

LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL
DALAM RANGKA PUBLIKASI INTERNASIONAL



SUPLEMENTASI AKROSIN
SPERMA KAMBING PERANAKAN ETAWA (PE) TERHADAP
POTENSI BIOLOGIS SPERMATOZOA

Oleh :

Budi Utomo, M.Si., drh.
Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phill., drh.
Tatik Hernawati, M.Si., drh.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan surat
Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Untuk Publikasi Internasional
No : 651/SP2H/PPM/DP2M/VII/2009

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009

LAPORAN
HIBAH KOMPETTITIF PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL
DALAM RANGKA PUBLIKASI INTERNASIONAL



**SUPLEMENTASI AKROSIN
SPERMA KAMBING PERANAKAN ETAWA (PE) TERHADAP
POTENSI BIOLOGIS SPERMATOZOA**

Oleh :

Budi Utomo, M.Si., drh.

Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phill., drh.

Tatik Hernawati, M.Si., drh.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan surat
Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Untuk Publikasi Internasional
No : 651/SP2H/PPM/DP2M/VII/2009

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN
HIBAH KOMPETTITIF KERJASAMA INTERNASIONAL**

1. Judul Penelitian : Suplementasi Akrosin Sperma Kambing Peranakan Etawa Terhadap Potensi Biologis Spermatozoa
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : drh. Budi Utomo, M.Si.
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. NIP : 131 653 443
 - d. Jabatan Struktural : —
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - f. Fakultas : Kedokteran Hewan
 - g. Pusat Penelitian : LPPM Unair
 - h. Alamat : Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya
 - i. Telpon/Faks : (031) 5992785
 - j. Alamat Rumah : Pandugo Baru 12/46 Blk R-4 Surabaya
 - k. Telpon : (031) 8714076
3. Jangka Waktu Penelitian : 10 bulan
4. Pembiayaan
- a. Jumlah biaya yg dibutuhkan : Rp. 225.000.000,-
 - b. Jumlah biaya yg disediakan oleh mitra : Rp. 50.000.000,-
 - Jumlah biaya dari Dikti : Rp. 175.000.000,-

Surabaya, 30 Oktober 2009

Mengetahui

Ketua

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga


Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, drh.
NIP. 131 837 004

Ketua Peneliti



drh. Budi Utomo, M.Si.
NIP. 131 653 443

DAFTAR ISI

	Halaman
Bab 1. PENDAHULUAN	2
1.1. Latar Belakang Masalah	2
1.2. Rekam Jejak Kerjasama Penelitian.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	3
1.4. Urgensi Penelitian	5
Bab 2. STUDI PUSTAKA.....	8
2.1. Tinjauan Tentang Spermatozoa	8
2.2. Fungsi Spermatozoa	10
2.3. Tinjauan Tentang Akrosin	12
2.4. Uraian Tentang Fertilisasi	15
2.5. Kapasitas dan Reaksi Akrosom	17
Bab 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
Bab 4. METODE PENELITIAN	22
4.1. Tahap Penelitian	22
4.1.1. Tempat dan waktu Penelitian	22
4.2. Metode Penelitian	23
4.2.1. Rancangan Penelitian.....	23
4.2.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	24
4.2.3. Kerangka Operasional Penelitian.....	25
4.2.4. Tahapan Penelitian.....	26
4.2.5. Variabel Penelitian	32
4.2.6. Definisi Operasional Penelitian	32
4.2.7. Analisa Data.....	33
Bab 5. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	34
5.1. Penelitian I : Isolat Akrosin	34
5.1.1. SDS-PAGE akrosin sperma kambing PE.....	34
5.1.2. Uji Imunositokimia	34
5.2. Penelitian II : Suplementasi Akrosin	35
5.2.1. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Motilitas Spermatozoa kambing PE	39
5.2.2. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Viabilitas Spermatozoa kambing PE	42
5.2.3. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Abnormalitas Spermatozoa kambing PE	45
5.2.4. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Integritas Membran Spermatozoa.....	50
5.2.5. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Status Kapasitas Spermatozoa.....	53
5.2.6. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Reaksi Akrosom Spermatozoa.....	58
KESIMPULAN DAN SARAN	63
DAFTAR PUSTAKA	64

ACROSIN HALF-BREED ETAWA GOAT SPERM SUPPLEMENT TO BIOLOGICAL POTENCY SPERMATOZOA

by: Budi Utomo, *et al*

ABSTRACT

The development of cattle population in Indonesia has not reached in happy condition, even in east Java in the 2001 was decreasing population of some cattle, such as goat 3,24 %, cow 5,86% and buffalo 5% whereas other cattle have increased far from our hope. (Anonymous, 2007).

The obstacle which is faced in the cattle breeding field is involving reproduction field, the priority fertilization problem includes failure sperm cell to penetrate zone pellucid on egg cell due to less enzyme acrosin potency and this is the first factor which hampers class cattle reproduction.

Focus on the problem mentioned, so the short aim of this research is to get specific identify protein from acrosin that is in the acrosom goat spermatozoa and to isolate specific protein from acrosin as the bioactive material to make better cattle fertility. As for the further aim of this research is to get supplying specific protein from acrosin as the commercial way as well as to make better cattle fertility by making better its class reproduction .

This research is laboratorial experiment, it is done by biological potential test from acrosin with spermatozoa medium without acrosin and spermatozoa + acrosin. The investigation of biological potential test including: motility percent, viability, abnormality, capacity, non-capacity and acrosom reaction. The investigation is divided into 2 incubation times, they are 30 minutes and 60 minutes.

The result are: acrosin supplementation 4,5 μ gram can increase motility goat PE's spermatozoa. Acrosin supplementation 3,0 and 4,5 μ gram can increase viability, capacity and spermatozoa goat acrosom reaction PE.

The conclusion are: acrosin supplementation (addition) with dosage 4,5 μ gram can be used to increase biological goat PE potency, so it can be used as alternative (bioactive) material to make better cattle goat fertility.

Key words: Acrosin, Bioactive Material, and Biological Potency.

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Akrosin adalah enzim protease yang terdapat pada akrosomal sperma dan sangat penting untuk proses fertilisasi. *Akrosin* dikeluarkan selama reaksi akrosom, ini ditunjukkan dengan penempelan spermatozoa ke dalam zona pelusida ovum dan atau penetrasi spermatozoa ke dalam zona pelusida. Kadar yang rendah dari *akrosin* akan menyebabkan subfertilitas dan infertilitas pada ternak. Dari penelitian yang telah dilakukan terdahulu menunjukkan bahwa jumlah *akrosin* berkorelasi positif dengan angka kejadian fertilisasi in-vitro. Kadar *akrosin* yang rendah pada spermatozoa menyebabkan kegagalan penetrasi pada sel telur (Adel A. Zalata, *et al.* 2004). Aktifitas dari *akrosin* pada spermatozoa dari suatu semen dapat dilihat berdasarkan konsentrasi sperma, persentase motilitas serta karakter dan morfologi sperma.

Enzim ini (*akrosin*) merupakan *trypsin-like serine proteinase* yang didapatkan pada akrosom spermatozoa. Ia merupakan enzim proteolitik yang penting yang dapat menghidrolisa zona pelusida dari ovum dan sangat vital dalam proses fertilisasi serta berpengaruh terhadap reaksi akrosom. *Akrosin* terbentuk oleh serine proteinase dari akrosom

spermatozoa dan terlibat dalam reaksi *akrosom* dalam kapasitas spermatozoa untuk menempel dan masuk ke zona pelusida (Williams RM, JK Graham and RH Hammerstedt. 2001). Banyak bukti bahwa *akrosin* penting untuk proses fertilisasi (Goodpasture, JC; KL.Polakoski; JD. Zaneveld. 2000)

Pada semen (sperma) beku untuk keperluan kawin suntik (*inseminasi buatan*) pada sapi maupun kambing penyimpanan yang terlalu lama ataupun suhu yang kurang terkontrol, akan mempengaruhi kualitas sperma beku tersebut. Hal ini karena aktifitas dari enzim *akrosin* akan menjadi menurun. Oleh sebab itu dalam penelitian ini akan dilakukan pengukuran kadar *akrosin* pada sperma beku dengan melihat potensi biologisnya, meliputi uji motilitas sperma, viabilitas, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh, kapasitas, reaksi akrosom, maupun daya tembus terhadap zona pelusida (*ZP*).

1.2. Rekam jejak kerjasama penelitian

Penelitian ini merupakan kerjasama antara Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand dalam MoU antara dekan kedua fakultas tersebut. Pada penelitian kali ini, purifikasi, karakterisasi, sampai mendapatkan isolat murni akrosin dilakukan di Faculty of Veterinary Science Thailand, sedang kan uji potensi biologis akrosin

dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh kedua fakultas yaitu penelitian tentang Avian Influenza (Flu Burung) dan hasilnya diharapkan dapat memberikan masukan pada kedua negara, Indonesia dan Thailand dalam menanggulangi serta memberantas Flu Burung. Sedangkan penelitian tentang akrosin kambing ini nantinya diharapkan dapat untuk meningkatkan populasi ternak kambing kedua negara dan diterbitkan dalam journal ilmiah.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengidentifikasi, mengisolasi dan karakterisasi akrosin kambing peranakan etawa dan mengetahui peran akrosin terhadap *potensi biologis* spermatozoa hasil sentrifugasi.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui berat molekul (*BM*) akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa
- b. Mengisolasi fraksi protein akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa
- c. Mengetahui pengaruh suplementasi akrosin spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap kualitas (*persentase motilitas spermatozoa yang progresif, viabilitas, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh*)

- spermatozoa hasil sentrifugasi yang di inkubasi 30 menit maupun 60 menit
- d. Mengetahui pengaruh suplementasi akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap persentase *kapasitasi* dan reaksi *akrosom* spermatozoa hasil sentrifugasi yang diinkubasi selama 30 menit maupun 60 menit
- e. Mengetahui apakah terdapat perbedaan suplementasi akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap *motilitas spermatozoa yang progresif, viabilitas, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh, kapasitasi, reaksi akrosom* spermatozoa hasil sentrifugasi antara waktu inkubasi 30 menit dengan 60 menit.

1.4. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Perkembangan populasi ternak di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan, bahkan di Jawa Timur pada tahun 2001 terjadi penurunan populasi beberapa ternak yaitu kambing sebesar 3,24 %, sapi 5,86 % dan kerbau 5 % sedangkan ternak yang lain mengalami kenaikan yang masih jauh dari harapan kita (Anonimous, 2001). Kendala yang sering dihadapi pada bidang peternakan adalah menyangkut bidang reproduksi, terutama gangguan pembuahan (*fertilisasi*) yang meliputi gagalnya sel sperma untuk menembus sel telur yaitu akibat dari

berkurangnya potensi enzim *akrosin* dan ini merupakan salah satu faktor utama yang menghambat tingkat reproduktivitas ternak.

Upaya yang dilakukan agar target reproduktivitas yang tinggi dapat tercapai adalah dengan melakukan perbaikan pengelolaan reproduksi yang meliputi perbaikan kesehatan alat reproduksi jantan dan betina melalui perbaikan manajemen pakan, pengobatan dan pencegahan penyakit reproduksi menular, perangsangan dengan hormonal dan pemakaian bahan-bahan bioaktif yang mendukung perbaikan dan perkembangan organ reproduksi jantan dan betina seperti spermatozoa dan ovum.

Dalam upaya meningkatkan produktivitas ternak, pemerintah telah memilih bioteknologi untuk mencapai tujuan tersebut. Hal ini didukung dengan keluarnya **Keputusan Menteri Riset dan Teknologi/Ketua BPPT No. 542/Kp/M/VIII/1992**, yang menetapkan program unggulan bidang bioteknologi peternakan yang meliputi : (a) peningkatan mutu genetik ternak, (b) peningkatan kemampuan reproduksi dan populasi ternak dan (c) koordinasi produksi bahan biologis dan diagnosa dini penyakit ternak. Berdasarkan pertimbangan di atas dapat disimpulkan bahwa peranan faktor reproduksi sangat besar dalam upaya meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas ternak.

Beberapa faktor kendala yang menghambat perkembangan populasi ternak ruminansia terkait dengan masih rendahnya pengelolaan

reproduksi yaitu akibat gagalnya pembuahan (*fertilization failure*) dan rendahnya tingkat kebuntingan (*conception rate*) sehingga upaya untuk mencapai tingkat reproduktivitas yang tinggi sulit dicapai.

Oleh karena itu perlu upaya untuk meningkatkan reproduktivitas ternak ruminansia dengan membuat bahan-bahan bioaktif yang mampu membantu meningkatkan angka pembuahan (*fertilisasi*) pada ternak kambing yaitu enzim akrosin yang ditambahkan pada spermatozoa saat pembuahan, sehingga dapat meningkatkan perolehan jumlah anak pada ternak ruminantia (termasuk kambing).

