

## PERANAN ANTIOKSIDAN DALAM PEMBEKUAN SEMEN

FERADIS

Badan Penelitian dan Pengembangan Provinsi Riau  
Jl. Diponegoro No. 24 A Pekanbaru, E-mail : [feradis\\_dr@yahoo.com](mailto:feradis_dr@yahoo.com)

### ABSTRACT

*Sperm plasma membrane was rich unsaturated fatty acid and vulnerable to peroxydative damage. Vulnerability sperm against lipid peroksidation could be caused by increased cold shock. The peroxydative processed alter the structure of sperm, particularly in the membrane and akrosom, lost motility, metabolic changed and the rapid released intraseluler component. This condition could be prevented by adding antioxidants to semen extender, such as vitamin E and BHT. Vitamin E has been proven to protected sperm plasma membrane during freezing to thawing, while Butylated Hydroxytoluene (BHT) prevent the sperm plasma membrane damage caused cold shock and provide protection against changes due to freezing. Vitamin E and BHT prevent lipid peroksidation through its the hidrogen atom to the radical peroksil rapidly. It can be concluded that an antioxidant could be prevent damage the sperm plasma membrane was caused cold shock and provide protection against changes due to freezing and to prevent lipid peroksidation.*

*Keywords: antioxidants, freezing semen, lipid peroksidation*

### PENDAHULUAN

Salah satu penyebab kerusakan pada spermatozoa selama proses kriopreservasi sampai pencairan kembali adalah peroksidasi lipid. Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas, terutama radikal hidroksil (OH<sup>\*</sup>). Radikal hidroksil ini dapat menimbulkan reaksi berantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid (Wijaya, 1996). Jones *et al.* (1979) menyatakan bahwa membran plasma spermatozoa kaya akan asam lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap kerusakan peroksidasi. Kerentanan spermatozoa terhadap peroksidasi lipid dapat meningkat disebabkan oleh cekaman dingin (Pursel, 1979).

Proses peroksidasi merubah struktur spermatozoa, terutama pada bagian membran dan akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler (Jones dan Mann, 1977). Keadaan ini dapat dicegah dengan menambahkan antioksidan ke dalam pengencer semen. Beberapa jenis antioksidan telah diteliti daya kerjanya

sehubungan dengan kemampuannya untuk melindungi membran plasma spermatozoa terhadap kerusakan oleh peroksidasi. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) telah dibuktikan dapat melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama pembekuan sampai pencairan kembali (Beconi *et al.*, 1993), sedangkan *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) dapat mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa yang disebabkan cekaman dingin dan memberikan perlindungan terhadap perubahan yang disebabkan pembekuan (Hammerstedt *et al.*, 1976). Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) dan BHT akan mencegah peroksidasi lipid melalui pemberian atom-atom hidrogennya yang cepat kepada radikal peroksil/lipid (Wijaya, 1996 dan Fardiaz, 1996).

### POKOK-POKOK PIKIRAN

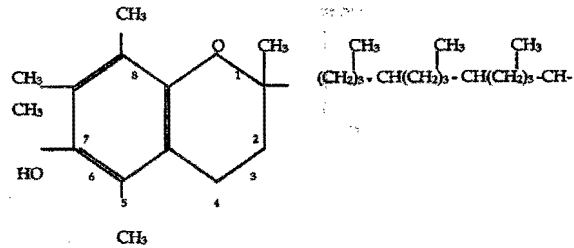
Antioksidan dapat diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok. Kelompok pertama adalah antioksidan sebenarnya (*true antioxidant*) dan juga dikenal sebagai *anti-oxygen*, mengandung substansi yang dapat menghambat oksidasi oleh reaksinya dengan radikal bebas dan kemudian menghambat rantai reaksi berikutnya. Contoh dari kelompok ini adalah *alkyl gallates*, *butylated*

