

PENGUJIAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA SEMEN CAIR DOMBA MENGGUNAKAN LARUTAN HIPOOSMOTIK

Arifiantini, R.I.¹⁾, B. Purwantara¹⁾ dan W.W. Putra²⁾

¹⁾ Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan IPB

²⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan IPB

ABSTRACT

An experiment was conducted to study the integrity of ram sperm plasma membrane using hypoosmotic solution as part of semen quality evaluation. Semen from six rams were collected using artificial vagina and evaluated macro- and microscopically. The collected semen were diluted in egg yolk-citrate extender and stored in refrigerator for 7 consecutive days. The preserved semen were examined to evaluate the motility and its plasma membrane integrity after exposed to incubation temperature for 15, 30, and 45 minutes. The result of the experiment showed a significant correlation between motility and sperm plasma membrane integrity. Correlation coefficient between motility and sperm plasma membrane integrity for 15, 30, and 45 minutes incubation time were 0.96, 0.97 and 0.98 respectively, ($P < 0.01$). The highest correlation (~ 1) was documented for 45 minutes and indicates that HOS Test should be took place at 45 minutes after incubation time. In conclusion, the sperm membrane plasma integrity could be evaluate in conjunction to motility in order to screen any cellular damage due to preservation process. The HOS Test for ram semen give the best result after 45 minute incubation time.

ABSTRAK

penelitian tentang pengujian keutuhan membran plasma spermatozoa domba dengan menggunakan larutan hipoosmotik atau dikenal sebagai Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test) sebagai bagian evaluasi kualitas semen. Enam ekor domba jantan ditampung semennya dan dilakukan evaluasi secara makro- dan mikroskopis. Semen diencerkan dalam pengencer sitrat kuning telur dan disimpan dalam lemari es selama 7 hari. Pemeriksaan motilitas dan HOS Test dilakukan setiap hari dengan lama penyimpanan dalam inkubator selama 15, 30, dan 45 menit. Dari hasil penelitian ini diperoleh hasil bahwa terdapat korelasi yang sangat nyata ($P < 0.01$) antara motilitas dengan keutuhan membran plasma, dengan lama penyimpanan 15, 30 dan 45 menit masing-masing sebesar 0,96; 0,97 dan 0,98. Dari hasil ketiga waktu pemaparan tersebut hubungan korelasi yang paling kuat tercatat pada lama penyimpanan dalam inkubator selama 45 menit. Hal ini dapat dinyatakan bahwa pemeriksaan HOS Test pada semen cair domba sebaiknya dilakukan penyimpanan pada inkubator selama 45 menit.

PENDAHULUAN

Domba merupakan ternak ruminansia kecil yang potensial untuk dikembangkan di Indonesia dan mempunyai peranan yang besar bagi ekonomi masyarakat di pedesaan.

Dibandingkan dengan sapi, domba memiliki daya reproduksi yang tinggi karena mampu melahirkan dua kali per tahun dan dapat melahirkan lebih dari satu ekor anak per kelahiran.

Inseminasi buatan (IB) merupakan alat yang ampuh untuk perbaikan genetik. IB pada domba di Indonesia belum banyak dilakukan dan belum begitu berhasil dibandingkan dengan ternak sapi. Dalam program IB, faktor pejantan memegang peranan yang amat penting karena di samping harus bermutu genetik tinggi, kemampuan fertilitasnya perlu diketahui dengan pasti. Guna mendukung keberhasilan IB, uji yang dilakukan untuk menilai daya fertilitas spermatozoa sangat diperlukan.

Evaluasi semen biasa dilakukan dengan pemeriksaan makroskopis dengan mengamati volume, warna, bau, konsistensi, pH semen dan pemeriksaan mikroskopis melalui penilaian gerakan massa, motilitas, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup, serta persentase abnormalitas spermatozoa. Evaluasi terhadap motilitas amat penting dilakukan untuk mengukur daya fertilitas spermatozoa meskipun belum terjamin daya fertilitasnya.

