

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**PENINGKATAN PENYEDIAAN PANGAN ASAL HEWAN DENGAN
TEKNOLOGI PENAMBAHAN L-ARGININ DALAM MEDIA
FERTILISASI INVITRO SPERMATOZOA KAMBING**

TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, MSi, Drh.	0004016309
Dr. RIMAYANTI, MKes, Drh.	0003126305
Dr. SUHARSONO MKes, Drh.	0004026106
Dr. TATIK HERNAWATI, MSi, Drh.	0029086005

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)

kkc
kk
LP 12/19
Pen



PENINGKATAN PENYEDIAAN PANGAN ASAL HEWAN DENGAN
TEKNOLOGI PENAMBAHAN L-ARGININ DALAM MEDIA
FERTILISASI INVITRO SPERMATOZOA KAMBING

TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. TRI WAHYU SUPRAYOGI, MSi, Drh.	0004016309
Dr. RIMAYANTI, MKes, Drh.	0003126305
Dr. SUHARSONO MKes, Drh.	0004026106
Dr. TATIK HERNAWATI, MSi, Drh.	0029086005

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENINGKATAN PENYEDIAAN PANGAN ASAL HEWAN DENGAN TEKNOLOGI PENAMBAHAN L-ARGININ DALAM MEDIA FERTILISASI INVITRO SPERMATOZOA KAMBING

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr TRI WAHYU SUPRAYOGI, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0004016309
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Pendidikan Profesi Dokter Hewan
Nomor HP : 081330215592
Alamat surel (e-mail) : tri-w-s@fkh.unair.ac.id: twsuprayogi@gmail.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr TATIK HERNAWATI M.Si
NIDN : 0029086005
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr SOEHARSONO
NIDN : 0004026106
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (3)
Nama Lengkap : drh.. Dr RIMAYANTI
NIDN : 0003126305
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

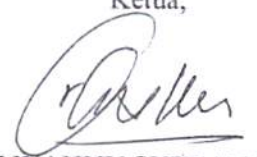
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 199,770,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan



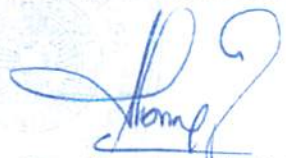
(Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr TRI WAHYU SUPRAYOGI, M.Si)
NIP/NIK 196304011990021001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Sc., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi spermatozoa kambing. Kegiatan penelitian ini terdiri dari 2 tahun. Tahun pertama (I) yaitu penambahan L-Arginin dalam media kapasitas spermatozoa kambing terhadap motilitas, viabilitas, membrane plasma utuh, nekrosis dan apoptosis spermatozoa. Tahun kedua (II) yaitu penambahan L-Arginin dalam media kapasitas spermatozoa kambing terhadap kapasitas, reaksi akrosom dan fertilisasi invitro. L-Arginin yang ditambahkan dalam media kapasitas 0,004 M/ml dan 0,006 M/ml. Kemudian data kapasitas, reaksi akrosom dan fertilisasi dikumpulkan. Data yang diperoleh dianalisis dengan F Test.

Kesimpulan yang didapat bahwa penambahan L-Arginin dalam bahan pengencer susu skim dengan dosis 0,006M/ml menunjukkan persentase yang paling tinggi dengan parameter motilitas, daya tahan hidup (viabilitas), membran plasma utuh, kapasitas dan fertilisasi in vitro, sedangkan reaksi akrosom spermatozoa paling rendah.

Keyword :Kambing jantan, L.Arginin, kapasitas, reaksi akrosom, fertilisasi

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Berkat rahmat Allah SWT, kegiatan penelitiandengan judul “Peningkatan Penyediaan Pangan Asal Hewan Dengan Teknologi Penambahan L-Arginin Dalam Media Fertilisasi Invitro Spermatozoa Kambing” (Tahun ke-2/terakhir), dapat berjalan dengan lancar sehingga bisa menyelesaikan sampai 100%.

Fertilisasi in vitro merupakan teknologi reproduksi yang sangat canggih. Proses fertilisasi ini membutuhkan spermatozoa sehat dan ovum juga sehat, serta diperlukan ruangan yang steril. Keberhasilan fertilisasi in vitro masih sangat rendah hal ini disebabkan banyak faktor, antara lain adalah media fertilisasi. Media fertilisasi merupakan media untuk tempat terjadinya peleburan antara spermatozoa yang mengalami kapasitasi dengan ovum yang sudah masak. Media fertilisasi yang baik harus mengandung komponen yang sangat kompleks, antara lain energi, mineral, vitamin, hormonal dan tidak kalah pentingnya adalah harus mengandung antioksidan, mengingat pada proses metabolisme sel selalu menghasilkan ROS, tidak terkecuali pada proses fertilisasi in vitro. Meskipun secara fisiologis sel menghasilkan antioksidan, tetapi terkadang tidak mencukupi untuk menetralsir ROS yang terbentuk. Oleh karena itu perlu ditambahkan antioksidan dari luar. Salah satu antioksidan adalah L-Arginin, suatu substrat merupakan asam amino semiesensial yang menghasilkan nitrat oksida dengan perantara enzim nitrat oksid synthase untuk menetralsir terbentuknya ROS.

Pada kesempatan ini tim peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

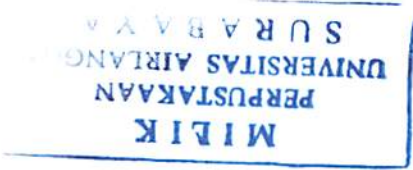
1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Atas diterimanya proposal penelitian ini.

Tim peneliti berharap bahwa laporan penelitian ini bermanfaat bagi kemajuan pengembangan Ilmu Biologi Reproduksi sehingga populasi ternak di Indonesia bisa meningkat secara signifikan. Tim menyadari penyusunan laporan penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu saran yang dapat meningkatkan kualitas laporan penelitian tersebut sangat kami butuhkan. Sekian terimakasih.

Surabaya, 10 Nopember 2018

Tim Peneliti



1	HALAMAN PENGESAHAN
ii	RINGKASAN
iii	PRAKATA
iv	DAFTAR ISI
v	DAFTAR TABEL
vi	DAFTAR GAMBAR
1	BAB 1. PENDAHULUAN
3	BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA
9	BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN
10	BAB 4. METODE PENELITIAN
13	BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI
21	BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA
22	BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN
23	DAFTAR PUSTAKA
26	LAMPIRAN
	1. Draf artikel ilmiah untuk disubmit ke jurnal internasional (Iraqi International Journal)
	2. Surat Keterangan submit di jurnal nasional ber ISSN (Ovozoa)
	3. Seritikal mengikuti Konferensi internasional (VMIC) 2017
	4. Draft HKI

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Karakteristik semen segar kambing.	13
Tabel 2. Rataan \pm SD kualitas semen kambing pada media kapasitasi	14

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Spermatozoa yang mengalami hidup dan mati	15
Gambar 2. Spermatozoa yang mengalami kapasitasasi dan reaksi akrosom	15

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Artikel ilmiah pada jurnal Chem Tech (publish)	20
Lampiran 2. Artikel ilmiah pada jurnal Iranian Journal of Applied Animal Science (draft)	21

BAB I. PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Sebagai sumber protein hewani kambing maupun domba berpotensi memasok sumber gizi berupa protein hewani. Sesuai dengan apa yang diprogramkan pemerintah yaitu pemberdayaan masyarakat desa dan ekonomi kerakyatan maka perlu kiranya membangun segala potensi yang terkait dipedesaan antara lain pemanfaatan sumber daya alam dan sumber daya manusia. Oleh karena itu perlu adanya peningkatan pengembangan sektor peternakan. Berbagai teknologi telah diciptakan dan telah dipergunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak. Inseminasi Buatan merupakan awal pemakaian Bioteknologi Reproduksi pada hewan jantan dan selanjutnya diikuti dengan penelitian tentang manipulasi *in vitro* spermatozoa. Cara manipulasi spermatozoa secara *in vitro* diantaranya adalah metode sentrifugasi. Pada proses fertilisasi *in vitro* dibutuhkan adanya ovum yang matang dan spermatozoa yang telah mengalami pendewasaan atau kapasitasasi. Proses pendewasaan spermatozoa secara *in vitro* dapat dicapai dengan menambahkan medium yang sesuai (Hardjopranto, 2006).

Dampak buruk dari hasil pemisahan plasma seminalis dengan teknik sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh spermatozoa. Adanya peningkatan akumulasi produksi ROS pada spermatozoa yang disentrifugasi diduga merupakan proses yang kompleks dan dapat berasal dari berbagai proses kimia, organel maupun sel bahkan berasal dari luar sel (Agaerwal *et al*, 2003). Bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralisir oleh system pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA selanjutnya terjadi penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995).

