terbaik dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 3-5°C. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kombinasi 0,6 % w/v glukosa dengan 0,004 % w/v astaxanthin dapat bekerja secara sinergis pada kuning telur fosfat dalam mempertahankan kualitas semen cair ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5°C. Kesimpulan dari penelitian ini adalah glukosa- astaxanthin dapat meningkatkan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung.

Kata kunci: glukosa, astaxanthin, spermatozoa, motilitas dan daya hidup, ayam kampung

PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan salah satu jenis ternak unggas yang telah memasyarakat dan tersebar di seluruh pelosok nusantara. Peranan ayam kampung sebagai penyedia daging dan telur untuk memenuhi konsumsi protein hewani sangat berarti terutama bagi masyarakat perdesaan. Kontribusi ayam kampung terhadap produksi daging unggas cukup tinggi (Anon, 1998). Besarnya permintaan akan produk ayam kampung baik dalam bentuk daging maupun telur belum mampu dipenuhi oleh peternak ayam kampung terutama bila permintaan dalam jumlah besar dan kontinu. Untuk mengatasi masalah ini perlu dicari berbagai alternatif untuk meningkatkan produktivitas ayam buras. Upaya peningkatan produktivitas ayam kampung dapat dilakukan dengan cara peningkatan mutu genetik ayam kampung, terutama dalam penyediaan bibit ayam kampung yang mempunyai produksi telur yang tinggi. Dimana hal tersebut dapat terlaksana dengan memanfaatkan teknologi Inseminasi Buatan.

Inseminasi Buatan (IB) adalah proses pemasukan semen ke dalam saluran reproduksi betina dengan menggunakan alat buatan manusia. Tujuan penerapan teknologi IB adalah untuk penyebaran pejantan unggul di suatu daerah yang tidak memungkinkan untuk kawin alam serta pelestarian plasma nutfah ternak jantan yang diinginkan. Keuntungan Inseminasi Buatan dibandingkan perkawinan secara alami dalam pengadaan DOC adalah penggunaan pejantan relatif lebih sedikit, memungkinkan dilakukannya seleksi dan persilangan antar induk yang memiliki mutu genetik unggul, sehingga dapat dihasilkan DOC unggul untuk tujuan tertentu (telur, daging atau keduanya), memungkinkan dilakukannya persilangan bagi ayam jantan unggul yang sulit melakukan perkawinan secara alami, dapat menghasilkan DOC dalam jumlah banyak, seragam dan dengan waktu relatif singkat, memungkinkan dilakukannya persilangan dengan ayam jenis lain.

Keberhasilan inseminasi buatan sangat di pengaruhi oleh kualitas semen, dan bahan pengencer yang dimana fungsinya untuk menambah volume dari semen tersebut serta untuk mempertahankan hidup semen selama masa penyimpanan. Kualitas semen yang baik harus mempunyai nilai minimal 40% spermatozoa yang hidup. (Partodihardjo, 1982).

Dalam proses pengolahannya, semen banyak berhubungan dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen, dimana dapat mengakibatkan 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 biokimia di dalam sel yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel itu sendiri.

Rizal (2005), melaporkan perubahan komposisi membran plasma sel spermatozoa akibat kejutan dingin (*cold shock*), sehingga untuk mengatasi terjadinya cold shock perlu ditambahkan bahan pengencer. Dimitropoulos (DV) dengan sumber bufer berupa sitrat dengan sumber karbohidrat yang banyak digunakan adalah glukosa (Ijaz & Ducharme, 1995). Glukosa adalah salah satu bagian monosakarida yang merupakan jenis karbohidrat sederhana yang terdiri dari 1 gugus cincin (Sreeranjit, 1993). Dalam penelitiannya Herdis *et al.* (2005), menyatakan penambahan maltosa 1,2 g/100 ml pengencer dalam pengencer semen cair Tris -kuning telur 20% menghasilkan kualitas semen domba Garut lebih baik. Penambahan laktosa sebanyak 0,6 g per 100 ml pengencer Tris (0,6%) merupakan dosis terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa kambing PE yang diberi plasma semen domba priangan, dan dapat mempertahankan persentase spermatozoa motil sebesar 40% hingga empat hari setelah dipreservasi pada suhu 3-5°C (Souhoka *et al.*, 2009).

Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, di dalam pengenceran semen perlu ditambahkan senyawa antioksidan. Penggunaan antioksidan dalam pengencer semen telah banyak dilaporkan seperti penggunaan astaxanthin dapat melindungi membran plasma spermatozoa. (Naguib, 2000) menyatakan bahwa antara astaxanthin dan jenis karoten lainnya telah memperlihatkan bahwa astaxanthin memiliki aktivitas antioksidan 10 kali lebih kuat dari kelompok karoten seperti β -karoten lainnya.

Astaxanthin adalah senyawa pigmen dari rumput laut yang berwarna merah dengan struktur molekul sedemikian rupa sehingga membuatnya menjadi aktif sebagai antioksidan golongan karotinoid yang merupakan antioksidan yang paling kuat saat ini. Penambahan antioksidan golongan karotinoid pada media pengencer semen hewan telah banyak dilakukan. Percobaan β -karoten telah dilakukan pada efektivitas berbagai konsentrasi β -karoten terhadap kualitas semen beku domba Garut. Perlakuan penambahan β -karoten yang dicobakan adalah: pengencer Tris + 0% (kontrol), 0,001 % (Kt0,001), 0,002% (Kt0,002), dan 0,003% (Kt0,003) β -karoten (Rizal, 2005).

Melihat besarnya peranan pengencer terhadap kualitas semen selama penyimpanan, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui penambahan glukosa, astaxanthin dan kombinasi glukosa dengan astaxanthin pada pengencer fosfat kuning telur yang disimpan pada suhu 3-5°C terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung.

METODE PENELITIAN

Bahan pengencer dibuat dengan melarutkan 1 tablet buffer fosfat kedalam 100 ml aquadestilata dan dilakukan pasteurisasi diatas kompor listrik selama 10 menit sambil diaduk agar homogen dan selanjutnya didinginkan. Untuk membuat kuning telur dilakukan dengan memecahkan telur dibagian tengah untuk mendapatkan kuning telur yang masih utuh dan terpisah dari putih telur kemudian kuning telur ditempatkan pada gelas beker dan dilakukan tusukan kuning telur agar pecah. Campurkan kuning telur kedalam larutan PBS dengan konsentrasi 20%, tambahkan antibiotik streptomycin kedalam bahan pengencer fosfat kuning telur untuk melindungi spermatozoa dari kontaminasi mikroorganisme (1000 µg/ml bahan pengencer). Timbang 0,6 g glukosa dengan timbangan analitik, kemudian larutkan glukosa kedalam 100 ml pengencer kuning telur fosfat. Timbang 0,004 mg astaxanthin dengan timbangan analitik, kemudian larutkan astaxanthin dengan 0,05 ml etanol dan aquadestilata, lalu larutkan kembali astaxanthin kedalam 100 ml pengencer kuning telur fosfat. Astaxanthin dilarutkan dengan etanol dan aquadestilata. Timbang 0,6 g glukosa dilanjutkan dengan menimbang 0,004 mg astaxanthin kemudian dilarutkan dengan 100 ml pengencer kuning telur fosfat.

Penampungan semen ayam kampung dilakukan dengan metode pemijatan atau massage pada bagian punggung ayam. Pada saat pengurutan, tangan membentuk sudut 45° dengan tulang punggung pejantan dan pengurutan dilakukan berulang kali sampai pejantan ereksi maksimal yang ditandai dengan naiknya bulu ekor dan keluarnya papillae dari kloaka. Semen yang keluar ditampung pada cawan petri dan dihindari dari kontaminasi oleh kotoran (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999).