Spermatozoa dapat kehilangan daya fertilitasnya tanpa harus kehilangan daya motilitasnya. Spermatozoa yang memiliki kerusakan dindingnya masih dapat menunjukkan gerakan normal meskipun tidak mampu membuahi sel telur. Menurut Toelihere (1981) kenyataan di Indonesia menunjukkan bahwa pelaksanaan IB pada domba belum dikembangkan secara optimal baik dengan menggunakan mani cair ataupun mani beku. Walaupun berbagai upaya pembekuan semen domba dengan angka motilitas tinggi sesudah pencairan kembali, namun fertilitasnya hanya mencapai angka konsepsi 0 sampai 30 persen. Atas dasar pemikiran tersebut, perlu dikembangkan suatu uji yang spesifik, sederhana, cepat dan akurat dalam rangka mengevaluasi kinerja semen yang digunakan.

Spermatozoa dibungkus oleh membran plasma yang berfungsi sebagai pelindung spermatozoa terhadap berbagai perubahan lingkungan, di samping sebagai unsur transport dari dalam sel ke luar sel atau sebaliknya. Apabila membran plasma mengalami kerusakan maka proses tersebut tidak dapat berlangsung secara normal sehingga akan menurunkan kualitas spermatozoa. Untuk menguji keutuhan membran plasma spermatozoa dapat dilakukan uji khusus yang disebut Hypoosmotie Swelling Test (HOS Test). Menurut Jeyendran *et al.* (1984) kemampuan spermatozoa membengkak dalam larutan hipoosmotik menunjukkan membran tersebut berfungsi.

Tujuan penelitian ini adalah (1) untuk mengetahui hubungan antara keutuhan membran plasma dengan motilitas spermatozoa (2) jangka waktu penyimpanan di dalam

inkubator yang tepat dalam melakukan HOS Test pada pengujian membran plasma spermatozoa.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan enam ekor domba jantan lokal berumur \pm 3 tahun yang ada di Bagian Reproduksi dan Kebidanan, FKH IPB. Tahap-tahap penelitian ini meliputi: (1) pembuatan pengencer semen, (2) penampungan semen, (3) evaluasi semen, (4) pengenceran semen, (5) pemeriksaan motilitas dan keutuhan membran plasma setiap hari selama tujuh hari berturut-turut. Pada penelitian pendahuluan dilakukan perlakuan HOS Test pada semen domba dengan lama penyimpanan di dalam inkubator selama dua jam dan setiap 15 menit dilakukan pemeriksaan keutuhan membran plasma spermatozoa.

Penelitian ini diawali dengan menyiapkan bahan pengencer semen dengan menggunakan larutan sitrat dan kuning telur dengan perbandingan 4:1 (Partodihardjo, 1980). Larutan sitrat adalah 2,9 %, dibuat dengan melarutkan 2,9 gr natrium sitrat ke dalam aquades sampai volume 100 ml.

Semen pejantan ditampung dengan menggunakan vagina buatan dan dievaluasi secara makro- dan mikroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna, konsistensi, bau, gerakan massa, motilitas, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup dan persentase abnormalitas. Pengenceran semen dengan larutan sitrat kuning telur dilakukan dengan dosis pengenceran 50. 10⁶/ 0,2 ml. Semen cair tersebut kemudian disimpan dalam lemari es selama 7 hari dan pemeriksaan terhadap motilitas dan keutuhan membran plasmanya dilakukan tiap hari.

