

**PENGARUH PENAMBAHAN LEVEL EKSTRAK BAWANG MERAH
(*Allium cepa liliaceae*) TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR KAMBING
PERANAKAN ETAWA (PE) DENGAN MENGGUNAKAN PENGECER
*RINGER'S DEXTROSE***

Aswin Kurniawan, Enike Dwi Kusumawati, Aju Tjatur Nugroho Krisnaningsih
Fakultas Peternakan
Universitas Kanjuruhan Malang
Email: enike@unikama.ac.id

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan level ekstrak bawang merah terhadap kualitas semen cair kambing peranakan ettawa (PE) dengan menggunakan pengencer *ringer's dextrose*. Materi yang digunakan adalah semen segar kambing peranakan ettawa (PE), *Ringer's Dextrose*, dan ekstrak bawang merah. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan menggunakan analisis statistik RAL (Rancangan Acak Lengkap). Pada penentuan tingkat ekstrak bawang dalam *Dextrosperlich Ringer* penguat adalah suhu ruang penyimpanan, hasil terbaik yang diketahui pada motilitas individu ($P < 0,01$) adalah penambahan 2% sebanyak $71,87 \pm 2,5$. Dalam menentukan tingkat Ekstraksi ekstrak bawang *Ringer Dextrose* room temperature, hasil terbaik yang diketahui dalam survival ($P < 0,01$) adalah penambahan 2% sebanyak $90,63 \pm 0,97$. Pengaruh kadar ekstrak bawang dalam pengencer *Ringer's Dextrose* juga memberikan kelainan ($P < 0,05$) di samping 2% sebanyak $0,61 \pm 0,18$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan ekstrak bawang bombay pada diluent *Ringer's Dextrose* memberikan pengaruh nyata terhadap motilitas, viabilitas. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai lama penyimpanan untuk mengetahui bagaimana ekstrak bawang bisa dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa.

Kata kunci : Antioksidan; Flavonoid; Quercetin; *Ringer's Dextrose*

**EFFECT OF ADDITION LEVEL EXTRACT ONION(*Allium cepa liliaceae*)
THE QUALITY OF SEMEN LIQUID GOAT ETAWA CROSS BREED'S
USING DILUENT RINGER 'S DEXTROSE**

Abstract

The purpose of this research was to know and study the influence of level of different onion extract in diluent *Ringer's Dextrose* to the quality of goat Ettawa cross breed's semen room temperature storage. The material which was used is fresh semen Ettawa cross breed's, *Ringer's Dextrose*, Onion extract. The research method which is used is experimental by using statistical analysis of RAL (*Complete Random Design*). On the determination of the level of onion extract in a diluent *Ringer's Dextrose* which is store room temperature, best results were known on motility of individuals ($P < 0,01$) is in addition of 2% as much as 71.87 ± 2.5 . In determining the level of onion extract dilution *Ringer Dextrose* room temperature, the best results are known in survival ($P < 0.01$) was the addition of 2% as much as 90.63 ± 0.97 . The influence of level of onion extract in diluents *Ringer's Dextrose* is also giving abnormality ($P < 0,05$) in addition of 2% as much as 0.61 ± 0.18 . The conclusion of this research is the addition of onion extract in diluent *Ringer's Dextrose* give the real influence to motility, viability. It needs further research concerning the length of storage in order to find out how onion extract could sustain the life of spermatozoa.

Key words: Antioxidants, Flavonoid, Quercetin, *Ringer's Dextrose*

PENDAHULUAN

Kambing Peranakan Ettawa (PE) adalah salah satu jenis ternak penghasil daging dan susu yang sudah lama dikenal para petani dan mempunyai potensi yang sangat baik untuk dikembangkan, terutama di daerah pedesaan, karena kambing PE mempunyai sifat-sifat yang menguntungkan, antara lain: cepat berkembang biak, jarak antar kelahiran pendek (150 hari) dan jumlah kelahiran anaknya lebih dari satu ekor (Sutiono, Suryaningsih, Setiatin, dan Lestari 2003). Populasi Kambing PE di Indonesia hingga kini baru mencapai 3,9 juta ekor atau 30% dari total jumlah ternak nasional yang mencapai 13 juta ekor (Ditjen Peternakan, 2013). Salah satu upaya untuk meningkatkan produktifitas ternak dengan metode Inseminasi Buatan (IB). Penerapan teknologi IB pada kambing hingga saat ini masih belum sesuai dengan harapan ditandai dengan angka kebuntingan yang rendah. Hasil penelitian Rosida, Anwar, Hidanah, dan Srianto, (2013). Menunjukkan bahwa angka kebuntingan pada Kambing PE menggunakan semen beku bervariasi dari 40-46%. Rizal, Toelihere, Yusuf, Purwantara dan Situmorang (2003) menjelaskan bahwa setiap pejantan kambing memiliki kemampuan melayani sekitar 35,88 ekor betina, jika menggunakan program IB dengan semen beku dalam *straw* mini. Hasil penelitian Tambing, Mozes, Tuty dan Utama (2000) melaporkan bahwa angka konsepsi yang diperoleh dari hasil IB pada Kambing PE bervariasi 33,3-84%.