BAB 2 STUDI PUSTAKA

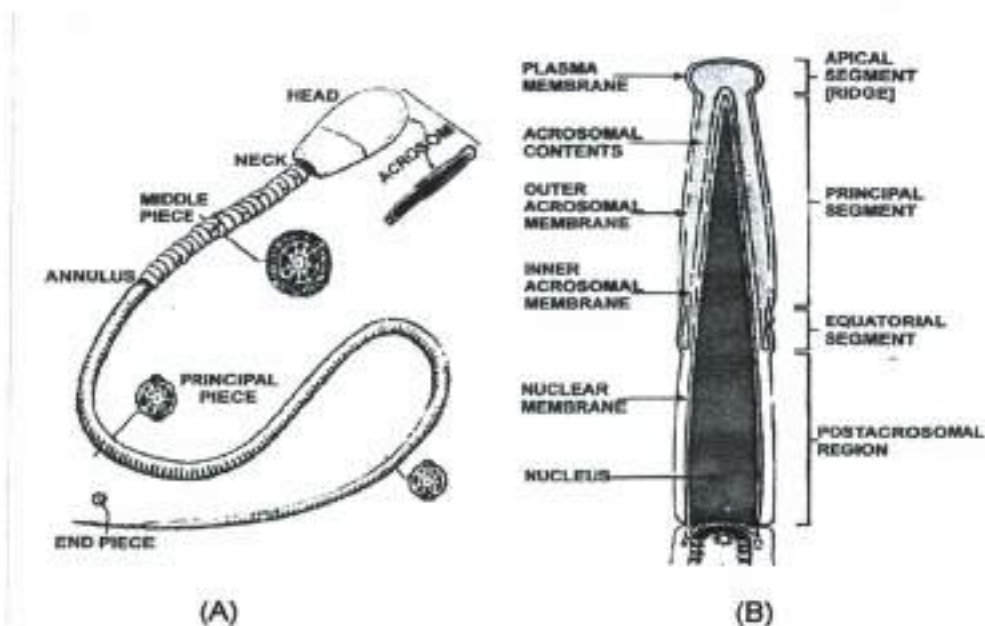
2.1. Tinjauan Tentang Spermatozoa

Spermatozoa terbentuk sebagai hasil transformasi spermatid yang haploid. Selama proses spermatogenesis, materi nukleus spermatid didapatkan membentuk kepala spermatozoa. Sedangkan sitoplasmanya direduksi dan berubah menjadi bagian tengah dan ekor. Organel sel kompleks *golgi* membentuk kap (*tudung*) di atas nukleus dan dinamakan akrosom.

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma (Polakoski dan Zeneveld, 1996). Bila terjadi reaksi akrosom membran plasma lepas dan hilang dari permukaan anterior kromosom. Kejadian tersebut diikuti dengan pelepasan enzim di akrosom sedikit demi sedikit (Garner and Hafez, 2000).

Akrosom mempunyai peranan yang sangat penting, karena mengandung enzim yang esensial untuk proses fertilisasi. Enzim-enzim tersebut antara lain : *hialuronidase*, *akrosin*, *enzim penetrasi korona (CPE)*, *neuromidase*, *ATP-ase*, *fosfatase*, *asparatil amidase* dan *glukoronidase* (Polakoski and Zeneveld, 1996). *Hialuronidase*, berfungsi untuk mendispersikan kumulus ooforus (lapisan terluar dari ovum), enzim *penetrasi korona (CPE)*, berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada korona radiata, sehingga korona radiata akan hancur. *Akrosin* berfungsi dalam proses

penembusan spermatozoa melalui zona pelusida, *ATP-ase* mempengaruhi akrosom untuk mengadakan kapasitas, *Glukoronidase*, berfungsi untuk memecah tetrasakarida yang dihasilkan oleh enzim hialuronidase dari asam hialuronat. Enzim *fosfatase* dan *amidase* belum diketahui fungsinya. Dari ketujuh enzim tersebut maka yang mempunyai fungsi penting dalam menembus lapisan yang ada di ovum adalah : *hialuronidase*, *CPE* dan *akrosin* (Hafez 2002). Pada proses pembekuan spermatozoa ketiga enzim tersebut mengalami gangguan atau kerusakan dan menjadi tidak aktif, menurut Chang et al (2002) gangguan akibat proses pembekuan tersebut dapat mencapai 45-55%. *Kerusakan tersebut terutama dialami oleh akrosin dalam menembus zona pelusida dari sel telur.*



Gambar 2.1. Anatomi spermatozoa.
 Keterangan : A. Spermatozoa Sapi dengan membran plasma, dan
 B. Anatomi kepala spermatozoa (Gamer dan Hafez, 2000)

2.2 Fungsi Spermatozoa

Dalam hal kemampuan spermatozoa pada proses fertilisasi maka spermatozoa pada dasarnya mempunyai beberapa fungsi yang harus dipenuhi, antara lain : *migrasi, pengikatan dan penetrasi*. Pertama tentang migrasi, spermatozoa mulai bergerak didalam epididimis, selama transportasi spermatozoa dengan menggunakan ATP sebagai sumber utama untuk bergerak maupun keperluan biosintesis. Energi spermatozoa terutama berasal dari proses glikolisis. ATP merupakan energi utama untuk menggerakkan flagella spermatozoa dan telah dibuktikan adanya korelasi, antara prosentase spermatozoa yang mempunyai motilitas sangat baik dengan konsentrasi ATP. Dalam perjalanan spermatozoa memperlihatkan berbagai sifat pergerakan, sehubungan dengan media lingkungan yang dilewati. Spermatozoa dalam tubuli seminiferi tidak menunjukkan pergerakan, baru dalam epididimis ini spermatozoa akan mengalami pematangan dan mampu bergerak sendiri.

Spermatozoa dalam vagina dihadapkan kemungkinan-kemungkinan yang lebih membahayakan untuk kehidupan dan pergerakannya. Terutama oleh karena pH yang asam di vagina (pH 3-4). Pada masa birahi lendir serviks mempunyai pH 7-7,8 yang sesuai untuk spermatozoa, sehingga penetrasi ke dalam lendir serviks cepat terjadi. Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa, yaitu 1) kualitas sperma yang ditentukan oleh morfologi spermatozoa, pH dan viskositas, 2)

waktu, frekuensi antar ejakulasi, 3) suhu dan 4) radiasi elektromagnetik (Salisbury, 1996). Transport spermatozoa dalam saluran reproduksi hewan betina meliputi 3 jenis : a) *rapid and short term*, b) *colonization* dan c) *slow release transportation*. Kedua, pengikatan merupakan proses ikatan membran spermatozoa yang terdiri dari lipida.

Kelompok sulfidril pada membran memegang peranan penting, karena perubahan menjadi disulfida berkaitan dengan maturasi spermatozoa. Perubahan reaksi antara SH dan S-S berpengaruh pada motilitas, metabolisme dan daya tahan hidup spermatozoa. Lipida pada plasma membran atau plasmalema berkaitan pula transmisi reseptor biokimia dari luar ke dalam sel spermatozoa. Selanjutnya plasma membran mengandung (Na⁺, K⁺) ATP-ase yang berfungsi untuk keseimbangan fungsi pompa Na dan K. ATP-ase mempunyai kriteria untuk ikatan reseptor, hal ini untuk fasilitas kontak antara spermatozoa dengan bahan luar. Ketiga, dalam fertilisasi setelah penembusan spermatozoa dalam sitoplasma sel telur pada akhirnya akan terjadi bentukan metafase dan diawali pembelahan zigot. Kejadian genetik dari kromosom haploid hewan jantan berpasangan dengan kromosom haploid hewan betina, membentuk kromosom diploid tunggal.

Pada penetrasi di kumulus ooforus diperlukan fasilitas dengan melepaskan hialuronidase. Hialuronidase efektif menghidrolisis kumulus ooforus. Selanjutnya zona pelusida hanya dapat dihidrolisa oleh enzim

proteolitik, yaitu akrosin dan tidak dapat dengan hialuronidase. Lapisan zona pelusida mempunyai dinding yang lebih tebal dibandingkan dengan lapisan kumulus ooforus, sehingga diperlukan daya penetrasi yang lebih kuat. Sedangkan enzim akrosin yang berfungsi untuk menembus zona pelusida sudah banyak mengalami kerusakan akibat proses pembekuan. Spermatozoa mencapai zona pelusida awalnya dengan bagian kepala spermatozoa pada permukaan sel telur, selanjutnya dengan posisi parallel. Selama penetrasi di seluruh zona pelusida dan masuk ke subzona (*perivitelina*) dalam waktu beberapa menit.

2.3. Tinjauan Tentang Akrosin

Pada testis mamalia (termasuk kambing) terdapat spermatozoa yg mengandung beberapa sistem enzim, salah satu satunya adalah proakrosin yg berfungsi mengaktifkan akrosin dan memegang peranan penting dalam fertilisasi terutama dalam penetrasi zona pelusida sel telur. Akrosin disebut juga enzim *proteinase* didapatkan pada akrosom dari spermatozoa. Enzim ini sangat penting untuk proses hidrolisa zona pelusida (ZP) (Adel A. Zalata, *et al.* 2004). Adanya *Oxidative tress (OS)* menyebabkan terjadinya penurunan aktifitas akrosin. Enzim ini berasal dari proakrosin dan menjadi akrosin dengan bantuan *a serine* proteinase sehingga menjadi enzim yg aktif dan berfungsi dalam penetrasi zona pelusida (ZP) pada sel telur (ovum) saat terjadinya fertilisasi pada makhluk hidup (hewan). Kehadiran *inhibitor*

akrosin mengindikasikan fungsi penting dari akrosin dalam interaksi *sperm-egg* pada penetrasi zona pelusida (ZP), dan ini bersifat spesies spesifik (Aditi, *et al.* 2000). Pada ovum terdapat 3 lapisan yaitu : kumulus oophorus, korona radiata dan zona pelusida. Enzim akrosin yang terdapat pada akrosomal sperma sangat penting untuk proses fertilisasi, hal ini ditunjukkan dengan penetrasi sperma ke dalam zona pelusida (ZP) dari ovum saat terjadinya fertilisasi. Peran karbohidrat sebagai signals dalam pertemuan sel sperma dengan sel telur, disamping itu untuk mengetahui sperma yang terkapasitasi maupun tidak terkapasitasi dalam menembus zona pelusida (ZP) secara *in-vitro*. Fungsi akrosin, proakrosin dan akrosin inhibitor dalam penembusan zona pelusida sel telur terjadi saat reaksi kapasitasi. Akrosin yg disebut juga *acrosomal serine protease* disintesa dari proakrosin dan menjadi enzim yang aktif dalam proses fertilisasi (Edda, TP. 1999).

Akrosin yg. dihasilkan oleh akrosom dari spermatozoa sangat berpengaruh terhadap penetrasi spermatozoa pada zona pelusida (ZP) dari sel telur atau (ovum). Aktivasi akrosin dan *plasminogen* sebagai enzim *proteolitik* pada spermatozoa kambing sangat penting untuk menginduksi reaksi akrosom serta penetrasi spermatozoa kedalam sel telur (oosit). Vitamin A juga merupakan aktifator dari aktifitas akrosin dan plasminogen. Kejadian reaksi akrosom dari masing-masing daerah epididymis setelah kapasitasi bertujuan untuk penetrasi sel telur (ovum) pada kambing

(Zervos *et al.* 2005). Faktor-faktor yang berhubungan dengan aktifitas akrosin pada spermatozoa dapat dipakai untuk evaluasi kesuburan pada hewan jantan. Pada proses kapasitasi menyebabkan terjadinya reaksi akrosom yang merupakan perubahan struktur yang luar biasa pada bagian anterior dari kepala spermatozoa yang nampaknya perlu bagi fertilisasi pada hewan mamalia (termasuk kambing). Hal ini memungkinkan pelepasan enzim akrosin dari organel seperti kantong sehingga dapat membantu penetrasi khususnya pada zona pelusida (ZP) dari sel telur.

Inhibitor akrosin yg disebut juga proteinase inhibitor dapat diisolasi dari seminal plasma. Kecepatan aktivasi akrosin secara alamiah dipengaruhi oleh keberadaan inhibitor pada reaksi akrosomal. Disamping itu Oxidative Stress (OS) menyebabkan terjadinya imbalance antara Reactive Oxygen Spesies (ROS) dengan antioxidant. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan aktifitas akrosin. Akrosin berperan sangat penting pada penembusan lapisan ketiga dari dinding sel telur (ovum). Lapisan ini disebut zona pelusida dan merupakan lapisan yang paling tebal dan kuat di banding kedua lapisan yang lain yaitu kumulus oophorus dan korona radiata (Adel *et al.* 2004).

Kadar yang rendah dari akrosin akan menyebabkan subfertilitas dan infertilitas pada ternak. Spermatozoa yang terkapasitasi mempunyai daya tembus terhadap zona pelusida (ZP) lebih baik dari pada yg tidak terkapasitasi pada saat ferfilisasi. Aktivitas pelepasan akrosin dari

proakrosin pada sperma membutuhkan waktu inkubasi 2-4 jam yang ditandai dengan pematangan sel sperma atau disebut reaksi kapasitasi (William *et al* 2001). Aktifitas akrosin dipengaruhi oleh konsentrasi sperma, motilitas sperma dan morfologi sperma. enzim akrosin menyebabkan terjadinya fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisa lapisan yg menyelimuti ovum (sel telur). Kapasitasi merupakan perubahan fisiologi yang dapat meningkatkan motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk melepaskan enzim akrosin dari bagian akrosom di kepalanya sehingga mampu menembus dinding sel telur yaitu zona pelusida (ZP) (Rosatti *et al.* 2003).



