

PENGARUH PENAMBAHAN α -TOKOFEROL PADA MEDIA PENGECER TRIS KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR DOMBA GARUT

Herdis, Ida Kusuma dan I Wayan Angga D.

Pusat Teknologi Produksi Pertanian Deputi Bidang TAB BPPT
Gd. BPPT II Lt. 16 Jl. M.H. Thamrin no. 8 Jakarta Pusat
kangherdis@yahoo.co.id

Abstract

*The study was conducted to know the influence of α -tocopherol additional into the egg yolk tris extender medium to the liquid semen quality of "Garut" lamb (*Ovis aries*). Parameter which had been evaluated i.e. percentages of progressive motile sperm, percentages of viable sperm and percentages of plasma membrane. On the 4th day evaluation showed that the addition of α -tocopherol with the dose 0,04 g/100 ml into the egg yolk tris extender produced the highest percentages of progressive motile sperm, percentages of viable sperm and percentages of plasma membrane (49,0 \pm 6,5%; 68,6 \pm 4,2% and 59,3 \pm 6,5%) but there were not significantly different from control (45,5 \pm 5%; 66,0 \pm 4,6% and 56,2 \pm 5,7%) and the addition of α -tocopherol with the dose 0,02 g/100 ml (49,0 \pm 6,5%; 66,6 \pm 4,0% and 59,3 \pm 2,8%) respectively. In conclusion, the addition of α -tocopherol in the egg yolk tris extender medium no significant effect on the liquid semen quality.*

Kata kunci : α -tokoferol, semen cair, domba garut

1. PENDAHULUAN

Semen merupakan cairan yang mengandung spermatozoa dan hasil-hasil kelenjar kelamin pelengkap Pada proses pengolahan semen, masalah yang sering timbul biasanya rusaknya membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya peroksidasi lipida (Herdis, 2005). Keadaan ini terjadi karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi (Maxwell dan Watson, 1996).

Saat pengolahan semen terjadi kontak antara semen dan udara bebas yang mengandung oksigen. Hal ini menyebabkan tingginya aktivitas metabolisme oksidatif yang berpotensi menghasilkan radikal bebas.

Guna meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, biasanya di dalam pengencer semen ditambahkan senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan ini akan bereaksi dengan radikal bebas, sehingga dapat meminimalkan kerusakan yang terjadi pada membran plasma sel spermatozoa. Menurut Suryohudoyo (2000) membran plasma merupakan bagian sel yang paling rentan mengalami kerusakan akibat serangan senyawa radikal bebas. Hal ini karena dua dari tiga komponen utama membran plasma sel yakni fosfolipida dan

glikolipida mengandung asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, dan arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan senyawa radikal bebas.

Pemakaian beberapa antioksidan untuk memperbaiki kualitas semen telah banyak dilaporkan antara lain vitamin C pada semen beku sapi (Beconi *et al.*, 1993), vitamin C dan E pada semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003), serta vitamin E dan *butylated hydroxytoluene* (BHT) pada semen beku domba *st. croix* (Feradis, 1999). Penggunaan senyawa α -tokoferol juga dilaporkan pada semen beku kambing peranakan etawah (Werdhany *et al.*, 2000) dan pada semen beku domba garut (Herdis *et al.*, 2002).

Vitamin E atau α -tokoferol merupakan salah satu antioksidan yang termasuk ke dalam kelompok yang dikenal sebagai antioksidan. Antioksidan ini mengandung substansi yang dapat menghambat oksidasi oleh reaksinya dengan radikal bebas dan kemudian menghambat rantai reaksi berikutnya. Contoh lain dari kelompok ini adalah *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *butylated hydroxytoluene* (BHT).

Menurut Combs (1992) *tokoferol* mempunyai fungsi dasar yang penting dalam pemeliharaan integritas membran pada seluruh sel tubuh. Fungsi antioksidan *tokoferol* meliputi reduksi radikal bebas yang kemudian menghambat reaksi

yang mempunyai kemampuan merusak seperti tingginya spesies oksidatif reaktif.

Menurut Mayes (1995) *Tokoferol* merupakan baris pertama pertahanan terhadap peroksidasi asam-asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam fosfolipid membran seluler dan subseluler. Sebagai antioksidan, *tokoferol* bertindak dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas sebagai akibat kemampuannya untuk memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksidasi dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi.