Pengencer berbahan dasardandianggap baik untuk kebutuhan IB ada tiga macam, yaitu larutan *Ringer's*, *Locke* dan *Thyrode*. Larutan *Ringer's* merupakan bahan pengencer yang paling baik dan mudah didapatkan diantara ketiga bahan pengencer semen tersebut (Danang, dkk, 2012).

Prosesing semen beku dapat menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa akibat reaksi peroksidasi lipid oleh radikal bebas yang dihasilkan selama proses metabolisme mengakibatkan rendahnya kualitas semen kambing (Kusno, 2002). Sementar papor dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen selama proses pembekuan. Hal ini mempercepat metabolisme dan menimbulkan reaksi peroksidasi lipid menyebabkan rusaknya membran plasma sel spermatozoa. Kerusakan ini disebabkan oleh terbentuknya radikal bebas sebagai salah satu produk dari metabolisme spermatozoa sendiri. Reaksi antara radikal bebas dan lipid, terutama asam lemak tak jenuh yang dominan menyusun membran plasma sel. Apabila reaksi awal ini tidak dikendalikan, maka akan terjadi reaksi secara terus menerus *Reactive Oxygen Species (ROS)* terbentuk secara alami, terutama pada rantai respirasi kompleks pada mitokondria dalam aktifitas selular yang normal.

Kerusakan membran spermatozoa dapat dihambat atau dicegah dengan menambahkan antioksidan. Salah satu antioksidan terdapat pada ekstrak bawang merah adalah *quercetin*. Khaki, Fathiazad, Nouri, Navid, and Maleki (2010) menyatakan bahwa *quercetin* merupakan antioksidan yang berasal dari ekstrak bawang merah dan telah terbukti mengurangi stres oksidatif pada spermatozoa tikus jantan. Antioksidan memiliki efek yang signifikan terhadap spermatogenesis, spermatozoa dan stres oksidatif.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar kambing PE umur 1,5-2 tahun dengan bobot badan 50-60 kg. Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*). Kegiatan penelitian yang dilakukan meliputi penampungan semen, pembuatan ekstrak bawang merah, pengenceran semen, uji kualitas semen, penyimpanan semen pada suhu ruang. Perlakuan dalam penelitian ini adalah 4 perlakuan yaitu P1=0%, P2=1%, P3=2% dan P3=3%. Total volume ekstrak bawang merah dan *Ringer's Dextrose* sebanyak 100 ml. Dengan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 16 kali.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Yitnosumarto, 1993) dengan empat variabel penambahan level ekstrak bawang merah yang berbeda, yaitu 0%, 1%, 2% dan 3% dalam 100ml pengencer *Ringer's Dextrose* dengan 16 kali ulangan dan. Apabila diantara perlakuan terdapat perbedaan, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen segar kambing PE harus diuji secara makroskopis untuk menentukan volume pengenceran. Hasil kualitas semen segar kambing PE pada pengamatan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji kualitas semen segar kambing PE

Variabel	Rataan
Volume (ml/ejakulasi)	1,03±0,05
Konsistensi	Kental
pH	7
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Motilitas massa	3+
Motilitas individu (%)	80
Viabilitas (%)	95,49±4,09
Abnormalitas (%)	1,59±1,38
Konsentrasi (10 ⁶)	3868,75±746,59

Kualitas Mikroskopis

Motilitas merupakan gambaran tentang kemampuan spermatozoa dalam membuahi ovum dan selama perjalanan, baik didalam saluran reproduksi jantan maupun betina, spermatozoa harus bertahan hidup untuk penetrasi ke dalam ovum. Hasil pemeriksaan mikroskopis bahwa motilitas semen segar kambing PE adalah $80\pm 0\%$ dengan gerak massa sangat baik (3+) hal ini diperkuat dengan pendapat Mahmali, dkk. (2006) bahwa motilitas individu spermatozoa kambing Boer sebesar 98% dan motilitas massa sangat baik (3+) dan hanya 2% yang berkualitas baik (2+).