*Peranan Antioksidan dalam Pembekuan Darah*

hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, nordihydroguaiaretic acid, dan tocopherol. Kelompok kedua adalah kelompok yang mengandung substansi yang dikenal sebagai agen pereduksi (*reducing agent*). Mereka efektif melawan agen oksidasi. Agen pereduksi juga dapat bereaksi dengan radikal bebas, contoh untuk kelompok ini adalah asam askorbat, asam isoaskorbat, potasium, garam natrium dan natrium formaldehid sulfoksilat. Kelompok ketiga adalah substansi yang dikenal sebagai sinergis antioksidan (*antioxidant synergist*). Substansi ini biasanya mempunyai efek antioksidan yang kecil, tetapi dapat mempertinggi aksi antioksidan pada kelompok pertama dengan reaksinya sebagai katalisator oksidasi dengan ion logam berat. Contoh kelompok ini adalah *citric acid*, *edetic acid*, *lecithin*, *tartaric acid* dan *thiodipropionic acid* (Reynolds, 1982).

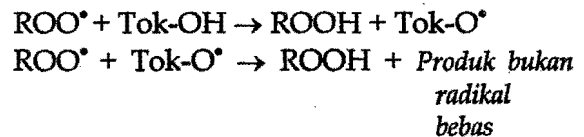
Menurut Mayes (1995) ada beberapa jenis tokoferol dalam bentuk alami. Semuanya merupakan 6-hidroksikromana atau tokol yang tersubstitusi isoprenoid (Gambar 1). D- $\alpha$ -Tokoferol (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, BM = 430.7) mempunyai distribusi alami yang paling luas dan aktivitas biologik yang paling besar.

Walaupun pada mulanya terdapat perdebatan apakah fungsi vitamin E semata-mata sebagai antioksidan lipid atau apakah vitamin E juga dibutuhkan untuk beberapa fungsi yang lain, tetapi informasi yang tersedia menunjukkan bahwa seluruh pengaruh nutrisi vitamin E konsisten dengan peranannya sebagai antioksidan biologik. Dalam hal ini, vitamin E diperkirakan mempunyai fungsi dasar yang penting dalam pemeliharaan integritas membran pada seluruh sel tubuh. Fungsi antioksidan vitamin E meliputi reduksi radikal bebas yang kemudian menghambat reaksi yang mempunyai kemampuan merusak seperti tingginya spesies oksidasi reaktif (Combs, 1992).



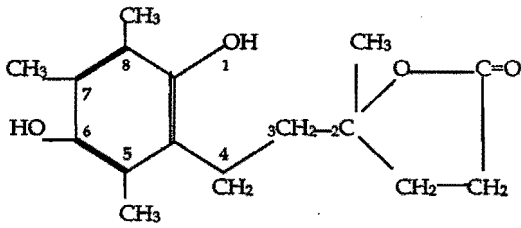
Gambar 1.  $\alpha$ -Tokoferol (Mayes, 1995).

Menurut Mayes (1995) vitamin E tampaknya merupakan baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi asam-asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam pospolipid membran seluler dan subseluler. Pospolipid pada mitokondria, retikulum endoplasmik serta membran plasma mempunyai afinitas terhadap  $\alpha$ -tokoferol, dan vitamin E tampaknya terkonsentrasi pada tempat-tempat ini. Tokoferol bertindak sebagai antioksidan dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas sebagai akibat kemampuannya untuk memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi (Gambar 2). Radikal bebas fenoksi yang terbentuk kemudian bereaksi dengan radikal bebas peroksil selanjutnya. Dengan demikian,  $\alpha$ -tokoferol tidak mudah terikat dalam reaksi oksidasi yang reversibel; cincin kromana dan rantai samping akan teroksidasi menjadi produk non-radikal bebas seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas antioksidan dengan memutuskan rantai yang dimiliki tokoferol (Tok-OH) terhadap radikal peroksil (ROO<sup>•</sup>) (Mayes, 1995).