Keutuhan membran plasma diuji dengan teknik Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test) sesuai dengan metode baku yang dikembangkan oleh Jeyendran dan Zaneveld (1986). Larutan yang digunakan adalah 2,7 gr fruktosa yang dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest dan 1,47 gr natrium sitrat yang dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest. Kedua larutan tersebut dicampur sehingga diperoleh larutan hipoosmotik dengan volume total 200 ml. Tabung reaksi yang berisi 3,5 ml larutan hipoosmotik, kemudian dicampurkan dengan 0,5 ml semen cair. Campuran di atas diinkubasikan dalam inkubator dengan temperatur 37 °C selama masing-masing 15 menit, 30 menit dan 45 menit dengan kelembaban jenuh 100 persen. Setelah diinkubasi sesuai jangka waktu tersebut di atas campuran tersebut diteteskan pada

gelas obyek dan ditutup dengan gelas penutup. Kondisi spermatozoa diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 450X (45X obyektif dan 10X okuler). Jumlah spermatozoa yang mengalami pembengkakan dicatat dan dihitung persentasenya terhadap spermatozoa total yang diamati. Prosedur pemeriksaan motilitas dan HOS Test ini dilakukan setiap hari selama tujuh hari.

Data yang tersedia dari hasil penelitian ini diperiksa dengan analisis Sidik Ragam. Analisis dilanjutkan dengan Uji Wilayah Berganda Duncan apabila hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen yang ditampung dievaluasi secara makro dan mikroskopis. Parameter makroskopis yang diamati meliputi: volume, warna, konsistensi dan bau. Sedangkan parameter mikroskopis meliputi: gerakan massa, konsentrasi, motilitas, persentase spermatozoa hidup dan persentase abnormalitas.

Dari enam ekor domba jantan yang digunakan seluruhnya menunjukkan kondisi semen yang normal. Ciri fisik semen yang diamati meliputi warna semen putih sampai dengan krem, konsistensi kental dan berbau khas. Ciri-ciri tersebut mengindikasikan bahwa semen yang ditampung tidak menunjukkan penyimpangan seperti peradangan, di samping hal tersebut mengindikasikan pula kualitas semen sebagaimana ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1: Kualitas makro dan mikroskopis semen domba (*Macro and mikroskopic quality of semen of ram*).

Parameter	Rataan	Kisaran
Volume semen (ml)	1,2	0,9-1,5
Gerakan massa	(+++)	(++) - (+++)
Persentase motilitas (%)	70,8	70,0-72,7
Konsentrasi (juta/ml)	2398,3	1760,0-3670,0
Persentase spermatozoa hidup (%)	89,1	86,0-92,9
Persentase abnormalitas (%)	9,5	7,0-11,3

Pada penelitian ini diperoleh rata-rata volume semen 1,2 ml dengan kisaran 0,9-1,5 ml. Hasil yang didapatkan sesuai dengan Toelihere *et al.*, (1980), yang melaporkan volume semen domba berkisar 0,7-3 ml. Hafez (1987) melaporkan bahwa volume semen domba

berkisar antara 0,8 sampai 1,2 ml. Perbedaan hasil yang diperoleh diduga disebabkan oleh perbedaan umur, berat badan, pakan hewan percobaan dan pengaruh individual.

Warna dan konsistensi semen yang diperoleh pada penelitian ini adalah putih sampai dengan krem dan kental. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Toelihere (1985) yang menyatakan bahwa semen domba mempunyai warna krem dengan konsistensi kental. Rataan konsentrasi spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini adalah 2398,3 juta/ml semen dengan kisaran 1760-3670 juta/ml semen. Hal ini sesuai dengan pendapat Hafez (1987), yang melaporkan konsentrasi domba berkisar antara 2000-3000 juta/ml semen. Sedangkan menurut Evans dan Maxwell (1987), konsentrasi domba berkisar antara 2000-6000 juta/ml semen.