Domba garut (*Ovis aries*) merupakan plasma nutfah domba Indonesia yang sangat potensial untuk dikembangkan. Domba garut jantan dewasa rata-rata mempunyai berat badan sekitar 60-80 kg bahkan bisa mencapai 120 kg, sedangkan domba garut betina mempunyai berat badan sekitar 30-40 kg. Domba garut jantan memiliki postur yang gagah dan tanduk yang khas dengan ukuran yang besar, kokoh, kuat dan melingkar. Domba garut jantan biasa digunakan sebagai domba laga yang berperan dalam industri pariwisata sehingga mempunyai nilai ekonomis yang lebih tinggi dibandingkan domba local (Herdis *et al.*, 2006)

Melihat peranan α -*tokoferol* sebagai antioksidan yang berperan penting dalam melindungi spermatozoa selama penyimpanan, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan α -*tokoferol* kedalam media pengencer semen cair Tris kuning telur. Hasil penelitian diharapkan menjadi informasi yang bermanfaat untuk mengembangkan inseminasi buatan dengan semen cair domba Garut sehingga dapat membantu meningkatkan populasi domba Garut sekaligus melaksanakan konservasi plasma nutfah domba Indonesia.

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Kecamatan Ciomas Kabupaten Bogor. Penelitian menggunakan enam ekor domba Garut jantan yang digunakan sebagai penghasil semen. Hewan percobaan dikandangan dalam kandang individu yang masing-masing dilengkapi dengan tempat pakan. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput segar dilengkapi dengan konsentrat.

Bahan-bahan yang digunakan adalah semen segar domba Garut, pengencer semen Tris-kuning telur, α -*tokoferol*, penisilin, streptomisin, akuades, *K-Y jelly* dan alkohol. Sedangkan alat-alat yang digunakan terdiri atas vagina buatan dan

Menggunakan zat pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak berwarna sedangkan yang mati berwarna merah. Evaluasi menggunakan sistem skor 0% sampai 100%.

Evaluasi persentase membran plasma utuh (%)

perlengkapannya, tabung sperma, mikroskop cahaya, gelas objek, gelas penutup, gelas erlenmeyer, gelas piala, timbangan mikro dan *waterbath*.

Pengencer semen Tris-kuning telur yang digunakan menggunakan komposisi pengencer : 2,42 g Tris (*hydroxymethyl*) aminomethan (Merck, Germany, cat. K27219882003), 1,28 g asam sitrat monohidrat (Merck, Germany, cat. K22939944632), 2,16 g D(-) fruktosa (Merck, Germany, cat. K27917123038), 100.000 IU penisilin-G (Meiji, Japan, cat. APG 0598 J) 50 mg streptomisin sulfat (Meiji, Japan, cat. SSL 1095 A), ad 100 ml akuabidestilata (Supracointra, Indonesia).

Setelah di campur secara merata pengencer semen dibagi menjadi tiga kelompok sesuai dengan jenis perlakuan dengan penambahan α -*tokoferol* yakni :

1. Kelompok pengencer tanpa α -*tokoferol* (kontrol).
2. Kelompok pengencer dengan α -*tokoferol* 0,02 g/100 ml pengencer .
3. Kelompok pengencer dengan α -*tokoferol* 0,04 g/100 ml pengencer .

Penampungan semen dilakukan dengan menggunakan metode vagina buatan. Segera setelah ditampung semen segar yang diperoleh dievaluasi secara mikroskopis dan makroskopis. Kemudian semen segar dicampurkan secara merata kepada masing-masing kelompok perlakuan dan disimpan pada lemari es.

Evaluasi dilakukan untuk melihat perubahan persentase motilitas, persentase hidup dan membran plasma utuh spermatozoa domba Garut pada semen cair yang telah diberi perlakuan α -*tokoferol* yang berbeda. Pengamatan dilakukan setiap hari pada pagi hari selama empat hari percobaan. Penelitian menggunakan enam kali ulangan dengan individu domba jantan sebagai ulangan.

Persentase Motilitas (%M) adalah persentase sperma yang bergerak kedepan, dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran objektif 40 kali. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan sistem skor. Skor 0% (tidak ada yang bergerak) sampai 100% (seluruh sperma bergerak kedepan).

Persentase hidup (%H) adalah persentase spermatozoa yang hidup, dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran objektif 100 kali.