Menurut Al-Ebady *et al* (2012), L-Arginin adalah asam amino yang memainkan peran penting dalam merangsang motilitas spermatozoa pada mamalia dalam kondisi *in vitro*. L-

Arginin juga berperan sebagai antioksidan yang menghasilkan nitrat oksida dari reaksi sintesis enzim sehingga mengurangi peroksidasi lipid membran spermatozoa yang terjadi karena radikal bebas saat spermatozoa berinteraksi langsung dengan oksigen. Nitrat oksida adalah molekul biologis yang berperan penting dalam fisiologi spermatozoa seperti motilitas spermatozoa, interaksi spermatozoa – ovum dan spermatogenesis. Nitrat oksida juga berperan dalam mekanisme pertahanan spermatozoa terhadap pembentukan oksigen reaktif selama dibawah titik beku dalam nitrogen cair pada -196°C , yang mempertahankan motilitas spermatozoa dan viabilitas post thawing.

Menurut Flaherty *et al* (2004), L-Arginin adalah suatu substrat yang menghasilkan nitrat oksida dengan perantara enzim nitrat oksid synthase. Enzim tersebut ada dibagian akrosom dan ekor spermatozoa. L-Arginin merangsang kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa.

Penelitian tentang L-Arginin memang telah banyak dilakukan, namun penelitian tentang penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi spermatozoa kambing belum pernah diteliti.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dapat meningkatkan persentase kapasitas spermatozoa kambing?
2. Apakah penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dapat meningkatkan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing?
3. Apakah penambahan L-Arginin dalam media kapasitas spermatozoa kambing dapat meningkatkan kejadian fertilisasi?

2.1. Semen Kambing

Semen adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina pada waktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan (Hafez, 2000). Pada kambing semen terdiri dari dua bagian yaitu plasma semen dan spermatozoa. Plasma semen diproduksi oleh kelenjar-kelenjar epididimis, vas deferens, vesica seminalis, prostat, kelenjar bulbourethralis (Cowper's) dan kelenjar urethra, sedangkan spermatozoa diproduksi di dalam tubulus seminiferus testis melalui proses spermatogenesis. Pada kambing plasma semen mengandung gliseril fosforil kolin dalam kadar yang tinggi dibanding sapi, babi dan kuda. Semen kambing mengandung spermatozoa sebanyak sepertiga bagian dan dua bagian adalah plasma semen (Hardjopranto, 1981). Plasma semen mengandung berbagai persenyawaan organik termasuk fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, gliseril fosforil kolin, ergotionin, phospholipid, prostaglandin, asam amino dan asam oksalat. Fruktosa merupakan karbohidrat yang siap dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi utama. Plasma semen kambing mengandung enzim fosfolipase A dari kelenjar bulbourethralis yang dapat mengkoagulasikan lesitin dari kuning telur pada bahan pengencer (Evans dan Maxwell, 1987).

2.2. Spermatozoa Kambing

Spermatozoa merupakan sel berukuran kecil, kompak dan sangat khas, yang tidak bertumbuh atau membagi diri. Secara morfologis spermatozoa terdiri dari kepala yang membawa materi genetik, dan ekor yang mengandung sarana penggerak. Spermatozoa tidak memegang peranan apapun dalam fisiologi hewan jantan yang menghasilkan dan hanya melibatkan diri dalam proses pembuahan di dalam saluran alat kelamin betina untuk membentuk individu baru yang sejenis dari mana ia berasal (Toelihere, 1985).

Menurut Frandson (1992), spermatozoa terdiri dari kepala, bagian tengah (midpiece) dan ekor. Inti ada di dalam kepala dan mempunyai ukuran kira-kira sepertiga

panjang kepala, mengandung bahan genetik yang dibutuhkan pada saat membuahi sel telur. Inti spermatozoa mengandung kromosom yaitu separuh dari jumlah kromosom inti yang diploid pada sel somatik. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria di dalamnya. Ekor spermatozoa menyerupai flagellum. Dua sentriol terletak dalam bagian tengah (midpiece). Dari sini fibril-fibril yang serupa dengan silia terentang dalam ekor. Terdapat dua fibril sentral yang dikelilingi oleh sebuah cincin yang terdiri dari 9 pasangan fibril perifer. Fibril-fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa. Fibril ini merupakan kerangka untuk berkontraksi dan berelaksasi, sama seperti kerjanya aktomiosin dari urat daging pada tubuh, yang menyebabkan gerakan ekor seperti cambuk dan mendorong spermatozoa bergerak kedepan di dalam cairan. Bagian leher juga mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian badan memiliki panjang 8-10 mikron, tetapi tebalnya hanya 1 mikron. Bagian badan ini banyak mengandung enzim dan bahan lipoid. Bagian ini berakhir pada cincin sentriol yang kemungkinan berfungsi mengkoordinir rentetan kontraksi-kontraksi dari serabut-serabut fibril itu. Ekornya yang berkurang garis tengahnya secara bertahap dari sambungan dengan bagian badan dicincin sentriol keujungnya, kira-kira panjangnya 40-44 mikron. Panjang keseluruhan spermatozoa 70 sampai 72 μm .

Spermatozoa yang memiliki abnormalitas morfologik, kemungkinan tidak subur, abnormalitas tersebut bisa terjadi secara primer maupun sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada saat spermatogenesis, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi setelah keluar dari tubulus seminiferus. Kesuburan kambing jantan tergantung pada proporsi spermatozoa yang abnormal terhadap spermatozoa normal di dalam air mani. Meski demikian beberapa spermatozoa yang memiliki morfologi normal dapat terjadi kekurangan kandungan DNA yang menyebabkan berkurangnya kesuburan.

2.3. Fungsi Membran Spermatozoa

Membran spermatozoa tersusun dari 43% lipid (dua lapis fosfolipid), 48% protein dan 9% karbohidrat. Komponen membrane spermatozoa mempunyai fungsi yang sangat unik dan spesifik seperti perlekatan spermatozoa dengan sel telur, transport substrat dan metabolisme. Fungsi-fungsi tersebut dilakukan oleh struktur yang secara morfologis terletak pada daerah-daerah tertentu. Seperti membrane pada bagian kepala berfungsi untuk penembusan sel telur pada proses fertilisasi. Membran bagian luar akrosom berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema sel telur pada proses fertilisasi sedangkan membrane pada bagian ekor mempunyai fungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantar gelombang gerakan. Fosfolipid merupakan komponen utama membrane lipid spermatozoa yang membentuk membrane lapis ganda kepala yaitu fosfolipid hidrofilik dan fosfolipid hidrofobik yang sangat penting kaitannya dengan proses fertilisasi. Diantara kedua lapisan tersebut terdapat protein globuler dan fibrous dengan distribusi yang bervariasi. Protein-protein ini berfungsi sebagai reseptor terhadap rangsangan eksternal dan adanya sinyal (misalnya cahaya, aroma, hormone, obat-obatan, factor penumbuh dan transporter) protein ini juga berfungsi seperti enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan kepala spermatozoa terhadap sel telur. Pada bagian luar dari kedua lapisan fosfolipid terdapat karbohidrat yang merupakan oligosakarida yang berikatan dengan protein dan membrane lipid. Karbohidrat pada membran spermatozoa selain berfungsi sebagai sumber untuk pembentukan ATP juga berperan penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Hardijanto dkk, 2010).

2.4. L-Arginin

Asam amino arginin memiliki kecenderungan basa yang cukup tinggi akibat ekresi dua gugus amina pada gugus residunya. Asam amino ini tergolong setengah esensial bagi

manusia dan mamalia lainnya, tergantung tingkat perkembangan atau kondisi kesehatan. Peranan arginin adalah meningkatkan kemampuan untuk melawan kanker dan memperlambat pertumbuhan tumor. L-Arginin adalah asam amino yang dapat merangsang motilitas spermatozoa mamalia dalam kondisi *in vitro* dan berperan penting dalam pertahanan imunitas seluler. Kekurangan L-Arginin dapat menyebabkan kekacauan metabolisme spermatozoa sehingga menurunkan motilitas spermatozoa dalam proses spermatogenesis juga akan terganggu (Srivastava et al., 2006).

