

Protein Kasar Plasma Seminalis Sapi Menurunkan Kejadian Nekrosis Spermatozoa Kambing yang Disimpan pada Suhu Dingin

*(BULL SEMINAL PLASMACRUDE PROTEIN DECREASING THE PERCENTAGE
OF NECROSIS IN GOAT SPERMATOZOA THAT KEPT IN COLD TEMPERATURE)*

Suherni Susilowati, Hardijanto, Indah Norma Triana

Departemen Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Airlangga, Kampus C Unair
Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115
Telpon: 031-5927832. E-mail : greatanesya@gmail.com

ABSTRAKS

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan manfaat protein plasma seminalis sapi yang ditambahkan dalam pengencer/*diluter* semen kambing pada suhu dingin. Penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan. Perlakuan control (P) adalah semen kambing + *diluter* (tanpa penambahan protein kasar plasma seminalis sapi); Perlakuan I (PI) adalah (*diluter* + semen kambing) + protein kasar plasma seminalis sapi (1:1); Perlakuan II (PII) adalah (*diluter* + semen kambing) + protein kasar plasma seminalis sapi (1:2). Kemudian disimpan di dalam lemari es (5°C). Semua perlakuan diperiksa setiap hari terhadap kejadian nekrosis spermatozoa kambing. Pemeriksaan pada *diluter* tanpa penambahan protein kasar plasma seminalis sapi menunjukkan kejadian nekrosis yang paling tinggi baik pada hari I, II, III, IV dan V. Nekrosis spermatozoa yang terjadi menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antar perlakuan kontrol, perlakuan I, dan perlakuan II. Pada perlakuan I menunjukkan persentase nekrosis paling rendah. Simpulan penelitian ini adalah penambahan protein kasar plasma seminalis sapi menurunkan kejadian nekrosis dalam *diluter* susu skim pada penyimpanan suhu dingin.

Kata-kata kunci : protein kasar plasma seminalis, sapi, nekrosis, spermatozoa kambing.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the benefits of bull seminal plasma crude protein in goat spermatozoa diluent to improve of frozen semen quality. This study consists of three treatments: (i) treatment control (P0, goat semen + diluents); (ii) treatment I (PI, diluent + goat semen + bull seminal plasma crude protein (1:1)); and (iii) treatment II (PII, diluent + goat semen + bull seminal plasma crude protein (1:2)). All treatments were kept in a refrigerator (5°C) and observed for necrosis of goat spermatozoa, daily. The highest spermatozoa necrosis was observed in the diluter without the bull seminal plasma crude protein either at day 1, 2, 3, 4 or day 5. The necrosis was statistically significant different ($p < 0,05$) between P0, PI and PII. With the lowest percentage necrosis at PI. In conclusion, the addition of bull seminal plasma crude protein in skim milk diluent will decrease the incidence of necrosis in goat spermatozoa which were kept in cold temperature.

