

Viabilitas Spermatozoa Ayam Hutan Hijau dalam Pengencer Posfat Kuning Telur Ditambah Laktosa pada Penyimpanan 5°C

**(GREEN JUNGGLE FOWL SPERM VIABILITY IN EGG YOLK PHOSFAT
DILUENTS CONTAINING LACTOSE STORED AT 5°C)**

Wayan Bebas, Desak Nyoman Dewi Indira Laksmi

Laboratorium Reproduksi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. Sudirman, Denpasar, Bali
Telepon (0361) 223791, Email : wayanbebas@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penambahan laktosa pada pengencer posfat kuning telur yang disimpan pada suhu 5°C terhadap membran plasma utuh (MPU), membran akrosoma utuh (MAU) spermatozoa ayam hutan hijau (*Gallus varius*), fertilitas dan daya tetas telur ayam kampung. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kelompok pengenceran semen ayam hutan hijau. Perlakuan I (T0) : pengencer posfat kuning telur tanpa penambahan apapun (kontrol); Perlakuan II (T1) : pengencer posfat kuning telur + laktosa 0,3%; dan perlakuan III (T2) : pengencer posfat kuning telur + laktosa 0,6%. Masing masing perlakuan terdiri dari sembilan ulangan. Semen dikumpulkan dari delapan ekor ayam hutan hijau. Evaluasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Semen diencerkan dengan masing masing perlakuan dengan satu dosis inseminasi (0,5 mL) dengan konsentrasi 150 juta sel motil progresif. Setelah diencerkan semen disimpan pada suhu 5°C selama 48 jam kemudian dilakukan pengamatan terhadap MPU, MAU, dan sebagian semen diinseminasikan pada ayam kampung betina untuk pengamatan fertilitas dan daya tetas telur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan laktosa 0,3% dan 0,6% memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) meningkatkan MPU, MAU, fertilitas, dan daya tetas telur jika dibandingkan dengan kontrol. Namun, penambahan laktosa 0,3% dan 0,6% tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0,05$). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan penambahan laktosa pada pengencer posfat kuning telur untuk menyimpan semen ayam hutan hijau pada suhu 3-5°C selama 48 jam mampu meningkatkan MPU, MAU, fertilitas, dan daya tetas telur ayam kampung.

Kata-kata kunci : laktosa, membran plasma utuh, membran akrosoma utuh, spermatozoa ayam hutan hijau.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the addition of lactose on egg yolk phosphate diluents stored at 5°C to the plasma membrane intact, acrosome membranes intact of green jungle fowl spermatozoa, fertility and hatchability of chicken eggs. This study used completely randomized design with three treatment groups. Treatment I (T0): egg yolk phosphate diluents only (control), treatment II (T1): egg yolk phosphate diluents + lactose 0.3%, and treatment III (T2): egg yolk phosphate diluents + lactose 0.6%. Each group was replicated nine times. Semen was collected from eight green jungle fowl and evaluated both macroscopically and microscopically. Semen was diluted with each treatment with a single insemination dose (0.5 mL) with a concentration of 150 million progressively motile cells. Once diluted, semen was stored at 3-5°C for 48 hours and then was observed for the plasma membrane of intact, acrosome membrane of intact, and some semen were inseminated on local female chicken village for fertility, and hatchability eggs observation. The results showed that the addition of lactose 0.3% and 0.6% providing significant increase ($P < 0.05$) on plasma membrane intact, acrosome membrane intact, fertility and egg hatchability when compared to controls. However the addition of 0.3% and 0.6% lactose did not showed a significant effect ($P > 0.05$). This study concluded that the addition of lactose on egg yolk phosphate diluents for storing green jungle fowl spermatozoa at 3-5°C for 48 hours can improve the plasma membrane intact, acrosome membranes intact, fertility and hatchability of chicken eggs.

Keywords: lactose, plasma membrane intact, acrosome membrane intact, green jungle fowl spermatozoa.