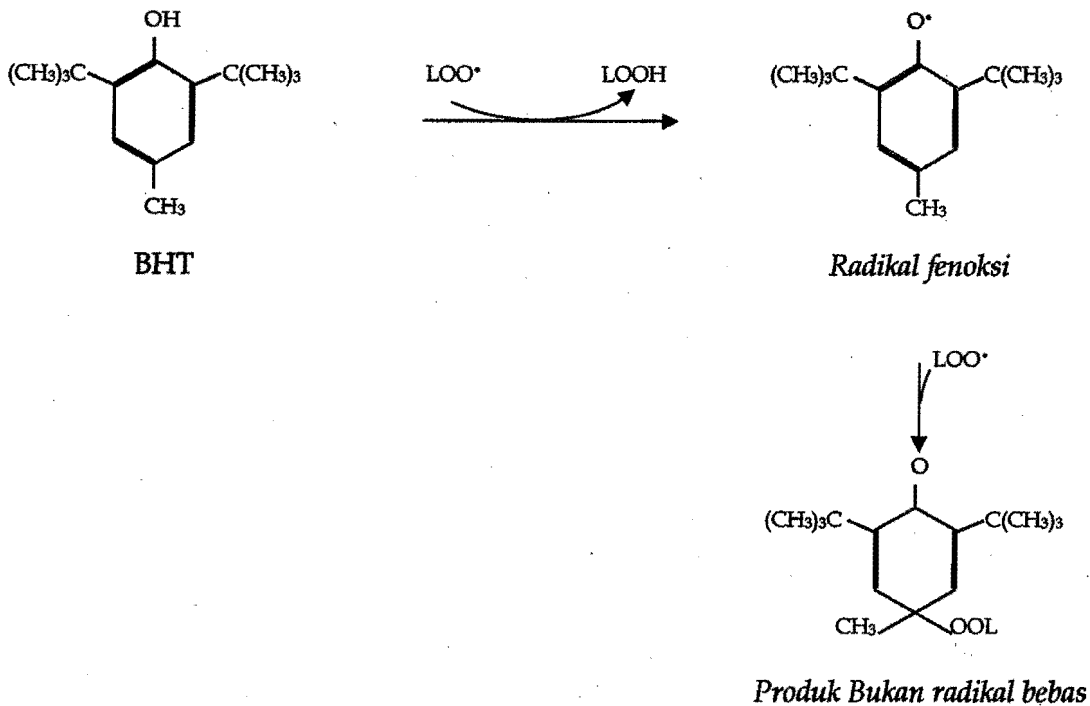
*Peranan Antioksidan dalam Pembekuan Darah*



Gambar 3. Produk oksidasi  $\alpha$ -tokoferol. Bilangan yang tercantum memungkinkan kita untuk menghubungkan atom-atom tersebut dengan atom-atom pada senyawa induknya (Mayes, 1995).

*Butylated Hydroxytoluene* atau *Butylhydroxytoluenum* ( $C_{15}H_{24}O$ , BM = 220.4) merupakan molekul hidrokarbon yang berbentuk bola (*quasi-spherical hydrocarbon molecule*).

BHT bekerja sebagai antioksidan dan biasanya ditambahkan ke dalam makanan (*food additive*) (Duan *et al.*, 1998). Selain itu BHT dapat digunakan sebagai stabilisator pelarut dalam makanan dan dalam pengawetan minyak, lemak atau vitamin (Reynolds, 1982). BHT tidak saja mencegah pengaruh buruk dari spesies oksigen reaktif, tetapi juga dapat meningkatkan palatabilitas makanan (Sun *et al.*, 1996). Menurut Anderson dan Huntley (1963) dalam Kikugawa *et al.* (1990) BHT yang ditambahkan ke dalam minyak akan mengisolasi produk oksidasi selama proses autoksidasi di dalam minyak berlangsung. Reaksi dimulai dengan pembentukan radikal fenoksi dari BHT yang diikuti oleh pembentukan produk bukan radikal bebas (Gambar 4).