Gambar 2.2 Rumus Molekuler Akrosin (Zervos, *et al.*, 2005)

2.4. Uraian Tentang Fertilisasi

Fertilisasi merupakan persatuan gamet jantan (spermatozoa) dengan gamet betina (ovum) yang akan membentuk zigot (Gilbert, 1998,

Hafez, 2002). Spermatozoa mamalia secara alami dapat membuahi ovum atau sel telur apabila telah berada dalam traktus genitalis selama beberapa saat, hal tersebut diperlukan karena di sini spermatozoa mengalami reaksi kapasitasi. Proses kapasitasi tersebut terjadi di dalam uterus dan tahap kedua berlangsung di tuba falopii. Para ahli menduga bahwa proses tersebut berlangsung karena terjadi kontak spermatozoa dengan cairan folikel yang dikeluarkan pada saat ovulasi dan karena adanya cAMP (Suhana, dkk. 2002). Terdapat 4 kegiatan selama fertilisasi antara lain : 1) kontak, pengenalan spermatozoa dan sel telur merupakan kontrol kualitas (spesies yang sama), 2) regulasi penetrasi spermatozoa pada sel telur merupakan kontrol kuantitas (hanya 1 sel spermatozoa), 3) fusi material genetik spermatozoa dan sel telur, dan 4) aktivasi metabolisme sel telur, awal mulai membelah (Gilbert, 1998).

Pada spermatozoa mamalia reaksi akrosom didahului oleh reaksi kapasitasi. Dalam proses kapasitasi terjadi pelepasan inhibitor proteinase dan proses ini merupakan hal yang penting sekali karena inhibitor tersebut bila tidak dilepaskan akan menghambat kerja enzim proteinase yang terdapat didalam akrosom. Dari penelitian yang telah dilakukan pada babi, diduga bahwa permukaan ovum diselubungi oleh reseptor yang konfigurasiya berkomplemen dengan molekul yang menyelubungi permukaan membran spermatozoa. Keduanya diberi nama fertilisin dan

antifertilisin, penelitian berikutnya menduga bahwa bahan ini diketemukan dalam beberapa filum.

Reaksi *fertilisin-antifertilisin* merupakan tahap penting dalam proses fertilisasi. Reaksi tersebut diduga merupakan proses pendahuluan dari reaksi akrosom dan berfungsi untuk menempelkan kepala spermatozoa pada permukaan ovum supaya reaksi selanjutnya dapat terjadi (Suhana *dkk.* 2002). Menurut beberapa ahli reaksi akrosom terjadi sebelum atau segera setelah kepala spermatozoa menempel pada ovum. Pada reaksi ini terjadi fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori, dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisis lapisan-lapisan yang menyelimuti ovum.



Gambar 2.3. Proses Fertilisasi (Hafez, 2002)

2.5. Kapasitas dan Reaksi Akrosom

Kapasitasi dan reaksi akrosom adalah dua proses yang sangat fundamental dalam proses fertilisasi. Secara fisiologis kapasitasasi dan reaksi

akrosom terjadi didalam saluran kelamin betina (Baldi *et al*, 2000) dan pada saat ini peristiwa kapasitasi dan reaksi akrosom dapat dilakukan dalam sistem kultur *in vitro* dengan cara inkubasi dengan medium yang spesifik (Harrison and Gadella, 2002; Garner, 2000). 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 hiperraktivasi dari spermatozoa (Garner, 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 proteinkinase. Terjadi 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. Keluarnya kolesterol merangsang perubahan susunan lipid membran yang pada akhirnya meningkatkan permeabilitas membran terhadap Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+ . Tingginya konsentrasi ion-ion intraseluler akan merangsang terjadinya reaksi akrosom. Komponen yang dapat merangsang kapasitasi adalah bicarbonat (CO_3) yang akan berperan dalam pembentukan adenyl cyclase yang akan menambah konsentrasi c-AMP mengaktifkan protein kinase A-

dependent protein phosphorylasi cascade yang dapat mengubah susunan lipid pada membran plasma spermatozoa (Harrison and Gadella, 2002).

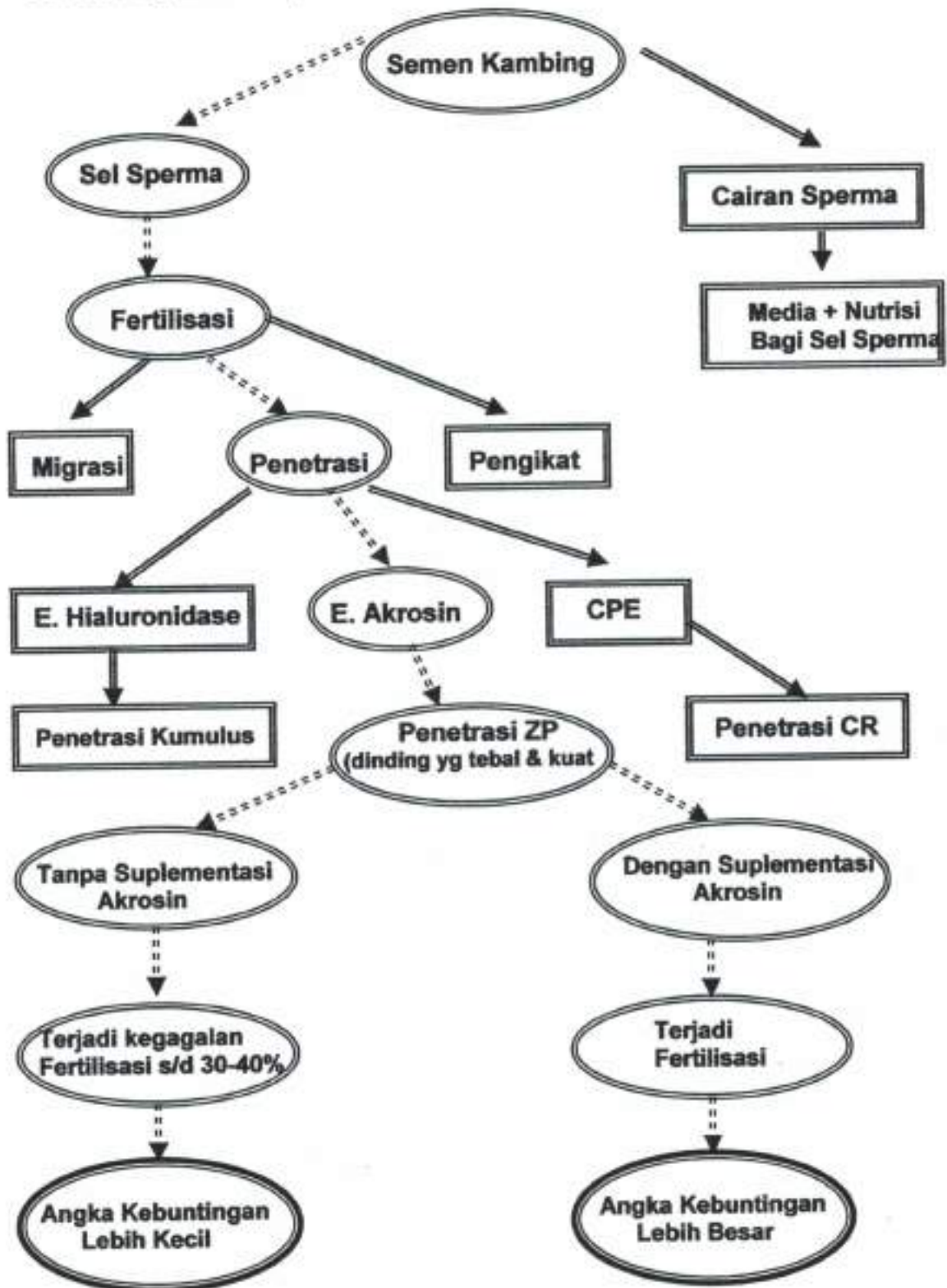
Reaksi akrosom secara fisiologis tergantung dari interaksi spermatozoa dengan protein dari zona pelusida yaitu ZP3. Proses ini diikuti dengan pelepasan beberapa enzim akrosom dan bahan-bahan lain yang memberi fasilitas penting untuk terjadinya penetrasi spermatozoa dalam zona pelusida dan berpindahnya molekul-molekul pada segmen equatorial spermatozoa yang diikuti dengan fusi dari membran spermatozoa dengan oolema dari oosit. Mekanisme berpindahnya molekul-molekul tersebut dan sinyal transduksi 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).



Gambar 2.4. Rangkaian kejadian status kapasitasi spermatozoa, keterangan : A. Non kapasitasi (distribusi *fluorescent* yang sama pada membran kepala spermatozoa), B. Reaksi akrosom (*fluorescent* terkonsentrasi pada daerah *post acrosomal*), dan C. Kapasitasi (*fluorescent* terkonsentrasi pada daerah *acrosomal*) (Susilawati, 2005) (Bar = 1 μ m)

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian



3.2. Hipotesis penelitian

Hipotesis yang diajukan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Penambahan *akrosin* pada sperma kambing peranakan etawa meningkatkan persentase motilitas spermatozoa.
- b. Penambahan *akrosin* pada sperma kambing peranakan etawa meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa.
- c. Penambahan *akrosin* pada sperma kambing peranakan etawa meningkatkan persentase integritas membran spermatozoa.
- d. Penambahan *akrosin* pada sperma kambing peranakan etawa meningkatkan persentase kapasitas dan meningkatkan reaksi akrosom spermatozoa.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Tahap Penelitian :

Penelitian tahap pertama adalah penelitian eksploratif laboratorik. Pada tahap ini dilakukan identifikasi, isolasi dan spesifitas akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui fraksi protein pada spermatozoa kambing, kemudian dilanjutkan isolasi protein, SDS PAGE, spesifitas dengan *Western Blot*, serta imunositokimia yaitu untuk mengetahui reseptor dari protein akrosin. Penelitian ini dilakukan di lab. Biomolecular Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Thailand.

Pada penelitian tahap kedua adalah suplementasi isolat akrosin spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap : motilitas, viabilitas, membran plasma utuh spermatozoa (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), kapasitasi, dan reaksi akrosom. Penelitian ini dilakukan di lab. Kemajiran dan Lab. Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair, serta lab. Biomolekuler FMIPA Unibraw Malang.

4.1.2. Tempat dan Waktu Penelitian :

Penelitian ini berlangsung 5 bulan yaitu mulai bulan mei 2009, dan dilakukan di 3 tempat, yaitu purifikasi, identifikasi, isolasi dan spesifisitas akrosin dilakukan di laboratorium *Biomolekuler Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn*

University Thailand. Suplementasi isolat akrosin terhadap potensi biologis spermatozoa kambing dilakukan di *FKH Unair* serta *FMIPA Unibraw*.

4.2. Metode Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui peran akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap persentase motilitas, viabilitas, integritas membran, kapasitas, dan reaksi akrosom spermatozoa.

4.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorik. Suplementasi enzim *proteinase (akrosin)* dan waktu inkubasi dengan menggunakan faktorial 4 x 2. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 faktor yaitu : pemberian medium dan waktu inkubasi. Faktor pemberian medium (A) terdiri dari 4 taraf yaitu tanpa pemberian akrosin, pemberian akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram. Sedangkan faktor inkubasi (B) terdiri dari 2 taraf yaitu waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ulangan.