Evaluasi semen dilakukan dengan 2 cara yaitu pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan semen secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH. Sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi gerakan massa, konsentrasi, motilitas dan persentase hidup atau mati (Hafez and Hafez, 2000).

Semen yang layak digunakan dalam penelitian ini harus memiliki volume $> 0,4$ ml / ekor, warna putih keruh, bau yang khas, konsistensi kental, pH $> 6,7$, gerakan massa +++++, konsentrasi semen $> 1,4$ M / ml, motilitas $> 80\%$, daya hidup $> 85\%$ dan abnormalitas $< 14\%$.

Pengenceran semen dilakukan dengan memasukkan semen kedalam bahan pengencer dengan konsentrasi sperma 150 juta/ml. dalam penelitian ini semen yang telah diencerkan disimpan pada refrigerator dengan suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ untuk dilakukan pengamatan selanjutnya.

Pengamatan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa dilakukan setiap 12 jam sekali. Pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan mengambil semen dari tempat penyimpanan refrigerator kemudian dihomogenkan lalu ditetaskan diatas object glass dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif. Sedangkan pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin sitrat dengan cara semen diambil dan diletakkan pada *object glass* kemudian ditetaskan pewarna eosin sitrat selanjutnya dibuat preparat hapusan dan dianginkan sampai kering, kemudian preparat diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah spermatozoa masih hidup. Data yang dikumpulkan berupa motilitas dan daya hidup spermatozoa yang dilakukan dengan interval waktu 12 jam dimulai saat penyimpanan sampai motilitas dan daya hidup spermatozoa dibawah 40%.

Data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis dengan menggunakan analisis *varians* selanjutnya dilakukan pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*. Bila terjadi perbedaan yang bermakna pada perlakuan maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Duncan. Penghitungan statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian motilitas spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan glukosa, astaxanthin serta kombinasi glukosa dengan astaxanthin yang disimpan pada suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ dapat di lihat pada tabel 1.1 dibawah ini.

Tabel 1.1. Rata-rata ($\bar{x} \pm SD$) motilitas spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan glukosa, astaxanthin serta kombinasi glukosa dengan astaxanthin yang disimpan pada suhu 3-5°C

Waktu Pengamatan	Motilitas (%)				
	Kontrol	Kontrol Etanol	Glukosa 0,6	Astaxanthin 0,004	Kombinasi Glukosa 0,6 & Astaxanthin 0,004
0 jam	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00
12 jam	88.25 ± 0.50	87.75 ± 0.50	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00
24 jam	85.50 ± 0.58	84.75 ± 0.50	87.00 ± 0.00	87.00 ± 0.00	88.00 ± 0.00
36 jam	82.50 ± 0.58	82.50 ± 0.58	85.00 ± 0.00	85.00 ± 0.00	86.75 ± 0.96
48 jam	77.00 ± 1.15	76.00 ± 1.15	82.25 ± 0.96	82.75 ± 0.50	84.00 ± 0.00
60 jam	69.25 ± 0.96	68.50 ± 0.58	72.50 ± 1.29	73.25 ± 0.96	79.50 ± 0.58
72 jam	57.75 ± 2.06	55.75 ± 0.96	66.25 ± 0.96	67.50 ± 0.58	70.75 ± 0.96
84 jam	47.00 ± 2.45	44.75 ± 0.96	53.50 ± 0.58	53.50 ± 0.58	57.50 ± 1.29
96 jam	32.75 ± 0.96	31.50 ± 0.58	46.00 ± 1.15	46.00 ± 1.15	49.25 ± 0.96
108 jam	10.25 ± 1.26	10.50 ± 0.58	35.50 ± 0.58	35.50 ± 0.58	40.75 ± 0.50

Uji lanjutan dengan menggunakan *Duncan* menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa dengan menggunakan perlakuan kombinasi glukosa 0,6 w/v % dengan astaxanthin 0,004 w/v % menunjukkan hasil paling baik untuk mempertahankan motilitas spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 3-5°C. (Tabel 1.2)

Tabel 1.2. Uji Duncan perlakuan penambahan kombinasi glukosa dengan astaxanthin terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung

Perlakuan	N	Subset			
		1	2	3	4
Kontrol Etanol	40	63.10			
Kontrol	40		63.92		
Glukosa 0.6%	40			70.60	
Astaxanthin 0.004%	40			70.85	
Astaxanthin 0.004% dengan Glukosa 0.6%	40				73.45

Penurunan motilitas spermatozoa ayam kampung terjadi seiring dengan lamanya waktu pengamatan (Tabel 1.3).

