

Penggunaan Berbagai Kuning Telur Sebagai Bahan Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung

(USING OF THE VARIOUS TYPES OF EGG YOLKS AS A EXTENDER ON PROGRESSIVE MOTILITY AND VIABILITY OF PELUNG FOWL SPERMATOZOA)

Wayan Arni Widiastuti¹, Wayan Bebas², I Gusti Ngurah Bagus Trilaksana²

¹Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,
²Laboratorium Reproduksi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl.P.B. Sudirman Denpasar Bali, Telp: 0361-223791
e-mail: arniwidias@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan berbagai macam kuning telur dalam bahan pengencer fosfat kuning telur terhadap motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 48 jam. Penampungan semen menggunakan metode pemijatan kemudian diencerkan dengan tiga pengencer kuning telur berbeda sebagai perlakuan, masing-masing perlakuan diulang sebanyak delapan kali sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 24 sampel. Perlakuan terdiri dari T1 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur ayam ras), T2 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur puyuh), dan T3 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur bebek). Variabel yang diamati adalah motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung. Hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa ketiga pengencer fosfat kuning telur berpengaruh nyata terhadap motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung. Uji lanjutan menggunakan uji Duncan menunjukkan pengencer fosfat kuning telur bebek memberikan hasil yang paling optimal dalam mempertahankan motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 48 jam.

Kata kunci: Ayam pelung; kuning telur; daya hidup; motilitas progresif

ABSTRACT

This study aims to determine the part of various types of egg yolks in egg yolk phosphate extender on progressive motility and viability of pelung fowl's spermatozoa stored at 4°C for 48 hours. Semen was collected by massage method then diluted with three different yolk diluents as treatment, each treatment was repeated eight times so that the number of sample was 24 samples. The treatment consisted of T1 (semen diluted with egg yolk phosphate), T2 (semen diluted with quail egg yolk phosphate), and T3 (semen diluted with duck egg yolk phosphate). The observed variables were spermatozoa progressive motility and viability. Statistically that the three egg yolk phosphate diluents had significant effect on the progressive motility and viability of pelung fowl spermatozoa. Further tests using the Duncan test showed the duck egg yolk phosphate diluent provides the most optimal results in maintaining progressive motility and viability of pelung fowl spermatozoa stored at 4°C for 48 hours.

Keywords: Pelung fowl; egg yolks; progressive motility; viability

PENDAHULUAN

Ayam pelung merupakan salah satu sumber daya genetik ternak lokal yang berasal dari Kabupaten Cianjur, Jawa Barat. Ayam pelung memiliki tubuh yang lebih besar dibandingkan dengan jenis ayam lokal lainnya (Daryono dan Miftahul, 2016). Ayam pelung dewasa memiliki rata-rata bobot badan 2,904 kg pada betina dan 4,002 kg pada pejantan (Iskandar dan Triana, 2007). Selain itu, ayam pelung juga memiliki suara kokok yang khas (*melung*) dengan ciri suara panjang, mengalun, bervolume besar, serta berirama dan ada empat tahap suara: (1) suara awal (*tetelur*), (2) tengah (*kukulurkukudur*), (3) akhir (*kukulir*), (4) ditutup dengan *kook* sehingga disebut sebagai ayam penyanyi. Posturnya yang besar dan kemampuan bersuaranya membuat ayam pelung digunakan sebagai ayam hias yang memiliki harga jual relatif tinggi dibandingkan dengan ayam-ayam lain (Nataamijaya, 2005).

Namun, dibalik keunggulannya dari segi penampilan dan kegunaannya, ayam pelung memiliki kelemahan dari segi fertilisasi, mengingat keanekaragaman hayati dari ternak ayam pelung cukup rendah karena disebabkan kesulitan dalam kawin secara alami karena perbandingan ukuran tubuh (*morfometrik*) antara ayam pelung pejantan dengan betina yang jauh berbeda, sehingga cukup menyulitkan dalam berkembang biak atau pemicu sering gagalnya fertilisasi, maka terbuka peluang untuk melakukan pemuliaan agar dapat dihasilkan *parent stock*. Salah satu program dalam pemuliaan ayam pelung adalah seleksi ayam pejantan, dapat dilakukan antara lain dengan menguji kualitas semen ayam tersebut. Untuk dapat memperbaiki mutu genetik ternak, memaksimalkan penggunaan pejantan, serta mencegah penularan penyakit salah satunya dilakukan dengan cara inseminasi buatan (IB). Keberhasilan IB dipengaruhi oleh kualitas semen dan bahan pengencer yang digunakan untuk penyimpanannya. Salah satu upaya untuk meningkatkan kualitas semen ayam pelung adalah dengan penambahan bahan pengencer pada semen yang bertujuan memperpanjang daya hidup spermatozoa di luar tubuh dan mengaplikasikannya pada inseminasi buatan (Junaedi *et al.*, 2016).