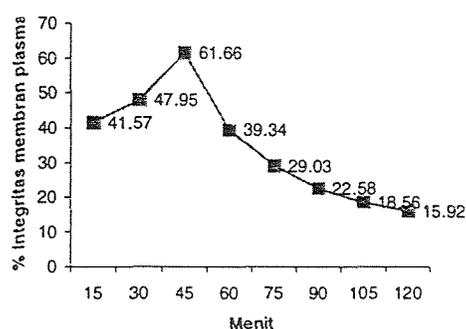
Gerakan massa yang diperoleh dari penelitian ini berkisar (++) sampai (+++), dengan rata-rata motilitas sebesar 70,8, rata-rata persentase spermatozoa hidup 89,1 % dan rata-rata persentase abnormalitas 9,5 % adalah sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh Toelihere *et al.* (1980); Evans dan Maxwell (1987). Toelihere *et al.* (1980) menyatakan bahwa gerakan massa spermatozoa normal berkisar antara (++) sampai (+++). Evans dan Maxwell (1987) menyatakan bahwa semen segar yang baik dan dapat digunakan untuk IB harus memiliki persentase motilitas minimal sebesar 70 %. Menurut Toelihere (1985), domba jantan fertil mempunyai 60 sampai 70 % spermatozoa motil. Sedangkan persentase abnormalitas yang tercatat dari percobaan ini sesuai dengan pendapat Hafez (1987), yang melaporkan bahwa morfologi normal spermatozoa tidak boleh kurang dari 90 %.

Pada pemeriksaan semen baik secara makro dan mikroskopis menunjukkan kualitas semen domba yang dihasilkan merupakan semen yang baik. Hasil pemeriksaan ini menjadi indikator bahwa semen tersebut dapat diproses lebih lanjut.

Pada penelitian pendahuluan, dilakukan perlakuan HOS Test pada semen domba dengan lama penyimpanan di dalam inkubator selama dua jam. Setiap 15 menit dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah spermatozoa yang mengalami pembengkokan ekor. Hasil pengamatan terhadap perubahan membran plasma tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil pengamatan tersebut, dari menit ke-15 sampai menit ke-45 terjadi kenaikan jumlah spermatozoa yang mengalami pembengkokan ekor sebagai respon terhadap larutan hipoosmotik. Hal ini berarti bahwa perembesan cairan dari dan ke dalam sel spermatozoa beragam tergantung dari kondisi membran plasma dari spermatozoa tersebut. Pada lama penyimpanan lebih dari 45 menit, terlihat adanya penurunan jumlah spermatozoa yang

mengalami pembengkakan ekor (Gambar 1). Hal ini dapat disebabkan oleh adanya kerusakan pada membran plasma. Dengan terjadinya aliran air masuk ke dalam spermatozoa dan membran plasma sudah tidak dapat lagi mempertahankan keseimbangan osmotik. Hal tersebut melandasi perlunya perhatian lebih khusus pada penggunaan HOS Test dengan kisaran pemaparan selama 15 menit, 30 menit dan 45 menit.



Gambar 1: Persentase keutuhan membran plasma spermatozoa dengan lama pemaparan 15 s.d. 120 menit (*Percentage of sperm membrane plasma integrity at 15 to 120 minutes of exposure*)

Menurut Rodriguez *et al.* (1994) inkubasi spermatozoa anjing dalam media hiposmotik dengan larutan sitrat (ORT medium, tekanan osmotik 100 mOsm) atau larutan sitrat dengan fruktosa (HOS medium, tekanan osmotik 150 mOsm) mengakibatkan pembengkakan pada bagian ekor spermatozoa. Reaksi tersebut tergantung dari waktu penyimpanan yang umumnya terjadi maksimal selama 45 sampai 60 menit. Persentase optimal pada pembengkakan ekor ini dengan menekan terjadinya pengaruh pada viabilitas semen dilakukan pada 100-150 mOsm. Respon dari viabilitas dan pembengkakan ekor pada spermatozoa dengan HOS Test pada semen segar yang disimpan selama 24 jam mempunyai respon yang sama. Persentase pembengkakan ekor menunjukkan korelasi yang nyata antara kelangsungan hidup dan motilitas.