L-Arginin memainkan peran penting sebagai antioksidan dengan menonaktifkan anion superoksida melalui peningkatan produksi nitrat oksida sehingga menurunkan peroksidasi lipid membran spermatozoa (Al-Badry, 2014). Nitrat oksida (NO) disintesa dari L-Arginin oleh enzim NOS (Nitric Oxide Synthase) yang terdapat dalam spermatozoa. Nitrat oksida juga berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS) selama proses pembekuan spermatozoa dibawah titik beku dalam cairan nitrogen pada suhu -196°C .

Menurut penelitian Al-Ebady *et al* (2012) menyatakan bahwa penambahan 0,005 M/ml L-Arginin pada semen sapi perah yang mengandung spermatozoa motil yang rendah dapat meningkatkan motilitas spermatozoa serta menurunkan kematian, kelainan dan cacat pada akrosom spermatozoa. Penelitian Al-Badry (2014) juga menunjukkan bahwa penambahan Arginin pada semen sapi perah post thawing dapat memberikan persentase kematian dan kelainan spermatozoa yang lebih rendah.

2.5. Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan sekelompok senyawa oksigen yang bersifat reaktif dan dapat merusak sel atau molekul yang ada disekitarnya dengan cara mengoksidasi atau mereduksi elektron dari / ke sel atau molekul lain yang ada disekitarnya (Halliwell and Gutteridge, 1999) ROS terbukti dapat menyebabkan disfungsi sel melalui

perubahan fungsi protein struktur (enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matrik dan sitoskeleton), rantai DNA dan membran sel, sehingga integritas sel terganggu (Suryohudoyo, 2000).

Secara umum ROS yang terlibat dalam berbagai proses biologis sel, sebagian besar berasal dari hasil metabolisme normal oksigen (O_2) suatu senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerob untuk menghasilkan ATP melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria. Dalam keadaan normal sekitar 85-90% oksigen diperlukan oleh mitokondria untuk menghasilkan energi dalam bentuk ATP dan sekitar 3-5% dari oksigen tersebut direduksi secara univalen menjadi ROS (Halliwell and Gutteridge, 1999). ROS dalam kondisi normal juga diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa dan terlibat dalam induksi hiperaktivasi, kapasitasi dan reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur (Dorota and Kurpisz, 2004).

Telah dilaporkan bahwa tingkat kerusakan membran oleh ROS bukan hanya tergantung pada sifat dan jumlah ROS yang dilibatkan tetapi juga tergantung pada momen dan durasi / lamanya paparan ROS serta faktor-faktor lain seperti temperatur, tekanan oksigen dan komposisi lingkungan sekitarnya (Aitken et al, 1994; Lamirade et al, 1997). Peroksidasi lipid merupakan salah satu proses yang menggambarkan terjadinya kerusakan oksidatif dari asam lemak poli tak jenuh sebagai konsekuensi dari peningkatan konsentrasi senyawa oksigen reaktif dalam sel atau organ. Aitken *et al*(1998), menyatakan bila asam lemak poli tak jenuh bereaksi dengan radikal hidroksil (salah satu bentuk ROS) akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Oksidasi yang berlanjut dari rantai samping asam lemak dan fragmentasi asam lemak ini akan menghasilkan komposisi kompleks lipid hydroksiperoxide dan produk akhir aldehid antara lain MDA. (Aitken *et al*, 1994). Oleh karena itu peningkatan kadar MDA dalam suspensi lazim

digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.6. Kapasitasi dan Reaksi Akrosom

Kapasitasi adalah suatu kompleks reaksi biokimia dan fisiologis. Selama kapasitasi terjadi modifikasi dan karakterisasi membran, aktivitas enzim dan sifat motilitas spermatozoa (Baldi et al, 2000), terjadi perubahan pola motilitas yaitu hiperaktivasi dari spermatozoa (Gordon, 2000). Pada saat kapasitasi secara molekuler terjadi modifikasi kalsium ion intraseluler dan ion-ion lainnya, perubahan lipid dan fosfolipid membran, perubahan fosforilasi protein dan aktivitas protein kinase. Terjadi perubahan-perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid sehingga meningkatkan fluiditas membran, merubah struktur dan komposisi membran plasma sehingga terjadi perubahan ratio kolesterol dan fosfolipid. Salah satu tahap awal pada kapasitasi spermatozoa adalah hilangnya kolesterol dari membran plasma, yang akan merangsang perubahan susunan lipid membran yang pada akhirnya meningkatkan permeabilitas membran terhadap Ca^{2+} , HCO_3^- dan K^+ . Tingginya konsentrasi ion-ion intraseluler akan merangsang terjadinya reaksi akrosom (Harrison and Gadella, 2002). Reaksi akrosom secara fisiologis tergantung dari interaksi spermatozoa dengan protein dari zona pelusida yaitu protein ZP3. Proses ini diikuti dengan pelepasan beberapa enzim akrosom dan bahan-bahan lain yang memberi fasilitas penting untuk terjadinya penetrasi spermatozoa dalam zona pelusida dan berpindahnya molekul-molekul pada segmen equatorial spermatozoa yang diikuti dengan fusi dari membran spermatozoa dengan oolema dari oosit. Berpindahnya molekul-molekul tersebut mendorong terjadinya proses kapasitasi dan reaksi akrosom dan adanya perubahan kadar kalsium ion intraseluler dan ion-ion lain serta adanya transfer lipid dan fosfolipid, serta aktivasi fosfolipase, aktivasi fosforilasi protein dan aktivasi protein kinase (Baldi et al, 2000).

2.7. Fertilisasi in Vitro

Fertilisasi adalah peristiwa bersatunya inti spermatozoa dan inti ovum yang merupakan proses awal pembentukan suatu individu. Proses yang terkait langsung dengan fertilisasi meliputi: kapaitasi, reaksi akrosom spermatozoa, fusi gamet jantan dan betina, pencegahan polispermia, dan penyelesaian pembelahan meiosis II oosit (Garner dan Hafez, 2000; Florman dan Ducibella, 2006).

Faktor-faktor yang memegang peranan penting dalam keberhasilan pelaksanaan pembuahan in vitro adalah lingkungan, kematangan oosit serta motilitas spermatozoa yang digunakan pada pembuahan oosit. Motilitas spermatozoa yang progresif ini mempunyai kemampuan untuk menembus sel telur, tetapi sebelumnya harus mengalami kapaitasi dan reaksi akrosom (Kim *et al.*, 2008).

Kecepatan kapaitasi dan reaksi akrosom dari semen beku setelah dicairkan kembali sangat dipengaruhi oleh pH dan jenis media pencucian semen yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan media EBSS (*Earle Balance Salt Solution*) yang ditambah 1% piruvat sebagai media pencucian dan kapaitasi. Pemakaian media ini didasarkan pada penelitian terdahulu untuk seleksi motilitas spermatozoa dari migrasi permukaan (*swim-up*) dan migrasi ke samping (*rosset*) untuk persiapan *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) pada pasangan individu infertil manusia. Media EBSS selain banyak mengandung mineral kalsium, potassium, magnesium dan sodium klorid juga mengandung glukosa, BSA dan piruvat 1% sebagai bahan nutrisi spermatozoa selama kapaitasi dan pembuahan *in vitro* (Hinting, 1989).

BAB. 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dapat meningkatkan kualitas embrio hasil fertilisasi in vitro, yang selanjutnya bisa meningkatkan populasi ternak kambing sehingga penyediaan pangan asal hewan terpenuhi.

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui penambahan L-Arginin dalam media kapasitas terhadap peningkatan persentase kapasitas, reaksi akrosom dan fertilisasi in vitro spermatozoa kambing.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah mengenai penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dalam meningkatkan angka fertilisasi in vitro kambing. Peningkatan proses fertilisasi in vitro dalam media fertilisasinya perlu ditambahkan L-Arginin, supaya kualitas embrio yang dihasilkan baik sehingga populasi ternak kambing dapat meningkat, selanjutnya penyediaan pangan asal hewan terpenuhi.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB.4. METODE PENELITIAN



4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini meliputi aplikasi L-Arginin dalam media fertilisasi spermatozoa kambing. Selanjutnya diperiksa kapasitas, reaksi akrosom sampai fertilisasi. Penampungan semen dilakukan pada kambing yang dipelihara di kandang hewan di FKH Unair. Pemeriksaan kualitas spermatozoa dilakukan di Laboratorium Inseminasi Buatan FKH Unair. Aplikasi penambahan L-Arginin dalam media kapasitas dan fertilisasi in vitro dilaboratorium in vitro FKH Unair.