Keywords: crude protein plasma seminalis, bull's, necrosis, goat's spermatozoa

PENDAHULUAN

Plasma seminalis adalah suatu medium spermatozoa yaitu campuran kompleks yang terdiri dari sekresi dari testes, epididimis dan kelenjar asesoris. Campuran tersebut terdiri dari beberapa bahan seperti bahan organik dan anorganik yang merupakan faktor yang memerankan pendewasaan spermatozoa melalui mekanisme hormonal dan enzimatis (Manjunanth *et al.*, 1993). Plasma seminalis juga mengandung faktor dekapasitasi (DF) yang pada waktu ejakulasi melapisi permukaan spermatozoa. Faktor-faktor dekapasitasi tersebut mengikat permukaan spermatozoa, mengaktifkan kalsium intraseluler ATP-ase untuk mempertahankan konsentrasi kalsium intraseluler tetap rendah (Baldi *et al.*, 1996). Faktor yang terdapat dalam plasma seminalis dapat memengaruhi viabilitas, motilitas, dan integritas membran spermatozoa dalam keadaan dingin (Beatriz *et al.*, 2000). Plasma seminalis menambah persentase spermatozoa yang motil selama pendinginan, pembekuan, dan *thawing* (Graham, 1994). Plasma seminalis mamalia mempunyai fungsi menghambat maupun merangsang fungsi spermatozoa. Komponen plasma seminalis khususnya protein berperan melapisi permukaan spermatozoa setelah ejakulasi, pada saat spermatozoa melalui saluran reproduksi betina (Muino-Blanco *et al.*, 2008). Perbaikan terhadap membran plasma sel, berpengaruh positif terhadap proses-proses biokimia di dalam sel dan pada akhirnya dapat memperbaiki kualitas spermatozoa yang lain seperti motilitas dan viabilitas spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami nekrosis dikaitkan dengan hilangnya motilitas (Lachaud *et al.*, 2004). Nekrosis mengakibatkan berbagai macam tahapan perubahan pada inti yaitu inti nampak lebih padat dan berwarna gelap hitam (piknosis), kemudian inti terbagi atas fragmen-fragmen (karioreksis), dan pada tahapan akhir menyebabkan inti tidak lagi berwarna jelas atau pucat/kariolisis (Soemirat, 2005).

Semen beku merupakan proses pembekuan semen pada suhu -196°C menggunakan pendingin nitrogen cair. Proses pembekuan menyebabkan kerusakan fungsi maupun struktur membran dan kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan hidup (Lessards *et al.*, 2000). Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama viabilitasnya. Kendala utama dari proses

pembekuan ini adalah terjadinya kerusakan sel. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga terjadi peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan bersifat racun selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya *osmotic swelling* (Kassai, 1996). Kerusakan selama pembekuan umumnya terjadi pada membran plasma maupun pada inti spermatozoa atau yang disebut dengan nekrosis. Kerusakan pada inti spermatozoa dapat menyebabkan mutasi gen. Nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel secara akut dan bersifat irreversibel dan sel tidak dapat melangsungkan metabolisme. Nekrosis disebabkan karena sel tidak mampu beradaptasi dan adanya kerusakan membran plasma sehingga tidak mampu mempertahankan homeostasis, yang menyebabkan masuknya air dan ion ekstraseluler (Edinger dan Thompson, 2004). Nekrosis memiliki ciri kerusakan membran sel sebagai akibat dari hilangnya integritas membran serta kerusakan pada kromatin inti sel (Pamungkasiwi, 2006) dan adanya pembengkakan dan rusaknya membrane (Feitosa *et al.*, 2008).

Sampai saat ini proses pembekuan semen kambing masih belum memuaskan, hal tersebut disebabkan karena plasma seminalis kambing mengandung (*egg yolk coagulating enzyme*) atau disebut dengan fosfolipase A dan trigliserol lipase (Gazali dan Tambing, 2002). Selain itu membran plasma spermatozoa kambing rentan terhadap cekaman dingin yang disebabkan oleh rendahnya kadar kolesterol pada membran plasma spermatozoa (Colas *et al.*, 2012). AliMehr dan Sharafi (2013) menyatakan bahwa penambahan *crude* plasma seminalis domba dalam bahan pengencer kuning telur pada proses pendinginan dan beku menunjukkan efek yang buruk terhadap kualitas spermatozoa domba. Hal tersebut berbeda dengan pendapat Perez-Pe *et al.*, 2001, yang menyatakan bahwa penambahan protein plasma seminalis dalam pengencer pada suhu beku dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa domba. Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini bertujuan mengkaji penambahan protein kasar plasma seminalis sapi ke dalam bahan pengencer susu yang disimpan pada suhu 5°C (lemari es) terhadap kejadian nekrosis spermatozoa kambing.