Menurut Toelihere (1993), spermatozoa yang berada di dalam saluran kelamin jantan cenderung dalam keadaan tidak bergerak, namun apabila telah ditampung dan kontak langsung dengan udara maka spermatozoa akan bergerak sangat aktif. Aktivitas metabolik tersebut meliputi proses oksidatif dan glycolitik yang menghabiskan secara

cepat zat-zat kimiawi dan menyebabkan penimbunan oksidan yang dapat menurunkan motilitas spermatozoa ayam pelung.

Oleh karena itu, penting untuk mempertahankan kualitas semen agar tetap baik dalam kurun waktu tertentu sehingga penggunaan semen menjadi efisien dan menghasilkan angka telur fertil yang tinggi. Pemeriksaan atau evaluasi semen diperlukan untuk penentuan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan serta untuk menentukan kadar pengenceran semen. Kualitas semen umumnya ditentukan berdasarkan volume, konsentrasi, daya gerak (motilitas), daya hidup (viabilitas), integritas membran dan abnormalitas spermatozoa. Untuk mempertahankan motilitas progresif dan viabilitas serta untuk memperoleh semen dengan kualitas baik dibutuhkan bahan pengencer yang mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa (Toelihere, 1993).

Lipoprotein kuning telur terdiri atas 85% lemak dan 15% protein. Lemak dari lipoprotein terdiri atas 20% *fosfolipid* (*lechin, fosfatidil serin*), 60% lemak netral (*trigliserida*) dan 5% kolesterol (Ariyani, 2006). Menurut Toelihere (1993), kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa, mengandung fraksi *low density lipoprotein* (LDL) yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Kuning telur sebagai bahan krioprotektan ekstraseluler berfungsi sebagai media penyedia makanan, sumber energi dan pelindung ekstraseluler spermatozoa dari *cold shock* saat pembekuan, agen protektif, memberikan efek sebagai penyangga terhadap spermatozoa dan glukosa kuning telur lebih sering dipakai spermatozoa untuk metabolisme dibandingkan fruktosa yang terdapat dalam semen.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian mengenai semen ayam pelung yang diencerkan dengan bahan pengencer dari kuning telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek yang disimpan pada suhu 4⁰C selama 48 jam dengan tujuan untuk membandingkan kuning telur mana yang lebih baik sebagai bahan pengencer serta mempertahankan motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung secara optimal.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam pelung jantan yang berumur sekitar 8 bulan. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar ayam pelung, eosin negrosin sitrat, PBS (*Phosfat Buffer Saline*), NaCl 3%, alkohol 70%, telur ayam ras, telur puyuh, dan telur bebek yang masih segar, streptomisin, dan penisilin. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop, *object glass*, *cover glass*, cawan petri, *beker glass*, spuit tuberculin 1 cc, tabung *erlenmeyer*, gelas ukur, dan *haemocytometer thoma*, pipet pasteur, pH meter, kertas saring, kompor listrik, tabung reaksi, tabung *ependorf*, gunting bedah, rak tabung reaksi, timbangan analitik, dan *refrigerator*.

Penelitian ini diawali dengan adaptasi hewan coba terhadap lingkungan dan kolektor (penampung semen) selama dua minggu. Teknik penampungan semen ayam pelung oleh Onishi *et al.* (1977) dengan metode *massages* yang dilakukan oleh dua orang, operator pertama yang memegang pejantan dan melakukan *massage* sedangkan operator lainnya melakukan penampungan semen menggunakan cawan petri. Evaluasi semen dilakukan dengan dua cara yakni dengan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis berupa pemeriksaan volume, pH, konsistensi/kekentalan, dan bau. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi spermatozoa (Toelihere, 1993).