Uji Mikroskopis Semen setelah Penambahan Ekstrak Bawang Merah

Berdasarkan uji kualitas semen kambing PE menggunakan Pengencer *Ringer's Dextrose* yang mengandung ekstrak bawang merah, meliputi: persentase motilitas individu, viabilitas, abnormalitas. Kandungan ekstrak bawang merah sebesar 0%, 1%, 2% dan 3% dalam 100 ml pengencer *Ringer's Dextrose*, kemudian semen disimpan pada suhu ruang selama satu jam. Pengamatan uji mikroskopis dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X.

Persentase Motilitas Individu Semen setelah Penambahan Ekstrak Bawang Merah

Motilitas individu merupakan salah satu parameter yang mutlak dari kualitas semen yang akan diproses untuk keperluan IB. Motilitas adalah kemampuan spermatozoa bergerak untuk penetrasi ke dalam ovum. Hasil pengamatan motilitas semen kambing PE setelah pengenceran dan penambahan ekstrak bawang merah pada suhu ruang selama satu sampai dua jam dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase motilitas individu spermatozoa kambing PE setelah pengenceran dengan *Ringer's Dextrose* dan ekstrak bawang merah

Variabel (ml)	Rataan Motilitas (%)
0%	$68,75\pm 2,24^a$
1%	$70,62\pm 1,71^b$
2%	$71,87\pm 2,5^{ab}$
3%	$69,68\pm 1,25^b$

Ket: Notasi yang berbeda (^{a-b}) menunjukkan bahwa tingkat penambahan ekstrak bawang merah memberikan perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas individu spermatozoa kambing PE

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penambahan ekstrak bawang merah sebanyak 2% memberikan perbedaan yang signifikan dalam mempertahankan motilitas individu spermatozoa setelah pengenceran dibandingkan penambahan 0%, 1% dan 3%

ekstrak bawang merah sebesar $71,87 \pm 2,5\%$. Hasil ini menunjukkan adanya pengaruh yang baik setelah penambahan ekstrak bawang merah terhadap motilitas spermatozoa setelah pengenceran.

Persentase viabilitas Semen setelah Penambahan Ekstrak Bawang Merah

Viabilitas merupakan salah satu parameter dari kualitas semen yang akan diproses untuk keperluan IB selain motilitas individu dan motilitas masa. Viabilitas adalah presentasi hidup mati spermatozoa. Hasil pengamatan viabilitas semen kambing PE pada suhu ruang dengan penambahan ekstrak bawang merah dapat di lihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase viabilitasspermatozoa kambing PE setelahpengenceran dengan *Ringer's Dextrose* dan ekstrak bawang merah

Variabel (ml)	Rataan Viabilitas (%)
0%	$90,18 \pm 4,38$
1%	$90,58 \pm 2,11$
2%	$90,63 \pm 0,97$
3%	$90,4 \pm 3,72$

Berdasarkan hasil pengamatan viabilitas setelah pengenceran semen segar kambing PE didapatkan hasil sebesar $95,49 \pm 4,09\%$ dan setelah pengenceran dan penambahan ekstrak bawang merah didapatkan hasil sebesar $90,63 \pm 0,97\%$. Hasil pengamatan menunjukkan adanya penurunan nilai viabilitas setelah dilakukan pengenceran menggunakan *Ringer's Dextrose* dan penambahan ekstrak bawang merah yang disebabkan oleh pemenuhan kebutuhan nutrisi semen hanya dari glukosa.



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa kambing PE yang diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x

Ket : Hidup : Spermatozoa yang putih dan tidak menyerap warna
Mati : Spermatozoa yang menyerap warna

Persentase Abnormalitas Semen setelah Penambahan Ekstrak Bawang Merah

Abnormalitas merupakan salah satu parameter pengujian kualitas dari semen sebelum diproses untuk keperluan IB selain motilitas individu, motilitas masa dan

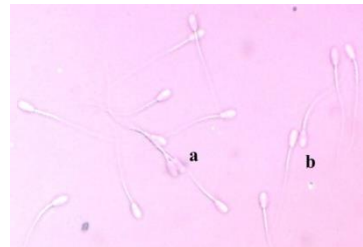
viabilitas menurut Susilawati (2011) morfologi abnormal pada spermatozoa berhubungan dengan fertilitas ternak. Hasil pengamatan abnormalitas kualitas semen kambing PE pada suhu ruang dengan penambahan ekstrak bawang merah dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase abnormalitas spermatozoa Kambing PE setelah pengenceran dengan *Ringer's Dextrose* dan ekstrak bawang merah