METODE PENELITIAN

Penampungan Semen Sapi

Semen ditampung dari sapi *simental* pejantan dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan disiapkan dengan memasang kedua selubung dan alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air hangat yang bersuhu 45°C dengan tujuan memberi suhu terhadap selubung dalam sebesar 42-43°C dan sepertiga bagian depan selubung dalam vagina buatan diolesi vaselin. Setelah vagina buatan selesai dipersiapkan, pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium untuk dipisahkan dari spermatozoa dan plasmanya digunakan untuk ditambahkan kedalam bahan pengencer semen kambing.

Semen kambing ditampung dengan vagina buatan dan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi, dan uji resistensi.

Pemisahan Protein Plasma Seminalis Sapi

Setelah semen sapi diperiksa secara mikroskopis dan makroskopis dengan syarat persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa di atas 70%, maka dilakukan proses selanjutnya, semen disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit untuk memisahkan spermatozoa dari plasma seminalis. Plasma seminalis kemudian disonikasi pada suhu 4°C dengan cara satu menit disonikasi setengah menit berhenti, cara tersebut dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan fraksinasi protein. Supernatan diambil dan disimpan dalam lemari es selama satu malam. Setelah penyimpanan satu malam supernatannya diambil untuk perlakuan selanjutnya.

Sampel Semen Kambing Kacang

Semen kambing ditampung dengan vagina buatan dan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi, dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi

gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi, dan uji resistensi. Semen kambing yang digunakan adalah utuh dan pada pemeriksaan spermatozoa terhadap gerakan individu dan viabilitasnya persentasenya di atas 70%.

Pembuatan Bahan Pengencer Susu dan Penambahan Protein Kasar Plasma Seminalis Sapi

Susu skim ditimbang sebanyak 10 gram kemudian ditambah air 100 mL dan dipanaskan 92-95°C. Susu skim tersebut selanjutnya didinginkan sampai suhu 20-27°C, ditambah penicillin 1000 IU/mL dan streptomycin 1mg/mL bahan pengencer. Setelah bahan pengencer susu disiapkan, kemudian semen kambing yang telah dievaluasi ditambahkan protein kasar plasma seminalis sapi. Perlakuan Kontrol (P0) adalah bahan pengencer + semen kambing (tanpa protein kasar plasma seminalis sapi). Perlakuan I (P1) adalah bahan pengencer, semen kambing + protein kasar plasma seminalis sapi (1 : 1), Perlakuan II (P2) adalah bahan pengencer, semen kambing + protein kasar plasma seminalis sapi (1 : 2). Kemudian ketiga perlakuan tersebut disimpan pada suhu 5°C dan diperiksa setiap hari terhadap kejadian nekrosis spermatozoa. Pengujian nekrosis dilakukan dengan pewarnaan hematoksin eosin (HE).

Pemeriksaan Nekrosis Spermatozoa

Semen diteteskan di atas gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan pada empat ujungnya telah diberi vaselin. Preparat spermatozoa difiksasi dengan metanol absolut selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan hematoksin dan eosin (HE) dengan melewati beberapa tahap yaitu pemberian zat warna HE, dehidrasi, *clearing*, dan *mounting*. Setelah terwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali. Spermatozoa yang mengalami nekrosis dapat diketahui melalui inti sel yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Inti sel yang mengalami piknosis dicirikan sebagai inti sel yang terlihat lebih padat, dan berwarna gelap hitam. Karioreksis berupa inti sel yang terbagi atas fragmen-fragmen, sedangkan kariolisis berupa inti sel yang tidak lagi berwarna jelas atau pucat bahkan inti sel menghilang (Soemirat, 2005). Pengamatan dilakukan dalam lapang pandang sebanyak 100 spermatozoa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini kualitas semen segar sapi yang digunakan masih dalam keadaan normal yaitu motilitas dan viabilitasnya di atas 70% sehingga memenuhi syarat untuk dipisahkan protein plasmanya. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi, disajikan pada Tabel 1.