Evaluasi membran plasma utuh (MPU) dilakukan dengan menggunakan metode Uji hipoosmotik atau *Hypo Osmotic Swelling* (HOS) *test*. Pengujian dilakukan dengan cara mencampur 0,1 ml semen dengan 9,9 ml medium hipoosmotik. Medium hipoosmotik dibuat dengan

melarutkan 0.179 NaCl ke dalam aquabidestilata menjadi 100 ml larutan. Setelah dicampurkan, sediaan diinkubasi dalam *waterbath* bersuhu 37°C selama 30 menit. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Penilaian dilakukan dengan sistim skor 0% sampai 100%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Evaluasi Semen Segar

Supaya dapat diproses lebih lanjut, semen segar harus mempunyai persentase motil progresif minimal 65%, konsentrasi spermatozoa minimal 700 juta spermatozoa/ml dan abnormalitas kurang dari 20% (Toelihere, 1993). Menurut Ax *et al.* (2000), spermatozoa dengan abnormalitas lebih dari 20 % tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Tabel 1 menunjukkan kualitas semen segar domba garut yang diperoleh pada penelitian.

Tabel 1. Rataan Evaluasi Makroskopis dan Mikroskopis Semen Segar

Parameter	Rataan
Volume (ml)	1,09 ± 0,28
Warna	Putih susu
Konsistensi	Kental
pH	6,9 ± 0,10
Gerakan massa	3,0 ± 0,
Konsentrasi (juta/ml)	3735 ± 37
Persentase spermatozoa motil (%M)	76,5 ± 2,34
Persentase Spermatozoa hidup (%H)	87,33 ± 2,25
Persentase spermatozoa abnormal (% Ab)	3,28 ± 0,85
Persentase membran plasma utuh (MPU)	87,17 ± 3,37

Warna semen yang ditampung adalah putih susu atau krem. Hasil ini sesuai dengan pendapat Ax *et al.* (2000) dan penelitian Qomariyah *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa warna semen domba adalah putih susu atau krem. Konsistensi semen domba garut yang diperoleh sesuai dengan penelitian Hastono *et al.* (2001) pada tiga jenis domba persilangan garut yaitu kental.

Persentase hidup spermatozoa domba garut hasil penelitian adalah 87,33 ± 2,25%. Hasil yang diperoleh tidak berbeda dengan hasil penelitian Feradis (1999) pada domba St croix (89,33%) namun lebih tinggi daripada yang diperoleh Adiati *et al.* (2001) sebesar

69,24±11,34% pada domba persilangan St. croix dan garut. Perbedaan ini terjadi karena adanya perbedaan individu, umur, dan kondisi reproduksi domba yang digunakan selama penelitian.

Hasil penelitian semen segar menunjukkan bahwa volume rata-rata semen cair domba Garut adalah 1,09 ± 0,28 ml. Hasil ini sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa volume semen domba rata-rata berkisar antara 0,8-1,2 ml. Menurut Qomariyah *et al.* (2001) volume semen domba garut per ejakulat sebesar 1,08 ± 0,14 ml. Perbedaan volume ini terjadi karena adanya perbedaan umur, ukuran tubuh, perubahan kesehatan reproduksi dan frekuensi penampungan.

Apabila dilihat dari parameter yang dievaluasi, penelitian menunjukkan semen segar yang diperoleh memenuhi syarat untuk dilakukan proses pengolahan semen lebih lanjut.

3.2. Persentase Motilitas Spermatozoa

Motilitas atau daya gerak spermatozoa digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Perkiraan motilitas adalah prosedur visual dan dinyatakan secara komparatif, tidak mutlak. Motilitas spermatozoa di dalam suatu contoh semen ditentukan secara keseluruhan atau sebagai rata-rata dari suatu populasi spermatozoa.

Pada hari ke-4 pengamatan, penelitian menunjukkan persentase motilitas tertinggi dicapai pada perlakuan penambahan *tokoferol* 0,04 g/100 ml pengencer (49,0 ± 6,5%) namun tidak berbeda dengan perlakuan kontrol dan perlakuan *tokoferol* 0,02 g/100 ml pengencer. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian *tokoferol* sampai dosis 0,04 g/100 ml pengencer pada pengencer semen cair belum dapat mempertahankan motilitas spermatozoa.