Variabel (ml)	Rataan Abnormalitas (%)
0%	0,35±0,31 ^a
1%	0,40±0,23 ^a
2%	0,61±0,18 ^b
3%	0,50±0,35 ^a

Ket: Notasi yang berbeda (a-b) menunjukkan bahwa tingkat penambahan ekstrak bawang merah memberikan perbedaan nyata ($P<0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa kambing PE

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan kontrol memberikan pengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa kambing PE sebesar 0,35±0,31, akan tetapi pemberian ekstrak bawang merah dalam pengencer *Ringer's Dextrose* 2% memberikan pengaruh yang terbaik dalam mempertahankan abnormalitas spermatozoa sebesar 0,61±0,18%.



Gambar 2. Abnormalitas spermatozoa Kambing PE yang diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan penambahan Ekstrak Bawang Merah 2%.

Keterangan:

- (a). Salah satu contoh spermatozoa abnormal, ditandai dengan kepala rangkap (*double head*).
- (b) Spermatozoa normal, ditandai dengan bentuk kepala dan ekor yang normal

KESIMPULAN

Penambahan level ekstrak bawang merah (*Allium Cepa Liliceae*)2% menggunakan pengencer *Ringer's Dextrose* memberikan hasil yang lebih baik pada pengujian kualitas spermatozoa meliputi persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa kambing PE setelah proses pengenceran.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak terutama Laboratorium Lapang Fakultas Peternakan Universitas Kanjuruhan Malang yang telah banyak membantu sejak persiapan hingga terselenggaranya penelitian ini dengan baik

DAFTAR PUSTAKA

Aboagla EM-E, and Terada T. 2004. *Effect Of Supplementation Of Trehalosa Extender Containing Egg Yolk With Sodium Dodecyl Sulfate On The Frezability Of Goat Spermatozoa*. Theriogenology 62: 809-818.

Aminasari, P. D. 2009. *Pengaruh Umur Pejantan Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Badan Litbang Pertanian. 2011. *Kambing Peranakan Etawah Sumberdaya Ternak Penuh Berkah*. Edisi 19-25 Oktober. No.3427 Tahun XLII.

Budi. S dan Bambang. 2005. *Bawang Merah, Intensifikasi Budidaya*, Kanisius. Yogyakarta

Darnell J, Lodish H, and Baltimore D. 1990. *Moleculer Cell Biology*. Ed ke-2 e. Anim Sci Books. Pp. 491 – 527.

Danang, D. R., N. Isnaini dan P. Trisunuwati. 2012. *Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung Dalam Pengencer Ringer's Pada Suhu 4° C*. J. Ternak Tropika.13 (1): 47-57.

Ditjen Peternakan. 2013. *Populasi Kambing Di Indonesia 2009-2013*. Badan Pusat Statistik.

Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. *Spermatozoa and Plasma Semen*. In *Reproduction in Farm Animal*. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds.). Lippincott & Williams. Baltimore, Marryland, USA.

Husin, N., T. Suteky dan K. Solihati. 2008. *Uji Kualitas Semen Kambing Nubian dan Peranakannya (Kambing Nubian X PE) serta Kambing Boer Berdasarkan Lama Penyimpanan*. J. Sain Peternakan Indonesia. 2 (2): 57-65.

Indriani, T. Susilawati dan S. Wahyuningsih, 2013. *Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Metode Water Jacket dan Free Water Jacket*. J. Veteriner. 14. 3: 379-386.

Jamshid, G.G. 2012. *Androgenic Effect of Onion (Allium Cepa. Linn) Aqueous Extract on Sperms Quantity and Viability Compared with Zn Sulfate Supplementation in the Rats*. Asian J.Exp.Biol.Sci 3(3) 2012: 506-509.

Jones RC, and Martin ICA. 1973. *The Effects Of Dilution, Eggyolk And Cooling To 5°c On The Ultrastructure Of Ram Spermatozoa*.

