

PENAMBAHAN PROTEIN *INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-I* COMPLEX DALAM PENGECER PEMBEKUAN SEMEN TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING PADA WAKTU EKUILIBRASI

Supplementation of Insulin Like Growth Factor – I Complex Protein into Frozen Semen Diluent on Goat Sperm Quality in Equilibration Time

Suherni Susilowati dan Tatik Hernawati

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: scorpios_girl88@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengisolasi protein *Insulin Like Growth Factor-I* (IGF-I) *complex* untuk meningkatkan kualitas semen beku kambing pada waktu ekuilibrasi setelah penambahan protein IGF-I *complex*. Penelitian ini terdiri atas 2 tahap yaitu isolasi protein IGF-I *complex* dari plasma seminal kambing dan aplikasi terhadap prosesing pembekuan semen. Pada tahap pertama dilakukan identifikasi IGF-I *complex* dengan menggunakan gel *native polyacrylamide gel electrophoresis* dan isolasi IGF-I *complex*. Pada tahap kedua dilakukan aplikasi penambahan protein IGF-I *complex* pada prosesing semen beku. Semen dikoleksi dengan menggunakan vagina buatan dan kemudian disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Kemudian semen dibagi menjadi tiga kelompok. Pada kelompok I, II, dan III ditambahkan protein IGF-I *complex* masing-masing 0, 12, dan 18 ng/ 3×10^6 sperma. Selanjutnya dilakukan ekuilibrasi selama 1 jam dan dilanjutkan dengan evaluasi motilitas, viabilitas, dan membran sperma. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan motilitas, viabilitas, dan membran sperma yang signifikan ($P < 0,05$) di antara tiga kelompok perlakuan. Dapat disimpulkan bahwa penambahan protein IGF-I *complex* dapat meningkatkan kualitas semen beku kambing pada fase ekuilibrasi.

Kata kunci: pembekuan semen, IGF-I *complex*, sperma kambing

ABSTRACT

The objective of this research was to isolate the Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I) complex protein and to increase the frozen semen quality of goat on equilibration time after supplemented by IGF-I complex. This research consisted of two phase: isolation of IGF-I complex protein from seminal plasm of goat and application on frozen semen. On the first phase, IGF-I complex was identified by using gel native polyacrylamide gel electrophoresis and isolation of IGF-I complex. The second phase concerned with the supplemented IGF-I complex protein on frozen semen processing. Semen was collected by artificial vagina and then centrifugated for 5 minutes at 1800 rpm. Semen then divided into 3 groups. Groups 1, 2, and 3 were added with IGF-I complex protein at doses of 0, 12, and 18 ng/ 3×10^6 sperm respectively. The equilibration was done for 1 hour and then the motility, viability, and membran sperm were evaluated. The result showed that the motility, viability, and membran sperm were significantly different ($P < 0.05$) among treatment groups. It can be concluded that protein of IGF-I Complex can improve the quality of frozen semen of goat on equilibration phase.

Keywords: frozen of semen, IGF - I complex, goat sperm

PENDAHULUAN

Masalah utama dalam pemuliabian kambing adalah terbatasnya jumlah pejantan unggul yang tersedia, sedangkan jumlah ternak betina yang harus dilayani untuk meningkatkan populasi sangat besar. Permasalahan di atas dapat diatasi dengan suatu tindakan alternatif yaitu melalui inseminasi buatan (IB). Inseminasi buatan pada kambing belum seefektif pada ternak sapi, namun beberapa penelitian menunjukkan adanya peningkatan efisiensi teknis dan ekonomis pada IB kambing (Evans dan Maxwell, 1987).

Keberhasilan penerapan IB pada kambing selama ini masih lebih baik bila menggunakan semen cair dari pada semen beku. Banyak kendala yang dialami dalam pembuatan semen beku kambing. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuatan semen beku pada kambing antara lain bahan pengencer yang dipakai, proses ekuilibrasi, gliserolisasi, penurunan suhu, dan bahan krioprotektan yang dipakai. Pengenceran semen juga mutlak harus dilakukan sebelum semen tersebut dibekukan (dibekukan pada suhu di bawah titik beku air).

Pengawetan semen secara kriogenik memiliki dampak yang kurang menguntungkan terhadap spermatozoa di dalamnya. Berdasarkan penelitian, proses pembekuan semen tersebut akan menyebabkan kerusakan spermatozoa akibat perubahan tekanan osmotik pembentukan kristal es. Oleh karena itu dalam proses pembekuan semen, selain harus menggunakan larutan yang mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa, ke dalam bahan pengencer tersebut harus pula ditambahkan bahan yang mampu menekan kerusakan spermatozoa seminimal mungkin pada saat menjalani proses pembekuan. Bahan yang dimaksud dikenal dengan agen krioprotektan, yang biasanya memakai gliserol (Toelihere, 1985; Evans dan Maxwell, 1987).