PENDAHULUAN

Lipid merupakan komponen utama semen unggas. Lipid terdapat pada plasma semen dan pada spermatozoa. Komposisi lipid dalam sel spermatozoa bersifat unik terdiri dari *poly unsaturated fatty acids* (PUFA) berantai panjang yang mempunyai peran penting dalam fungsi membran sel dan bioaktivasi biomolekul. Kadar PUFA yang tinggi dalam spermatozoa membuatnya sangat mudah mengalami kerusakan akibat adanya peroksidasi berupa serangan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) (Tabatabaei *et al.*, 2011). Selama proses penyimpanan pada suhu 3-5°C spermatozoa sering mengalami *cold shock*.

Cold shock dapat merusak membran plasma sel spermatozoa berupa perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C. Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein pada membran plasma menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran plasma rusak, yang menyebabkan ion-ion seperti ion kalsium, dan substrat lainnya bebas masuk ke dalam sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada membrane sel (Martinenaitte dan Tavenier, 2010).

Untuk meminimalkan kerusakan membran sel akibat pengaruh buruk suhu rendah (*cold shock*), maka upaya yang dapat dilakukan dengan menambahkan krioprotektan ke dalam pengencer. Ada dua jenis krioprotektan yaitu intraseluler dan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler digunakan untuk pembekuan semen seperti gliserol sedangkan krioprotektan ekstra seluler seperti karbohidrat digunakan untuk preservasi semen pada suhu rendah (3-5°C) (Labetubun dan Siwa, 2011).

Menurut Viswanath dan Shannon (2000), senyawa krioprotektan golongan karbohidrat seperti laktosa memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat laktosa sangat membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas. Aisen *et al.*, (2002) menyatakan golongan karbohidrat disakarida berperan menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel yang langsung berhubungan dengan pengencer. Selanjutnya

dinyatakan bahwa laktosa dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama pembekuan, dan menurunkan interaksi ikatan *van der Waals* di antara rantai karbon.

Aktivitas metabolisme spermatozoa secara fisiologi menghasilkan senyawa-senyawa oksigen reaktif. Oksigen secara fisiologi mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses metabolisme untuk menghasilkan energi. Mitokondria melalui reaksi redoks menggunakan oksigen untuk mengoksidasi molekul-molekul untuk menghasilkan *adenosin triphosphat* (ATP) sebagai sumber energi. Selama proses ini oksigen menghasilkan beberapa derivat oksigen, berupa radikal bebas ROS (Agarwal *et al.*, 2005; Apel dan Hirt, 2004; Wolf *et al.*, 2001).

Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup sel spermatozoa karena memiliki sifat yang sangat reaktif untuk memperoleh elektron. Radikal bebas menyerang dan mengambil elektron dari asam lemak tak jenuh yang banyak menyusun fosfolipid membran plasma sel, jika tidak dicegah akan terjadi reaksi otokatalitik (reaksi rantai) dan pada akhirnya merusak seluruh fosfolipida membran plasma sel spermatozoa (Rizal, 2005). Selama proses penampungan semen, pengenceran, dan penyimpanan terjadi peroksidasi lipid pada membran plasma yang menghasilkan radikal bebas (Partyka *et al.*, 2007; Blesbois *et al.*, 2005; Chabory *et al.*, 2010).

Laktosa merupakan salah satu senyawa pereduksi dan memiliki struktur yang stabil. Sebagai senyawa pereduksi, laktosa memiliki fungsi yang mirip dengan senyawa antioksidan karena mampu meredam senyawa-senyawa pengoksidasi, sehingga juga berperan dalam meminimalkan terjadinya reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi bersifat merugikan karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas membran plasma sel. Sebagai senyawa yang stabil, laktosa tidak mudah mengalami perubahan struktur menjadi bentuk ion yang dapat mengubah tekanan osmotik larutan pengencer semen. Perubahan tekanan osmotik larutan pengencer menjadi hipoosmotik atau hiperosmotik dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Lehninger, 1994). Penambahan laktosa pada pengencer akan mampu melindungi membran sel spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu dingin (3-5°C) dan serangan radikal bebas sehingga membran

