

Pengaruh Penambahan Adenosin Triphosphat Kedalam Pengencer Semen terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk

(Effects of Adding Adenosine Triphosphate to Semen Diluter on Quality of Spermatozoa of Fat-Tailed Sheep)

Edy Pramono* dan Taswin Rahman Tagama

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Suparno, Karangwangkal Purwokerto 53123

ABSTRACT: The research aimed to investigate the effects of adding different levels of Adenosine Triphosphate (ATP) to semen diluter on quality of sperms of fat-tailed sheep. Treatments consisted of 5, 10 and 15 mg of ATP addition into semen diluter (Egg Yolk Sodium Citric). Results showed that treatments have no significant effects on spermatozoa motility, significant effects on spermatozoa viability, and high significant effects on spermatozoa mortality. On average, sperm motility for control was $79.16 \pm 3.99\%$; ATP 5 mg = $84.13 \pm 5.36\%$; ATP 10 mg = $85.16 \pm 4.54\%$; and ATP 15 mg = $85.33 \pm 3.79\%$; sperm viability for control was 25.28 ± 0.49 ; ATP 5 mg = 26.17 ± 1.53 ; ATP 10 mg = 27.56 ± 1.48 ; and ATP 15 mg = 28.34 ± 1.03 (hours); sperm mortality for control was $12.91 \pm 1.05\%$; ATP 5 mg = $15.59 \pm 5.12\%$; ATP 10 mg = $21.95 \pm 2.32\%$; and ATP 15 mg = $22.25 \pm 1.83\%$; and quality of sperm for control was 198.216 ± 5.65 ; ATP 5 mg = 206.312 ± 5.67 ; ATP 10 mg = 208.164 ± 5.14 ; and ATP 15 mg = 207.104 ± 5.90 . It can be concluded that addition of ATP into semen diluter was able to increase spermatozoa viability.

Key Words: Fat-tailed sheep, spermatozoa, viability, diluter

Pendahuluan

Rendahnya pasokan daging kambing dan domba untuk memenuhi kebutuhan nasional berkait langsung dengan kinerja reproduksi dari ternak domba dan kambing tersebut. Misalnya, rendahnya angka kebuntingan akan berakibat langsung pada rendahnya angka kelahiran, sehingga akhirnya akan berpengaruh secara langsung pada peningkatan populasi.

Untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak domba, maka yang perlu diperbaiki salah satunya adalah aspek teknologi reproduksinya, terutama pada sistem perkawinan sebaiknya sudah harus menggunakan Inseminasi Buatan (IB). Namun, untuk keberhasilan program IB tersebut harus diiringi dengan penggunaan semen yang berkualitas, karena semua hasil IB akan bermuara pada fertilitas.

Optimalisasi pemanfaatan domba jantan dalam aplikasi program IB sangat tepat, karena dari hasil penelitian dilaporkan bahwa fertilitas domba jantan yang dipelihara secara sederhana masih menunjukkan angka yang cukup tinggi (Tagama dan Saleh, 1988).

Namun, kualitas spermatozoa yang secara umum baik tersebut tidak diimbangi dengan daya tahan hidup (viabilitas) spermatozoa, justru viabilitas spermatozoa domba sangat singkat. Kondisi tersebut menurut Hafez (1980) karena terbatasnya plasma semen sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa, sedangkan di lain pihak motilitas spermatozoa pascaejakulasi sangat aktif. Akibat dari kondisi yang bertolakbelakang tersebut, yaitu sumber nutrisi yang terbatas dan motilitas spermatozoa yang aktif, maka angka kematian spermatozoa akan meningkat. Menurut Corteel (1977) dan Aamdal (1982) motilitas spermatozoa yang sangat aktif akan berpengaruh langsung pada peningkatan metabolisme sehingga asam laktat yang merupakan produk limbah hasil metabolisme akan menumpuk dan merupakan racun bagi spermatozoa.