Pengencer yang digunakan pada penelitian ini berbahan dasar beberapa jenis kuning telur unggas seperti kuning telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek. Cangkang telur disterilkan dengan alkohol 70%, kemudian dibelah dan buang putih telurnya. Agar kuning telur terbebas dari putih telur dilakukan penggelindingan di atas kertas saring steril pada setiap permukaan kuning telur. Setelah semua putih telur terisap lalu tusuk selaput kuning telurnya dan tampung kuning telur ke dalam *beker glass*. Lakukan hal yang sama pada kedua jenis kuning telur lainnya. Ukur volume kuning telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek dengan ukuran yang sama yaitu masing-masing sebanyak 10 ml. *Phosfat buffer saline* (PBS) dibuat dengan cara melarutkan satu granul *buffer phosfat* (PBS) ke dalam 100 ml aquades lalu dilakukan pasteurisasi. Tambahkan tiap-tiap 10% kuning telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek ke dalam PBS lalu dihomogenkan. Perbandingan antara kuning telur dengan PBS adalah 10 : 90 sehingga didapatkan volume total menjadi 100 ml. Tambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin masing-masing 1000 IU dan 1000

µg dalam setiap 1 ml pengencer (Toelihere, 1993). Semen yang telah ditampung dan pengencer dalam tabung dengan beberapa jenis kuning telur diletakkan dalam waterbath suhu 37 °C, bertujuan untuk menyamakan suhu pengencer dengan suhu semen. Pengenceran semen dilakukan dengan memasukkan semen ke dalam bahan pengencer. Semen yang telah diencerkan lalu disimpan pada suhu 4 °C selama 48 jam.

Semen dievaluasi kembali dengan pemeriksaan motilitas progresif dan penghitungan daya hidup (viabilitas). Pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan menghomogenkan semen terlebih dahulu lalu diteteskan diatas *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif. Pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin-negrosin sitrat. Sel spermatozoa yang mati akan terlihat berwarna merah, sedangkan yang masih hidup tidak terwarnai/transparan. Hitung spermatozoa yang mati dan yang hidup dalam satuan persen (Toelihere, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen segar yang telah ditampung kemudian di evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil evaluasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas Semen Segar dari Dua Ekor Pejantan Ayam Pelung

Kualitas Semen Ayam Pelung		
Pemeriksaan Makroskopis	Volume (ml)	0,49
	Warna	Putih
	pH	7,4
	Bau	Khas
	Konsistensi	Kental
Pemeriksaan Mikroskopis	Gerakan Massa	+++
	Motilitas Progresif (%)	88 P
	Konsentrasi (10 ⁶)	3575
	Sperma Hidup (%)	94
	Abnormalitas (%)	7
	Membran Plasma Utuh/MPU (%)	90

Keterangan: +++ = Gerakan gelombang massa sangat baik

P = Gerakan individu sperma maju dan cepat

Hasil penelitian semen ayam pelung yang diencerkan dengan bahan pengencer kuning telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek terhadap motilitas

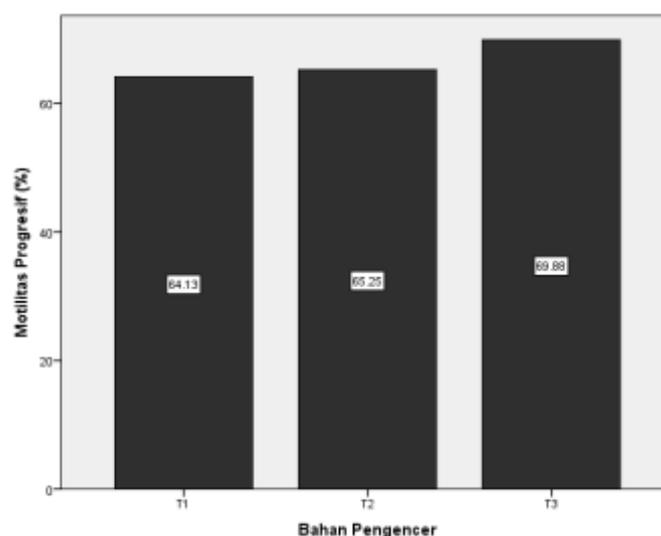
progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4 °C selama 48 jam dapat di lihat pada Tabel 2. dibawah ini.

Tabel 2. Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung yang Diencerkan dengan Bahan Pengencer Berbagai Jenis Kuning Telur

Parameter	Perlakuan		
	T ₁	T ₂	T ₃
Motilitas Progresif (%)	64,13 ± 0,835 ^a	65,25 ± 0,886 ^a	69,88 ± 1,458 ^b
Daya Hidup (%)	72,75 ± 1,035 ^a	75,38 ± 0,744 ^b	78,88 ± 1,246 ^c