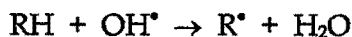


Gambar 4. Aktivitas BHT dengan memutuskan rantai yang dimilikinya terhadap radikal peroksil (Kikugawa *et al.*, 1990)

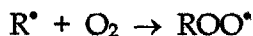
Oksigen merupakan suatu unsur yang esensial, tetapi ekse atau kelebihan  $O_2$  menyebabkan kerusakan peroksidatif. Peroksidasi lipid terjadi akibat adanya radikal bebas, yaitu senyawa kimia yang memiliki elektron tak berpasangan dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas antara lain berupa superoksida ( $O_2^*$ ), hidroksil ( $OH^*$ ) dan peroksil ( $ROO^*$ ). Di dalam tubuh, senyawa reaktif ini dapat berasal dari produk samping rantai pernafasan di dalam mitokondria. Oksigen yang masuk ke dalam tubuh kira-kira 90% ke mitokondria. Pada saat proses respirasi pada mitokondria, oksigen terlibat dalam pembentukan ATP dengan mengikutsertakan enzim-enzim respirasi. Dalam proses respirasi, oksigen mengalami reduksi dalam rangkaian elektron transpor di dalam mitokondria. Proses reduksi oksigen tersebut dapat menghasilkan radikal bebas dan hidrogen peroksida sebagai zat antara (Siregar, 1992).

Radikal bebas bersifat sangat reaktif, jika bereaksi dengan asam lemak tak jenuh akan menghasilkan lipid peroksida. Reaksi ini terjadi secara berantai dan terus menerus karena menghasilkan radikal bebas yang mengakibatkan peroksidasi lebih lanjut. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :

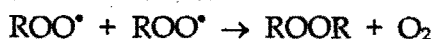
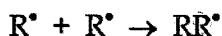
1. Pencetusan :



2. Perambatan :



3. Terminasi :



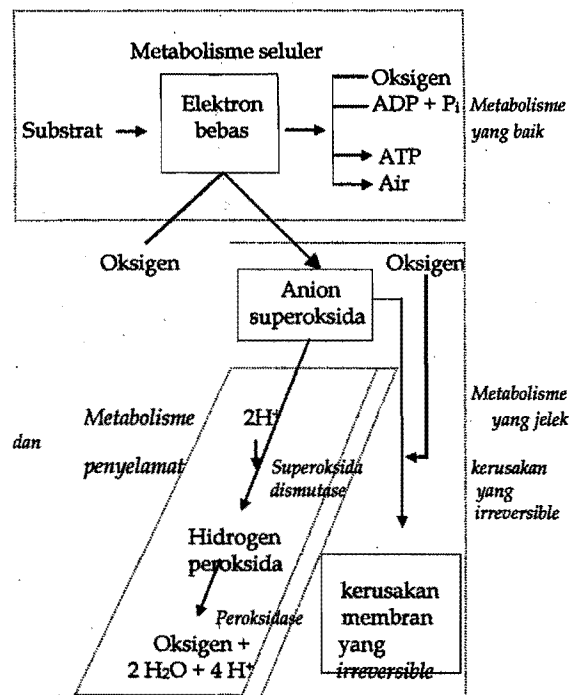
Mekanisme reaksi radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh dimulai dari satu atom hidrogen yang dilepaskan sehingga menghasilkan radikal lipid bebas. Kemudian radikal lipid bebas bereaksi dengan  $O_2$  membentuk lipid peroksida atau endoperoksida. Jika asam lemak tak jenuh mula-mula berupa asam

lemak yang mengandung paling sedikit tiga ikatan rangkap, maka produk akhirnya adalah *malondialdehid* (MDA).