Untuk dapat bergerak aktif spermatozoa memerlukan energi. Sumber energi utama spermatozoa adalah plasmalogen, dan tiga komponen organik lainnya terutama yang berasal dari plasma seminalis atau plasma semen, yaitu fruktosa, sorbitol, dan *Glicerilphosphoril Choline* atau GPC (White, 1973; dan Lamming, 1990), dan dapat pula berasal dari bahan *diluter* atau pengencer semen (Pickett *et al.*, 1975; Saacke, 1978; dan Toelihere, 1985). Ditambahkan oleh Hunter (1980) dan Partodihardjo (1985) bahwa plasma semen merupakan sarana untuk

* Korespondensi penulis : Telp (0281) 637778

Alamat Kantor : Fakultas Peternakan Unsoed, Jl. Dr. Suparno, Karangwangkal, Purwokerto 53123 Telp./Fax. (0281)-638792

berenang sekaligus sebagai sumber energi bagi spermatozoa, yang dapat dimanfaatkan untuk bergerak aktif (motil). Menurut Rico (1984); Rico dan Socase (1984); Bearden dan Fuquay (2000); dan Hafez dan Hafez (2000), energi yang diperlukan oleh spermatozoa untuk motilitas berasal dari perombakan ATP di dalam selubung mitokondria yang berada di bagian tengah ekor spermatozoa melalui reaksi penguraian menjadi *Adenosin Diphosphat* (ADP) dan *Adenosin Monophosphat* (AMP). Jika ATP dan ADP habis, maka spermatozoa akan berhenti bergerak. Untuk membangun kembali ATP dari ADP, atau ATP dari AMP diperlukan sumber energi lain dari luar.

Terkait dengan kebutuhan energi yang selalu meningkat bagi spermatozoa karena adanya aktivitas motil, sedangkan di pihak lain ketersediaan energi sangat terbatas, maka perlu dicari solusi untuk mengatasi kondisi tersebut. Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah melalui pemanfaatan teknologi reproduksi dengan memodifikasi pengencer, yaitu penambahan zat-zat tertentu sebagai pemerkaya dalam pengencer semen dengan harapan agar kualitas semen terutama viabilitasnya dapat meningkat. Penggunaan ATP yang ditambahkan ke dalam pengencer sebagai zat pemerkaya semen diharapkan dapat mengatasi berbagai kekurangan terkait dengan energi yang diperlukan oleh spermatozoa. Hafez dan Hafez (2000) menyatakan bahwa ATP merupakan energi yang siap pakai, dengan adanya ATP tersebut maka spermatozoa akan memanfaatkan ATP sebagai sumber energi terlebih dahulu, dan sumber nutrisi lainnya dapat dihemat, sehingga spermatozoa dapat bertahan lebih lama. Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan kualitas spermatozoa domba ekor gemuk dengan menambahkan ATP ke dalam pengencer semen.

Metode Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen dari enam (6) ekor domba ekor gemuk (DEG), dengan rata-rata bobot badan $33,80 \pm 0,17$ kg; dan rata-rata umur $39,80 \pm 0,40$ bulan. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dan rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), sebagai perlakuan adalah penambahan ATP ke dalam pengencer Natrium Sitrat Kuning Telur (NSKT). Rincian

perlakuannya adalah P_0 (kontrol); P_1 (dosis ATP sebanyak 5 mg); P_2 (dosis ATP sebanyak 10 mg), dan P_3 (dosis ATP sebanyak 15 mg). Setiap perlakuan diulang lima (5) kali berupa koleksi semen. Komposisi pengencer yang digunakan adalah 50 ml Natrium Sitrat; 100 mg Kuning Telur; dan penambahan antibiotik berupa penisilin dan streptomisin masing-masing sebanyak 1.000 i.u. dan 0,5 mg.

Peubah yang diamati adalah motilitas, aktivitas, viabilitas, dan mortalitas spermatozoa. Data dianalisis menggunakan analisis ragam, dan jika terdapat perbedaan pengaruh yang nyata hingga sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Hasil dan Pembahasan

Motilitas Spermatozoa

Evaluasi motilitas spermatozoa DEG menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10×10 . Hasil pengamatan motilitas dihitung dalam satuan persen, dan yang dievaluasi adalah spermatozoa yang motilitasnya progresif atau maju ke depan, sesuai dengan pendapat dari Hafez (1980), Bearden dan Fuquay (1980), Partodihardjo (1982), dan Toelihere (1985). Untuk validitas data maka setiap sampel dievaluasi sebanyak tiga kali, dan rata-rata datanya dari lima kali koleksi tertera pada Tabel 1.