Pengawetan semen secara kriogenik memiliki dampak yang kurang menguntungkan terhadap spermatozoa di dalamnya. Kerusakan selama pembekuan biasa terjadi pada membran plasma maupun pada inti spermatozoa. Kerusakan pada inti spermatozoa dapat menyebabkan mutasi gen. Berdasarkan penelitian, proses pembekuan semen menyebabkan kerusakan spermatozoa akibat perubahan tekanan osmotik dan pembentukan kristal es. Sampai saat ini penambahan bahan selain bahan pengencer dan krioprotektan untuk proses pembekuan semen kambing belum berhasil maksimal. Oleh karena itu peneliti ingin meneliti pembuatan semen beku kambing dengan penambahan protein *Insulin Like Growth Factor-I* (IGF-I) *complex*.

Insulin Like Growth Factor-I complex merupakan salah satu protein yang terdapat di dalam plasma seminalis. Plasma seminalis kuda, terdiri atas 14 fraksi protein (Macpherson *et al.*, 2002) sedangkan pada domba terdiri atas 20 fraksi (Beatriz *et al.*, 2000). Pada manusia IGF-I mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi serta pengaruhnya diperantarai oleh *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP) (Hoflich *et al.*, 1999). Pemberian IGF-I pada tikus yang kekurangan *Growth Hormon* (GH) akan menambah motilitas dan memperbaiki morfologi sperma yang belum matang. *Insulin Like Growth Factor-I* (IGF-I) *complex* yang berikatan dengan molekul lain mempunyai berat molekul 150 kDa yang terdiri dari tiga molekul protein yaitu satu molekul IGF-I dengan berat molekul 7,6 kDa, satu molekul IGFBP dengan berat molekul 53 kDa dan satu

molekul *Acid Label Subunit* dengan berat molekul 85 kDa (Kostecka dan Blanovec, 1999). Mekanisme IGF-I dalam mempertahankan motilitas spermatozoa kemungkinan melalui metabolisme energi yang ditunjukkan dengan peningkatan produksi asam laktat, peningkatan aktivitas piruvat dehidrogenase, dan kemungkinan yang lain adalah mempunyai efek antioksidan (Donald *et al.*, 2003).

MATERI DAN METODE

Semen kambing ditampung untuk isolasi protein IGF-I *complex*. Isolasi protein IGF-I *complex* dilakukan dengan cara elektroelusi, kemudian hasil elusi (protein) diaplikasikan ke dalam bahan pengencer untuk proses pembekuan semen. Identifikasi protein dengan *native PAGE* yaitu 15 μ l sampel ditambah 15 μ l non *Reducing Sample Buffer* (non RSB) yang dimasukkan ke dalam tabung eppendorf, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 μ l dan dimasukkan dalam tiap-tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama dengan sampel. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian 0,05 cm dari batas bawah plat gel. Plat dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining *Coomassie Blue R-250* selama 30-60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan *destaining* dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil elektroforesis difoto atau dipindai (Aulanni'am, 2005). Selanjutnya untuk mengetahui berat molekul pita yang terbentuk dilakukan penghitungan berat molekul dengan menghitung nilai Rf dari masing-masing pita.

Isolasi dengan elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan pita pada gel *native PAGE* ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap menjaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat *electrophoresis horizontal* (Bio-Rad). Alat elektroforesis diisi dengan buffer sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. *Running* elektroelusi dilakukan pada kondisi 130 volt, 30 mA selama

1 jam. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung eppendorf, disimpan pada suhu -70°C , siap dipakai untuk penelitian berikutnya (Aulanni'am, 2005).

Untuk aplikasi, semen kambing disentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit dengan menggunakan medium BO. Sebelum disentrifus dilakukan pemeriksaan makroskopis meliputi warna, volume, pH, bau, dan konsistensi, sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu (motilitas), viabilitas, dan konsentrasi. Prosesing dilakukan apabila gerakan massa +++ (membentuk gelombang besar dan banyak) dan persentase motilitas individu dan viabilitasnya 70%. Selanjutnya disiapkan pengencer susu kuning telur untuk proses pembekuan.