4.2. Variabel penelitian :

1. Variabel bebas : macam media kapasitas (HEPES) dan dosis L-Arginin
2. Variabel tergantung : kapasitas, reaksi akrosom dan fertilisasi
3. Variabel kendali : umur kambing, pakan dan pemeliharaan

4.3. Definisi operasional penelitian :

1. Kapasitas spermatozoa : perubahan membran spermatozoa melibatkan perubahan metabolisme dan influk ion Ca^{2+} dan mempersiapkan terjadinya reaksi akrosom. Spermatozoa yang terkapasitas ditandai dengan bagian akrosom berfluoresen.
2. Reaksi Akrosom : Perubahan yang melibatkan fusi antara membran plasma dan membran akrosom luar spermatozoa dan pelepasan enzim hyaluronidase dan akrosin sehingga membran spermatozoa menjadi tidak stabil dan tidak ada Ca^{2+}
3. Fertilisasi in vitro : pertemuan ovum dan spermatozoa dalam media fertilisasi secara in vitro

4.4. Tahapan Penelitian

1. Penampungan Semen

Semen ditampung dari kambing jantan dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan disiapkan dengan memasang kedua selubung dan alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air hangat yang bersuhu 45°C dengan tujuan memberi suhu terhadap selubung dalam sebesar 42-43°C dan sepertiga bagian depan selubung dalam vagina buatan diolesi vaselin. Setelah vagina buatan selesai dipersiapkan, pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium untuk diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi dan resistensi test.

2. Aplikasi L-Arginin pada Media kapasitas Spermatzoa

Semen kambing yang berkualitas baik, sebanyak 0,5 ml ditambah medium HEPES sebanyak 1 ml dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Dihitung 3×10^6 spermatozoa untuk diberi perlakuan. Spermatozoa hasil sentrifugasi masing-masing dibagi 3 yaitu tabung I diisi dengan spermatozoa dan medium HEPES, tabung II diisi dengan spermatozoa, medium HEPES dan L-Arginin 0,004 M/ ml HEPES. Tabung III diisi dengan spermatozoa dan L-Arginin 0,006 M ml/ml HEPES. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 15 menit dan dilakukan pengamatan pendewasaan atau kapasitas dengan pewarnaan Chlor Tetracyclin (CTC). Preparat diperiksa dengan mikroskop fluoresen dengan perbesaran 1000x. Gambaran yang tampak adalah: kepala spermatozoa seluruhnya berfluoresen adalah spermatozoa yang tidak mengalami kapasitas. Kepala spermatozoa separuh bagian atas berfluoresen adalah spermatozoa yang mengalami pendewasaan atau kapasitas.

3. Koleksi oosit dan pematangan oosit In Vitro

Oosit diambil dengan cara aspirasi, cairan folikel ovarium yang ukuran diameternya 3-5 mm, menggunakan alat suntik yang steril dan jarum suntik ukuran 18 Gauge. Cairan folikel kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi secara hati-hati supaya sel-sel kumulus tidak rusak dan disimpan dalam penangas air dengan suhu 37°C, ditunggu 10 menit sampai oosit mengendap. Kemudian cairan bagian bawah dievaluasi dengan menempatkan pada cawan petri dibawah mikroskop sterio dengan perbesaran 100 x. Hanya oosit yang mempunyai kumulus lengkap saja yang digunakan, kemudian dicuci sebanyak dua kali dengan larutan OWS dan satu kali dengan media pematangan.

Pematangan digunakan media Tissue culture yang terdiri dari TCM 199 yang ditambahkan dengan 1% Foetal Calf Serum (FCS), 100µg pyruvat, 25µg gentamisin dan ditambahkan serum sapi berahi 10%. Oosit dimatangkan pada media dalam bentuk tetes (50µl/tetes) Kemudian tetes tersebut ditutup dengan minyak parafin dan diequilibrasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5° C dengan kelembaban 95% paling sedikit 2 jam sebelum digunakan untuk pematangan oosit. Setelah pencucian dengan media pematangan, 5-10 oosit yang berkumulus lengkap ditempatkan dalam tetes fertilisasi media pematangan kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% yang sama untuk equilibrasi

$$\text{Persentase pembelahan} = \frac{\text{Jumlah embrio yang membelah}}{\text{Jumlah oosit yang dipakai fertilisasi}} \times 100\%$$

4.5. Rancangan Dan Analisis Statistik

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dan analisis data dilakukan dengan Uji Anava, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan Duncan Test (Santoso dan Fandy, 2001).

BAB 5. HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

5.1. Hasil yang dicapai

Semen kambing yang digunakan untuk penelitian

Semen kambing yang akan digunakan untuk penelitian harus memenuhi syarat yaitu motilitas progresif dan daya tahan hidupnya $\geq 70\%$. Pemeriksaan makroskopis (volume, warna, pH, konsistensi dan bau) dan secara mikroskopis (gerakan massa spermatozoa, gerakan individu progresif dan daya tahan hidup spermatozoa) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik semen segar kambing

Parameter	Rataan \pm SD
Volume (ml)	1,3 \pm 0,05
Konsistensi	kental
Warna	Putih kekuningan
Bau	khas
pH	6,5
Motilitas massa spz	+++
Motilitas individu progresif spz (%)	91,00 \pm 0,10
Daya tahan hidup/viabilitas spz (%)	93,35 \pm 0,30
Konsentrasi (juta/ml).	3930 \pm 105,50

Hasil pemeriksaan semen kambing adalah volumenya 1,30 \pm 0,05 ml, konsistensinya kental, warnanya normal (putih kekuningan), bau nya khas (tidak menyimpang), pH 6,5 (normal), motilitas massa +++, motilitas individu progressif sebesar 91 \pm 0,10 %, daya tahan hidup nya 93,35 \pm 0,30 % serta konsentrasinya 3930 \pm 105,50 juta /ml. Pada umumnya volume semen akan bertambah banyak sesuai dengan umur, besar tubuh, perubahan keadaan, kesehatan organ reproduksi dan frekuensi penampungan semen. Warna, konsistensi dan konsentrasi spermatozoa mempunyai hubungan erat satu sama lain. Semakin encer suatu semen maka konsentrasi spermatozoa akan rendah dan warna semen semakin pucat.

Sedangkan konsistensi semen tergantung pada perbandingan spermatozoa dan plasma semen (Evans and Maxwell, 1987). Derajat keasaman pH sangat mempengaruhi daya hidup spermatozoa. Bila pH tinggi atau rendah akan menyebabkan spermatozoa tersebut mati, Derajat keasaman semen kemungkinan dipengaruhi oleh konsentrasi asam laktat yang dihasilkan dalam proses akhir metabolisme. Menurut Toelihere 1985, metabolisme spermatozoa dalam keadaan anerobik akan menghasilkan asam laktat yang tertimbun dan meningkatkan atau menurunkan pH semen. Dapat disimpulkan bahwa kualitas semen segar kambing tersebut memenuhi syarat untuk dilakukan kapasitasasi..

Kualitas semen kambing dengan penambahan L-Arginin dalam media kapasitasasi

Motilitas individu, viabilitas, membran plasma utuh, kapasitasasi, reaksi akrosom spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan terhadap kapasitasasi, dan reaksi akrosom spermatozoa dengan menggunakan mikroskop flourecen pembesaran 1000 kali dan dinyatakan dalam persen dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel.2. Rata-rata \pm SD dan uji F terhadap kualitas spermatozoa kambing dalam media kapasitasasi