Angka motilitas spermatozoa DEG yang diberi perlakuan ATP secara keseluruhan baik (Tabel 1), karena masih berada dalam kisaran persentase motilitas spermatozoa yang normal. Seperti yang dilaporkan oleh Hafez (1980), bahwa motilitas spermatozoa domba yang berada dalam kisaran 70 sampai 90 persen adalah termasuk normal. Ditambahkan oleh Lamming (1990) bahwa persentase motilitas spermatozoa domba termasuk normal jika berada dalam kisaran 70 sampai 90 persen.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa penambahan ATP dalam pengencer semen tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap motilitas spermatozoa DEG. Hal ini diduga karena dosis ATP yang digunakan masih terlalu rendah, sehingga tidak mampu untuk meningkatkan daya gerak atau motilitas spermatozoa secara nyata, meskipun dari peningkatan dosis ATP yang diberikan memberikan peningkatan pula pada persentase motilitas spermatozoa.

Tabel 1. Rataan dan simpang baku (Sb) motilitas spermatozoa DEG pascaperlakuan (%)

Penambahan ATP	Ulangan					Rataan $\pm$ Sb.
	1	2	3	4	5	
Kontrol	80,00	73,51	76,56	85,40	80,33	79,16 $\pm$ 3,99
5 mg	76,81	88,43	90,00	81,25	84,13	84,13 $\pm$ 5,36
10 mg	90,00	87,46	85,37	77,81	85,16	85,16 $\pm$ 4,54
15 mg	89,51	88,40	78,63	84,66	85,33	85,33 $\pm$ 3,79

Tabel 2. Rataan dan simpang baku (Sb) viabilitas spermatozoa DEG pascaperlakuan (%)

Penambahan ATP	Ulangan					Rataan $\pm$ Sb.
	1	2	3	4	5	
Kontrol	25,67	24,67	25,67	25,33	24,67	25,28 ^a $\pm$ 0,49
5 mg	27,33	26,33	28,33	24,00	25,33	26,17 ^b $\pm$ 1,53
10 mg	28,00	29,67	27,00	28,67	27,67	27,56 ^b $\pm$ 1,48
15 mg	27,67	28,67	29,67	28,67	26,67	28,34 ^b $\pm$ 1,03

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0,05$

Namun, secara statistik peningkatan persentase motilitas tersebut belum memberikan pengaruh yang nyata. Penyebab lain diduga karena kandungan nutrisi dalam bahan pengencer terutama kuning telur dapat memberikan energi tambahan bagi spermatozoa. Hal ini diperkuat oleh Ortavant *et al.* (1969); Evan dan Maxwell (1987) bahwa selain enersi utama yang digunakan oleh spermatozoa untuk motilitas berasal dari plasma semen, juga spermatozoa akan memanfaatkan secara maksimal sumber energi yang berasal dari luar, seperti kuning telur, air susu, atau pun komposisi pengencer lainnya.

Hal lain yang memungkinkan kurang berpengaruhnya perlakuan yang diberikan adalah persediaan sumber energi dari plasma semen belum terpakai semua, karena rentang waktu antara saat koleksi semen, pemberian perlakuan, hingga evaluasi kualitas semen tidak terlalu lama.

Viabilitas Spermatozoa

Evaluasi viabilitas spermatozoa bertujuan untuk mengetahui kemampuan spermatozoa tetap bertahan motil dalam kurun waktu tertentu pascaperlakuan, disimpan secara *invitro* dalam suhu ruang. Evaluasi motilitas dianggap selesai jika dalam populasi spermatozoa yang diamati sudah tidak ada motilitas (gerakan) sama sekali. Satuan yang digunakan untuk

viabilitas spermatozoa adalah jam. Rataan data viabilitas dan simpang baku tertera pada Tabel 2.

Data viabilitas spermatozoa DEG pascaperlakuan yang disimpan secara *in vitro* pada temperatur ruang menunjukkan rata-rata yang tertinggi selama 28,34 $\pm$ 1,03 jam; dan rata-rata data yang terendah adalah 25,28 $\pm$ 0,49 jam. Hasil ini tidak berbeda dengan laporan Hafez (1980) bahwa spermatozoa domba yang diencerkan menggunakan pengencer NSKT kemudian disimpan dalam temperatur almari es (sekitar 4 sampai 5°C) akan bertahan hidup motil selama 25 sampai 30 jam. Di pihak lain, Tagama dan Saleh (1988) melaporkan bahwa spermatozoa domba yang disimpan dalam temperatur ruang dengan pengencer NSKT hanya dapat bertahan selama 4.32 jam saja.