Tabel 1.3. Uji Duncan waktu pengamatan terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung

Waktu	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
108 jam		26.50								
96 jam	24		41.10							
84 jam	24			51.25						
72 jam	24				63.60					
60 jam	24					72.60				
48 jam	24						80.40			
36 jam	24							84.35		
24 jam	24								86.45	
12 jam	24									88.60
0 jam	24									89.00

Hasil penelitian daya hidup spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan glukosa, astaxanthin serta kombinasi glukosa dengan astaxanthin yang disimpan pada suhu 3-5°C dapat di lihat pada tabel 1.4 dibawah ini

Tabel 1.4. Rata-rata ($\bar{x} \pm SD$) daya hidup spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan glukosa, astaxanthin serta kombinasi glukosa dengan astaxanthin yang disimpan pada suhu 3-5°C

Waktu Pengamatan	Daya Hidup (%)				
	Kontrol	Kontrol Etanol	Glukosa 0,6	Astaxanthin 0,004	Kombinasi Glukosa 0,6 & Astaxanthin 0,004
0 jam	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00
12 jam	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00	92.00 ± 0.00
24 jam	89.50 ± 0.58	88.00 ± 1.41	90.00 ± 0.00	90.00 ± 0.00	90.75 ± 0.50
36 jam	87.00 ± 1.15	87.50 ± 1.00	89.00 ± 0.00	89.00 ± 0.00	89.50 ± 0.58
48 jam	83.00 ± 0.00	81.50 ± 0.58	86.25 ± 0.96	86.50 ± 0.58	87.75 ± 0.50
60 jam	77.50 ± 1.29	76.50 ± 0.58	81.00 ± 0.82	81.50 ± 0.58	84.50 ± 0.58
72 jam	65.00 ± 1.41	64.00 ± 0.82	72.25 ± 0.96	72.50 ± 0.58	77.00 ± 1.15
84 jam	53.25 ± 1.89	51.50 ± 0.58	59.50 ± 0.58	59.50 ± 0.58	63.00 ± 0.82
96 jam	39.50 ± 0.58	38.50 ± 0.58	51.25 ± 0.96	50.75 ± 0.96	53.75 ± 0.96
108 jam	16.25 ± 1.26	15.75 ± 0.50	40.50 ± 0.58	40.50 ± 0.58	46.00 ± 0.00

Uji lanjutan dengan menggunakan *Duncan* menunjukkan bahwa daya hidup spermatozoa dengan menggunakan perlakuan kombinasi glukosa dengan astaxanthin menunjukkan hasil paling terbaik untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa ayam kampung pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 3-5°C. (Tabel 1.5).

Tabel 1.5. Uji Duncan perlakuan penambahan kombinasi glukosa dengan astaxanthin terhadap daya hidup spermatozoa ayam kampung

Perlakuan	N	Subset			
		1	2	3	4
Kontrol Etanol	40	68.72			
Kontrol	40		69.50		
Glukosa 0.6%	40			75.37	
Astaxanthin 0.004%	40			75.42	
Astaxanthin 0.004% dengan Glukosa 0.6%	40				77.62

Penurunan daya hidup spermatozoa ayam kampung terjadi seiring dengan lamanya waktu pengamatan (Tabel 1.6).