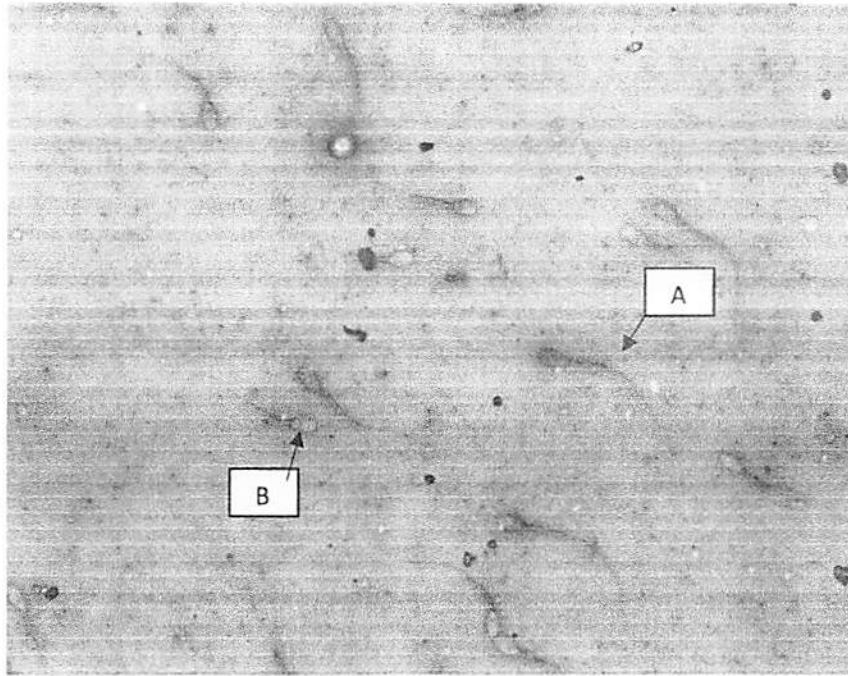
Parameter	P0 (Kontrol) Tanpa L-Arginin	P1 (0,004 M L-Arginin)	P2 (0,006 M L Arginin)
Motilitas progresif spz (%)	32,05 ^b \pm 0,50	35,10 ^b \pm 0,05	49,25 ^a \pm 0,75
Daya tahan hidup spz (%)	33,15 ^b \pm 0,55	36,50 ^b \pm 0,25	50,50 ^a \pm 0,30
Membran plasma utuh (%)	31,25 ^b \pm 0,10	34,05 ^b \pm 0,40	47,10 ^a \pm 0,20
Kapasitasi(%)	20,10 ^b \pm 0,30	23,25 ^b \pm 0,30	28,25 ^a \pm 0,20
Reaksi akrosom spz (%)	2,15 ^a \pm 0,70	5,15 ^b \pm 0,45	7,25 ^b \pm 0,20

Notasi huruf yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan : P0 : Tanpa penambahan L-Arginin dalam media kapasitasasi

P1 : Penambahan L-Arginin 0,004 M/ml dalam media kapasitasasi

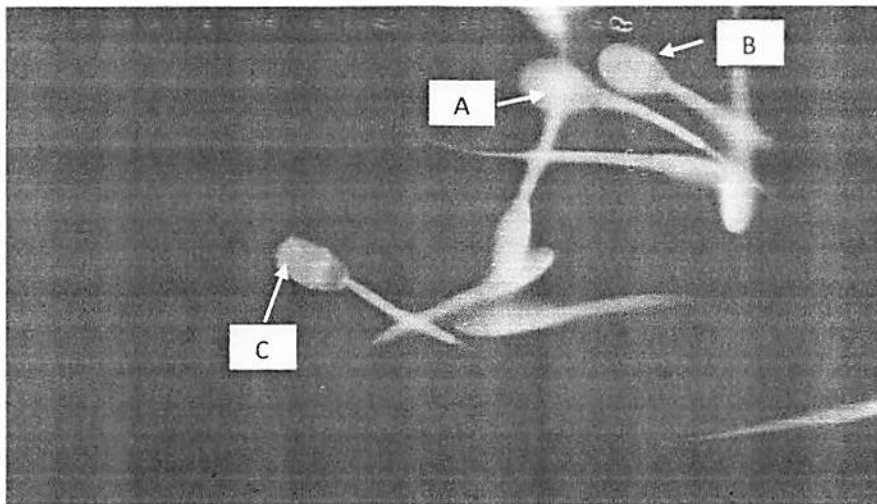
P2 : Penambahan L-Arginin 0,006 M/ml dalam media kapasitasasi



Gambar 1. Spermatozoa yang Mengalami Hidup dan Mati

Keterangan gambar :

- A. Spermatozoa yang mati (kepala spermatozoa berwarna merah keunguan)
- B. Spermatozoa yang hidup (kepala berwarna transparan).



Gambar 2. Spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom

Keterangan gambar :

- A. Spermatozoa yang tidak mengalami kapasitasi (semua permukaan kepala spermatozoa berfluoresen)
- B. Spermatozoa yang mengalami kapasitasi (bagian akrosom spermatozoa berfluoresen)
- C. Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom (bagian segmen equatorial berfluoresen)

Tabel.3. Rata-rata \pm SD dan uji F terhadap fertilisasi spermatozoa kambing dalam media kapasitasasi

Perlakuan	Fertilisasi (%)
P0 (Kontrol)	40,65 ^b \pm 0,05
P1 (0,004 M L-Arginin)	59,05 ^a \pm 0,25
P2 (0,006 M L-Arginin)	62,45 ^a \pm 0,35

Notasi huruf yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

Keterangan : P0 : Tanpa penambahan L-Arginin dalam media kapasitasasi

P1 : Penambahan L-Arginin 0,004 M/ml dalam media kapasitasasi

P2 : Penambahan L-Arginin 0,006 M/ml dalam media kapasitasasi

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa kualitas spermatozoa kambing dengan penambahan L-Arginin dengan dosis 0,006 M/ ml dalam media kapasitasasi menunjukkan persentase motilitas, daya tahan hidup, membran plasma utuh, kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa yang paling tinggi. Demikian juga pada tabel 3 dapat dilihat bahwa persentase fertilisasi yang paling tinggi adalah dengan penambahan dosis 0,006 M/ml. Uji Anava terhadap motilitas progresif, daya tahan hidup (viabilitas), membran plasma utuh, kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa serta fertilisasi in vitro terdapat perbedaan yang nyata $p < 0,05$ antara P0, P1 dan P2. Uji jarak berganda Duncan pengamatan pada perlakuan II menghasilkan persentase motilitas, daya tahan hidup, membran plasma utuh, kapasitasasi dan reaksi akrosomnya spermatozoa yang paling tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, kapasitasasi, reaksi akrosom dan fertilisasi spermatozoa tertinggi pada media HEPES+ 0,006M/ml. Hal ini karena pengaruh dari L-Arginin yang bertindak sebagai antioksidan yang melindungi spermatozoa dari radikal bebas dan terjadinya peroksidasi lipid bisa dicegah sehingga membran plasma spermatozoa tetap utuh. Selain itu dikarenakan dosis L-Arginin yang diberikan dalam media kapasitasasi tersebut mengimbangi terjadinya peroksidasi lipid atau radikal bebas, sehingga membran sel masih stabil dan berfungsi.

Kelompok kontrol atau tanpa penambahan L-Arginin, banyak spermatozoa struktur membran plasmanya kurang stabil sehingga banyak spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom dini, karena sebelum dilakukan fertilisasi *in vitro* spermatozoa harus dilakukan pencucian dengan EBSS, kemudian dilanjutkan inkubasi dalam inkubator CO₂ selama 30 menit, hal-hal tersebut bisa mempengaruhi fungsi spermatozoa untuk membuahi oosit, karena fungsi membran akrosom tidak mampu lagi menghasilkan enzim-enzim yang dapat menembus zona pelusida dan membran vitelin akibatnya pembuahan tidak terjadi. Sebagaimana yang telah diketahui, proses pembuahan melibatkan sel kelamin jantan (spermatozoa) dan sel kelamin betina (oosit). Baik oosit maupun spermatozoa harus mengalami pematangan (*maturation*) sebelum mampu melakukan pembuahan. Khusus pada spermatozoa, selain mengalami proses pematangan, spermatozoa tersebut juga harus mengalami proses kapasitasi dan reaksi akrosom yang membuatnya mampu membuahi oosit yang sudah matang (Liu *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2008).

L-Arginin adalah asam amino yang dapat merangsang motilitas spermatozoa mamalia dalam kondisi *in vitro* dan berperan penting dalam pertahanan imunitas seluler (Srivastava *et al.*, 2006). L-Arginin melindungi spermatozoa terhadap peroksidasi lipid melalui peningkatan produksi nitrat oksida dan menonaktifkan radikal bebas. Nitrat oksida telah terbukti menjadi antioksidan dan bermanfaat terhadap species oksigen reaktif (ROS) seperti hidrogen peroksida (H₂O₂) dan anion superoksida (O²) (Al-Ebady *et al.*, 2012). L-Arginin merupakan antioksidan sekunder yang bekerja dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkap radikal bebas. L-Arginin juga dapat meningkatkan glikolisis spermatozoa. Proses glikolisis dapat menghasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP), yang dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan sehingga dapat tetap motil dan mempertahankan daya hidupnya.