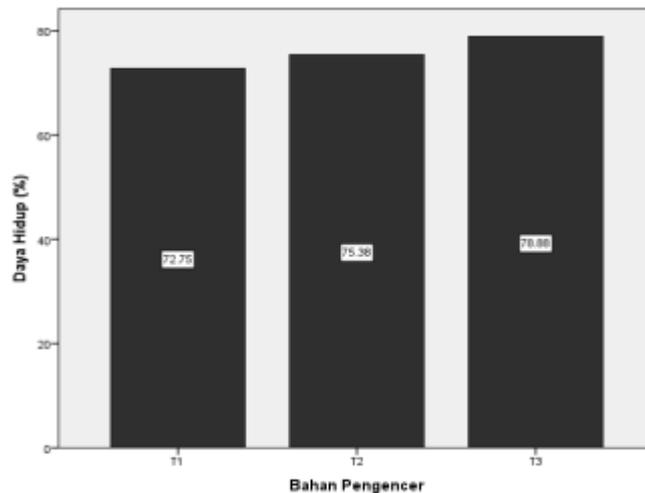
Keterangan: Angka dengan superskrip huruf yang sama dalam satu baris menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Angka dengan superskrip huruf yang berbeda dalam satu baris menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$).

Setelah dilakukan pengujian dengan uji *Duncan* terhadap motilitas progresif spermatozoa ayam pelung, menunjukkan bahwa semen yang diencerkan dengan pengencer fosfat kuning telur ayam ras tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan pengencer fosfat kuning telur puyuh. Sedangkan semen yang diencerkan dengan pengencer fosfat kuning telur bebek berbeda nyata ($P<0,05$) dengan pengencer fosfat kuning telur ayam ras dan pengencer fosfat kuning telur puyuh. Grafik dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 1. Grafik Motilitas Progresif Spermatozoa Ayam Pelung yang Diencerkan dengan Bahan Pengencer Berbagai Jenis Kuning Telur

Daya hidup spermatozoa ayam pelung yang dilakukan pengujian dengan uji *Duncan* menunjukkan bahwa semen yang diencerkan dengan bahan pengencer fosfat kuning telur ayam ras, fosfat kuning telur puyuh, dan fosfat kuning telur bebek menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Grafik dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 2. Grafik daya hidup spermatozoa ayam pelung yang diencerkan dengan bahan pengencer berbagai jenis kuning telur

Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan tampak bahwa bahan pengencer dari beberapa jenis kuning telur yakni telur ayam ras, kuning telur puyuh, dan kuning telur bebek berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung. Menurut Toelihere (1993), saat terjadi proses metabolik, sel-sel spermatozoa akan menghasilkan hasil sampingan yaitu berupa asam laktat yang dapat menyebabkan perubahan pH pada medium sekitarnya kemudian akan menyebabkan kematian spermatozoa, namun dengan adanya penambahan pengencer fosfat dari ketiga jenis kuning telur tersebut dapat memperpanjang masa hidup dan mempertahankan motilitas progresif lebih lama karena kuning telur mengandung asam-asam amino *L-tyrosin*, *L-tryptophan*, dan *L-phenylalanine* yang menghasilkan hydrogen peroksida pada deaminasi oksidatif. Oleh sebab itu, adanya penambahan pengencer fosfat kuning telur ayam ras, puyuh, dan bebek sangat berpengaruh dalam mempertahankan kualitas spermatozoa khususnya motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung.

Pada kedua parameter yang diamati yaitu motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung diperoleh semen ayam pelung yang diencerkan dengan pengencer fosfat kuning telur bebek menunjukkan rata-rata motilitas dan daya hidup spermatozoa yang paling baik diantara berbagai perlakuan. Perbedaan pengencer dari beberapa jenis kuning telur akan menyebabkan perbedaan kandungan nutrisi yang diterima oleh sel-sel spermatozoa, pengencer yang memiliki nutrisi lebih lengkap dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa lebih lama. Hal ini sesuai dengan kandungan gizi yang dikandung kuning telur bebek yang apabila dibandingkan dengan kuning telur ayam ras dan puyuh ternyata telur bebek mempunyai zat gizi yang lebih baik (Bathgate *et al.*, 2006).

Menurut USDA (2007) kandungan kolesterol yang dimiliki oleh per 100 gram telur bebek lebih banyak yaitu 884 mg, diikuti dengan telur puyuh yang mengandung kolesterol sebanyak 844 mg, sedangkan telur ayam ras memiliki kandungan kolesterol yang lebih rendah yaitu 423 mg. Begitu juga dengan energi, protein, total lemak, serta vitamin yang lebih banyak dikandung oleh telur bebek. Menurut Bathgate *et al.* (2006) kuning telur dari berbagai jenis unggas ini mengandung komponen dasar yang hampir sama, namun kandungan asam lemak dan fosfolipid-nya yang berbeda. Perbedaan komposisi kimia antar spesies unggas terutama terletak pada jumlah dan proporsi zat-zat yang dikandungnya, yang umumnya dipengaruhi oleh strain, makanan dan lingkungan. Kuning telur bebek mengandung lebih banyak *monounsaturated fatty acids* dibandingkan kuning telur ayam ras dan puyuh. Kolesterol lebih banyak dikandung kuning telur bebek dan puyuh dibandingkan dengan ayam ras. Kuning telur bebek mengandung lebih banyak *phosphatidylinositol* dibandingkan ayam ras dan puyuh, maka hal ini berbanding lurus dengan kemampuannya dalam mempertahankan motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung.