Tabel 1.6. Uji Duncan waktu pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa ayam kampung

Waktu	N	Subset								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
108 jam		31.80								
96 jam	24		46.75							
84 jam	24			57.35						
72 jam	24				70.15					
60 jam	24					80.20				
48 jam	24						85.00			
36 jam	24							88.40		
24 jam	24								89.65	
12 jam	24									92.00
0 jam	24									92.00

Dalam penelitian ini di peroleh hasil bahwa glukosa dengan konsentrasi 0,6 w/v % dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal ini disebabkan karena glukosa dapat bertindak sebagai krioprotektan ekstra seluler untuk melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) dengan cara glukosa berikatan dengan glikolipid atau glikoprotein yang ada pada selubung sel (glikokaliks), disamping sebagai krioprotektan ekstra seluler glukosa juga bertindak sebagai cadangan energi.

Penambahan astaxanthin 0,004 % juga dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal ini disebabkan karena astaxanthin adalah merupakan antioksidan yang dapat melindungi spermatozoa dari peroksidasi lemak akibat adanya radikal bebas (oksidan). Dalam melindungi kerusakan spermatozoa akibat peroksidasi lemak, astaxanthin memutus reaksi rantai peroksidasi lemak dan melindungi lemak membran bereaksi dengan singlet oksigen (O^{\cdot}). Dimana menurut Naguib (2000) astaxanthin memiliki aktivitas antioksidan 10 kali lebih kuat dari kelompok β – karoten lainnya.

Dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa glukosa dan astaxanthin memiliki kemampuan yang sama, ($p>0,05$) sedangkan kombinasi antara glukosa dengan astaxanthin memiliki kemampuan yang berbeda secara nyata ($p<0,05$) dibandingkan dengan glukosa ataupun astaxanthin secara berdiri sendiri, hal ini menunjukkan bahwa glukosa dengan astaxanthin dapat bekerja secara sinergis dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5°C.

Waktu pengamatan memberikan hasil yang berbeda secara nyata ($p<0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa, hal ini menunjukkan bahwa pada suhu 3-5°C proses metabolisme spermatozoa dan reaksi oksidasi tetap berlangsung.

Pemberian etanol dapat menyebabkan penurunan motilitas, tetapi tidak mengurangi daya hidup spermatozoa, hal ini menandakan bahwa etanol mempunyai daya toksisitas terhadap motilitas spermatozoa.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Glukosa, astaxanthin dan kombinasi glukosa dengan astaxanthin dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5°C. Kombinasi glukosa dengan astaxanthin lebih baik dibandingkan dengan glukosa ataupun astaxanthin dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5°C.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian terhadap fertilitas dan daya tetas telur, yang dihasilkan dari proses IB dengan menggunakan semen yang telah terlebih dahulu diencerkan dengan menggunakan penambahan astaxanthin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1998. Buku Statistik Peternakan. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan.
- Herdis MR, Toelihere, SupriatnaI, PurwantaraB, AdikaraRTS. 2005. Optimalisasi Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) melalui Penambahan Maltosa ke dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur. MKH. 21(2).
- Ijaz A, Ducharme R. 1995. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C . *Theriogenology* 44:1039-1050.
- Naguib YMA. 2000. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural Chemicals*, 48:1150-1154.
- Partodihardjo S. 1982. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara, Jakarta: Cetakan I.
- Rizal, M. 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Betakarotein terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. *Animal Production*, 7(1) Januari 2005:6-13.
- Sastrodihardjo S. 1996. Inseminasi Buatan Pada Ayam Buras. Leaflet. Ciawi-Bogor: Cetakan kedua BALITNAK
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M. 2009. Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *J Vet.* 10 (3) : 135-142
- Sreeranjit CVK, Lal JJ. 1993. Glucose : Properties and Analysis. In *Encyclopedia Of Food Science, Food Technology & Nutrition*. Academic Press. pp.2898-2903.
- Suryohudoyo P. 2000. Kapita Selektallmu Kedokteran Molekular. Jakarta: C. V Sagung Seto: 31-47.
- Hafez ESE. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Di dalam: Hafez ESE, Hafez B (ed). *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 431- 442.