Peroksidasi lipid yang berkepanjangan merusak struktur matrik lipid, menyebabkan instabilitas pada membran. Kerusakan minimal mengubah viskositas (sifat merekat/kekentalan) membran dan merangsang aktivitas *pospolipase*  $A_2$ . Peningkatan kerusakan pada sistem nonmembran juga telah dilaporkan. Karena spermatozoa tidak dapat melakukan biosintesis untuk memperbaiki kerusakan, maka menyebabkan perubahan pada fungsi spermatozoa.

Sulit untuk menghambat peroksidasi lipid secara total karena proses metaboliknya sama-sama berhubungan dengan jalur metabolik yang esensial. Metabolisme sel menggunakan satu mol  $O_2$  sebagai akseptor elektron pusat dalam suatu proses yang menggunakan elektron bebas sebagai lanjutan yang penting. Metabolisme yang berhubungan dengan respirasi untuk menghasilkan ATP dibutuhkan untuk memenuhi keperluan bioenergetik. Seri reaksi yang kedua meliputi interaksi elektron bebas dengan  $O_2$  untuk membentuk anion superoksida. Jika anion superoksida didegradasi oleh *superoksida dismutase* ditambah *peroksidase*, kerusakan membran tidak akan terjadi. *Katalase* juga dapat menghilangkan keracunan akibat hasil sampingan (*byproduct*) hidrogen peroksida (Gambar 5).

Reaksi anion superoksida dengan  $O_2$  yang lain di lingkungan membran menghasilkan kerusakan membran yang tidak dapat dikembalikan seperti semula (*irreversible*). Reaksi radikal bebas ini bersifat *autocatalitic*, sekali dimulai beberapa ikatan ganda karbon-karbon yang rentan akhirnya menjadi rusak. Perlu dicatat bahwa proses ini melibatkan sedikitnya dua mol  $O_2$  (Hammerstedt, 1993).



Gambar 5. Skema hubungan antara metabolisme seluler dan peroksidasi lipid. Metabolisme seluler secara aerob menghasilkan ATP (metabolisme yang baik) yang tergantung pada elektron bebas. Reaksi elektron ini dengan  $O_2$  dapat menghasilkan anion superoksida yang mana bila bereaksi lagi dengan molekul  $O_2$  dapat menyebabkan kerusakan sel (metabolisme yang jelek dan kerusakan yang tidak dapat dikembalikan seperti semula). Sel yang memiliki superoksida dismutase dan peroksidase dalam jumlah yang cukup dapat menghilangkan anion superoksida (metabolisme penyelamat) dan meminimalkan kerusakan peroksidatif (Hammerstedt, 1993).

Plasma membran spermatozoa kaya akan asam lemak tak jenuh dan oleh karena itu rentan terhadap kerusakan peroksidasi (Jones *et al.*, 1979 dan Maxwell dan Watson, 1996). Peroksidasi lipid terjadi pada spermatozoa yang disimpan lama yang dapat menurunkan daya tahan dan mempengaruhi pengawetan semen untuk inseminasi buatan (Alvarez dan Storey, 1982). Proses

peroksidasi merubah struktur spermatozoa, terutama pada bagian akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler (Jones dan Mann, 1977). Membran plasma dan akrosom lebih sensitif daripada inti dan bagian lokomotor (bagian tengah) sel spermatozoa. Membran luar akrosom lebih sensitif daripada bagian dalam (akrosom sebenarnya) dan membran bagian dalam (Salamon dan Maxwell, 1995). Fiser dan Fairfull (1984) menemukan hubungan antara persentase akrosom yang intak dan proporsi spermatozoa yang motil baik sebelum maupun sesudah pembekuan sampai dengan pencairan kembali, dan fertilitas berkorelasi dengan proporsi spermatozoa dengan akrosom yang tidak rusak waktu diinseminasikan. Walaupun proporsi spermatozoa domba yang dapat mempertahankan motilitas mereka setelah pembekuan sampai pencairan kembali cukup tinggi (40% sampai 60%), hanya sekitar 20% sampai 30% yang tidak mengalami kerusakan biologis. Seekor spermatozoa dapat motil, tetapi rusak, dan dalam kasus ini diragukan spermatozoa tersebut mampu memasuki sel telur dan membuahnya.