- Khaki, F. Fathiazad, M. Nouri, A Khaki, Navid, A. and Maleki. 2010. *Beneficial Effects Of Quercetin On Sperm Parameters In Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats*. Article first Published Online. 24 (9): 1285–1291.
- Kelso, Redpath KAA, Noble RC, and Speake BK. 1997. *Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bull*. J Repro Fert.109 : 1 – 9.
- Koo. H.M and S. Mohamed.2001. *Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, andApigenin)*. Content of Edible Tropical Plants.49 (6): 3106-12.
- Kusno, U. 2002. *Efektifitas Berbagai Dosis A- Tokoferol Dan Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Motilitas Dan Integritas Membran Plasma Semen Cair Domba Garut*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. *Production And Storage Of Goat Semen For Artificial Insemination*. Anim. Reprod. Sci. 62: 113-141.
- Noprida H, T. Suteky, dan Kususiyah. 2007. *Uji Kualitas Semen Kambing Nubian dan Peranakannya (Kambing Nubian X PE) serta Kambing Boer Berdasarkan Lama Penyimpanan*. Jurnal Sain Peternakan Indonesia. 2 (2) : 59-66.
- Pamungkas. W.R., L.G.S. Astiti, T. Panjaitan, A. Muzani dan N. Agustini. 2009. *Beternak Kambing Intensif*. Juknis. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Nusa Tenggara Barat, Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Badan Litbang Pertanian.
- Peraturan Menteri Pertanian.2008. *Persyaratan Teknis Minimal Benih Dan Bibit Ternak*. Nomor : 07/Permentan/OT.140/1/2008. Tanggal : 30 Januari 2008.
- Prabowo Agung. 2010. *Budidaya Ternak Kambing (Materi Pelatihan Agribisnis bagi KMPH)*.Report No. 51. STE. Final. BPTP Sumatera Selatan.
- Putranti, O. D., Kustono dan Ismaya. 2010. *Pengaruh Penambahan Crude Tannin Pada Sperma Cair Kambing Peranakan Ettawa yang Disimpan Selama 14 Hari Terhadap Viabilitas Spermatozoa*. Buletin Peternakan 34(1): 1-7.
- Rachmawati A, Sumitro B, dan Susilawati T, 2002. *Induksi Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing Dan Sapi Dengan Bovine Zona Pellucida 3 (bZP3)*. Tesis. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya
- Resi A.W dan A. Sugrani.2009. *Flavonoid (Quercetin)*. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Ridwan.2008. *Pengaruh Pengencer Semen Terhadap Abnormalitas Dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Kambing Lokal Pada Penyimpanan Suhu 5°C*. J. Agroland 16 (2) : 187 – 192.
- Ridwan dan Rusdin. 2008. *Konservasi Semen Ayam Buras Menggunakan Berbagai Pengencer Terhadap Fertilitas Dan Periode Fertil Spermatozoa Pasca Inseminasi Buatan*. J. Agroland 15 (1) : 63 – 67.

Rosida , H. Anwar, S. Hidanah, dan P.Srianto, 2013, *The Quality of Etawa Goat-Breed's Frozen Semen in Various Types of Diluent*, Veterine, 6 (1) 69-74.

Rusdin dan K. Jum'at. 2000. *Motilitas dan Recovery Sperma Domba dalam Berbagai Pengencer Selama Penyimpanan Pada Suhu 5°C*. Laporan Penelitian. Fakultas Pertanian Universitas Tadulako, Palu.

Schatten H, and Constantinescu GM. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. USA: Blackwell Pub.

Souhoka, D.F., M.J. Matatula, W.M. Mesang-Nalley dan M. Rizal. 2009. *Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan*. Jurnal Veteriner. 10(3): 135-142.

Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. UB Press. Universitas Brawijaya. Malang.

Susilowati, S. 2008. *Komplek Insulin Like Growth Faktor-I Mempengaruhi Presentase Membrane Plasma Utuh dan kadar Malondialdehid Spermatozoa*. Jurnal Veteriner. Vol 9 (4): 168-175.

Sutiono, D. Suryaningsih, E.T.Setiatin dan C.M.S. Lestari, 2003, *Performas Anak Berdasarkan Tipe Kelahiran Pada Kambing Peranakan Etawa*. Skripsi. Universitas Diponegoro, Semarang.

Tambing. S.N, Mozes R. Toelihere, Tuti L. Yusuf dan Utama. I.K. 2000. *Pengaruh Gliserol Dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah*. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.5 (2): 1-8

Tambing. S.N, Muhammad. G, dan Bambang. P, 2001. *Pemberdayaan teknologi inseminasi buatan pada ternak kambing*. Wartazoa. 11 (1): 1-19.

Taepongsorat L, Tangpraprutgul P, Kitana N, and Malaivijitnond S. 2008. *Stimulating Effects Of Quercetin On Sperm Quality And Reproductive Organs In Adult Male Rats*. Asian J Androl.;10(2):249-58.

Zribi N, Chakroun NF, Ben Abdallah F, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, dan Keskes LA. 2012. *Effect Of Freezing-Thawing Process And Quercetin On Human Sperm Survival And DNA Integrity*.Cryobiology..65(3):326-31.