L-Arginin memainkan peran penting dalam fisiologis spermatozoa kambing, meningkatkan metabolisme sel (Patel *et al.* 1998) dan juga memiliki efek perlindungan terhadap peroksidasi lipid (Srivastava *et al.* 2000). Pada dosis tinggi L-Arginin pada pasien oligospermia dapat memperbaiki konsentrasi dan motilitas spermatozoa tanpa efek samping (Scibona *et al.*, 1994). L-Arginin dapat menekan produksi ROS dengan jalan meningkatkan NO (Nitrat Oksida), hal ini dapat menyebabkan reaksi kapasitasi. Menurut penelitian Al-Ebady *et al* (2012) menyatakan bahwa penambahan 0,005 M/ml L-Arginin pada semen sapi perah yang mengandung spermatozoa motil yang rendah dapat meningkatkan motilitas spermatozoa serta menurunkan kematian, kelainan dan cacat pada akrosom spermatozoa. Penelitian Al-Badry (2014) juga menunjukkan bahwa penambahan Arginin pada semen sapi perah post thawing dapat memberikan persentase kematian dan kelainan spermatozoa yang lebih rendah.

5.2. Luaran Penelitian

1. Keberhasilan L-Arginin sebagai medium kapasitasi untuk spermatozoa kambing
2. Publish artikel ilmiah pada jurnal international (Chem Tech Researche, 2018).
3. Draft Artikel ilmiah rencana akan disubmitkan pada jurnal Iranian Journal of Applied Animal Science (draft)

BAB. 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan Penelitian

1. Penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dapat meningkatkan persentase kapasitas spermatozoa kambing dengan dosis 0,006 M
2. Penambahan L-Arginin dalam media fertilisasi dapat meningkatkan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing dengan dosis 0,006 M
3. Penambahan L-Arginin dalam media kapasitas spermatozoa kambing dapat meningkatkan kejadian fertilisasi dengan dosis 0,006 M

6.2. Saran Penelitian

L-Arginin dapat ditambahkan dalam media kapasitas spermatozoa kambing dengan dosis 0,006M/ml



DAFTAR PUSTAKA

- Al-Badry, K.I. 2014. Re-Dilution Effect and Arginine Addition for Activation Poor Post-Thaw Motility of Sperms for Holstein Bulls Born in Iraq. Online International Interdisciplinary Research Journal. ISSN :2249 – 9598. 4:18-26.
- Al-Ebady, A.S., S.O. Hussain, K.I., Al-Badry and F.F. Ibrahim. 2012. Effect of Adding L-Arginine on Some Parameters of Bull Sperms After Freezing in Liquid Nitrogen (-196°C). Al-Qadisiya Journal of Vet Med Sci. 11(2):15-161.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz and G. Forti. 1996. Human Sperm Activation during Capacitation and Acrosome Reaction: Role of Calcium, protein phosphorylation and Lipid Remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience*. : 189-205.
- Bansal AK and G.S Bilapuri. 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*. Article ID 686137.
- Beatriz, B., R. Perez-Pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muino Blanco and J.A. Cebrian Perez. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology Reproduction*. 63:1531-1537.
- Crompton M, Virji S and Ward JM, 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258:729-735.
- Curry MR, PF Watson, 1995. Sperm Structure and Function in Gamete the Spermatozoa. *Cambridge Reviews in Human Reproduction*. Ed. Gruzinkas & JL Yovich, Cambridge University Press.
- Direktorat Jenderal Produksi Peternakan. 2007. Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Feitosa, W.B.; A.M. De Rocha; C.M Mendez, M.P. Milazzoto; M.D Goissis; C Delboni; J.A Visintin and M.E. OD'Avila Assumpco, 2008. Kinetics of change in plasma membrane related to apoptosis and necrosis in bovine sperm cells at different incubation times. *Braz. J. Vet Res. Anim. Sci, Sao Paulo*. 4 (5):398-404.
- Flaherty, C.O; Pablo R and Sudha Srivastava. (2004). L-Arginine Promotes Capacitation and Acrosome Reaction in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674: 215-221.
- Florman, H. M. and Ducibella, T. 2006. Fertilization in mammals. In *The Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Neill, J. D. ed. New York: Elsevier.
- Garner and Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th Edition. Philadelphia. Baltimore. New York London.

- Evans.G and M.W.C.Maxwell. 1988. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butherworths, Sydney.
- Hardijanto, Susilowai, S.Sardjito T. Hernawati T., Suprayogi TW. 2010. Buku Ajar. InseminasiBuatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hinting, A. 1989. Assesment of Human Sperm Fertilizing Ability. Thesis Submitted in Fulfillment of The Requirement for The Degree of Special Doctor in Reproductive Medicine. Rijksuniversiteit Gent. Belgium.
- Kasai, M. 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. *Animal Reproduction Sciences*. 42(1): 67-75.
- Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S., and Baba, T. 2008. Sperm Penetration Through Cumulus Mass and Zona Pellucida. *International Journal of Developmental Biology*. 52: 677-682.
- Kleinsmith, L.J. 2006. Principle of Cancer Biology. Pearson Education Inc.
- Lessard, C.,S. Parent, P. LEclerc, J.L. bailey and R. Sullivan, 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Andrology*.21:700-707.
- Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNasewhn released from mitokondria. *Nature* 6842: 95-99.
- Liu de Y., C. Garrett and H.W. Baker. 2004. Clinical Application of Sperm-Oocyte Interaction Tests in In Vitro Fertilization – Embryo Transfer and Intracytoplasmic Sperm Injection Programs. *Fertility and Sterility*. 82: 1251-1263.
- McGavin MD and Zachary JF (Eds), 2007. Pathologic basis of veterinary disease.4 thed Mosby Elsevier. Philadelphia.PA
- Muino-Blanco, T.; R. Perez –Pe and J.A. Cebrian Perez. 2008. Seminal Plasma Protein and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animal*, 43:18-31.
- Peterson QP, Goode DR, West DC, Botham RC and Hergenrother PJ. 2010. Preparation of the caspase -3/7 substrate AC-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* 5 : 294-302. Published online 28 January 2010.
- Santoso,S dan Fandy, T, 2001. Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia . Jakarta.
- Salisbury, G.W and N.L VanDemark, 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Srivastava,S., Prashant D., Evans C., Girjesh G. 2006. Mechanism of Action of L-Arginin onThe Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Byosynthesis of Nitric Oxide. *Biology of Reproduction* 74: 954-958.

Susilowati,S. Potensi Biologis Insulin Like Growth Factor-I Complex Plasma Seminalis Kambing Hasil Sentrifugasi. Disertasi. Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Susilowati, S dan Hernawati .T. 2013. Protein Plasma Seminalis Dan Pembekuan Semen Kambing .Hand Out. Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

The Addition of L-Arginine in Capacitation Media to Motility, Viability, and Spermatozoa Capacity of Goats

Tri Wahyu Suprayogi¹, Rimayanti¹, Tatik Hernawati¹, Suharsono²,
Suherni Susilowati^{1*}

¹Department of Veterinary Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

²Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

Abstract : The purpose of this study is improving the provision of animal origin food of in vitro fertilization technology. Specific targets to be achieved in this study is to increase the incidence of capacitation spermatozoan and success in in vitro fertilization process . This research utilized four treatment groups, namely controlled group (P0) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium , group (P1) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium by 0,002 M / ml ,group (P2) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium by 0,004 M / ml. and group (P3) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium by 0,006 M / ml Further evaluations included motility, viability, capacitation reaction of spermatozoa. Data obtained in the form of percentage of motility, viability and capacitation reaction is analyzed by F Test. The conclusion of this study, group (P3) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium by 0,006 M / ml increase of motility, viability and capacitation reaction.

Keywords : L-Arginine, capacitation medium, motility, viability and capacitation reaction.

1. Introduction

Various technologies have been created and have been used to improve the efficiency of livestock reproduction. Artificial Insemination is the initial use of Reproductive Biotechnology in male animals and then followed by research on in vitro manipulation of spermatozoa. How to manipulate spermatozoa in vitro include the method of centrifugation. In the process of in vitro fertilization requires the presence of a mature ovum and spermatozoa who have experienced maturity or capacitation. The maturation process of spermatozoa in invitro can be achieved by adding the appropriate medium⁸.

The adverse effects of seminal plasma splitting with centrifugation techniques are the increased formation of Reactive Oxygen Species (ROS) by spermatozoa¹¹. The increased accumulation of ROS production in centrifuged spermatozoa is thought to be a complex process and can be derived from various chemical processes, organelles or cells even from outside the cell². If the production of ROS is excessive and

International Journal of ChemTech Research, 2018,11(03): 13-18

DOI : <http://dx.doi.org/10.20902/IJCTR.2018.110303>

unable to be neutralized by the antioxidant defense system present in the spermatozoa or seminal plasma can cause damage poly unsaturated fatty acid which is an important component of the phospholipid membrane membrane spermatozoa cells, the inactivation of glycolytic enzymes, motility and spermatozoa³. According to¹, L-Arginine is an amino acid that plays an important role in stimulating the motility of spermatozoa in mammals under in vitro conditions. L-Arginine also acts as an antioxidant that produces nitric oxide from enzyme synthesis reactions thus reducing peroxidation of lipid membrane spermatozoa that occurs due to free radicals when spermatozoa interact directly with oxygen. Nitric oxide is a biological molecule that plays an important role in physiological spermatozoa such as spermatozoa motility, spermatozoa-ovum interaction and spermatogenesis. Nitric oxide also plays a role in the defense mechanism of spermatozoa against the formation of reactive oxygen under the freezing point in liquid nitrogen at -196°C, which maintains sperm motility and post thawing viability.