Antioksidan merupakan senyawa yang bersifat *nucleophilic*, dimana mereka memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas dan mereka mampu untuk mengakhiri siklus reaksi. Antioksidan yang potensial seperti BHT dan vitamin E mempunyai pengaruh perlawanan yang tepat terhadap peroksidasi (Hammerstedt, 1993).

Usaha untuk meminimalkan peroksidasi spermatozoa telah dilaporkan oleh Aitken dan Clarkson (1988) dalam Hammerstedt (1993) yang menguji kemampuan antioksidan untuk meminimalkan kerusakan. Baik BHT maupun vitamin E dapat mengurangi kerusakan peroksidatif. Antioksidan yang larut dalam air (*hypotaurine*) dan yang larut dalam lemak (vitamin E) dapat meminimalkan kerusakan peroksidatif

(Holland *et al.*, 1982). Tingkat kerusakan peroksidatif meningkat dengan meningkatnya temperatur dan tegangan O<sub>2</sub>. Spermatozoa dari spesies yang berbeda, mempunyai sensitivitas yang berbeda pula terhadap kerusakan peroksidatif (degradasi ikatan ganda karbon-karbon dari 0.1 sampai 0.8 nmol per 10<sup>8</sup> spermatozoa).

*Superoksida dismutase*, *katalase* dan *glutation peroksidase* merupakan pertahanan pertama spermatozoa melawan *radical oxigen spesies* (ROS). Namun demikian spermatozoa sapi, domba dan babi mengandung sedikit *katalase* (Holland *et al.*, 1982), sedangkan kandungan  $\alpha$ -tokoferol spermatozoa domba sekitar 1.5 mg/100 ml dan 0.1 mg/100 ml pada cairan seminal plasma (Kaludin *et al.*, 1989), sehingga kurang mampu melawan keracunan hidrogen peroksida.

Beconi *et al.* (1993) melaporkan kemampuan antioksidan vitamin E, dimana antioksidan ini dapat melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama pembekuan dan pencairan kembali. Selanjutnya dijelaskan, pada semen dengan kualitas yang baik, penambahan 1 mg  $\alpha$ -tokoferol asetat (per mililiter pengencer) ke dalam pengencer yang mengandung 0.20 M tris, 0.06 M sitrat, 0.13 M glisin, 0.06 M fruktosa, 20% kuning telur dan 7% gliserol dengan pH pengencer 6.6 dapat menurunkan kerentanan membran plasma terhadap peroksidasi dibandingkan dengan kontrol. Tumen dan Ozkoca (1991) menemukan kualitas semen yang baik bila ditambahkan vitamin E ke dalam pengencer semen domba.

Antioksidan juga dapat meningkatkan fertilitas semen beku, tetapi tidak pada semen segar. Angka kebuntingan setelah inseminasi intrauterin pada domba 86% atau 81% untuk semen segar dan 82% atau 67% untuk semen beku dengan atau tanpa antioksidan secara berturut-turut (Maxwell dan Watson, 1996).

Pursel (1979) menyatakan bahwa cekaman dingin dapat meningkatkan kerentanan spermatozoa terhadap peroksidasi lipid. Kemudian Hammerstedt *et al.* (1976) melaporkan bahwa BHT dapat mencegah kerusakan (patah, *fracture*) membran spermatozoa yang disebabkan pendinginan yang cepat ke suhu 0°C, dan memberikan sedikit perlindungan terhadap perubahan yang disebabkan pembekuan. BHT menekan metabolisme mitokondria spermatozoa dan juga melindungi membran sel dari kerusakan selama cekaman dingin. Selanjutnya ditambahkan oleh Watson dan Anderson (1983) bahwa BHT nyata menurunkan tingkat kerusakan akrosom yang terjadi pada spermatozoa domba selama cekaman dingin. Pada pengencer yang diberi BHT menghasilkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol. Konsentrasi 2 sampai 4 mM BHT memberikan respon yang maksimum.