Adanya perbedaan lama viabilitas yang sangat jauh tersebut disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain adalah temperatur penyimpanan, komposisi pengencer, dan saat evaluasi. Hafez (1980) dan Bearden dan Fuquay (1980) menyatakan bahwa spermatozoa sangat sensitif terhadap perubahan temperatur. Oleh sebab itu, untuk mempertahankan viabilitas spermatozoa dianjurkan semen harus segera diencerkan menggunakan pengencer baku yang berkualitas, dan simpan pada temperatur refrigerator dengan kisaran temperatur 4 sampai 5°C.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa penambahan ATP dalam pengencer semen DEG memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa. Hasil penelitian ini memperkuat laporan Adam dan Wei (1975); Amann *et al.* (1982) bahwa ATP yang ditambahkan ke dalam pengencer merupakan energi yang siap pakai, sehingga saat terjadi penyatuan antara spermatozoa dengan pengencer, maka zat ATP tersebut langsung dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi untuk mempertahankan hidup lebih lama. Kondisi ini terbukti dengan adanya peningkatan dosis ATP dalam setiap perlakuan, maka viabilitas spermatozoa DEG akan bertahan lebih lama. Kenyataan tersebut sesuai dengan dengan laporan Flipse dan Anderson (1969); Garbers *et al.* (1971); dan Lindemann dan Gibbons (1975) bahwa ATP adalah salah satu bentuk energi yang dapat digunakan oleh spermatozoa. Ditambahkan oleh Hoskins *et al.* (1972) bahwa ATP dikonversikan ke ADP akan menghasilkan energi sebanyak 7.000 kalori per mole. Di samping itu, ada faktor lain yang ikut berkontribusi terhadap viabilitas spermatozoa, yaitu natrium sitrat yang terkandung dalam pengencer memberikan peran untuk menetralkan kenaikan pH, sehingga pH semen tetap stabil dan penimbunan asam laktat dapat dicegah. Ditegaskan oleh Storey dan Kayne (1977) bahwa natrium sitrat harus ditambahkan dalam pengencer semen, karena sangat fungsional sebagai penyangga (*buffer*), sehingga perubahan pH secara drastis dapat dihindarkan.

Mortalitas Spermatozoa

Evaluasi motilitas spermatozoa mengacu pada sensitivitas sel untuk menyerap zat warna tertentu. Spermatozoa yang telah mati dindingnya sangat *permeable* (mudah ditembus) oleh zat warna, sehingga spermatozoa yang menyerap warna dianggap mati, dan yang tidak menyerap warna dianggap hidup. Dalam evaluasi mortalitas dihitung minimal sebanyak 200 ekor spermatozoa. Hasil

evaluasi mortalitas spermatozoa DEG tertera pada Tabel 3.

Mencermati data yang tertera pada Tabel 3, ternyata rata-rata mortalitas tertinggi adalah $22,25 \pm 1,83$ persen, sedangkan terendah adalah $12,91 \pm 1,05$ persen. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan laporan Hafez (1980) bahwa angka mortalitas spermatozoa domba masih termasuk normal jika berada dalam kisaran 5 sampai 10 persen; Bearden dan Fuquay (1980) memberikan angka mortalitas dalam kisaran 10 sampai 20 persen; dan Toelihere (1985) menyebutkan angka mortalitas spermatozoa domba masih termasuk normal jika berada dalam kisaran 15 sampai 20 persen.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan ATP dalam pengencer semen DEG memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap mortalitas spermatozoa. Secara keseluruhan dari data yang tertera pada Tabel 3 terlihat jelas perbedaan yang tampak nyata, bahwa semakin ditingkatkan dosis ATP untuk setiap perlakuan maka semakin tinggi persentase mortalitasnya. Hal ini membuktikan bahwa penambahan ATP yang merupakan energi siap pakai langsung dimanfaatkan oleh spermatozoa untuk bergerak aktif. Aktivitas yang tinggi tersebut menyebabkan metabolisme meningkat, sehingga berakibat meningkatnya asam laktat sebagai sisa hasil metabolisme yang merupakan racun bagi spermatozoa (Peterson dan Freund, 1975; Lindemann, 1978; Partodihardjo, 1982; dan Toelihere, 1985). Dalam kondisi ini natrium sitrat sebagai *buffer* belum mampu untuk menekan perubahan pH akibat aktivitas metabolisme spermatozoa yang terlalu aktif. Ternyata hasil evaluasi ini sangat kontradiktif dengan peningkatan viabilitas dan aktivitas seiring dengan meningkatnya dosis ATP, karena hasil ini membuktikan pendapat King (1993) bahwa semakin aktif motilitas maka akan semakin cepat spermatozoa tersebut mengalami kematian atau mortalitas.