sel tetap dalam keadaan utuh, motilitas sel dapat dipertahankan dan daya fertilitas tetap dalam keadaan baik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akibat penambahan laktosa pada pengencer posfat kuning telur yang kemudian disimpan pada suhu 5°C terhadap membrane plasma utuh (MPU), membrane akrosoma utuh (MAU) spermatozoa ayam hutan hijau, fertilitas dan daya tetas telur ayam kampung yang dibuahi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan delapan ekor ayam hutan hijau jantan dengan kisaran umur 1,5–2,0 tahun. Penampungan semen dilakukan dengan metode pemijatan Burrows dan Quinn (Yuwanta, 1993). Ayam hutan dipelihara secara individu dalam kurungan ayam terbuat dari bambu dengan diameter 50 cm, dan tinggi 75 cm. Kurungan digantung pada tempat yang tenang untuk menghindari ayam hutan dari stres. Ayam hutan diberi pakan berupa campuran jagung, beras merah, kacang hijau giling, dan gabah dengan perbandingan 1:1:1:1. Untuk menjaga kesehatannya, ayam hutan diberikan kroto segar atau jangkrik secukupnya dan dalam air minumnya ditambahkan obat antistress. Ayam kampung betina yang digunakan berumur tujuh bulan dalam keadaan masa produksi. Ayam kampung diberi pakan jadi (Part L®, Comfeed Indonesia) sebanyak 200 g per hari, pemberian air secara *ad libitum*. Ayam dikandangkan menggunakan kandang baterai. Kandang baterai berbentuk kotak berisi satu ekor ayam dengan ukuran tinggi 40 cm, dan lebar 20 cm

Semen yang telah ditampung (dari ke delapan pejantan) dihomogenkan lalu dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen secara makroskopis dan mikroskopis. Semen diencerkan menggunakan pengencer posfat kuning telur, dibuat dengan menambahkan 10% kuning telur ke dalam buffer posfat dengan penambahan antibiotik kanamisin 80 mg/L pengencer (Roca *et al.*, 2000). Semen diencerkan dengan pengencer yang diberi perlakuan laktosa konsentrasi 0,3% dan 0,6%. Laktosa 0,3% dan 0,6% dibuat dengan menambahkan masing-masing 0,3 g dan 0,6 g laktosa kristal (Merck) masing-masing kedalam 100 mL pengencer posfat kuning telur. Satu dosis inseminasi (0,5 mL) mengandung 150 juta sel motil progresif. Semen disimpan pada suhu 3-5°C selama 48 jam

kemudian dilakukan pengamatan terhadap MPU dan MAU.

Pemeriksaan MPU dengan menggunakan teknik *hyposmotic swelling test* (HOS) (Revell dan Mrode, 1994). Komposisi larutan hiposmotik terdiri : 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 20 mL larutan hiposmotik ditambahkan dengan 0,2 mL semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi berdasarkan pengamatan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus. Penilaian MPU dilakukan dalam persentase.

Pemeriksaan MAU dilakukan berdasarkan metode Saacke dan While (1972) yaitu dengan cara semen dipaparkan ke larutan NaCl 0,9% yang mengandung 1% formalin. Spermatozoa yang mempunyai membran akrosoma yang masih dalam keadaan utuh pada bagian ujung kepala/tudungnya akan kelihatan berwarna hitam tebal. Dilakukan penghitungan sebanyak 200 spermatozoa berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali. Penilaian MAU dilakukan dalam persentase.