Hasil ini sejalan dengan penelitian Maxwell dan Watson (1996) yang menyimpulkan penambahan antioksidan pada pengencer semen dapat meningkatkan fertilitas semen beku, tetapi tidak berpengaruh terhadap semen segar. Apabila dilihat dari persentase motilitas yang diperoleh pada setiap hari pengamatan, penelitian menunjukkan bahwa semua perlakuan memenuhi syarat untuk digunakan pada program inseminasi buatan karena memiliki motilitas spermatozoa lebih dari 40% (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase Motilitas Spermatozoa Domba Garut pada Berbagai Perlakuan α -tokoferol

Waktu Evaluasi	Perlakuan α -tokoferol		
	Kontrol (%)	0,02 g / 100 ml (%)	0,04 g / 100 ml (%)
Hari ke-1	75,0 \pm 0	75,0 \pm 0	75,0 \pm 0
Hari ke-2	68,0 \pm 2,9	69,0 \pm 2,2	69,0 \pm 2,2
Hari ke-3	59,0 \pm 2,2	60,0 \pm 6,1	59,0 \pm 4,1
Hari ke-4	45,0 \pm 5,0	49,0 \pm 6,5	49,0 \pm 6,5

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % (DMRT)

3.3. Persentase Hidup dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Hasil evaluasi dengan pewarna eosin menunjukkan spermatozoa yang hidup terlihat tidak berwarna setelah diberi pewarna eosin. Hal ini terjadi karena pada spermatozoa yang hidup, pewarna yang masuk akan dipompa kembali keluar sehingga spermatozoa terlihat tidak berwarna. Pada spermatozoa yang mati, kemampuan daya pompa dari sel sudah tidak berfungsi dengan baik sehingga pewarna tetap berada di dalam sel, dan sel spermatozoa terlihat berwarna merah.

Membran plasma merupakan bagian dari spermatozoa yang berfungsi melindungi secara fisik organel-organel sel serta berperan dalam menjaga keseimbangan elektrolit intra dan ekstra seluler. Rusaknya membran plasma akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme dan proses fisiologis spermatozoa sehingga menyebabkan kematian spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hari ke-4 pengamatan, persentase hidup tertinggi dicapai pada perlakuan penambahan *tokoferol* 0,04 g/100 ml pengencer (68,6 \pm 4,2%) namun tidak berbeda dengan perlakuan kontrol (66,0 \pm 4,6%) dan perlakuan *tokoferol* 0,02 g/100 ml pengencer (66,6 \pm 4,0%). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian *tokoferol* sampai dosis 0,04 g/100ml pengencer belum berpengaruh terhadap persentase hidup spermatozoa. Tabel 3

menunjukkan secara lengkap persentase hidup spermatozoa pada empat hari pengamatan.

Tabel 3. Persentase Hidup Spermatozoa Domba Garut pada pada Berbagai Perlakuan α -tokoferol

Waktu Evaluasi	Perlakuan α -tokoferol		
	Kontrol (%)	0,02 g / 100 ml (%)	0,04 g / 100 ml (%)
Hari ke-1	84,4 \pm 0,9	83,0 \pm 3,0	84,0 \pm 2,1
Hari ke-2	75,0 \pm 3,0	77,2 \pm 2,0	78,6 \pm 1,1
Hari ke-3	70,8 \pm 6,0	71,0 \pm 5,4	71,8 \pm 5,6
Hari ke-4	66,0 \pm 4,6	66,6 \pm 4,0	68,6 \pm 4,2

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % (DMRT)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hari ke-4 pengamatan, persentase membran plasma utuh tertinggi dicapai pada perlakuan penambahan *tokoferol* 0,04 g/100 ml pengencer (59,3 \pm 6,5%) dan perlakuan *tokoferol* 0,02 g/100 ml pengencer (59,3 \pm 2,8%), namun tidak berbeda dengan perlakuan kontrol (56,2 \pm 5,67%).

Hasil ini mendukung parameter persentase motilitas dan persentase hidup dan memperkuat argumentasi bahwa penambahan antioksidan termasuk *tokoferol* tidak berpengaruh terhadap proses pengolahan semen cair namun berpengaruh terhadap proses pengolahan semen beku. Menurut Maxwell dan Watson (1996) antioksidan dapat meningkatkan fertilitas semen beku, tetapi tidak pada semen segar.

Manfaat antioksidan pada semen beku telah dibuktikan oleh Feradis (1999) pada semen beku domba St. Croix yang menyimpulkan penambahan antioksidan ke dalam bahan pengencer dapat meningkatkan kualitas semen beku domba St. Croix. Menurut Beconi *et. al.* (1993) *tokoferol* dapat melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama pembekuan dan pencairan kembali. Menurut Tumen dan Ozkoca (1994) kualitas semen domba yang baik dicapai bila ditambahkan *tokoferol* ke dalam pengencer semen. Tabel 4 menunjukkan persentase membran plasma utuh pada semua perlakuan yang diberikan.