Pembuatan Pengencer A

Pembuatan semen beku dilakukan dengan menggunakan 10 g susu bubuk skim yang dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan aquades 100 ml, diaduk sampai homogen dan dipanaskan di atas penangas sampai suhu $92-95^{\circ}\text{C}$. Kuning telur ditambahkan ke dalam susu skim yang telah disiapkan sebanyak 5% (5 ml dalam 100 ml). Selanjutnya ditambahkan penisilin 1000 IU/ml pengencer dan streptomisin 1 mg/ml pengencer.

Pembuatan Pengencer B

Semen yang memenuhi syarat pemeriksaan dicampur dengan protein IGF-I *complex* dengan dosis 12 dan 18 ng/konsentrasi 3×10^6 spermatozoa dan setelah itu dimasukkan ke dalam pengencer sampai 50% dari volume akhir. Pada saat yang bersamaan ambil larutan B 50% dari volume akhir, kemudian kedua larutan dimasukkan ke dalam lemari es yang bersuhu $3-5^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Proses ini disebut dengan ekuilibrisasi. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas, persentase hidup spermatozoa, dan keutuhan membran spermatozoa.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji analisis varian (Santoso dan Fandy, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil pemeriksaan semen segar dari 8 kali penampungan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kualitas dan kuantitas semen segar kambing

| Parameter | Karakter |
|-------------------------|--------------------|
| Warna | putih kekuningan |
| Bau | khas |
| Konsistensi | kental |
| pH | 7,00 |
| Volume (ml) | 1,25 |
| Konsentrasi (juta) | 3650×10^6 |
| Motilitas massa | +++ |
| Motilitas individu (%) | progresif (937,16) |
| Hidup (%) | 95,308,29 |
| Abnormal (%) | 5,571,98 |
| Membran plasma utuh (%) | 89,967,15 |

Penilaian kualitas semen segar baik secara makroskopis maupun mikroskopis yang dilakukan segera setelah penampungan sangat penting artinya sebelum melakukan proses lebih lanjut terhadap semen tersebut seperti penambahan volume pada proses pembekuan, pemisahan spermatozoa dari plasma seminalis untuk proses isolasi protein maupun untuk keperluan pembuahan *in vitro*. Kualitas semen yang baik menggambarkan pentingnya peran protein dalam plasma seminalis terhadap fungsi spermatozoa. Hal tersebut dibuktikan juga oleh Macpherson *et al.* (2002), bahwa ada korelasi positif antara kadar protein IGF-I plasma seminalis kuda dengan konsentrasi, morfologi, dan motilitas spermatozoa, sehingga dapat disimpulkan bahwa semen yang mempunyai kualitas baik mempunyai korelasi positif dengan kadar protein IGF-I.

Volume semen yang dihasilkan dari seekor pejantan sangat bervariasi. Karena dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain kondisi individu, seperti kualitas reproduksi, umur, dan kondisi manajemen peternakan. Selain itu teknik dan metode penampungan serta persiapan alat penampungan akan mempengaruhi juga volume semen yang dihasilkan. Warna semen merupakan gambaran konsistensi semen, semakin kental konsistensinya semakin pekat warnanya. Demikian juga sebaliknya pada semen yang berwarna agak pucat akan didapatkan konsentrasi dan konsistensinya yang relatif rendah (Donald's, 2003). Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Perubahan pH ke arah yang lebih asam terjadi karena penimbunan asam laktat yang merupakan hasil metabolisme spermatozoa dalam kondisi anaerob (Toelihere, 1985). Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai

gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak yang progresif. Gerakan massa spermatozoa merupakan gambaran dari motilitas atau gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik (semakin tebal dan pergerakannya akan semakin cepat). Berdasarkan hasil penilaian kualitas semen segar kambing peranakan etawa yang ditampung dapat disimpulkan bahwa semen segar kambing yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam proses isolasi protein plasma seminalis. Hal ini sesuai dengan apa yang dikemukakan oleh Toelihere (1985).