Spermatozoa anjing akan membengkak pada kondisi larutan hiposmotik. Angka maksimal dari pembengkakan tersebut pada tekanan osmotik sebesar 60 mOsm fruktosa, setelah 45 menit inkubasi (Kumi Diaka, 1993). Correa dan Zavos (1994) melakukan HOS Test pada semen sapi yang dibekukan. Larutan yang digunakan adalah fruktosa dan sodium

sitrat. Larutan dengan osmolaritas 100 mOsm/L menunjukkan angka terbesar untuk melihat pembengkokan spermatozoa. Spermatozoa menunjukkan pembengkokan pada bagian ekornya lebih dari 60 % pada larutan HOS Test pada tekanan osmotik sebesar 100 mOsm/L.

Suatu membran semipermeabel apabila dibatasi oleh larutan yang berbeda tekanan osmotiknya, maka air akan mengalir melintasi membran tersebut dari larutan yang hipoosmotik ke larutan yang hiperosmotik, sehingga banyaknya air pada larutan yang hiperosmotik bertambah dan tekanan osmotiknya mengecil, sedang banyaknya air pada larutan yang hipoosmotik berkurang dan tekanan osmotiknya membesar. Keadaan ini terus berlangsung sampai besarnya tekanan osmotik antara kedua larutan tersebut sebanding.

Penggunaan teori osmosis untuk menentukan fertilitas spermatozoa sudah dimulai tahun 1963 oleh Drevious. Drevious (1972) menyatakan bahwa ekor spermatozoa sapi akan membengkok dan melingkar seperti spiral bila spermatozoa tersebut berada di dalam cairan hipoosmotik. Menurut peneliti yang sama, pembengkokan ini adalah akibat gangguan kontraksi relaksasi ekor oleh karena adanya aliran ion/bahan yang berat molekulnya dari ekor ke medium hipoosmotik tersebut.

Dasar metode HOS Test adalah hukum osmosis. Bila spermatozoa terpapar pada medium hipoosmotik, maka air akan mengalir ke dalam spermatozoa sampai tercapai keseimbangan osmotik antara larutan di dalam dan di luar spermatozoa, sehingga spermatozoa bengkak. Kebengkakan ini berupa pembengkokan yang mudah dilihat.

Peristiwa osmosis pada spermatozoa ini dapat terjadi karena membran plasmanya bersifat semipermeabel dan berfungsi normal. Jadi spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik dan memperlihatkan pembengkokan ekor adalah spermatozoa yang normal. Menurut Casper *et al.* (1996) HOS Test dikembangkan untuk melihat kemampuan membran spermatozoa sebagai sarana transport. Sperma dalam larutan hipoosmotik, apabila membran berfungsi dengan baik maka akan terjadi pembengkakan pada membran plasma dan pembengkokan ekor.

Hasil pengamatan motilitas dan perlakuan HOS Test selama 7 hari, dapat dilihat pada Tabel 2.