Menurut Salisbury dan Van Demark (1985), volume semen yang diejakulasikan dari setiap pejantan tidaklah sama. Pada umumnya volume semen bertambah banyak sesuai dengan umur, besar tubuh, perubahan keadaan lingkungan, kesehatan organ reproduksi, dan frekuensi penampungan semen. Derajat keasaman (pH) sangat memengaruhi daya hidup spermatozoa. Bila pH tinggi atau rendah, menyebabkan spermatozoa tersebut mati. Derajat keasaman (pH) semen dipengaruhi oleh konsentrasi asam laktat yang dihasilkan dalam proses akhir metabolisme.

Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi simental

Indikator	Karakter
Volume	5,7 mL
Konsistensi	Kental
Warna	Putih susu
Bau	Khas
pH	6,6
Gerakan massa	+++
Gerakan individu	Progresif(P)
Motilitas	85%
Viabilitas	88%
Konsentrasi	2330x10 ⁶ spermatozoa/mL

Adanya nekrosis spermatozoa kambing yang diencerkan dengan susu skim yang ditambah dengan protein kasar plasma seminalis sapi disajikan pada Tabel 2. Nekrosis pada spermatozoa ditandai dengan adanya tahapan perubahan pada inti yaitu inti terlihat lebih padat, warna hitam gelap (piknosis), kemudian inti terbagi atas fragmen-fragmen (karioreksis), dan pada tahapan terakhir inti tidak lagi berwarna jelas atau pucat (kariolisis) terlihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

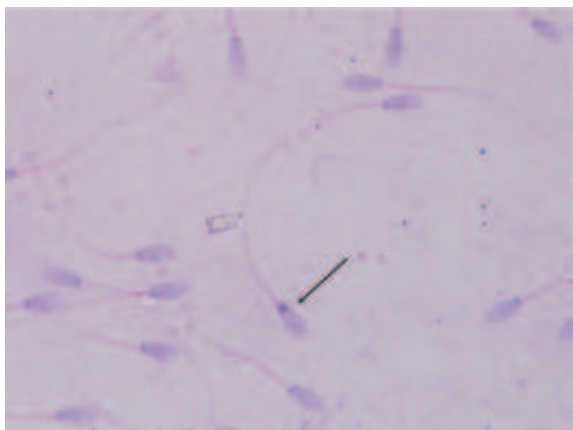
Pada Tabel 2 disajikan bahwa penambahan protein kasar plasma seminalis sapi dalam bahan pengencer semen kambing menghasilkan perbedaan yang nyata terhadap kejadian nekrosis spermatozoa. Pengamatan pada P1 yaitu satu bagian bahan pengencer semen kambing dan satu bagian protein kasar plasma seminalis sapi menghasilkan persentase nekrosis yang paling rendah baik pada penyimpanan hari I, II, III, IV, dan V. Uji sidik ragam terhadap kejadian nekrosis spermatozoa kambing menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara P0, P1, dan P2. Uji jarak berganda Duncan pengamatan kejadian nekrosis spermatozoa pada kelompok P1 menunjukkan persentase nekrosis spermatozoa yang terendah.

Nekrosis adalah kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan sel secara akut dan bersifat *irreversible* dan sel tersebut tidak dapat melangsungkan metabolisme. Nekrosis disebabkan karena sel tidak mampu beradaptasi dan adanya kerusakan membran plasma sehingga sel tidak mampu mempertahankan homeostasis yang menyebabkan masuknya air dan ion ekstraselluler (Edinger dan Thompson, 2004). Rusaknya membran sel mengakibatkan meningkatnya permeabilitas membran sel sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak

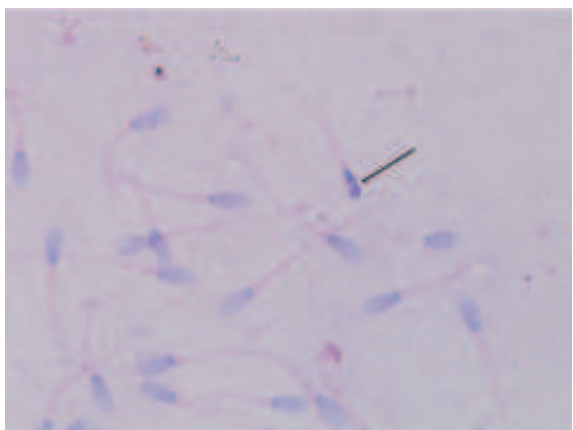
Tabel 2. Rataan persentase kejadian nekrosis spermatozoa kambing yang diencerkan dengan susu skim pada perlakuan yang disimpan pada suhu dingin (5°C) dan diperiksa setiap hari (enam kali ulangan)

Perlakuan	Hari I (%)	Hari II (%)	Hari III (%)	Hari IV (%)	Hari V (%)
P0 (Kontrol)	4,00±1,78 ^a	5,00±1,25 ^a	7,00±2,00 ^b	8,00±1,75 ^b	11,00±1,20 ^c
P1(1:1)	2,00±1,65 ^a	3,00±2,00 ^a	6,00±1,80 ^a	6,00±2,35 ^a	7,00±1,45 ^a
P2(1:2)	3,00±2,35 ^b	4,00±1,75 ^b	7,00±2,10 ^b	8,00±1,50 ^b	10,00±1,60 ^b

Keterangan : Huruf yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$); P0 : Semen kambing + bahan pengencer susu (tanpa protein kasar plasma seminalis sapi); P1: (1 bagian semen kambing + bahan pengencer susu) + 1 bagian protein kasar plasma seminalis sapi); P2 : (1 bagian semen kambing + bahan pengencer susu) + 2 bagian protein kasar plasma seminalis sapi)



Gambar 1. Spermatozoa yang mengalami piknosis (inti tampak memadat)



Gambar 2. Spermatozoa yang mengalami karioreksis (inti mengalami fragmentasia)



Gambar 3. Spermatozoa yang mengalami kariolisis (inti tampak pucat)

boleh melewati membran sel dapat dengan bebas keluar masuk sel dan akhirnya integritas spermatozoa terganggu (Agaerwal *et al.*, 2003).

Semakin lama semen disimpan pada suhu dingin, membuat banyak energi yang dikeluarkan. Energi yang tersedia, terkuras habis dan adenosin tri phosphate akan habis mengakibatkan membran spermatozoa menjadi lebih semipermeabel terhadap elektrolit. Keadaan tersebut berakibat membran sel pecah yang berakhir dengan kematian spermatozoa. Hal tersebut sesuai pendapat De Jarnette *et al.* (2000) bahwa peningkatan persentase nekrosis disebabkan oleh kondisi membran setelah penyimpanan pada suhu dingin. Makin lama waktu penyimpanan semen, *reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk juga makin banyak sehingga tidak mampu diredam oleh sistem antioksidan. Senyawa ROS tersebut menyebabkan kerusakan *polyunsaturated fatty acid* yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA yang selanjutnya menyebabkan kematian spermatozoa (Alvarez dan Storey, 1995). Selain itu ROS yang terbentuk, merusak struktur membran mitokondria spermatozoa sehingga menginduksi terjadinya nekrosis spermatozoa. Makin tinggi produksi ROS maka tingkat peroksidasi lipid pada membran juga meningkat (Suryohudoyo, 2000). Dalam konsentrasi rendah ROS berperan penting sebagai mediator pada fungsi spermatozoa normal dan terlibat dalam hiperaktivasi, kapasitas, reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur (Lamirande *et al.*, 1997). Pada kelompok PI, kejadian nekrosis adalah yang terendah, hal ini kemungkinan plasma seminalis sapi tidak mengandung enzim fosfolipase A dan protein kasar yang ada pada plasma seminalis sapi dapat bertindak sebagai antioksidan. Tetapi, apakah dengan jalan mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksigen secara berlebihan ataukah mencegah reaksi rantai berlanjut, belum jelas dipahami. Beatriz *et al.*, 2000, menyatakan bahwa faktor yang terdapat didalam plasma seminalis sapi dapat memengaruhi motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa dalam keadaan dingin.