Identifikasi konstituen protein plasma seminalis kambing dilakukan dengan *native-polyacrylamid gel electrophoresis (native PAGE)* konsentrasi 12% dalam elektroforesis set mini protein gel (Bio-Rad) dan hasilnya diwarnai dengan *Commassie Blue Standard* (Bio-Rad). Plasma seminalis kambing dalam proses elektroforesis dengan *native-PAGE* menghasilkan 7 pita. Berdasarkan urutan berat molekulnya, ketujuh pita tersebut berturut-turut adalah pita pertama (BM 150,288 kDa) adalah protein IGF-I complex, pita kedua (BM 103,486 kDa), pita ketiga (BM 76,155 kDa), pita keempat (BM 53,249), pita kelima (BM 35,378 kDa), pita keenam (BM 14,099 kDa), dan pita ketujuh (BM 11,492 kDa). Semen terdiri dari plasma seminalis yang secara biokimia mengandung senyawa organik dan anorganik. Salah satu senyawa tersebut adalah protein (Garner dan Hafez, 2000). Protein dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis. Elektroforesis dengan larutan detergen tidak hanya memisahkan berbagai subunit protein secara individu akan tetapi juga memberi kemungkinan untuk memperkirakan berat molekul suatu protein. Ini karena detergen yang dipakai yaitu *sodium dodecyl sulphat* (SDS) mengelilingi molekul protein, menetralkan seluruh muatan alamiah, dan merusak struktur sekunder dan tertier. Akibatnya molekul-molekul protein terpisahkan menurut ukurannya masing-masing ketika melewati pori-pori gel elektroforesis, protein-protein yang lebih kecil bergerak lebih cepat dari pada molekul protein yang lebih besar (Dorothy, 1993).

Rata-rata Kualitas Spermatozoa Kambing Sebelum dan Sesudah Sentrifugasi

Rata-rata kualitas spermatozoa kambing sebelum dan sesudah sentrifugasi disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa terjadi penurunan motilitas spermatozoa sesudah sentrifugasi dari 93,45±7,25 (sebelum sentrifugasi) menjadi 82,65±5,75%, viabilitas spermatozoa dari 94,25±8,30 menjadi 84,10±4,35% dan keutuhan membran spermatozoa dari 90,20±5,15 menjadi 79,30±6,50%. Persentase kualitas spermatozoa baik itu motilitas, viabilitas dan keutuhan membran setelah perlakuan sentrifugasi menunjukkan penurunan, hal tersebut karena sentrifugasi dapat menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa. Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa peneliti terdahulu. Iwazaki dan Gagnon (1992) menemukan adanya peningkatan produksi ROS spermatozoa manusia setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 4-5 kali diatas produksi ROS spermatozoa basal. Meningkatnya produksi ROS oleh spermatozoa setelah sentrifugasi kemungkinan diakibatkan adanya trauma mekanik pada membran spermatozoa. Aitken *et al.* (1994) mengungkapkan bahwa trauma fisik pada spermatozoa akibat gesekan dengan dinding tabung dapat merangsang pembentukan radikal superoksida anion oleh spermatozoa melalui peningkatan influks Ca²⁺ ion di dalam sel. Tingginya konsentrasi ion Ca²⁺ intraseluler akan menyebabkan peningkatan ikatannya dengan kalmodulin membentuk ikatan Ca²⁺-kalmodulin dependen yang penting untuk mengaktifkan enzim-enzim protease seperti kalpain. Hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa dapat meningkatkan akumulasi produksi ROS dalam suspensi spermatozoa.

Plasma seminalis selain penting sebagai media transpor dan sumber nutrisi bagi spermatozoa juga mengandung enzim-enzim dan bahan-bahan yang bersifat sebagai antioksidan seperti superoksid dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (Alvarez dan Storey, 1995). Hilangnya plasma seminalis ini akan menyebabkan menipisnya kandungan enzim-enzim antioksidan dalam suspensi, sehingga ROS yang dihasilkan tidak mampu dinetralisir.

Tabel 2. Kualitas spermatozoa kambing sebelum dan sesudah sentrifugasi

| Parameter | Sebelum sentrifugasi | Sesudah sentrifugasi |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Motilitas (%) | 93,45±7,25 | 82,65±5,75 |
| Viabilitas (%) | 94,25±8,30 | 84,10±4,35 |
| Keutuhan membran (%) | 90,20±5,15 | 79,30±6,50 |

Tabel 3. Kualitas spermatozoa kambing hasil sentrifugasi setelah ekuilibras

| Parameter | Tanpa IGF-I complex | IGF-I complex 12 ng (3x10 ⁶) | IGF-I complex 16 ng (3x10 ⁶) |
|----------------------|--------------------------|--|--|
| Motilitas (%) | 61,25±1,165 ^c | 72,88±1,808 ^b | 76,63±1,061 ^a |
| Viabilitas (%) | 62,38±1,188 ^c | 74,50±0,926 ^b | 77,50±0,327 ^a |
| Keutuhan membran (%) | 60,00±0,926 ^c | 70,63±1,598 ^b | 74,50±0,926 ^a |

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Rata-rata Kualitas Spermatozoa Kambing Hasil Sentrifugasi Setelah Ekuilibras

Rata-rata kualitas spermatozoa kambing hasil sentrifugasi setelah ekuilibras disajikan pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran setelah ditambah protein IGF-I complex dalam bahan pengencer pada proses ekuilibras lebih tinggi dibanding tanpa protein IGF-I complex, tetapi yang paling baik adalah pada dosis pemberian 18 ng. Pemberian protein IGF-I complex mampu meningkatkan kualitas spermatozoa kambing dalam pengencer susu kuning telur setelah ekuilibras. Hal ini sesuai dengan pendapat Donald *et al.* (1998), dengan penambahan protein IGF-I complex dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang motil dan kemungkinan protein IGF-I complex mempertahankan motilitasnya melalui efek antioksidan.