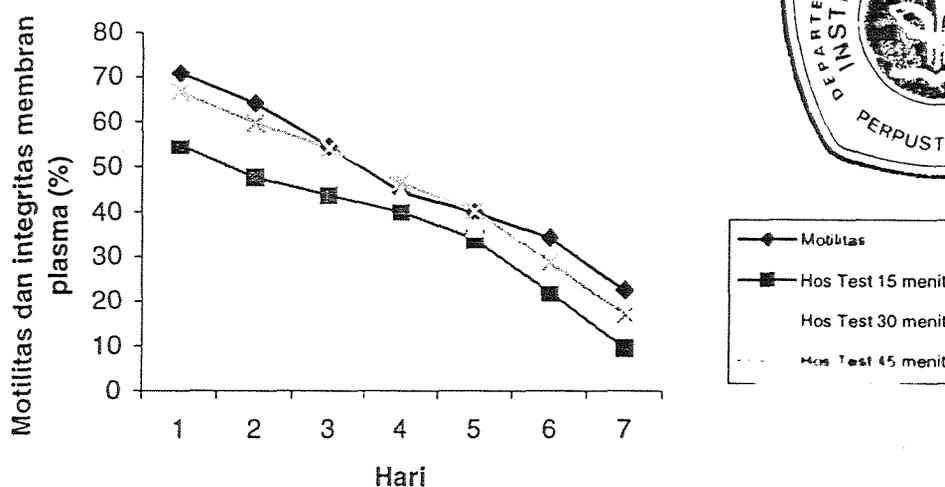
Dari hasil pengamatan (Tabel 2) pada rata-rata keenam domba terlihat bahwa pada hari pertama nilai motilitasnya mencapai 70,8 % dan nilai HOS Test pada lama penyimpanan masing-masing pada 15, 30 dan 45 menit adalah 54,7 %, 58,1 % dan 66,6 %. Hal ini berarti ada spermatozoa yang motil tetapi tidak bereaksi terhadap larutan hipoosmotik yang menunjukkan adanya kerusakan pada membran plasma. Masing-masing pada lama

penyimpanan 15, 30 dan 45 menit adalah sebesar 16,08 %, 12,65 % dan 4,23 %. Hal ini menunjukkan dengan lama penyimpanan di inkubator selama 45 menit akan dapat diperoleh angka yang lebih teliti.

Tabel 2. Persentase motilitas dan keutuhan membran plasma pada domba percobaan selama tujuh hari berturut-turut (*Percentage of motility and sperm membrane plasma integrity during 7 days of observation*)

Hari ke	Persentase motilitas (rata-rata dan kisaran)	Persentase keutuhan membran plasma (rata-rata dan kisaran) sesuai lama penyimpanan		
		15 menit	30 menit	45 menit
1.	70,8 (69,2-72,7)	54,7 (48,6-54,4)	58,1 (55,2-61,3)	66,6 (63,3-69,0)
2.	64,2 (57,1-66,7)	47,6 (41,2-50,0)	56,5 (52,1-61,1)	59,7 (56,7-61,7)
3.	54,4 (50,0-62,5)	43,7 (40,4-45,4)	47,7 (45,9-49,3)	54,0 (50,0-60,5)
4.	44,4 (41,7-50,0)	40,0 (35,1-43,9)	43,9 (40,6-47,5)	46,5 (43,5-49,3)
5.	39,8 (36,4-44,4)	33,8 (29,2-35,9)	36,4 (35,1-38,1)	40,1 (36,5-44,8)
6.	34,1 (30,0-38,5)	21,9 (9,4-32,0)	25,6 (17,2-30,0)	28,7 (21,9-32,2)
7.	22,5 (18,2-27,3)	9,6 (5,7-13,5)	14,6 (12,4-16,3)	17,0 (13,6-20,1)

Hasil rata-rata motilitas dan HOS Test dari keenam domba penelitian disajikan dalam Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Hubungan Prosentase Motilitas dan HOS Test pada Keenam Domba (*Correlation Percentage Between Motility and HOS Test from Six Sheeps*)

Membran plasma merupakan salah satu yang mempengaruhi motilitas (Hafez, 1987) dan untuk menguji keutuhan membran plasma menggunakan HOS Test. Jayendran dan Zaneveld (1986) meneliti hal ini dengan menggunakan larutan hiposmotik yang terbuat dari 100 ml aquades berisi 2,70 gr fruktosa dan 100 ml aquades berisi 1,47 g sodium sitrat.2H₂O. Mereka melakukan terhadap spermatozoa manusia.

Jayendran dan Zaneveld berpendapat bahwa spermatozoa dengan membran plasma utuh dan fungsional akan bertambah besarnya jika tersimpan pada suatu medium hiposmotik. Medium akan menggunakan tekanan osmotik yang cukup besarnya untuk mengakibatkan aliran air masuk ke dalam spermatozoa sehingga menjadi bengkak.