Menurut Hammerstedt (1993) untuk penyimpanan spermatozoa sebaiknya dilakukan pada konsentrasi O<sub>2</sub> yang rendah dan mengandung antioksidan pada pengencer. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan kontainer yang tertutup sehingga dapat mengontrol lingkungan di sekitar spermatozoa.

## KESIMPULAN

Antioksidan berperan mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa yang disebabkan cekaman dingin dan memberikan perlindungan terhadap perubahan yang disebabkan pembekuan dan mencegah peroksidasi lipid.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa : its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.*, 27:1102-1108.
- 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, Jr., G. F. 1992. *The Vitamins : Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Duan, S., X. C. Weng, X. W. Dong, Y. P. Li and J. R. Jin. 1998. Antioxidant properties of butylatedhydroxytoluene refluxed in ferric chloride solution. *Food Chemis.*, 61:101-105.
- Fardiaz, D. 1996. Antioksidan non-gizi bahan pangan penangkal radikal bebas. *Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan ; Reaksi biomolekuler, dampak terhadap kesehatan dan penangkalan. Pusat Studi Pangan dan Gizi-IPB dan Kedutaan Besar Perancis, Jakarta.*
- Fiser, P. S. and R. W. Fairfull. 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21:542-551.
- Hammerstedt, R. H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation : a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5:675-690.
- Hammerstedt, R. H. R. P. Amann, T. Rucinsky, P. D. Morse II, J. Lepock, W. Snipes and A. D. Keith. 1976. Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm : effect of *Butylated Hydroxitoluene* and cold shock. *Biol. of. Reprod.*, 14:381-397.
- Holland, M. K., Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1982. Lipid peroxidation on different tissues. Its role on the same. *Biol. Reprod.*, 27:1109-1118.
- Jones, R. and T. Mann. 1977. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 50:255-260.
- Jones, R., T. Mann and R. J. Sherrins. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa : spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 31:531-537.
- Kaludin, I., I. G. Ivanov and I. Dimitrova. 1989. Influence of selenium and methionine on the tocopherol content of ram semen (in Bulgarian). *Veterinarna Sbirka*, 87:50-52, abstract.
- Kikugawa, K., A. Kunugi and T. Kurechi. 1990. Chemistry and implications of degradation of phenolic antioxidants. *In : Food Antioxidants*. Editor : B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science. London and New York. Pp.65-98.
- 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. pp.681-691.
- Pursel, V. G. 1979. Effect of cold shock on boar sperm treated with *Butylated Hydroxitoluene*. *Biol. Reprod.*, 21:319-325.
- Reynolds, E. F. 1982. *Martindale; The Extra Pharmacopoeia*. The Pharmaceutical Press. London.
- Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and method of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:1-36.

## *Peranan Antioksidan dalam Pembekuan Darah*

- Siregar, P. 1992. Metabolit oksigen radikal bebas dan kerusakan jaringan. *Cermin Dunia Kedokteran*. 80:112-115.
- Sun, B., M. Fukuhara, T. Kinoshita, M. Kimura and F. Ushio. 1996. Differential induction of isozymes of drugs-metabolizing enzymes by butylatedhydroxytoluene in mice and chinese hamster. *Food and Tox.*, 34:595-601.
- Tumen, H. and A. Ozkoca. 1994. Studies on the fertility and characters of ram semen diluted by various techniques (in Turkish). *Turk Veterinerlik ve hayvancilik dergisi*, 18:287-291, abstract.
- Watson, P. F. and W. J. Anderson. 1983. Influence of *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.*, 69:229-235.
- Wijaya, A. 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. *Forum Diagnosticum* No. 1, Laboratorium Klinik Prodia.