SIMPULAN

Protein kasar plasma seminalis sapi dapat menurunkan persentase kejadian nekrosis spermatozoa kambing yang disimpan pada suhu dingin.

SARAN

Pada proses pembekuan semen kambing sebaiknya dalam bahan pengencer ditambah dengan protein kasar plasma seminalis sapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Ditlitabmas tahun anggaran 2015. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Agaerwal A, Saleh RA, Bedalwy MA. 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertil Steril* 79: 829-843.
- AliMehr R M, Sharafi F. 2013. The Effect of Seminal Plasma on the Quality of Coated Ram Frozen-Thawed Spermatozoa. *Iranian J Veterinary Research* 14(4): 305-312.
- Alvarez JG, Storey . 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid into and Peroxidative Loss of Fatty Acid from Phospholipid of Human Spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42: 334-345.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. 1996. Human Sperm Activation During Capacitation And Acrosom Reaction :Role of Calcium, protein phosphorylation and Lipid Remodeling Pathways. *Frontiers in Bioscience* 1: 189-205.
- Beatriz B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, .Osada J, Muino Blanco, Cebrian Perez JA. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology Reproduction* 63: 1531-1537.
- Blanco TM, Perez-Pe R, Cebrian Perez JA. 2008. Seminal Plasma Protein and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Dom Anim* 43(4):18-31
- Colas CR, Perez-Pe A, Casao M, Ollero L, Gallego T, Blanco M Cebrian Perez JA. 2012. Remodelling of Lipid Rafts During In Vitro Capacitation and Acrosome Reaction of Ram Spermatozoa. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 3: 191
- De Jarnette JM, Barnes DA, Marshall CE.2000. Effect of Pre and Post Thaw Termhal Insults on Viability Characteristics of Cry Preserved Bovine Semen. *Theriogenology* 53: 1225-1238.
- Edinger Al, Thompson CB. 2004. Death by Design : Apoptosis, Nekrosis and Authophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 663-669.
- Gazali M, Tambing SN. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *J Hayati* 9(1): 27-32.
- Graham JK. 1994. Effect of Seminal Plasma on the Motility of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa of The Ram and Bull During Cryopreservation *Theriogenology* 41: 1151-1162.
- Kassai M. 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. *Animal Reproduction Science* 42(1): 67-75.
- Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C. 2004. Apoptosis and Necrosis in Human Ejaculated Spermatozoa. *Human Reprod* 19: 607-610.
- Lessards C, Parent S, Leclers P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation Alters the Levels of The Bull Sperm Surface Protein P25b. *J Andrology* 21: 700-707.
- Lamirande EH, Jiang A, Kodana H, Gagnon C. 1997. Reactive Oxygen Species and Sperm. *Physiol Rev Reprod* 2(1): 48-54.
- Manjunanth P, Chandonnet L, Leblond E, Denoyers L. 1993. Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 49: 27-37.
- Manjunanht P, Therien I, Souberyrand S. 1997. Major Protein of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High Density Lipoprotein. *Biol Reprod* 57(5): 1080-1088.
- Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian Perez JA. 2008. Seminal Plasma Protein and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Domest Anim* 4: 18-31.

- Pamungkasiwi. 2006. *Mikromineral Seng dalam Kehidupan Manusia*. Yogyakarta. Dinas Kesehatan Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta.
- Perez-Pe R, Cebrian Perez JA, Muino Blanco-T. 2001. Semen Plasma Protein Prevent Cold Shock Membrane Damage. *Theriogenology* 56: 425-434.
- Salisbury GW, Van Demark NL. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada sapi*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Soemirat J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta Gadjah Mada University Press..
- Suryohudoyo P. 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Cetakan I. Jakarta : CV Sagung Seto Hlm. 31-47.