Skema rancangan penelitian tahap II : peran enzim *proteinase (akrosin)* pada spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap *persentase motilitas, abnormalitas, viabilitas, integritas membran, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa*

Perlakuan Spermatozoa	Medium	Waktu Inkubasi	
		30 menit	60 menit
Sentrifugasi	Spz Spz + 3,0 μ gram Akr Spz + 4,5 μ gram Akr Spz + 6,0 μ gram Akr		

Keterangan :

Spz : Spermatozoa
Akr : Akrosin

4.2.2. Bahan Dan Alat Penelitian

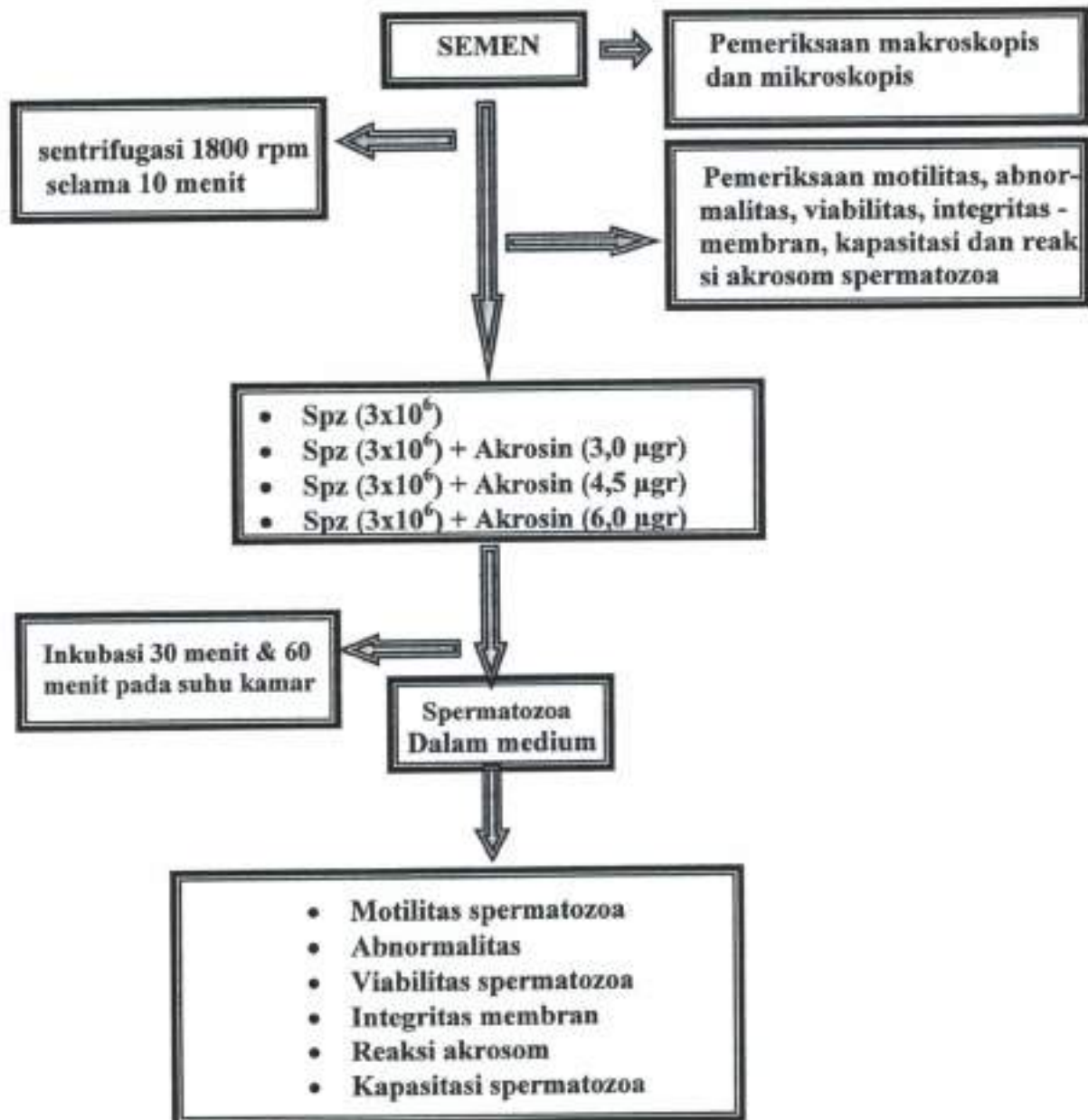
4.2.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah isolat akrosin dari spermatozoa kambing peranakan etawa hasil elusi dari penelitian tahap I, semen kambing yang ditampung dari kambing peranakan etawa (sebanyak 10 ekor) dalam kondisi sehat dan mempunyai libido tinggi, larutan hipoosmotik 0,032 M (7,35 g Natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan ke dalam 1 liter akuades), formalin, eosin negrosin, NaCl 3%, NaCl fisiologis, pewarnaan Chlortetracyclin (CTC, CTC Fixative, DABCO, asam trikloroasetat 20%, HCl 1N, Natrium thiobarbiturat 1%).

4.2.2.2. Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah tabung berskala, tabung sentrifus, alat sentrifus, gelas objek, gelas penutup, mikroskop, inkubator, mikroskop fase kontras, mikroskop fluoresen, spektrofotometer.

4.2.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II : Uji akrosin terhadap potensi biologis spermatozoa hasil sentrifugasi



4.2.4. Tahapan Penelitian

4.2.4.1. Penampungan Semen

Semen dari kambing pejantan ditampung 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. Selanjutnya pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium untuk diperiksa.

4.2.4.2. Pemeriksaan kualitas semen segar dan pemeriksaan semen setelah disuplementasi dengan akrosin

Pemeriksaan kualitas semen segar dilakukan secepat mungkin setelah penampungan. Pemeriksaan kualitas semen segar terdiri dari pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis, yaitu meliputi : volume, warna, konsistensi, pH, motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran dan status kapasitas. Pemeriksaan spermatozoa setelah disuplementasi dengan akrosin meliputi : motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran dan status kapasitas.

Pemeriksaan yang dilakukan meliputi :

Pemeriksaan makroskopis :

a. Volume

Volume semen dapat diketahui secara langsung dari semen yang terlihat pada tabung penampung berskala.

b. Warna

Warna semen dapat dilihat secara langsung sesaat setelah penampungan

c. Konsistensi

Konsistensi/derajat kekentalan diperiksa dengan menggoyangkan tabung yang berisi semen secara perlahan-lahan dan sambil melihat gerakan permukaan semen di dalam tabung. Jika pergeseran semen dalam tabung gerakannya lambat diartikan sebagai semen yang memiliki konsistensi kental, sedangkan jika gerakannya cepat diartikan sebagai semen yang memiliki konsistensi encer.

d. Derajat keasaman (pH)

Pengukuran pH semen dilakukan dengan meneteskan semen dengan menggunakan ose pada kertas pH indikator. Perubahan warna pada kertas pH indikator dicocokkan dengan warna-warna standar pH.

Pemeriksaan Mikroskopis meliputi :

a. Motilitas individu

Motilitas individu spermatozoa diamati segera setelah dilakukan penampungan semen. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop

cahaya pembesaran 10 x 40 pada selapis tipis semen di atas gelas objek. Kriteria motilitas individu spermatozoa sebagai berikut : 0% (spermatozoa imotile dan tidak bergerak), 50% (gerak melingkar, <50% bergerak progresif dan tidak bergelombang), 50-80% (spermatozoa bergerak progresif dan terbentuk gerakan masal), 90% (gerakan progresif sangat gesit dan segera membentuk gelombang) dan 100% (gerakan sangat progresif dan seketika membentuk gelombang) (Toelihere, 1993).

b. Motilitas massa

Motilitas massa diamati kurang dari 10 menit setelah semen ditampung dengan mikroskop cahaya perbesaran 10 x 10. Gerak spermatozoa yang diamati meliputi gerakan spermatozoa dalam suatu kelompok dengan kecenderungan bergerak secara bersama-sama ke satu arah membentuk gelombang-gelombang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat. Kriteria motilitas massa spermatozoa sampel yaitu 2+ sampai 3+

c. Konsentrasi

Pengujian hipotesis semen menggunakan *spectrophotometer*. Prosesnya sebagai berikut : NaCl 3% diambil dengan *micropipette* atau *scorex* sebanyak 3,98 ml dan dimasukkan ke dalam tabung *cuvet* yang telah diisi dengan 0,02 ml semen kemudian dihomogenasi dengan *thermomixer*. Selanjutnya tabung *cuvet* tersebut dimasukkan ke dalam *spectrophotometer*, beberapa saat kemudian terlihat angka, kemudian dilihat dalam table, sehingga diketahui konsentrasi spermatozoa per ml semen (Zenichiro *et al.*, 2002).

d. Viabilitas dan abnormalitas spermatozoa

Pengamatan viabilitas (% spermatozoa hidup) dan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarnaan diferensiasi yaitu membuat preparat ulas yang diwarnai dengan eosin-negrosin. Prosesnya sebagai berikut : (1) semen sampel diambil dengan ose ditetaskan pada gelas obyek, kemudian zat warna diambil dengan ose eosin yang lain dan ditetaskan pada gelas obyek pada sisi yang lain. Tetesan semen dan eosin dicampur secara hati-hati menggunakan gelas penutup, (2) hasil campuran semen dan eosin didorong pada gelas penutup ke ujung lain, kemudian preparat dikeringkan, (3) pengamatan spermatozoa dilakukan pada mikroskop cahaya pembesaran 40 x 10. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna eosin (transparan), sedangkan spermatozoa yang mati berwarna ungu karena menyerap warna negrosin. Pengamatan terhadap abnormalitas spermatozoa dilakukan untuk mengamati kelainan-kelainan yang terdapat pada kepala dan ekor spermatozoa (Ax et al., 2000; Hafez, 2000a; Said dkk, 2004). Kelainan spermatozoa dikategorikan atas 2 jenis yaitu (1) abnormal pada kepala yang terdiri atas : normal (oval), kepala terlalu besar atau kecil (*macrocephalic* atau *microcephalic*), terlalu pendek dan melebar (*amorphous*), pipih dan memanjang (*taperedhead*), tanpa kepala (*absent head*) dan kepala rangkap (*double head*), (2) abnormal pada ekor seperti : ekor ganda (*double tail*), ekor terputus (*tail stump*), ekor melingkar (*dag defect*) dan ekor kecil dan melingkar (*pseudo-droplet*) (Ax et al., 2000).

e. Integritas membrane spermatozoa dengan menggunakan larutan HOS tes

Integritas membran spermatozoa diuji dengan larutan *hypoosmotic swelling test* (HOS test). Sebanyak 100 µl semen dicampur dengan 1 ml larutan hipoosmotik (0,49 g sodium sitrat x 2H₂O dan 0,9 fruktosa dalam 100 ml aquades). Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Membran spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali terhadap terjadinya penggelembungan spermatozoa dan adanya ekor yang menggulung (Fonseca, *et al.*, 2005; Nur, *et al.*, 2005), Selanjutnya Nur *et al.*, (2005) menyatakan bahwa larutan hipoosmotik menyebabkan spermatozoa yang membrannya utuh (intak) akan melingkar, sedangkan apabila membrannya rusak air tidak dapat masuk ke dalam membrane, sehingga spermatozoa tidak menggelembung dan ekor tidak melingkar.

f. Status Kapasitas Spermatozoa

Pengujian status kapasitas (kapasitas, reaksi akrosom dan non kapasitas), baik semen segar maupun semen perlakuan dilakukan dengan pewarnaan *Chlortetracycline* (CTC Staining). Secara singkat proses preparasi CTC sebagai berikut : (1) 100 µl semen segar atau semen perlakuan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang telah dibungkus aluminium foil dan ditambah dengan 100 µl pewarna CTC, vorteks selama 1 menit, dan tambahkan 8 µl larutan CTC *fixative* vorteks selama 1 menit, (2) Ambil 10 µl (campuran 1 dan 2) dan tempatkan di atas *object glass*, tambahkan dengan 10 µl larutan DABCO kemudian dicampur dengan tip mikropipet. Tutup dengan *cover glass* dan tekan

secara hati-hati dengan telapak tangan yang dilapisi tissue tebal. Sisi *cover glass* diberi perekat dengan *cutex* (Fraser dan McDermott, 1992). (3) Pengamatan dilakukan dengan mikroskop *epifluorescence* (*Nikon Microscope OPTIPHOT-2* menggunakan *filter-UV2A* yang terdiri atas *excitation filter EX330-3*, *dichonic mirror DM400* dan *Barrier filter BA435*) menggunakan sumber cahaya ultra violet (Sumitro dan susilawati, 1998). Pewarnaan CTC pada spermatozoa memperlihatkan tiga bentuk perbedaan *fluorescent*, yaitu (1) Distribusi *fluorescent* yang sama pada kepala spermatozoa (non kapasitasi), (2) *Fluorescent* terkonsentrasi pada daerah post acrosomal (reaksi akrosom) dan (3) *Fluorescent* terkonsentrasi pada daerah acrosomal yang menandakan spermatozoa mengalami kapasitasi (Kaul, *et al.*, 1997). Pengamatan status kapasitasi dilakukan setelah 24 jam berikutnya.

g. Status Akrosom pada Spermatozoa

Spermatozoa difiksasi dengan 4% *formal dehyde*, kemudian dicuci dengan menambahkan PBS 3 ml dan disentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit, supernatant dibuang dan ditambahkan dengan 0,3 ml FITC con A (Sigma) dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam PBS *dulbeccos*. *Staining* dilakukan selama 25 menit pada suhu ruangan, selanjutnya dicuci 2 kali dengan sentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan digoreskan pada *flow labs slide* (specimen), ditetesi dengan gliserol 90%. Selanjutnya specimen diamati pada mikroskop *epifluorescent* (*Nikon Japan*) dengan *excitation B* (eksitasi 490 rpm dengan emisi 525 nm) untuk mengetahui *fluoresen* pada spermatozoa hasil FITC.

Pengamatan memperlihatkan: (a) spermatozoa dengan akrosom intak, dan (b) spermatozoa tanpa akrosom. Metode ini merupakan hasil modifikasi peneliti dari metode sebelumnya (Susilawati, 2000) dari metode Nishikima (1997).