According to⁶, L-Arginine is a substrate that produces nitric oxide with an intermediate enzyme nitrate oxide synthase. The enzyme is in the acrosome section and the spermatozoa tail. L-Arginine stimulates capacitation and spermatozoa acrosome reaction¹¹. At low concentration, NO improve sperm motility. Beside promoting sperm motility, NO is also know to enhance capacitation and acrosom reaction in mouse and human spermatozoa^{11;13}. However, higher concentrations of L-Arginin can have adverse effect on motility and fertility of human¹⁴ and rat²³. Research on L-Arginine has been done, but research on the addition of L-Arginine in goat spermatozoa media has not been studied.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental animal

Semen is collected from three male goats by using an artificial vagina. The average body weight was 45 kg and average age was 3-4 years. An artificial vagina is prepared by placing both shrouded and sterilized containers, while the space between the outer and inner sheath is filled with warm water at 45 ° C in order to give the temperature to the inner sheath of 42-43 ° C and the front third of the envelope in the vaginal artificial Vaseline smeared . After the artificial vagina is prepared, the male is given a stimulus with the angler females then carried out semen storage. Immediately after the shelter, the semen was taken by a laboratory to be separated from the spermatozoa and the plastics were used to be added to the goat semen diluent. The goat semen is accommodated with an artificial vagina and examined macroscopically and microscopically. Macroscopic examination includes volume, color, odor, consistency and pH and microscopic examination including mass movement, individual movement, viability, concentration and test resistance.

2.2. L-Arginine application on spermatozoa capacitation media

Good quality semen (percentages of spermatozoa motility and viability should be 70% or above), as much as 0.5 ml plus HEPES medium 1 ml and centrifugation at 1800 rpm for 10 minutes. Calculated 3×10^6 spermatozoa for treatment. Spermatozoa of each centrifugation divided by 4 groups. Tube I filled with spermatozoa and HEPES medium, tube II filled with spermatozoa + HEPES medium + L-Arginin 0.002 M / ml HEPES. Tubes III filled with spermatozoa + HEPES medium + L-Arginin 0.004 M / ml HEPES. Tubes IV filled with spermatozoa + HEPES medium + L-Arginin 0.006 M / ml HEPES. Then incubated for 15 minutes at room temperature and evaluated for motility, viability and capacitation.

2.3. Assesment of motility

The motility of spermatozoa was analyzed by mixing the semen gently and placing a 10µl drop of diluted semen on warm slide covered with a glass cover slip (18 x 18 mm) from five selected representative fields. One hundred spermatozoa were evaluated in at least five different fields in each smear under a light microscope. Individual sperm were recorded as being motil or non motil²¹.

2.4. Sperm viability

Eosin – negrosin staining was used to evaluate sperm viability as described by²¹. One drops of semen was placed on a tempered glass slide and this samples was mixex with one drop of eosin negrosin solution. The mixture was smeared on the glass slide and allowed to air dry. One hundred spermatozoa were evaluated in at

least five different fields in each smear under a light microscope. Eosin penetrates non viable, non stained cells

2.5. Assesment of sperm capacitation with Tetracycline Chlorine Staining

Examination of sperm capacitation with ChlorTetracyclin (CTC) staining. Preparations are examined under a fluorescent microscope with a magnification of 400x. The visible picture is: the whole head of the spermatozoa is fluorescent, the spermatozoa are non-capacitated. The upper half spermatozoa head fluorescent is a spermatozoa that undergoes capacitation.

2.6. Design and Statistical Analysis

The research design used is complete randomized design and data analysis done with Anova Test, if there is difference followed by Duncan Test ¹⁷.

3. Result

3.1. Collection of Goat semen for Treatment

This research requires fresh semen of goats that are first examined in macroscopic and microscopic. The macroscopic examination includes: volume, color, odor, consistency and degree of acidity or pH. Microscopic examination includes mass movement, individual movement, concentration and survival (viability) of spermatozoa. The results of the macroscopic and microscopic examination of goat's semen (Table 1).

Table 1. Macroscopic and microscopic examination of fresh goat semen

Indicator	Character
Colour	White-yellowish
Smell	Typical
Consistency	Thick
pH	7,00
Volume (ml)	2,5±0,35
Concentration (juta) spz/mm ³	3985x10 ⁶
Mass Motility	+++
Individual Motility (%)	Progressive (87±3,50)
Viability (%)	93±2,45
Whole Plasma Membrane (%)	85±1,55

The results showed that the goat semen that was accommodated was yellowish white, typical smell, thick consistency, pH ± 7, volume 2.5 ± 0.35 ml, concentration 3985 ± 106, mass motility +++ (movement of large and large waves), individual motility progressive move 87 ± 3.50%, viability 93 ± 2.45 and intact plasma membrane 85 ± 1.55%. In general, the volume of semen will increase according to age, body size, changes in state, reproductive health and frequency of semen shelter. The color, consistency and concentration of spermatozoa are closely related to each other. The more dilute a semen the concentration of spermatozoa will be lower and the color of the semen is getting pale. While the consistency of semen depends on the ratio of spermatozoa and plasma semen ⁴. The degree of acidity (pH) greatly affects the life-force of spermatozoa. When a high or low pH will cause the spermatozoa die. The degree of acidity of semen is influenced by the concentration of lactic acid produced in the metabolic process. According⁸, spermatozoa metabolism in anaerobic state will produce lactic acid buried and increase or decrease the pH of semen.

3.2 Examination of motility, viability and capacitation of goat sperm in HEPES + L-Arginine media

Individual motility was observed using a 400 times magnification light microscope. Observations were made on the number of progressive motile spermatozoa and spermatozoa velocity from one field of view and expressed in percent can be seen in table 2.

Observation of spermatozoa viability was done using a light microscope with 400 times magnification. The percentage of viability of spermatozoa can be seen in table 2. The live spermatozoa are characterized by clear or transparent colored spermatozoa heads while the dead spermatozoa are characterized by pink spermatozoa heads.

The observed capacities and acrosome reactions were performed by Chlortetracyclin (CTC) staining and were observed with a magnification fluorescence microscope 400 times. The visible picture is: the whole head of the spermatozoa is fluorescent, the spermatozoa are not capacitated. The upper half-fluorescent spermatozoa head is a spermatozoa that has matured or capacitated. Observations were made from one field of view and expressed in percentages can be seen in table 2.

Table 2. Percentage of motility, viability and capacitation of goat spermatozoa in HEPES-added L-Arginine media.

Parameter	HEPES	HEPES + 0,002 M/mL L-Arginin	HEPES + 0,004 M/mL L-Arginin	HEPES + 0,006 M/mL L-Arginin
Motility P (%)	50,10±2,55 ^a	35,05±2,25 ^b	56,75±1,50 ^a	68,35±3,05 ^c
Viability (%)	58,35±2,30 ^a	44,55±1,05 ^b	65,75±2,50 ^a	72,25±1,75 ^c
Capacitation (%)	54,45±0,75 ^a	37,45±2,25 ^b	60,45±0,80 ^a	82,55±0,85 ^c

Different letter notations on the same line are significantly different ($p < 0.05$)

In Table 2 it can be seen that the addition of L-Arginine in the capacitation medium (HEPES) yields a distinct pattern of difference in progressive motility, viability and spermatozoa capacitance. Motility, viability and spermatozoa capacitation in HEPES + medium 0.002 M / mL L-Arginine showed the lowest percentage. Between medium HEPES and HEPES + 0,004 M / ml L-Arginine there was no difference, meanwhile the highest on medium HEPES + 0,006 M / ml L-Arginin. Uji Multivariant to motility, viability and spermatozoa capacitation there was significant difference $p < 0,05$ between the treatments.