Tabel 4. Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa Domba Garut pada pada Berbagai Perlakuan α -tokoferol

Waktu Evaluasi	Perlakuan α -tokoferol		
	Kontrol (%)	0,02 g per 100 ml (%)	0,04 g per 100 ml (%)
Hari ke-1	82,6 \pm 3,7	83,2 \pm 3,2	83,2 \pm 2,2
Hari ke-2	72,2 \pm 4,2	76,0 \pm 1,2	75,6 \pm 2,1
Hari ke-3	64,6 \pm 4,6	67,2 \pm 4,4	67,3 \pm 5,6
Hari ke-4	56,2 \pm 5,7	59,3 \pm 2,8	59,3 \pm 6,5

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5 % (DMRT)

Penelitian menunjukkan pada semua parameter, perlakuan *tokoferol* 0,04 g/100 ml pengencer menghasilkan kualitas semen cair lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil ini mengindikasikan bahwa penggunaan *tokoferol* cenderung dapat mempertahankan kualitas spermatozoa pada semen cair.

Keadaan ini diduga terjadi karena α -*tokoferol* lebih mampu menghambat proses peroksidasi lipida dibandingkan tanpa perlakuan α -*tokoferol*. Menurut Hamilton *et. al.* (1997) dalam Feradis (1999) tingkat reaksi α -*tokoferol* dengan radikal bebas jauh lebih tinggi dibandingkan BHT. Keunggulan lain α -*tokoferol* dibandingkan dengan BHT adalah kemampuan α -*tokoferol* yang dapat didaur ulang setelah digunakan oleh spermatozoa dengan bantuan vitamin C yang terkandung dalam semen domba.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa penambahan *tokoferol* sampai dosis 0,04 g/100 ml pengencer cenderung meningkatkan persentase motilitas, daya hidup dan membran plasma utuh spermatozoa namun belum mampu mempertahankan kualitas semen cair domba garut.

Dari hasil penelitian disarankan, pada proses pengolahan semen cair tidak menambahkan *tokoferol* ke dalam media pengencer semen cair supaya efisien

DAFTAR PUSTAKA

- Adiati, U, Subandriyo, B Tiesnamurti dan S Aminah. 2001. Karakteristik semen segar tiga genotipe domba persilangan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Balai Penelitian Ternak. 113-117.
- Ax RL, M Dally, BA Didion, RW Lenz, CC Love, DD Varner, B Hafez and ME Bellin. 2000. Semen Evaluation. In : Hafez B, ESE Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7thEd. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp : 365-389.
- Beconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora and M.A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology. 40:841-851
- Combs, F.G. 1992. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Academic Press Inc. New York.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba ST. Croix. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Garner DL and ESE Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In : Hafez B, ESE Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7thEd. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp : 96-109.
- Hastono, I. Inounu dan N. Hidayati. 2001. Karakteristik semen dan tingkat libido domba persilangan. Prosiding Seminar Teknologi Peternakan dan Veteriner, Balai Penelitian Ternak, Bogor. 106-112.
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). (Disertasi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Herdis, M. Surachman, M. Rizal, A. Budiono dan Yulnawati. 2006. Pengaruh Penambahan Trehalosa dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) Jurnal Ilmiah Biologi Biosfera Vol. 23 No. 1. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto. 24 – 30.

- Maxwell, W.M.C. and P.F. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
- Mayes, P.A. 1995. Struktur dan fungsi vitamin yang larut dalam lemak. *In Biokimia Harper*. Editor : D.H. Ronardy dan J. Oswari. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta. 681-691.
- Qomariyah, S. Mihardja dan R. Idi. 2001. Pengaruh kombinasi telur dengan air kelapa terhadap daya tahan dan abnormalitas spermatozoa domba Priangan pada penyimpanan 5⁰C”, Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor. 172-177.
- Suryohudoyo, P. 2000. Oksidan, antioksidan, dan radikal bebas. Suryohudoyo P *di dalam: Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. CV. Sagung Seto, Jakarta. Hlm 31-47.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Tumen, H. and A. Ozkoca. 1994. Studies on the fertility and characters of ram semen diluted by various techniques . *Turk Veterinerlik ve hayvancilik dergisi.* 18:287-291. abstract.
- Werdhany, I.W., M.R. Toelihere, I. Supriatna, dan I.K. Utama. 2000. Efek pemberian berbagai konsentrasi α -tokoferol sebagai antioksidan dalam pengencer Tris sitrat terhadap motilitas sperma kambing peranakan Etawah. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan. Bogor, 18-19 Oktober 1999. Hlm 244-252.
- 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.