4.2.5. Variabel Penelitian

Variabel bebas : lama inkubasi, dosis akrosin

Variabel tergantung : motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran, serta status kapasitasi

Variabel kendali : medium, kualitas semen, umur kambing, pakan dan pemeliharaan

4.2.6. Definisi Operasional Penelitian :

- a. Semen segar adalah semen kambing PE yang ditampung di kandang dengan menggunakan vagina buatan khusus kambing
- b. Motilitas individu yaitu rataan persentase spermatozoa yang bergerak aktif ke depan dari sampel semen diletakkan pada objek gelas, kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.
- c. Viabilitas spermatozoa yaitu rataan persentase spermatozoa hidup dengan eosin negrosin menunjukkan tidak berwarna (transparan) dan warna ungu (gelap) menandakan spermatozoa mati. Viabilitas dihitung sedikitnya dari 200 spermatozoa. Pengamatan dilakukan pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.
- d. Abnormalitas spermatozoa yaitu rataan persentase jumlah spermatozoa yang memiliki kelainan tertentu (abnormal primer dan sekunder) dari sampel semen hasil pengamatan pada objek gelas, dihitung sedikitnya 200 spermatozoa. Pengamatan dilakukan pada mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

- e. Integritas membran spermatozoa yaitu rataan persentase sejumlah spermatozoa yang memiliki membrane utuh dari sampel semen hasil pengamatan pada objek gelas, dihitung sedikitnya 200 spermatozoa. Pengamatan dilakukan pada mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.
- f. Membran akrosom adalah hasil pengamatan membran spermatozoa dengan menggunakan FITC con A dan dievaluasi dengan menggunakan *epifluorescence* pembesaran 400 kali.
- g. Status kapasitas spermatozoa kambing (non kapasitas, kapasitas dan reaksi akrosom) dengan pewarnaan CTC, pengamatan dilakukan pada 2 preparat.

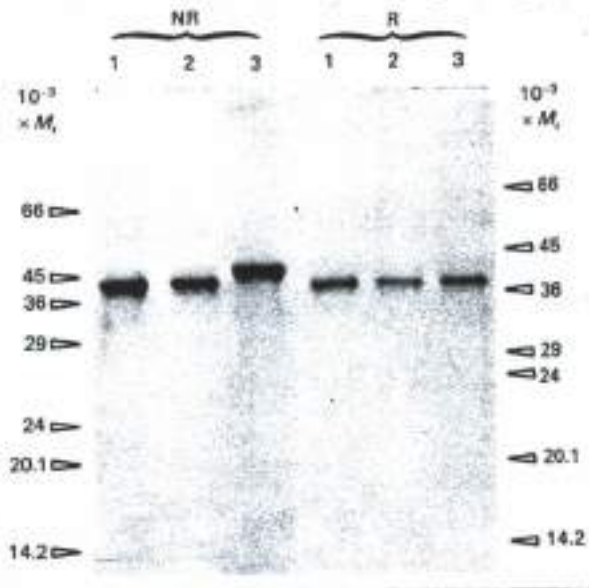
4.2.7. Analisa Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Faktorial. Data hasil pengamatan, ditabulasi dan dilakukan analisis. Sebelum dianalisis dilakukan transformasi arcsin, kemudian dilakukan Analisis Variansi (ANAVA). Apabila perlakuan menunjukkan berpengaruh nyata atau sangat nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Ganda Duncan (Steel & Torrie, 1989). Untuk mengetahui derajat hubungan antar variable yang diamati dilakukan perhitungan korelasi Pearson.

BAB 5
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Penelitian I : Isolat Akrosin

5.1.2. SDS-PAGE akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa



Gambar 5.1. Pemeriksaan SDS-PAGE akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa dengan BM 42,36 kDa

5.1.2. Uji Imunositokimia



Gambar 5.2. Pemeriksaan immunofluorescence akrosin pada spermatozoa kambing peranakan etawa dengan antibodi akrosin

5.2. Penelitian II : Suplementasi Akrosin

Pada penelitian tahap II ini adalah uji suplementasi akrosin kambing peranakan etawa terhadap potensi biologis spermatozoa

Semen yang dijadikan sebagai sampel penelitian untuk disuplementasi akrosin memiliki kriteria sebagaimana semen yang layak untuk dipakai sebagai inseminasi buatan pada kambing, yaitu berwarna putih susu dan sedikit yang berwarna krem kekuningan, pH 6-7, motilitas massa 2⁺ - 3⁺, motilitas individu spermatozoa $\geq 70\%$ (Zenichiro, et al., 2002). Dari 10 ekor kambing PE jantan setelah diambil semennya melalui vagina buatan hasilnya tertera pada Tabel 5.1 dibawah ini :

Tabel 5.1. Karakteristik semen segar kambing PE

Parameter	Rata-rata \pm SD
Warna	Putih susu
Konsistensi	Pekat
Ph	6,56 \pm 0,25
Volume (ml)	1,12 \pm 0,25
Konsentrasi (10 ⁶)	2326,91 \pm 106,14
Motilitas Massa	2 ⁺ - 3 ⁺
Motilitas Individu (%)	75,56 \pm 2,96
Viabilitas (%)	92,50 \pm 3,67
Abnormal (%)	5,56 \pm 2,40
Integritas Membran (%)	65,89 \pm 7,22
Status Kapasitasi:	
- Status Kapasitasi (%)	57,55 \pm 4,22
- Kapasitasi (%)	24,42 \pm 8,97
- Reaksi Akrosom (%)	18,34 \pm 5,75

Karakteristik spermatozoa pada semen perlu dievaluasi dengan maksud untuk mengetahui apakah semen tersebut layak untuk diproses lebih lanjut dan untuk menentukan tingkat pengencerannya (Tambing,*dkk.*, 2000). Bergeron, *et al.*, (2004) menyatakan bahwa evaluasi semen segar meliputi: volume, warna, motilitas, konsentrasi, dan viabilitas.

Tabel 5.1. menunjukkan bahwa rata-rata persentase volume segar dari hasil penelitian ini adalah $1,12 \pm 0,25$ ml, hampir sama dengan yang diperoleh Garner dan Hafez (2000) bahwa volume semen kambing di daerah tropis berkisar antara 0,8 - 1,2 ml. Perbedaan volume semen yang dihasilkan dari seekor pejantan bervariasi. Jainudeen, *et al.*, (2000) menyatakan bahwa volume semen dan jumlah spermatozoa yang dihasilkan dari setiap ejakulasi dipengaruhi oleh spesies, umur, musim, lingkungan, frekuensi ejakulasi, kondisi pangan dan kesehatan.

Warna semen kambing umumnya berwarna putih susu dan sedikit yang berwarna krem kekuningan. Variasi warna kekuningan ini berhubungan dengan adanya kandungan riboflavin yang dihasilkan dari sekresi kelenjar vasikula seminalis (Lindsay, *et al.*, 1982; Evans dan Maxwell, 1987).

Konsistensi spermatozoa hasil penelitian umumnya pekat. Secara visual semakin pekat semen menunjukkan konsentrasi spermatozoa dalam semen semakin tinggi (McDonald dan Pineda, 1989).

Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dari penelitian ini adalah $2326,91 \pm 106,14 \times 10^6$ spz/ml. Rata-rata persentase konsentrasi ini tergolong normal. Garner dan Hafez (2000) menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa

kambing berkisar antara $2.000 - 3.000 \times 10^6$ spz/ml. Devendra dan Burns (1994) menyatakan bahwa konsentrasi semen segar kambing per ejakulat berkisar antara $1,8 - 4 \times 10^6$ spz/ml., sedangkan Tambing, *dkk.*, (2000) melaporkan bahwa konsentrasi spermatozoa kambing adalah $2,881,0 \pm 234,6 \times 10^6$ spz/ml. Konsentrasi semen saat diejakulasi sangat terhantunga pada proses spermatogenesis. Spermatogenesis dipengaruhi oleh *Folicle Stimilating Hormone* (FSH). FSH berperan dalam merangsang sel germinatif dari tubulus seminiferus dari testis (McDonald dan Pineda, 1989).

Derajat keasaman (pH) berperan menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Rataan pH semen segar kambing yang diperoleh dari penelitian ini adalah $6,56 \pm 0,14$. Nilai pH tersebut berada sedikit dibawah pH normal, sebagaimana dinyatakan oleh Garner dan Hafez (2000) bahwa kambing memiliki pH berkisar antara 5,9 - 7,3.

Rataan persentase motilitas spermatozoa kambing PE dari penelitian ini adalah $75,56 \pm 2,96$ %. Motilitas spermatozoa ini menunjukkan lebih tinggi dibandingkan yang dilaporkan Tambing, *dkk.* (2000) bahwa motilitas spermatozoa kambing FE adalah $74,29 \pm 2,70$ %, akan tetapi sedikit lebih rendah dari yang dilaporkan Wicaksono (1999) bahwa motilitas spermatozoa kambing adalah $87,88 \pm 2,61$ %. Motilitas merupakan tolak ukur kualitas yang sifatnya subyektif karena berdasarkan keputusan individu pemeriksa (Bearden dan Fuquay, 1997). Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada kondisi medianya (Salisbury, *et al.*, 1978). Spermatozoa yang motilitasnya baik terlihat dari gerak

massa membentuk awan tebal dan gerak progresif individu aktif ke depan (Susilawati, 2007). Suryadi, dkk. (2004) menyatakan bahwa motilitas massa 2+ adalah cukup baik dan motilitas individu 50% - 80% tergolong normal. Motilitas dapat dijadikan sebagai ukuran tidak langsung terhadap aktivitas metabolisme dan daya hidup spermatozoa serit mempunyai kontribusi yang penting pada saat transportasi di saluran reproduksi betina, usaha untuk mencapai oosit dan penetrasi *zona pellucida* (Garner dan Hafez, 2000; Hallap, 2005)

Pemeriksaan kualitas fisiologis spermatozoa lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan gambaran tentang kondisi fisiologis per individu spermatozoa sebagai ukuran keberhasilan proses fertilisasi. Aspek fisiologi spermatozoa lanjutan meliputi integritas membran, kapasitas, reaksi akrosom dan non kapasitas spermatozoa.

Rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing dari penelitian ini adalah $65,89 \pm 7,22$ %. Hasil ini lebih rendah dibandingkan yang dilaporkan Isnaini (2006) bahwa integritas membran kambing PE adalah $72,33 \pm 3,66$ %. Penurunan kualitas spermatozoa dapat terjadi karena faktor biologi maupun karena pengaruh faktor prosesing semen.

Hasil penelitian kapasitas, reaksi akrosom dan non kapasitas spermatozoa semen segar masing-masing adalah $23,42 \pm 8,97$ %, $18,34 \pm 5,75$ % dan $57,55 \pm 4,22$ %. Hasil ini sedikit lebih baik dari yang dilaporkan masing-masing Zamanti (2003) bahwa kapasitas yaitu $24,25 \pm 0,10$ %, reaksi akrosom yaitu $11,83 \pm 0,14$ % dan non kapasitas yaitu $64,23 \pm 0,21$ %, sedangkan Isnaini (2006) menyatakan bahwa kapasitas yaitu $43,75 \pm 5,25$ %, reaksi akrosom yaitu

39,57 ± 5,89 % dan non kapasitas yaitu 16,74 ± 1,63 %. Kapasitas dini pada spermatozoa kambing berhubungan dengan rendahnya kandungan energi terutama fruktosa. Kandungan fruktoda dalam semen kambing yaitu 250 mg/100 ml, lebih rendah dari semen sapi yaitu 460 - 600 mg/100 ml (Garner dan Hafez, 2000), selain itu kambing tergolong spesies hewan dengan kandungan kolesterol yang rendah. Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa kambing dan babi hutan hanya membutuhkan waktu 1 sampai 2 jam untuk mencapai kapasitas spermatozoa yang optimal, karena semen kambing memiliki kolesterol yang lebih rendah (14 % dari total lemak) dibandingkan dalam semen sapi dan manusia memiliki kandungan kolesterol lebih tinggi (25 mol dari total lemak) dalam semennya, sehingga untuk mencapai kapasitas yang optimal membutuhkan waktu lebih lama yaitu 6 sampai 8 jam.

5.2.1. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing PE

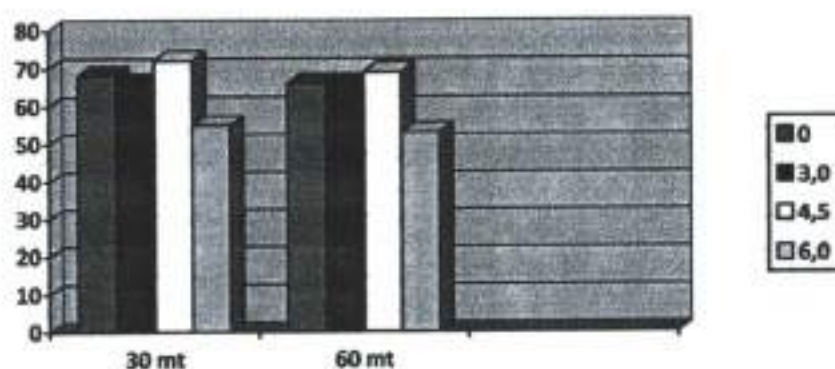
Tabel 5.2. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing PE

Kadar Akrosin (μ gr)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Motilitas Spermatozoa Kambing (%)
0	30	67,10 ± 5,29 ^a
	60	65,34 ± 7,65 ^a
3,0	30	67,81 ± 4,19 ^a
	60	68,18 ± 4,81 ^a
4,5	30	68,90 ± 8,59 ^b
	60	70,20 ± 6,34 ^b
6,0	30	53,50 ± 9,81 ^c
	60	55,12 ± 6,26 ^c

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.2. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase motilitas spermatozoa kambing PE berkisar antara 53,50 - 70,20%. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi akrosin 3,0; 4,5

dan 6,0 masing-masing menghasilkan rata-rata persentase motilitas berkisar antara 53,50 - 61,70%; 66,33 - 66,94% dan 55,00 - 62,88%. Hubungan antara suplementasi akrosin dan motilitas pada berbagai level inkubasi tertera pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Rataan persentase motilitas spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing PE. Efek perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing, sedangkan interaksi antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi (keduanya) menunjukkan tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa (lampiran 2).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND) hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa akrosin dan perlakuan dengan akrosin 3,0 µgram pada berbagai level lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing PE. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi akrosin 4,5 dan 6,0 µgram pada berbagai lama inkubasi menunjukkan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing PE (lampiran 2). Secara biologi menunjukkan bahwa perlakuan akrosin 4,5 µgram menghasilkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Hal ini karena penambahan akrosin dapat menurunkan pembentukan asam laktat dalam sel yang berakibat pada peningkatan pH, sehingga proses metabolisme menjadi meningkat. Peningkatan proses metabolisme menyebabkan bertambahnya pembentukan ATP, sehingga akan meningkatkan motilitas spermatozoa (Jones, et al., 1992; Garner dan Hafez, 2000; Rigau, et al., 2002; Ford, 2006).