Sebagian semen diinseminasikan pada ayam kampung betina dengan satu dosis inseminasi sebanyak 0,5 mL mengandung konsentrasi 150 juta sel yang motil progresif, yang dideposisikan di *utero vagina junction* (UVJ) dengan memasukkan alat inseminasi sedalam 3 cm. Inseminasi dilakukan sekitar jam 16.00 wita (Bebas, 2006). Telur dikumpulkan setelah hari I-XI pascainseminasi. Telur dieramkan dengan menggunakan mesin tetas, fertilitas telur diamati setelah lima hari pengeraman dengan cara peneropongan. Fertilitas telur dicatat dengan membagi telur yang fertil dengan jumlah telur yang dieramkan dikali seratus.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga kelompok perlakuan. Perlakuan I (T₀): Semen diencerkan dengan posfat kuning telur; Perlakuan II (T₁): Semen diencerkan dengan posfat kuning telur + laktosa 0,3%; Perlakuan III (T₂): Semen diencerkan dengan posfat kuning telur + laktosa 0,6%

Masing-masing perlakuan terdiri dari sembilan ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji Wilayah Bergandu Duncan (SPSS 17 *for window*)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil evaluasi semen dari delapan ayam hutan hijau secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Evaluasi semen ayam hutan hijau secara makroskopis dan mikroskopis

No.	Kualitas Semen Ayam Hutan Hijau	
1.	Volume (mL)	0,8
2.	pH	7,0
3.	Warna	Putih
4.	Bau	Khas
5.	Kekentalan	Kental
6.	Konsentrasi (10 ⁹ /mL)	2,53
7.	Sperma Bergerak Progresif (%) (MP)	89
8.	Daya Hidup (%) (DH)	90
9.	Abnormalitas (%)	5

Hasil persentase MPU, MAU, fertilitas, dan daya tetas telur ayam kampung akibat penambahan laktosa pada pengencer posfat kuning telur yang disimpan selama 48 jam disajikan pada Tabel 2.

Penambahan laktosa dengan konsentrasi 0,3% dan 0,6% memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan persentase MPU masing masing 38,33%, dan 37,00% jika dibandingkan dengan kontrol (30,00%). Laktosa dengan konsentrasi 0,3% memberikan pengaruh yang tidak nyata (P>0,05) jika dibandingkan dengan laktosa 0,6%.

Penambahan laktosa dengan konsentrasi 0,3% dan 0,6% memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan prosentase MAU masing masing 38,00%, dan 37,33% jika dibandingkan dengan kontrol (30,33%). Laktosa dengan konsentrasi 0,3% memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata (P>0,05) jika dibandingkan dengan laktosa 0,6%.

Penambahan laktosa dengan konsentrasi 0,3% dan 0,6% memberikan pengaruh yang nyata terhadap peningkatan fertilitas telur (P<0,05) masing masing 25,26%, dan 23,15% jika dibandingkan dengan kontrol (11,11%). Laktosa dengan konsentrasi 0,3% memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata (P>0,05) jika dibandingkan dengan konsentrasi laktosa 0,6%.

Penambahan laktosa 0,3% dan 0,6% menghasilkan daya tetas masing masing 25,26% dan 23,15% secara nyata lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan dengan kontrol (11,11%). Daya tetas penambahan laktosa 0,3% tidak memberikan pengaruh yang nyata (P>0,05) jika dibandingkan laktosa 0,6%

Penambahan laktosa baik konsentrasi 0,3% dan 0,6% pada pengencer dapat meningkatkan secara nyata (P<0,05) MPU, MAU spermatozoa ayam hutan hijau, fertilitas, dan daya tetas telur ayam kampung hal ini disebabkan karena

Tabel 2. Rataan persentase MPU, MAU, fertilitas, dan daya tetas telur ayam kampung setelah dibuahi spermatozoa ayam hutan hijau

Pengamatan	Perlakuan		
	T ₀	T ₁	T ₂
MPU (%)	30,00 + 1,00 ^a	38,33 + 0,58 ^b	37,00 + 1,00 ^b
MAU (%)	30,33 + 1,58 ^a	38,00 + 1,00 ^b	37,33 + 0,58 ^b
Fertilitas (%)	11,11 + 0,00 ^a	25,26 + 3,18 ^b	23,15 + 1,69 ^b
Daya Tetas (%)	11,11 + 0,00 ^a	25,26 + 3,18 ^b	23,15 + 1,69 ^b