Hal ini disebabkan karena peranan *low density lipoprotein* (LDL) yang mampu melindungi spermatozoa dari cekaman dingin, sehingga spermatozoa dapat bertahan hidup lebih lama dikarenakan LDL pada fraksi kuning telur akan berikatan dengan fosfolipid membran plasma sel yang menyebabkan membran plasma sel menjadi lebih fleksibel sehingga mampu menanggulangi cekaman dingin selama proses pengenceran dan penyimpanan (Moussa *et al.*, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengencer fosfat kuning telur bebek merupakan bahan pengencer dari kuning telur terbaik yang dapat digunakan untuk

mempertahankan motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 48 jam secara optimal. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan dari Bebas dan Gorda (2016) yang menunjukkan bahwa pengencer fosfat kuning telur bebek memberikan hasil yang lebih baik terhadap motilitas progresif, daya hidup, dan membran plasma utuh serta abnormalitas yang rendah pada semen babi jika dibandingkan dengan pengencer fosfat kuning telur puyuh dan ayam kampung. Andrabi *et al.*(2008) yang menggunakan telur bebek sebagai bahan dasar pengencer yang dapat meningkatkan kualitas semen beku kerbau. Serta diperkuat dengan penelitian Ihsan (2011) bahwa penggunaan kuning telur itik mampu digunakan sebagai bahan pengencer semen kambing Boer terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas dengan konsentrasi terbaik 30 persen.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengencer fosfat kuning telur ayam ras, pengencer fosfat kuning telur puyuh, dan pengencer fosfat kuning telur bebek berpengaruh nyata terhadap motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 48 jam. Pengencer fosfat kuning telur bebek merupakan pengencer terbaik yang dapat mempertahankan motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4 °C selama 48 jam.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui fertilitas inseminasi buatan pada semen ayam pelung yang diencerkan menggunakan bahan pengencer dari tiga jenis kuning telur yakni kuning telur ayam ras, puyuh, dan bebek.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen yang telah membimbing dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 104: 427-433.

- Ariyani E. 2006. *Penetapan Kandungan Kolesterol dalam Kuning Telur pada Ayam Petelur*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor
- Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. 2006. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with Different Avian Egg Yolk Types on in Vitro Post-thaw Sperm Quality. *Reprod Domest Anim.* 41(1):68-73
- Bebas W, Gorda W. 2016. Penambahan Astaxanthin pada Pengencer Kuning Telur Berbagai Jenis Unggas Dapat Memproteksi Semen Babi Selama Penyimpanan. *Jurnal Veteriner* 17(4): 484-491.
- Daryono BS, Miftahul M. 2016. Pola Pewarisan Kaki Rengket Secara Autosomal Resesif dan Koefisien Inbreeding pada Ayam Pelung di Cianjur. *Jurnal Veteriner* 17(2): 218-225.
- Ihsan NM. 2011. Penggunaan Telur Itik sebagai Pengencer Semen Kambing. *Jurnal Ternak Tropika* 12(1): 10-14
- Iskandar S, Triana S. 2007. Karakter dan Manfaat Ayam Pelung di Indonesia. *Wartazoa* 17(3): 128-136.
- Junaedi RI, Arifiantini C, Sumantri A, Gunawan. 2016. Penggunaan *Dimethyl Sulfoxide* sebagai Krioprotektan dalam Pembekuan Semen Ayam Kampung. *Jurnal Veteriner* 17(2): 307-310
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A. 2002. Low Density Lipoproteins Extracted from hen Egg Yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Bull Semen. *Theriogenology.* 57:1695-1706
- Nataamijaya AG. 2005. Karakteristik Penampilan Pola Warna Bulu, Kulit, Sisik Kaki, dan Paruh Ayam Pelung di Garut dan Ayam Sentul di Ciamis. Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Bogor. *Buletin Plasma Nutfah.* 11(1):1-5
- Onishi N, Kato Y, Futamura K. 1977. *Artificial Insemination in Duck*. Bull Nat. Inst. Agric. Sci. Series 6 (11): 17-31
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Cetakan Ketiga. Bandung: Penerbit Angkasa.
- United States Departement of Agriculture (USDA). 2007. *Nutrient Database for Standard Reference*. RI.