Secara alami motilitas spermatozoa kambing PE akan mengalami penurunan seiring lamanya waktu inkubasi. Selama proses inkubasi spermatozoa terus melakukan pergerakan dan metabolisme yang membutuhkan banyak energi sehingga semakin lama, persediaan nutrisi yang dibutuhkan spermatozoa semakin berkurang. Keadaan ini menyebabkan spermatozoa mengalami penurunan motilitasnya (Wabershi et al., 1994) dan dalam jangka

waktu yang lama akan menurunkan fertilitas dan plasma semen menjadi tidak isotonis.

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kondisi lingkungan panas dan dingin, demikian juga penanganan semen pada waktu pemeriksaan kualitas semen (Sarastina, 2006). Selanjutnya Ax, *et al.* (2000) menyatakan bahwa motilitas *in vitro* bervariasi sesuai dengan kepadatan cairan, suhu lingkungan, umur spermatozoa dan faktor nutrisi.

5.2.2. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Viabilitas Spermatozoa Kambing PE

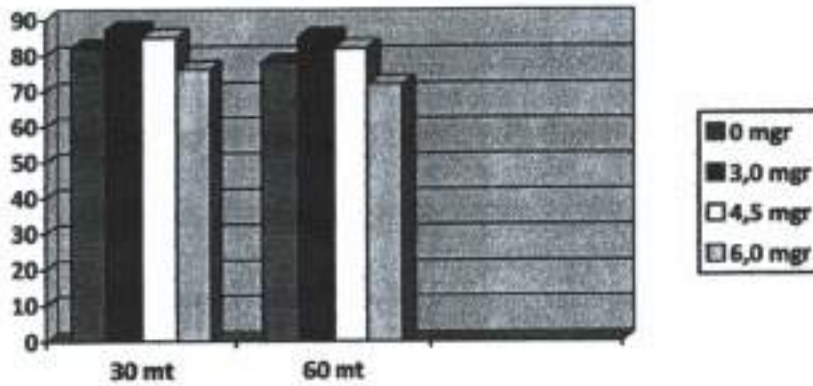
Tabel 5.3. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Viabilitas Spermatozoa Kambing PE

Kadar Akrosin (μ gr)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Viabilitas Spermatozoa Kambing (%)
0	30	82,19 \pm 4,64 ^a
	60	78,60 \pm 3,45 ^a
3,0	30	87,20 \pm 2,79 ^b
	60	85,48 \pm 4,76 ^b
4,5	30	85,23 \pm 3,89 ^b
	60	83,20 \pm 6,34 ^b
6,0	30	76,50 \pm 9,81 ^c
	60	74,12 \pm 6,26 ^c

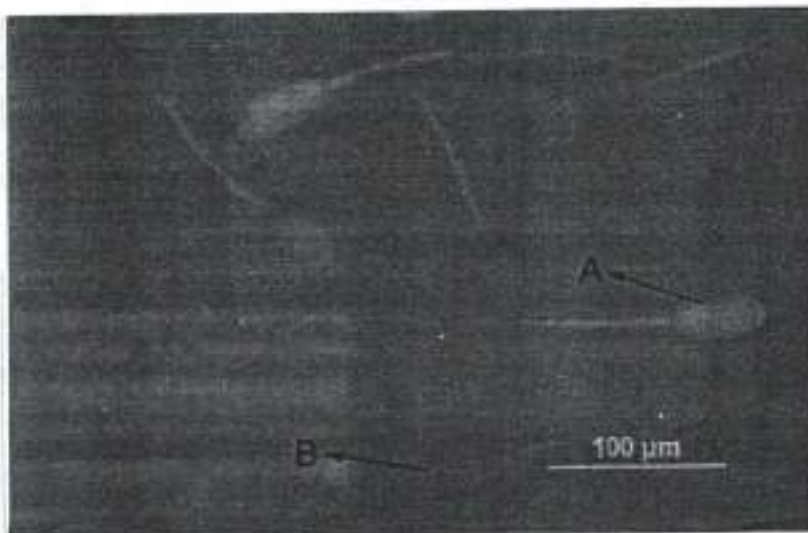
Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.3. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase viabilitas spermatozoa kambing PE berkisar antara 74,12 - 87,20%. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram masing-masing menghasilkan rataan persentase motilitas

Secara deskriptif menunjukkan bahwa penambahan akrosin sampai 3,0 μ gram dapat menaikkan rata-ran persentase viabilitas spermatozoa kambing PE. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rata-ran persentase viabilitas spermatozoa kambing PE tertera pada gambar 5.4.



Gambar 5.4. Rataan persentase viabilitas spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda



Gambar 5.5. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa kambing PE dengan mikroskop cahaya phase kontras, keterangan : A. spermatozoa hidup (transparan) dan B. spermatozoa mati (warna ungu)

Spermatozoa yang hidup memiliki membran yang intak (Gambar 5.5A), menyebabkan zat warna eosin negrosin tidak dapat masuk melewati membran.

Membran berfungsi melindungi organ dalam sel dan sebagai filter pada permukaan intraseluler dan ekstraseluler. Spermatozoa yang mati (gambar 5.5B) menunjukkan membran plasmanya rusak. Keadaan ini menyebabkan proses metabolisme sel terganggu dan permeabilitas membran menjadi sangat tinggi sehingga zat warna eosin negrosin dapat melewati membran dan berakibat fatal bagi spermatozoa (Saili, 1999).

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi serta interaksi keduanya berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-rata persentase viabilitas spermatozoa kambing PE (lampiran 3).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap viabilitas spermatozoa kambing PE dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan dengan suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram pada lama inkubasi berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-rata persentase viabilitas spermatozoa kambing PE (lampiran 3). Secara biologi menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin 3,0 μ gram pada berbagai lama inkubasi menghasilkan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa kambing PE yang lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa

suplementasi akrosin sampai dengan 4,5 µgram dalam semen kambing PE masih memberikan efek yang lebih baik terhadap kehidupan spermatozoa. Akrosin dapat meningkatkan metabolisme sebagai sumber energi utama spermatozoa (Garner dan Hafez, 2000; Susilawati, 2003). Suplementasi akrosin 6,0 µgram telah menunjukkan terjadi penurunan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa kambing PE. Hal ini diduga berkaitan dengan pembentukan asam laktat (Hafez, 2000).

Selama inkubasi, spermatozoa mengalami perubahan molekul penyusun membran yang menyebabkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran. Bearden dan Fuquay (1997) menyatakan bahwa aktifitas metabolik semen menjadi maksimum jika diencerkan dengan pengencer isotonik, akan tetapi jika pengencer bersifat hipotonik atau hipertonic akan menurunkan kecepatan metabolisme tetapi tidak akan meningkatkan spermatozoa hidup.

5.2.3. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Abnormalitas Spermatozoa Kambing PE

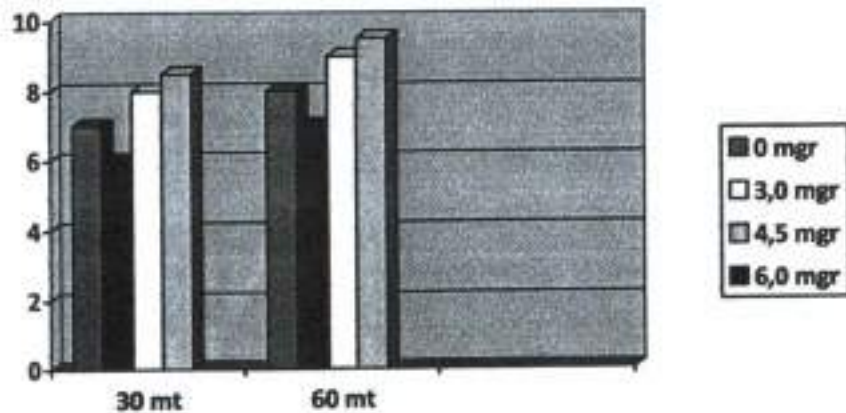
Hasil penelitian rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa kambing tertera pada tabel 5.4.

Tabel 5.4. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Abnormalitas Spermatozoa Kambing PE

Kadar Akrosin (μ gr)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Abnormalitas Spermatozoa Kambing (%)
0	30	7,40 \pm 3,76 ^a
	60	8,87 \pm 2,49 ^a
0,15	30	6,44 \pm 2,19 ^a
	60	7,38 \pm 2,09 ^a
0,30	30	8,23 \pm 3,30 ^a
	60	9,44 \pm 2,36 ^b
0,45	30	8,87 \pm 2,45 ^a
	60	9,96 \pm 1,67 ^b

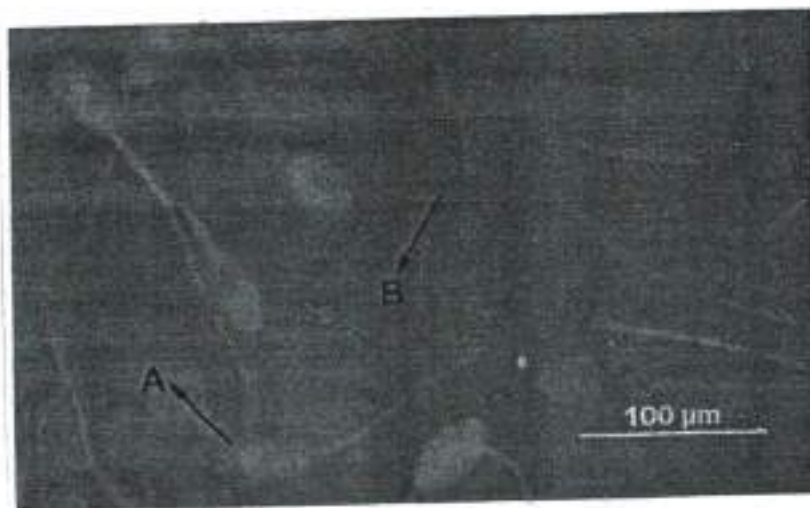
Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.4. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE berkisar antara 6,44 - 9,96%. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 masing-masing menghasilkan rataan persentase motilitas berkisar antara 7,40 - 8,87%; 6,44 - 7,38%; 8,23 - 9,44 dan 8,87 - 9,96%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa penambahan akrosin sampai 3,0 μ gram dapat menurunkan rataan persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE tertera pada gambar 5.6



Gambar 5.6. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama yang berbeda

Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa kambing PE dengan pewarnaan eosin negrosin yang diamati pada mikroskop phase kontras pembesaran 1000 kali tertera pada gambar 5.7.



Gambar 5.7. Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa kambing PE dengan mikroskop cahaya phase kontras, keterangan : A. Spermatozoa utuh (seluruh bagian tubuh spermatozoa sempurna dan berwarna transparan) dan B. spermatozoa abnormal (bagian tubuh tidak normal dengan formasi ekor tidak sempurna)

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-ran persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin menunjukkan berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap rata-ran persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE, sedangkan lama inkubasi serta interaksi keduanya berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-ran persentase abnormalitas kambing PE (lampiran 4)

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap abnormalitas spermatozoa kambing PE dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan dengan suplementasi akrosin dosis 6,0 μ gram pada berbagai lama inkubasi berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-ran persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE, sedangkan suplementasi akrosin dosis 3,0 dan 4,5 μ gram pada berbagai lama inkubasi berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap rata-ran persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE (lampiran 4).

Secara biologi menunjukkan bahwa suplementasi akrosin dosis 3,0 μ gram dapat menurunkan rata-ran persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE. Hal ini, diduga karena karena akrosin berperan meningkatkan stabilitas membran dengan cara berikatan dengan fosfolipid yang terkandung dalam kepala spermatozoa (Chen, et al. 1999), sehingga jika membran utuh tidak dapat

ditembus zat warna eosin negrosin (saili, 1999), sehingga menghambat abnormalitas spermatozoa kambing.