Tabel 3. Rataan dan simpang baku (Sb) mortalitas spermatozoa DEG pascaperlakuan (%)

Penambahan ATP	Ulangan					Rataan $\pm$ Sb.
	1	2	3	4	5	
Kontrol	12,70	14,13	14,10	12,64	11,50	12,91 ^a $\pm$ 1,05
5 mg	10,16	20,20	24,16	12,18	16,23	18,59 ^b $\pm$ 1,72
10 mg	23,14	21,83	18,24	25,33	21,42	21,95 ^b $\pm$ 2,32
15 mg	22,46	22,39	21,14	23,43	18,81	22,25 ^b $\pm$ 2,83

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0,01$

Tabel 4. Rataan dan simpang baku (Sb) kualitas spermatozoa DEG (10^6 /ml/semen)

Penambahan ATP	Ulangan					Rataan $\pm$ Sb.
	1	2	3	4	5	
Kontrol	204,735	203,111	198,415	210,124	192,311	198,216 $\pm$ 5,65
5 mg	203,433	197,614	198,631	207,651	203,213	206,312 $\pm$ 5,67
10 mg	196,350	202,601	204,514	205,610	198,145	208,164 $\pm$ 5,14
15 mg	199,241	200,113	203,316	197,253	215,416	201,104 $\pm$ 5,96

Kualitas Spermatozoa

Kualitas spermatozoa merupakan aspek yang terakhir dievaluasi untuk mengetahui secara utuh kondisi spermatozoa yang sesungguhnya terkait dengan fertilitas, karena kualitas spermatozoa merupakan hasil kali dari seluruh parameter yang telah dievaluasi (Hafez, 1980). Oleh sebab itu, segala upaya dimaksimalkan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa agar fertilitasnya meningkat pula, termasuk salah satunya adalah melakukan pengenceran dengan menambah zat pemerkaya. Penggunaan ATP sebagai salah satu zat pemerkaya dalam pengencer baku untuk semen domba dalam penelitian ini merupakan upaya untuk meningkatkan angka fertilitas spermatozoa. Data hasil perhitungan untuk kualitas spermatozoa dari masing-masing perlakuan tertera pada Tabel 4.

Rataan kualitas spermatozoa yang terendah sebanyak $198,216 \pm 5,65 \times 10^6$ /ml semen, dan rataaan yang tertinggi sebanyak $208,164 \pm 5,14 \times 10^6$ /ml semen (Tabel 4). Soenarjo (1983) menyatakan bahwa untuk mengetahui kualitas spermatozoa yang dikaitkan dengan fertilitas dalam program IB, maka diperlukan spermatozoa dalam jumlah tertentu untuk sekali IB, atau lebih dikenal dengan dosis IB. Terkait dengan pernyataan tersebut, Sorensen (1979); Bearden dan Fuquay (1980) menyatakan bahwa dosis IB untuk ternak domba minimal harus mengandung 5 sampai 6×10^6 ekor spermatozoa, maka dengan rataaan kualitas spermatozoa DEG hasil penelitian ini masih sangat layak untuk digunakan. Hasil perhitungan kualitas spermatozoa DEG penelitian dengan mengacu pada dosis IB sebanyak 5 sampai 6×10^6 ekor spermatozoa menunjukkan bahwa domba betina yang diinseminasi sebanyak 40 ekor. Jadi, kualitas semen DEG di atas masih memenuhi syarat untuk digunakan dalam program IB dengan derajat pengenceran 10 kali, dan setiap dosis harus mengandung minimal 5×10^6 ekor spermatozoa.

Kesimpulan

Penambahan ATP dalam pengencer semen tidak mempengaruhi motilitas spermatozoa DEG, namun zat ATP yang ditambahkan dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa. Peningkatan lama waktu viabilitas seiring dengan peningkatan dosis ATP yang ditambahkan dalam pengencer semen.

Penambahan ATP yang merupakan energi siap pakai ke dalam pengencer akan sangat tepat pada semen cair yang akan segera digunakan karena memberikan efek positif terhadap motilitas. Namun, jika semen akan disimpan dalam waktu yang relatif agak lama, maka penambahan ATP tidak dianjurkan, karena motilitas spermatozoa meningkat yang akhirnya akan bermuara pada meningkatnya angka mortalitas spermatozoa.