Keterangan : Huruf yang berbeda kearah baris menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).
 T₀ : Semen diencerkan dengan posfat kuning telur tanpa penambahan laktosa
 T₁ : Semen diencerkan dengan posfat kuning telur + Laktosa 0,3%
 T₂ : Semen diencerkan dengan posfat kuning telur + Laktosa 0,6%
 MPU : membran plasma utuh
 MAU : membran akrosoma utuh

laktosa memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat laktosa ini membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas (Viswanath dan Shannon, 2000).

Karbohidrat disakarida berperan menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel yang langsung berhubungan dengan pengencer. Selanjutnya dinyatakan bahwa laktosa dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama pembekuan, dan menurunkan interaksi ikatan *van der Waals* di antara rantai karbon (Aisen *et al.*, (2002) . Hal inilah yang menyebabkan penambahan laktosa mampu meningkatkan MPU.

Laktosa juga merupakan salah satu senyawa pereduksi dan memiliki struktur yang stabil. Sebagai senyawa pereduksi, laktosa memiliki fungsi yang mirip dengan senyawa antioksidan karena mampu meredam senyawa-senyawa pengoksidasi, sehingga juga berperan dalam meminimalkan terjadinya reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi bersifat merugikan karena meniadakan produk yang dapat merusak integritas membran plasma sel. Sebagai senyawa yang stabil, laktosa tidak mudah mengalami perubahan struktur menjadi bentuk ion yang dapat mengubah tekanan osmotik larutan pengencer semen. Perubahan tekanan osmotik larutan pengencer menjadi hipoosmotik atau hiperosmotik dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Lehninger, 1994).

Laktosa sebagai salah satu karbohidrat golongan disakarida terdiri atas dua unit monosakarida, yakni glukosa dan galaktosa. Membran plasma sel mengandung karbohidrat yang berikatan dengan lipid (*glikolipid*) atau dengan protein (*glikoprotein*) yang disebut selubung sel atau *glikokaliks*. Hal ini yang dapat menjelaskan mengapa karbohidrat disebut sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler. Karbohidrat yang ditambahkan di dalam pengencer berfungsi melindungi *glikokaliks* membran plasma sel spermatozoa dari proses kerusakan selama preservasi semen (Lehninger, 1994).

Laktosa mempunyai peranan melindungi membran sel spermatozoa terhadap kerusakan selama proses pendinginan (mampu menanggulangi *cold shock*) sehingga dari hasil

penelitian menunjukkan terjadi peningkatan MPU, MAU yang mempunyai peranan yang sangat penting terhadap viabilitas sel dan proses fertilisasi sehingga dalam penelitian ini mampu meningkatkan daya fertilitas dan daya tetas jika dibandingkan dengan kontrol. Sifat laktosa yang mempunyai struktur yang setabil dan berfungsi sebagai senyawa pereduksi juga mampu mencegah terjadinya proses oksidasi terhadap membran sel.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Labetubun dan Siwa (2011), bahwa penambahan laktosa pada pengencer Tris menunjukkan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol mulai dari hari ketiga hingga hari ketujuh preservasi. Hal ini menunjukkan bahwa laktosa mampu memberikan perlindungan dan sekaligus sebagai substrat sumber energi bagi spermatozoa selama proses preservasi. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) karbohidrat merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler, dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap viabilitas sel. Metabolisme sel akan berlangsung dengan baik jika membran plasma sel tetap dalam keadaan utuh, karena membran plasma sel berperan dalam mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme (Lehninger, 1994).