Abnormalitas spermatozoa dibedakan atas abnormalitas primer yaitu kelainan spermatozoa karena proses spermatogenesis di dalam tubuli semeniferi dan abnormalitas sekunder yaitu kelainan spermatozoa setelah meninggalkan tubuli seminiferi (Jaenudeen dan Hafez, 2000). Rataan persentase abnormalitas kambing PE yang diperoleh dari penelitian ini kurang dari 10. Hal ini menunjukkan bahwa proses penanganan semen dari penampungan sampai dilakukan suplementasi secara teknis telah dilakukan dengan baik, sehingga abnormalitas sekunder dapat ditekan serendah mungkin. Bearden dan Fuquay (1997) menyatakan bahwa abnormalitas sampai 25% belum berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa dalam proses fertilisasi. Said (2004) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa kurang dari 20% masih layak digunakan untuk inseminasi buatan.

5.2.4. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Kambing PE

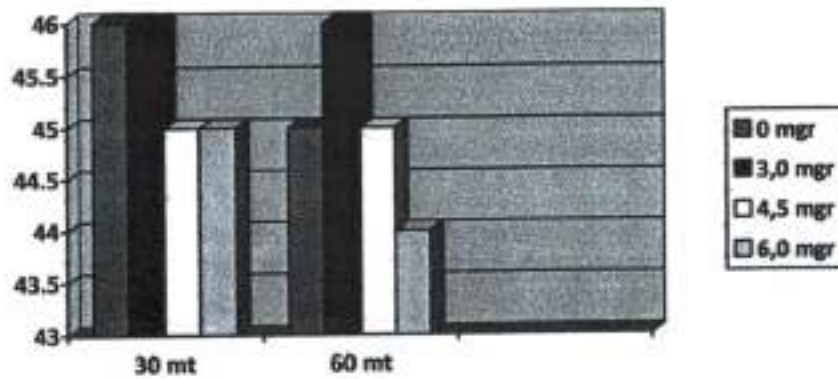
Integritas membran spermatozoa diamati dengan uji *Hipo-Osmotic Swelling* (HOS) tes. Hasil penelitian rata-ran persentase integritas membran spermatozoa kambing PE tertera pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Kambing PE

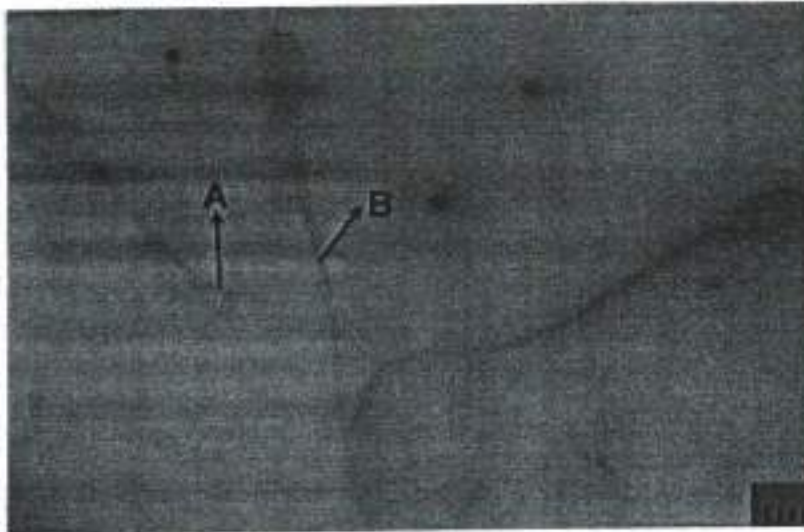
Kadar Akrosin (μ gr)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Integritas Membran Spermatozoa Kambing (%)
0	30	46,40 \pm 5,76 ^a
	60	45,87 \pm 4,49 ^a
3,0	30	46,44 \pm 4,19 ^a
	60	46,38 \pm 5,09 ^a
4,5	30	45,23 \pm 3,30 ^a
	60	45,44 \pm 2,36 ^a
6,0	30	45,87 \pm 2,45 ^a
	60	44,96 \pm 1,67 ^a

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.5. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing berkisar antara 44,38 - 49,40%. Suplementasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram masing-masing menghasilkan rataan persentase integritas membran berkisar antara 45,87-46,40%; 46,38-46,44%; 45,44-45,23% dan 45,87-44,96%. Secara deskriptif menunjuk kan bahwa suplementasi akrosin sampai 0,30 μ gram dapat meningkatkan rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing PE dan setelah suplementasi akrosin 6,0 μ gram menunjukkan terjadi penurunan rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing. Hubungan suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing PE tertera pada gambar 5.8.



Gambar 5.8. Rataan persentase Integritas Membran spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda



Gambar 5.9. Hasil pengamatan Integritas Membran spermatozoa kambing PE dengan mikroskop cahaya, keterangan : A. spermatozoa dengan membran intak- (ekor melingkar), dan B. spermatozoa dengan membran spermatozoa rusak (ekor lurus). (Bar = 2 μ m)

Hasil pengamatan integritas membran spermatozoa kambing dengan uji HOS tes dan diamati pada mikroskop cahaya tertera pada gambar 5.9 menunjukkan bahwa spermatozoa yang membrannya utuh memperlihatkan ekornya melingkar sebagai akibat masih berfungsinya membran dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik (gambar 5.9A), sedangkan spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang

lurus (gambar 5.9 B). Nur, *et al.* (2005) menyatakan bahwa larutan hiposmotik menyebabkan spermatozoa yang membrannya utuh akan mengikat air sehingga bagian tubuh menggelembung dan ekor akan melingkar, sedangkan apabila membrannya rusak terjadi kehilangan air dan cairan lainnya (dehidrasi) sehingga terjadi fusi pada dua permukaan (*inner membrane dan outer membrane*) sehingga membrane menjadi tidak stabil atau terjadi *lipid bilayer destabilitation* yang ditandai dengan membrane yang mengkerut dan ekor yang lurus. Ketidakstabilan membran ini berakibat pada penurunan fisiologi spermatozoa (Sum, *et al.*, 2003).

Kombinasi suplementasi akrosin dan lama inkubasi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap integritas membran spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi serta interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase integritas membrane spermatozoa kambing PE (lampiran 5). Secara biologi menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin 3,0 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing PE yang lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 3,0 μ gram memberikan respon yang baik terhadap integritas membran spermatozoa kambing, karena : (1) akrosin berperan dalam menstabilkan membran dan mempertahankan kualitas spermatozoa selama inkubasi (Bearden dan Fuquay, 1997), (2) akrosin juga berperan mempertahankan integritas pada proses transport aktif membran

spermatozoa, transport aktif mencegah hilangnya komposisi ion-ion vital dari spermatozoa (Hafez, 2002), (3) akrosin dapat berikatan dengan fosfolipid yang terdapat pada kepala spermatozoa (chen *et al*, 1993). Membran sel merupakan bagian terluar yang membatasi bagian dalam dengan lingkungan luar sel dan berperan sebagai filter pada pertukaran zat-zat intraseluler dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2000).

5.2.5. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Status Kapasitas Spermatozoa Kambing PE

Hasil penelitian rata-rata persentase status kapasitas spermatozoa kambing PE tertera pada tabel 5.6.

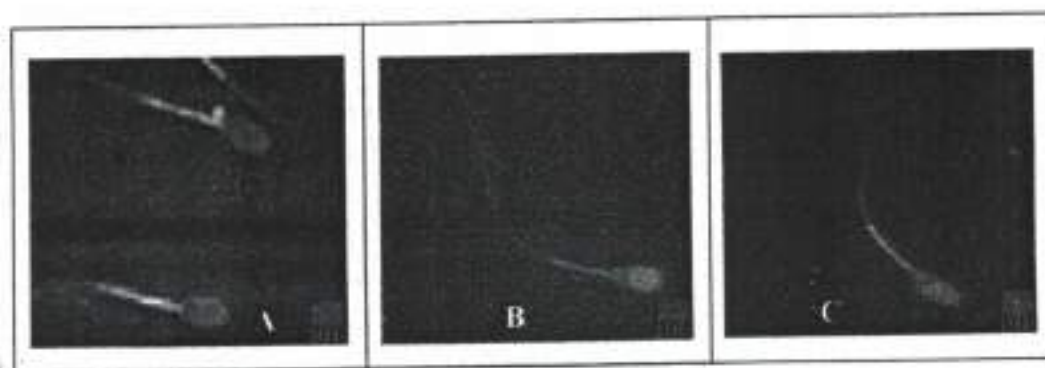
Tabel 5.6. Rataan Persentase Status Kapasitas Spermatozoa Kambing PE setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Perlakuan		Kapasitasi (%)	Reaksi Akrosom (%)	Non Kapasitas (%)	Total (%)
Akrosin (μ gram)	Inkubasi (menit)				
0	30	53,45 \pm 9,91 ^a	7,66 \pm 3,40 ^a	38,58 \pm 9,23 ^a	99,69
	60	61,64 \pm 10,46 ^a	5,61 \pm 2,08 ^b	32,75 \pm 9,19 ^a	99,90
3,0	30	61,91 \pm 11,60 ^a	9,17 \pm 4,55 ^c	27,71 \pm 4,08 ^b	98,79
	60	70,95 \pm 11,11 ^b	8,45 \pm 4,21 ^c	20,59 \pm 7,81 ^b	99,99
4,5	30	76,58 \pm 17,77 ^b	8,98 \pm 4,02 ^c	10,28 \pm 9,09 ^c	95,84
	60	80,92 \pm 9,39 ^c	11,56 \pm 4,03 ^d	7,52 \pm 7,65 ^c	100,00
6,0	30	53,71 \pm 15,56 ^a	4,40 \pm 1,02 ^b	41,87 \pm 5,05 ^a	99,98
	60	55,68 \pm 18,59 ^a	5,52 \pm 1,64 ^b	36,34 \pm 7,62 ^a	97,54
Rata-rata					99,24

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin, suplementasi akrosin 0; 3,0 μ gram, 4,5 μ gram dan 6,0 μ gram masing-masing diperoleh rata-rata

persentase kapasitas spermatozoa kambing PE adalah : 57%, 65,5%, 78%, 54%, rata-rata persentase reaksi akrosom masing-masing adalah : 6%, 8,5%, 9,5%, 4,5% dan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa kambing PE masing-masing adalah : 35%, 23,5%, 8,5% dan 36,5%. Hasil pengamatan kapasitas spermatozoa kambing PE dengan pewarnaan CTC menggunakan mikroskop *epifluorescence* pada pembesaran 400 kali (gambar 5.9.)



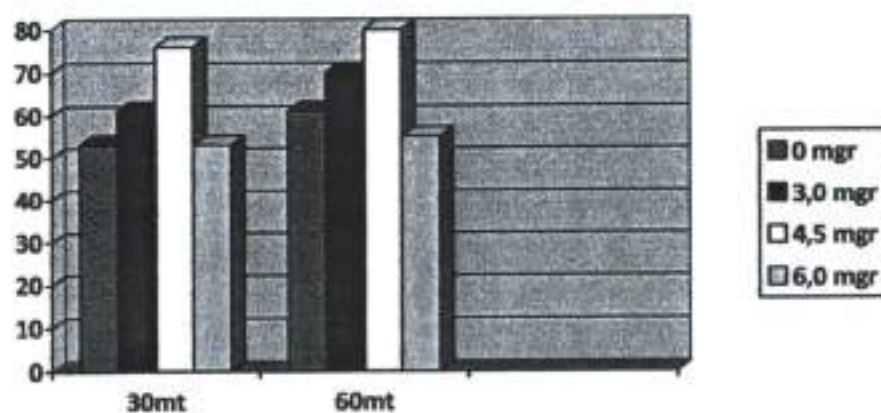
Gambar 5.9. Hasil pengamatan status kapasitas spermatozoa kambing pada proses pengenceran dengan pewarnaan CTC menggunakan mikroskop *epifluorescence* (Bar = $\frac{1}{2}$ μ m), keterangan : A. non kapasitas, B. kapasitas dan C. reaksi akrosom.

Status kapasitas spermatozoa kambing dari pewarnaan CTC di atas memperlihatkan ada tiga bentuk pendaran fluoresen pada kepala spermatozoa kambing, yaitu (1) distribusi fluoresen yang sama pada membran kepala spermatozoa (gambar 5.9A), menunjukkan spermatozoa kambing yang non kapasitas, (2) fluoresen terkonsentrasi pada daerah acrosomal (gambar 5.9B),

menunjukkan spermatozoa kambing yang mengalami reaksi akrosom. Hasil pendaran flouresen pada spermatozoa kambing (gambar 5.9.) diatas merupakan gambaran distribusi Ca^{2+} pada membran kepala spermatozoa, seperti telah dilaporkan oleh Mattiollli, *et al* (1996), Kaul *et al* (1997) dan susilawati (2005).

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase kapasitas spermatozoa kambing berkisar antara 53-61. Suplementasi akrosin 3,0 μ gram, 4,5 μ gram dan 6,0 μ gram masing-masing menghasilkan rataan persentase kapasitas berkisar antara 61-70 μ gram, 76-80 μ gram, dan 53-55 μ gram. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin sampai 0,30 μ gram dapat meningkatkan rataan persentase kapasitas spermatozoa kambing.

Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase kapasitas spermatozoa kambing tertera pada gambar 5.10.