Daftar Pustaka

- Aamdal, J., 1982. Artificial insemination in goats with frozen semen in Norway. *Proceedings of 3rd International Conference on Goat Production And Disease*. Tucson, Arizona.
- Adam, D.E., dan J. Wei, 1975. Mass transport of ATP within the motile sperm. *Journal of Theoretical Biology* 49: 124-145.
- Amann, R.P., S.R. Hay dan R.H. Hammertstedt, 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biology of Reproduction* 27: 723-733.
- Bearden, H.J., dan J.W. Fuquay, 1980. *Applied Animal Reproduction*. 3th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bearden, H.J., dan J.W. Fuquay, 2000. *Applied Animal Reproduction*. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Corteel, J.M., 1977. Production, storage, and insemination of goat semen. *Proceedings of Symposium on Management of Reproduction In Sheep and Goats*. University of Wisconsin, Madison.

- Evans, G., dan M.W.C. Maxwell, 1987. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Butterworths, Sydney.
- Garbers, D.L., W.D. Lust, N.L. First dan H.A. Lardy, 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10: 1825.
- Flipse, R.J., dan W.R. Anderson, 1969. Metabolism of bovine semen. XIX. Product of fructose metabolism by washes spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 52: 1070.
- Hafez, E.S.E., 1980. *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hafez, B. dan E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hoskins, D.D., E.R. Casillas dan D.T. Stephens, 1972. Cyclic AMP dependent protein kinases of bovine epididymal spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 48: 1331-1338.
- Hunter, R.H.F., 1980. *Physiology and Technique of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press, London
- King, C.J., 1993. *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam-London-New York-Tokyo.
- Lamming, G.E., 1990. *Marshall's Physiology of Reproduction*. Volume 2. *Reproduction in Farm Animals*. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne. New York.
- Lindemann, C.B. dan I.R. Gibbons, 1975. Adenosin triphosphate-induced motility and sliding of filaments in mammalian sperm extracted with Triton X-1000. *Journal of Cell Biology* 65: 147.
- Lindemann, C.B., 1978. A cAMP-induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell* 13 (1): 9.
- Nalbandov, A.V., 1990. *Physiology of Reproduction on Mammals and Birds*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Ortavan, R., M. Courot dan M.T. Hochereau, 1969. Spermatogenesis and morphology of the Spermatozoon. In: H.H. Cole and P.T. Cupp (Eds.): *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York
- Partodihardjo, S., 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Penerbit Muatiara, Jakarta.
- Peterson, R.N. dan M. Freund, 1975. The inhibition of the motility of human spermatozoa by various pharmacological agents. *Biology and Reproduction* 13: 552.
- Pickett, B.W., L.D. Burwash, J.L. Voss, dan D.G. Black, 1975. Effect of seminal extenders on equine fertility. *Journal of Animal Science* 40: 1136.
- Rico, A.G., 1984. Metabolism of Endogenous and Exogenous Anabolic Agents in Cattle. *Journal of Animal Science* 57: 226-232.
- Rico, A.G. dan V.B. Socase, 1984. New Data on Metabolism of Anabolic Agents. In: Roche, J.F. and D.O. Callahan (Eds.). *Manipulation of Growth in Farm Animals*. Martinus Nijhoff Publisher, Boston.
- Saacke, R.G., 1978. Factor affecting spermatozoon viability from collection to use. *Proceedings of 7th Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, p. 3. NAAB, Columbia.
- Soenarjo, Ch., 1983. Beberapa faktor penyebab Rendahnya Efisiensi Reproduksi dan Usaha Meningkatkan pada Sapi Betina PO di Daerah Inseminasi Buatan. *Disertasi*. Fakultas Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Sorensen, A.M., 1979. *Principle and Practice Animal Reproduction*. McGraw-Hill, Book Company. New York.
- Storey, B.T. dan F.J. Kayne, 1977. Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria. *Biology and Reproduction* 16: 549.
- Tagama, T.R. dan D.M. Saleh, 1988. Pengamatan Aktivitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba. *Laporan Penelitian*. Fakultas Peternakan. UNSOED, Purwokerto.
- Toelihere, M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi padu Ternak*. Penerbit PT Angkasa, Bandung.
- White, I.G., 1973. Biochemical aspects of spermatozoa and their environment in the male reproductive tract. *Journal of Reproduction and Fertility* 18: 225.