Berdasarkan uji statistik didapat korelasi yang nyata antara motilitas dengan HOS Test. Korelasi motilitas dengan HOS Test dengan lama penyimpanan 15, 30 dan 45 menit masing-masing sebesar (r) : 0.96, 0.97 dan 0.98 dengan P < 0,01. Hal ini mendukung pernyataan bahwa membran plasma merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi motilitas. Dari hasil analisa statistik tersebut hubungan korelasi yang paling kuat (~1) yaitu korelasi antara motilitas dengan HOS Test dengan lama penyimpanan dalam inkubator selama 45 menit. Hal ini dapat dinyatakan bahwa pemeriksaan HOS Test pada semen cair domba sebaiknya dilakukan penyimpanan pada inkubator selama 45 menit. Hal ini diperkuat dengan hasil Duncan Multiple Range Test (DMRT) diketahui kombinasi perlakuan motilitas pada hari pertama menghasilkan respon tertinggi, disusul kombinasi perlakuan HOS Test dengan lama penyimpanan dalam inkubator selama 45 menit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa (1) kemampuan spermatozoa berespon terhadap larutan hiposmotik dengan adanya pembengkokan ekor, menandakan membran plasma dalam keadaan utuh, (2) Adanya korelasi yang sangat nyata antara motilitas dengan keutuhan membran plasma, (3) HOS Test pada semen cair domba dengan lama penyimpanan dalam inkubator selama 45 menit akan didapatkan hasil yang lebih akurat mengenai keutuhan membran.

Saran

Saran yang dapat diberikan adalah (1) dalam mengevaluasi semen sebaiknya dilakukan HOS Test untuk mendukung uji fertilitas baik pada semen beku atau semen cair, (2) perlu

dilakukan penelitian lanjut tentang keutuhan membran plasma dengan komposisi pengencer yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Casper R. F., J. S. Meriano, K. A. Jarvi, L. Cowan, M. L. Lucato.(1996). The Hypo-osmotic Swelling Test for Selection of Viable Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Men with Complete Asthenozoospermia. *Fertility and Sterility.*, 64(5): 973-976
- Correa, J. R. and P. M. Zavos. 1994. The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of the Frozen Thawed Bovine Sperm Membran. *Theriogenology.*, 42: 351-360.
- Drevious, L. O. 1972. Bull Spermatozoa As Osmometers. *J. Reprod. Fert.*, 28: 29-39
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths. Sydney.
- Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Jeyendran, R. S. and L. J. D. Zaneveld. 1986. Intruction for Hypoosmotic Swelling (HOS) Test. Short Course: Reproduction Andrology and Non-hormonal Contraception. Luke's Medical Center. Chicago.
- Jeyendran, R. S., H.H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B.G. Crabo and L.J.D. Zaneveld. (1984) Development of an Assay to Assess the Functional Integrity on the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 70: 219-228
- Kumi-Diaka, J.1993. Subjecting Canine Semen to the Hypoosmotic Test. *Theriogenology.*, 39: 1279-1289.
- Partodihardjo, S. 1980. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara, Jakarta.
- Rodriguez, G. J. E., A. Montserrat and T. Rigau. 1994. Effect of Hypoosmotic Incubation on Acrosome and Tail Structure on Canine Spermatozoa. *Theriogenology.*, 42: 815-829.
- Steel, R. G. D and J. H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Cetakan ketiga Terjemahan Bambang Sumantri. Gramedia, Jakarta. 748 hal.
- Toelihere, M. R. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Mutiara, Jakarta.
- Toelihere, M. R. 1985. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M. R., T. L. Yusuf dan M. B. Taurin.1980. Pengantar Praktikum Inseminasi Buatan. Depeartemen Reproduksi. Institut Pertanian Bogor.