Protein IGF-I complex merupakan glikoprotein yang mempunyai berat molekul 150.288 kDa, yang mempunyai peran melindungi membran plasma spermatozoa dengan cara memutus reaksi rantai pada peroksidasi lipid sehingga rantai asam lemak tidak putus dan hasil akhir malondialdehid (MDA) yang merupakan senyawa toksik pada spermatozoa tidak terbentuk. Malondialdehid yang tidak terbentuk tidak akan mempengaruhi membran spermatozoa sehingga lalu lintas molekul yang digunakan untuk metabolisme berjalan dengan normal. Akibatnya membran plasma spermatozoa tidak mengalami kerusakan sehingga transpor molekul yang melalui membran plasma berjalan dengan normal. *Insulin Growth Factor-I complex* akan berikatan dengan reseptornya yaitu pada membran plasma spermatozoa (Donald's, 2003). Reseptor protein IGF-I termasuk reseptor transmembran (Marybeth dan Adriana, 2002). Reseptor transmembran terletak pada permukaan membran sel, molekul sinyal bersifat hidrofilik karena tak dapat menembus membran sel sehingga ditransduksikan kepada molekul lain yang terdapat di dalam sel yaitu tirosin kinase yang terdapat di dalam sel.

KESIMPULAN

Protein IGF-I complex dapat memperbaiki kualitas spermatozoa pada waktu ekuilibras pembekuan semen kambing.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional atas dana yang diberikan untuk penelitian program Hibah Kompetensi Tahun 2010.

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, R.J., J.S. Clarkson, and B. Fishert. 1994. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxydation and human sperm function. **Biol. Reprod.** 40:183-197
- Alvarez, J.G. and B.T. 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
- Aulanni'am. 2005. **Protein dan Analisisnya**. Citra Mentari Group, Malang.
- Beatriz, B., R. Perez-Pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muino Blanco, and J.A. Cebrian-Perez. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold shock damage on ran sperm membrane. **Biology Reproduction.** 63:1531-1537.
- Donald, M.H., J.K. Andrew, R.L. Brett, R.B. William, and S.L. Gray. 1998. Identification of insulin like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa. **Influence on Sperm Motility.** 59:330-337.
- Donald's, M. 2003. **Veterinary Endocrinology and Reproduction.** 5th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Dorothy, E.S. 1993. **Intisari Biokimia**. Binarupa Aksara, Jakarta.

- Evans, G. and M.W.C. Maxwell. 1988. **Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat**. Butterworths, Sydney.
- Garner, B. and E.S.E. Hafez. 2000. **Reproduction in Farm Animals**. 7th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Hoflich, A., H.D. Reichenbach, J. Schwartz, T. Grupp, M.M Weber, J. Foll, and E.Welf 1999. Insulin like growyh factors and igf binding protein in bovine seminal plasma. **Domest. Anim. Endocrinol.** 17(1):39-51.
- Iwazaki, A. and C. Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patient. **Fertl.Steril.** 57:408-416.
- Kostecka, Z. and J. Blanovec. 1999. Insulin like growth factor binding protein and their functions. **Endocrin Regulation.** 33:90-94.
- Macpherson, M.L., R.C.M. Simmen, F.A. Simmen, J. Hernande, B.R. Sheerin, D.D. Varner, P. Loomis, M.E. Cadario, C.D. Miller, S.P. Brinsko, S. Rigby, and T.L. Blanchard. 2002. Insulin like growth factor I and insulin like growth factor binding protein 2 and 5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction.** 67:648-654.
- Marybeth, M. and S. Adriana. 2002. **Insulin Like Growth Factor I and Estrogen in Breast Cancer**. Department of Oncology. Georgetown University, Washington, DC.
- Santoso, S. dan T. Fandy. 2001. **Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS**. Gramedia, Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1985. **Fisiologi Reproduksi pada Ternak**. Penerbit Angkasa, Bandung.