4. Discussion

The movement of spermatozoa can occur because of the energy (ATP) that is product by mitochondria and the existence motor dynein (Cytoskeleton) for flagela or tail of sperm. The movement organized by Ca^{2+} (Cyclic Adenosin Mono Phosphat)²². Absolute spermatozoa survival require the integrity of the membrane. During the centrifugation process in addition to the antioxidant present in the seminal plasma disappear there is also membrane molecular materials resulting in membrane destabilization thereby decreasing the physiological function of the membrane under normal condition, living cells need a source of energy formed from ATP through oxidative fosforylation requiring oxygen in process of reduction of oxygen in the transfer 4 electron. Inextain situation this transfer of 4 electron is running less than perfect, so that the reactive oxygen compound is very dangerous and damage the cells if not muted. The reaction oxygen compound is power full oxidant than can damage cell components that are essential to maintain cell integrity in live²⁰.

Capacitation showed a correlation with change in fluidity of plasma membrane spermatozoa, intracellular ion concentration, metabolism and motility²². Molecularly during capacitation there are modifications of calcium intracellular ions and other ions, changes in lipid and phospholipid membrane spermatozoa, changes in protein phosphorylaion and activity of protein kinase. Capacitation is the re-arrangement of biochemical membrane spermatozoa where as capacitance increases in intracellular Ca^{2+} level¹⁵. The increasing of Ca^{2+} activity activates spermatozoa (hyperactivation).

The results showed that the highest percentage of motility, viability and capacitance of spermatozoa in HEPES + 0,006M / ml L-Arginine. The statement is appropriate with the research⁶, which writing L-Arginine can acts as an antioxidant that protects spermatozoa from free radicals and lipid peroxidation so that the spermatozoa plasma membrane remains intact. In addition, because the dose of L-Arginine given in the medium of capacitance is to balance the occurrence of lipid peroxidation or free radicals.

L-Arginine is an amino acid that can stimulate the motility of mammalian spermatozoa under in vitro conditions and play an important role in the defense of cellular immunity¹⁹. L -Arginin protects spermatozoa against lipid peroxidation by increasing the production of nitric oxide and deactivating free radicals. Nitric

oxide has been shown to be an antioxidant and beneficial to reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻). The mechanism of L-Arginine action is through the production of NO in the presence of NOS, and it was confirmed by the inhibition of the enzyme action as well as by scavenging the NO free radical. A similar role of NO has been demonstrated in human spermatozoa where this ROS has been shown to trigger tyrosine phosphorylation and double serine/threonine phosphorylation (Herrero *et al*, 2000) both events being closely related with capacitation¹⁰. Moreover, ⁹and ⁷mentioned that the arginine acts as an antioxidant which protects spermatozoa against lipid peroxidation during storage through increasing nitric oxide production which reduces lipid peroxidation by activating free radicals. L-Arginine is a secondary antioxidant that works by chopping off a chain-oxidation reaction from free radicals or by capturing free radicals. L-Arginine can also increase spermatozoa glycolysis. The process of glycolysis can produce energy in the form of adenosine triphosphate (ATP), which is used by spermatozoa as a source of energy in the process of movement so that it can remain motile and maintain its life force. Furthermore, ⁵reported that the nitric oxide have a major role in stimulation of lactic dehydrogenase which was a key for metabolic process in sperm motility that may be presumably given as the sperm direct effects responses individual motility.

The conclusion of this study, group (PIII) is the addition of L-Arginine in spermatozoa (HEPES) capacitation medium by 0,006 M / ml increase of motility, viability and capacitation reaction.

Acknowledgement

This research was supported by funding from the Research and Technology, and Directorate General of Higher Education Ministry (RISTEK-DIKTI) (2017). The authors are also grateful to all of the laboratory staff in the Department of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University.

References

1. Al-Ebady, AS., SO. Hussain, KI., Al-Badry and FF. Ibrahim. 2012. Effect of Adding L-Arginine on Some Parameters of Bull Sperms After Freezing in Liquid Nitrogen (-196°C). *Al-Qadisiya Journal of Vet Med Sci.* 11(2):15-161.
2. Agaerwal, R; R.A Saleh and M.A Bedalwy, 2003. Role of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Human Sperm Function. *Biology Reprod.* 40: 183-197.
3. 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.
4. Evans, G and M.W.C. Maxwell, 1988. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat.* Butherworths, Sydney.
5. Clancy RM; Levatovsky D; Leszczynska-Piziak J. Yegudin J, Abramson SB, 1994. Nitric Oxide Reacts with Intracellular Glutathione and Activates the Hexose Monophosphate Shunt in Human Neutrophils, Evidence for S-nitroso Glutathione as a Bioactive Intermediary. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3680-3684.
6. Flaherty, C.O; Pablo R and SudhaSrivastava.(2004). L-Arginine Promotes Capacitation and Acrosome Reaction in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1674: 215-221.
7. Govil G; Phadke RS, Srivastava S, 1992. Physical/chemical studies of vitamin E in membranes. In Ong ASH, Packer L (eds). *Lipid Soluble Antioxidant. Biochemistry and Clinical Applications.* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. pp.27-46.
8. Hardjopranjoto, 2006. *Perkembangan Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak. Pidato Ilmiah. Pada Acara Temu Ilmiah Sehari Dalam Rangka Purnabakti Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto MSc, Drh. Dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.*
9. Hogg N, Kalyanaraman B, 1999. Nitric Oxide and Lipid Peroxide Ion. *Biochem. Biophys. Acta* 1411 : 378-384.
10. Thindathil, J; E. de Lamirande, C Gagnon 2003. Nitric Oxide Regulates the phosphorylation of The Threonine-Glutamine-Tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol. Reprod.* 68:1291-1298.
11. Herrero, M.B; S, Chaterjou, Letfieve, E. de Lamirande, C. Gagnon, 2000. Nitric Oxide Interacts with The cAMP pathway to Modulate capacitation of Human Spermatozoa. *Free Radic. Biol. Mol.* 29:522-536.

12. Laughlin, Mac; E. A and W.C.L Ford, 1994. Adenosin Triphosphate and Motility Characteristics of Fresh and Cryopreservation of Human Spermatozoa. *Int. J. Androl.* 17:19-23. Frequencies of Fertilization. *Theriogenology.* 23: 216.
13. Revelli, A; C. Costamagna, F. Moffa, E. Aldieri, S Ochesti, A Bosia, M Massobrio, B. Lindbiom, D. Ghigo, 2001. Signaling Pathway of Nitric -Oxide- Induces Acrosom Reaction in Human Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 64: 1708-1712.
14. Roselli, M; R.K. Dubey, B, Imthum, E, Macas, P. Keller, 1995. Effects of Nitric Oxide on Human Spermatozoa : Evidence that Nitric Oxide Decreases Sperm Motility and Induce Sperm Toxicity . *Human Reprod.* 10: 1786-1790.
15. Parrish, J.J; J.J. Susko Parish and N.L. Fisk, 1985. In Vitro Fertilization of Bovine Oocytes Using Heparin Treated and Swim Up Separated Frozen – Thawed Bovine Semen is Repeatable and Result In High
16. Palmer, R.M.J; D.S; Ashton S, Moncada (1988). Vascular Endothelial Cell Synthesize Nitric Oxide from L-Arginin. *Nature* 33:664—668.
17. Santoso, S dan Fandy, T, 2001. Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia . Jakarta.
18. Salisbury, G.W and N.L VanDemark, 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
19. Srivastava, S., Prashant D., Evans C., Girjesh G. 2006. Mechanism of Action of L-Arginin on The Vitality of Spermatozoais Primarily Through Increased Byosynthesis of Nitric Oxide. *Biology of Reproduction* 74: 954-958.
20. Suryohudoyo, P, 2000., Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan Pertama. Jakarta. CV. Sagung Seto. 31-47.
21. Susilowati, S; Hardiyanto; Tri Wahyu Suprayogi; Trilas Sardjito; Tatik Hernawati , 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Airlangga University Press.
22. Visconti, P.E; G.D. Moore; J.L. Bailey; P. Leciere; S.A. Connors; D.P.P Old – Clarke and G.S. Kopf, 1995. Capacitation of Mouse Spermatozoa Division of Reproductive Biology Departement of Obstretics and Gynecology. University of Pennylvania School of Medicine. Philadelphia. *Reprod.* 5: 234-245
23. Ratnassooriya, W.D; M.G. Dharmasiri, 2001. L-Arginin the Substrate of Nitric Oxide Synthase , Inhibits Fertility of Male Rats. *Asian Journal Androl.* 3 : 97-103.
24. Yanagimachi, R, 1994. Mammalian Fertilization. In. Knobil, E. Nell, JD (eds). *The Physiology of Reproduction.* New York. Raven Press. Ltd. 189-318.