Beberapa peneliti telah melakukan penambahan laktosa pada pengencer dan melaporkan bahwa penambahan laktosa dapat meningkatkan kualitas semen seperti pada semen beku domba garut (Rizal, 2005), semen cair domba garut (Rizal, 2006); penambahan laktosa dan maltosa pada semen cair sapi bali (Labetubun dan Siwa, 2011).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan laktosa pada pengencer posfat kuning telur untuk menyimpan semen ayam hutan hijau pada suhu 3-5°C selama 48 jam mampu meningkatkan membran plasma utuh, membran akrosoma utuh, fertilitas, dan daya tetas telur ayam kampung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Rektor Univ. Udayana yang telah memberikan biaya penelitian melalui skema penelitian Hibah Unggulan Unud 2012

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Sushila, Prabakaran, Said, TM. 2005. Minireview. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *Journal of Andrology* 26(6): 654-660.
- Aisen EG, Medina, VH, Venturino. 2002. Cryopreservation and Post-Thawed Fertility of Ram Frozen Semen in Different Trehalose Concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801-1808.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive Oxygen Species : Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Bebas W. 2006. Pengaruh Frekuensi dan Waktu Inseminasi Semen Ayam Hutan Hijau (*Gallus varius*) Terhadap Fertilitas Telur Ayam Kampung (*Gallus domesticus*). *Jurnal Veteriner* 7 (4): 163-168.
- Blesbois E, Graseau L, Seigneurin F. 2005. Membrane Fluidity and the Ability of Domestic Bird Spermatozoa to Survive Cryopreservation. *Reproduction* 129: 371-378
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Henry-Berger J, Vernet P, Cadet R, Saez, F, and Drevet J R. 2010. Mammalian Glutathione Peroxidases Control Acquisition and Maintenance of Spermatozoa Integrity. *J Anim Sci* 88:1321-133.
- Labetubun J, Siwa IP. 2011. Kualitas Spermatozoa Kauda Epididimis Sapi Bali dengan Penambahan Laktosa atau Maltosa yang Dipreservasi pada Suhu 3-5°C. *Jurnal Veteriner* 12(3): 200-207.
- Lehninger AL. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 2. Alih bahasa: Thenawijaya M. Jakarta. Erlangga. 73-106
- Martinenaite M. Tavenier J. 2010. Cryonics. 3rd semester project, Final report, Roskilde University. Roskilde. International Basic Studies in Natural Sciences.
- Partyka A, Jerysz A, Pokorny P. 2007. Lipid Peroxidation In Fresh and Storage Semen of Green Legged Partridge. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities (EJPAU)* 10 (2) : 480-484.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An Osmotic Resistance Test for Bovine Semen. *Anim Reprod Sci* 36: 77-86.
- Rizal M. 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi α -Karoten terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. *Animal Production* 7(1): 6-13
- Rizal M. 2006. Pengaruh Penambahan Laktosa di Dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis* 31: 224-231.
- Roca J, Mart'ínez S, Vázquez JM, Lucas X, Parrilla I, Mart'ínez A. 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 5°C. *Animal Reproduction Science* 64: 103-112.
- Saacke RG, White JM. 1972. Semen Quality Test and Their Relationship to Fertility. Proceeding 4th. Technology Conference on Artificial Insemination and Reproduction. Natl Assoc Anim Columbia (NAAB). Pp 22-27.
- Supriatna I. Pasaribu FH. 1992. *In Vitro* Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Tabatabaei S, Batavani R, Ayen RE. 2011. Effects of Vitamin E Addition to Chicken Semen on Sperm Quality During in Vitro Storage of Semen. *Veterinary Research Forum* 2: 103-111.
- Viswanath R, Shanon P. 2000. Storage of Bovine Semen In Liquid Frozen. *Anim Reprod Sci* 62: 23-53.
- Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S. 2001. Molecular Characteristics of Astaxanthin and Beta-Carotene in the Phospholipid Monolayer and their Distributions in the Phospholipid Bilayer. *Chem Phys Lipids* 113(1-2): 11-22.
- Yuwanta T. 1993. Perencanaan dan Tata Laksana Pembibitan Unggas PTI, 683, Sub Bagian Inseminasi Buatan pada Unggas. Yogyakarta. Program Studi Ilmu Ternak Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.