Gambar 5.10. Rataan persentase kapasitas spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase

kapasitasi spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi dan efek lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase kapasitasi spermatozoa kambing, sedangkan interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase kapasitasi spermatozoa kambing (lampiran 6).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap kapasitasi spermatozoa kambing PE dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin, suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase kapasitasi spermatozoa kambing, sedangkan perlakuan dengan suplementasi akrosin 6,0 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase kapasitasi spermatozoa kambing PE (lampiran 6). Secara biologi menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi 6,0 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rataan persentase kapasitasi spermatozoa kambing yang lebih rendah, dengan demikian maka penambahan suplementasi akrosin 6,0 μ gram dapat menghambat kapasitasi spermatozoa kambing. Hal ini karena akrosin berfungsi mempertahankan spermatozoa agar terjadi kapasitasi dan mempercepat terjadinya reaksi akrosom pada saat fertilisasi (Mori, *et. al*, 1993).

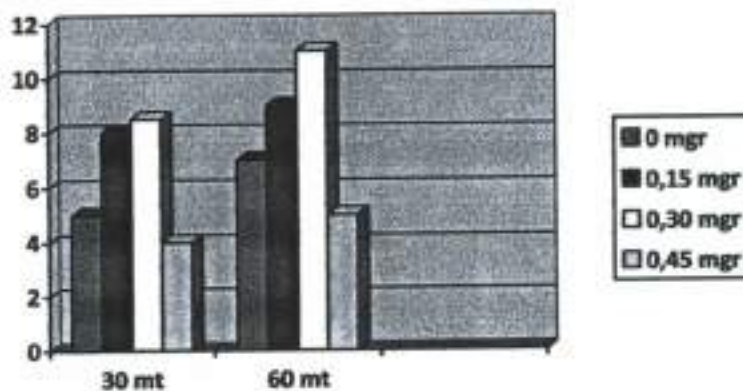
Rataan persentase kapasitasi spermatozoa dari perlakuan suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram menunjukkan terjadi peningkatan sehubungan lama

inkubasi 30 dan 60 menit masing-masing adalah : 61% dan 70% serta 76% dan 80%. Hal ini memberikan indikasi bahwa pada spermatozoa kambing mengalami peningkatan kapasitas (Mc. Donald dan Pineda, 1989). Flesch dan Gadella (2000) menyatakan bahwa kapasitas pada beberapa jenis ternak dapat bersifat *reversible* karena dalam seminal plasmanya mengandung makro molekul yang berperan sebagai faktor kapasitas. Makro molekul tersebut adalah glikokaliks yang merupakan oligosakarida dan terikat dengan protein dan lemak (Evans dan Graham, 1989; Darnel, *et al.*, 1990), sehingga spermatozoa yang telah mengalami kapasitas mampu untuk melakukan fertilisasi (Maxwell dan Watson, 1996).

Kapasitas pada spermatozoa kambing berhubungan dengan kandungan kolesterol yang rendah pada semennya. Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk kapasitas spermatozoa optimal berhubungan dengan kandungan kolesterol. Spesies hewan dengan kandungan kolesterol tinggi yaitu 25 % dari total lemak netral (manusia dan sapi) membutuhkan waktu yang lebih lama (antara 6-8 jam) untuk mencapai kapasitas optimal, sementara spermatozoa babi hutan dan kambing dengan kandungan kolesterol lebih rendah yaitu 14% dari komposisi lemak netral (Flesch dan Gadella, 2000), sehingga kapasitas yang optimal hanya membutuhkan waktu 1 sampai 2 jam (Yanagimachi, 1994).

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin menghasilkan rata-rata persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing berkisar

antara 5,61-7,66%. Perlakuan suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0% masing-masing menghasilkan rata-ran persentase reaksi akrosom berkisar antara 8,45-9,17%; 8,98-11,56 dan 4,40-5,52. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 3,0 μ gram dapat meningkatkan rata-ran persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rata-ran persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing tertera pada gambar 5.11



Gambar 5.11. Rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rata-ran persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-ran persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing,

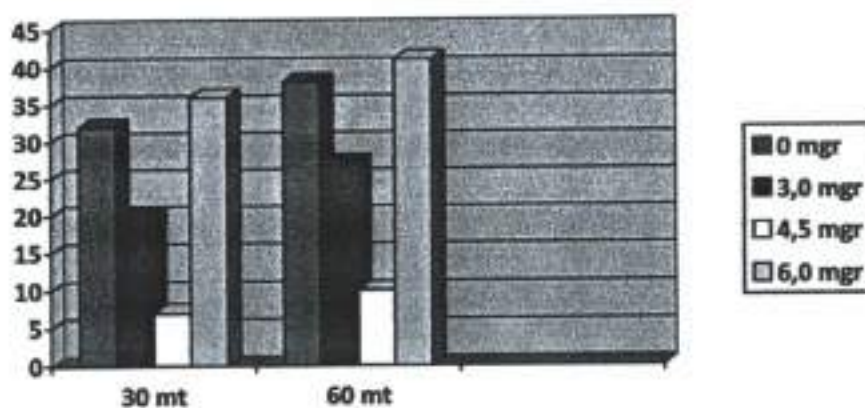
sedangkan interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing (lampiran 7).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap reaksi akrosom spermatozoa kambing dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND). Hasil analisis menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan suplementasi akrosin 6,0 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing, sedangkan perlakuan dengan suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing (lampiran 7). Secara biologi perlakuan suplementasi akrosin 4,5 μ gram pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing yang tinggi, sehingga lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini karena suplementasi akrosin 4,5 μ gram dapat mempercepat kapasitas dan meningkatkan terjadinya reaksi akrosom (Liberda, *et al.* 2001).

Reaksi akrosom hanya terjadi pada spermatozoa yang mempunyai membran utuh (Flesch dan Gadella, 2000). Selain itu reaksi akrosom berlangsung menjelang spermatozoa melakukan penetrasi pada zona pelusida /ZP (Grudzinskas dan Yovich, 1995) dan untuk dapat menetrasi ZP, spermatozoa kambing harus menjalani reaksi akrosom. Sebelum reaksi akrosom berlangsung,

spermatozoa perlu mensekresikan enzim tertentu yaitu proakrosin yang kemudian diaktifkan menjadi akrosin (Susilawati, 2003).

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin menghasilkan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa kambing berkisar antara 32,75 - 38,58. Suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram masing-masing menghasilkan rata-rata persentase non kapasitas berkisar antara 20,59 - 27,71; 7,52 - 10,28 dan 36,34 - 41,87. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 6,0 μ gram dapat meningkatkan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa kambing. Hubungan antara konsentrasi suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa kambing PE tertera pada gambar 5.11.



Gambar 5.11. Rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing PE setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-rata persentase non

kapasitas spermatozoa kambing PE. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi dan interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing PE (lampiran 8).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap non kapasitas spermatozoa kambing dilanjutkan dengan uji Jarak Nyata Duncan (JND). Hasil analisis menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin pada lama inkubasi yang berbeda berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing, sedangkan perlakuan suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μ gram pada lama inkubasi yang berbeda berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing. Secara biologi menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram pada lama inkubasi yang berbeda menghasilkan rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing yang lebih tinggi dari pada tanpa suplementasi. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin dapat meningkatkan rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing. Peningkatan rataan persentase non kapasitas spermatozoa kambing PE tertinggi diperoleh pada suplementasi akrosin 4,5 μ gram.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan dengan suplementasi akrosin 4,5 μ gram menghasilkan rataan persentase non kapasitas yang semakin meningkat dengan lama inkubasi 60

menit. Fakta ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin mampu memberikan pengaruh spermatozoa menjadi lebih siap pada proses fertilisasi, yaitu meningkatkan kapasitas dan reaksi akrosom (Mori, et al., 1993). Selain itu, akrosin juga berperan dalam mempertahankan integritas proses transport aktif membran spermatozoa. Transport aktif tersebut mencegah hilangnya komposisi ion-ion vital dari spermatozoa (Hafez, 2000).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

- a. Suplementasi akrosin 4,5 μ gram dapat meningkatkan motilitas spermatozoa kambing PE
- b. Suplementasi akrosin 6,0 μ gram dapat menurunkan motilitas spermatozoa kambing PE
- c. Suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram dapat meningkatkan viabilitas, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa kambing PE
- d. Suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 μ gram dapat menurunkan non kapasitas spermatozoa kambing PE

6.2. Saran

Suplementasi (penambahan) akrosin dengan dosis 4,5 μ gram dapat digunakan untuk meningkatkan potensi biologis spermatozoa kambing PE, sehingga dapat dipakai sebagai bahan alternatif (bioaktif) untuk perbaikan fertilitas ternak (kambing).

DAFTAR PUSTAKA

- Adel A. Zalata, Ashraf H. Ahmed and Frank H. Comhaire. 2004. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J. Androl. Dec.*, 6, 2004 : 313-318
- Aditi Chatterjee, Sagarika Kanjilal and Asok K. Bhattacharyya. 2000. Purification of human seminal acrosin inhibitor and its kinetics. *Reproductive Biology Laboratory. Department of Biochemistry, Calcutta University College of Science, 35, Ballygunge Circular Road, Calcutta 700019 India. J. Biology of Reproduction. Vol 13 no 6*
pp. 571-578
- Anonimus. 2007. *Populasi Ternak di Jawa Timur 2005 - 2007*. Dinas Peternakan Pripinsi Jawa Timur. Surabaya.
- Annop Kunavongkrit. 2005. *Manual Practice of Biomoleculer*. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. Thailand.
- Ax, R.L.; R.M. Baleato; E.A. McLaughlin; B. Nixon; M.R. Dally; B.A. Didion; B. Hafez and M.E. Belin. 2000. *Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animal*. Hafez. B. And Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kltiwer Company. Philadelphia.
- Baldi, E; L. Michael; B. Lorella; M. Monica and F. Gianni. 2000. Intracellular Event and Signaling Pathways Involved In Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity and Acrosom Reaction. *Frontier in Bioscience*. 5.110-123.
- Ba'a La Ode, 2008. *Peran D-Fruktosa dan Kuning Telur Dalam Proses Penghambatan Kapasitasi dan Kerusakan Membran Spermatozoa Kambing*. Pasca Sarjana Unibraw.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1997. *Applied Animal Reproduction*. 4th ed. Prentice - Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bergeron, A.; MH. Crete; Y. Bridle and P. Manjunath. 2004. Low Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biol. Reprod.* 70 : 708-717.
- Chang; MR. Curry and PF. Watson. 2002. *Sperm Structure and Function in Gamete the Spermatozoon*. Cambridge Reviews in Human Reproduction. Ed. J.G. Gruzinkas & J.L. Yovich, Cambridge University Press.

- Chen, Y.; M.J. Cann; T.N. Litvin; V. Lourgenko; M.L. Sinclair; R.L. Levin and J. Buck. 1999. Progesterone Induced Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa is Mediated by a Plasma Membrane Progesterone Receptor. *Biol. Reprod.* 59: 733-742.
- Darnell, J., H. Lodish., and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2nd Edition. Sci. Am. Books:141-527
- Donald's, Mc. 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fifth Edition. Edited by : Maurico H Pineda, Michael Dooley. Pp 154 - 225.
- Edda Topfer Petersen. 1999. Carbohydrate based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. Institute of Reproductive Medicine, Veterinary School of Hanover, Germany. *J Human Reproduction Update*. 1999. Vol 5 no4, pp 314 -329
- Evans, G.; and WMC. Maxwell. 1987. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Butterworth, Sidney.
- Evans, W.H. and J.M. Graham. 1989. *Membrane Structure and Function* . IRL Press. Oxford University. Oxford : 11-28.
- Flesch, F.M., and B.M., Gadella. 2000. Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in The Process of Fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469: 197-235
- Ford, W.C.L. 2006. Glycolysis and Sperm Motility; does a Spoonful of Sugar Help the Flagellum go Round. *Human Reprod.* 12 (3) : 269-274.
- Garner and Hafez, ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Philadelphia, Baltimore, New York, London.
- Gilbert, S.F. 1998. *Developmental Biology*, 2nd ed. Sinauer Association, Inc Publisher, Sunderland, Massachusetts. P.313-330.
- Goodpasture J.C., KL Polakoski and JD Zaneveld .2000. Acrosin, Proacrosin and Acrosin Inhibitor of human spermatozoa. Department of Physiology and Biophysics, University of Illinois. USA. *American Society of Andrology*, Vol1 (3): 16-27
- Grudzinskas J.G. and J.L. Yovich. 1995. *Gametes The Spermatozoa*. Cambridge University Press.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Assisted Reproductive Technology : Ovulation Manipulation, In Vitro Fertilization/Embryo Transfer (IVF/ET) in Reproduction in Farm Animal*. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia.

- Hafez, E.S.E. 2002. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia. USA. Pp 260-282.
- Hallap, JP. 2005. *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press. New Jersey.
- Harrison, R.A.P. and B.M. Gadella, 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphat-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *67* : 340-350.
- Higgins, J.E. and A.P.Klinbaun, 1985. *Design Methodology For Randomized Clinical Trial With an Emphasis on Contraseptive Research*. Family Health International.
- Isnaini. N. 2006. Peran Trehalosa dalam Pendinginan dan Pembekuan Semen kambing Boar. Disertasi. Program Pascasarjana. Unibraw Malang.
- Jainudeen, M.R. and E.S.E. Hafez. 2000. *Sheep and Goats in Reproduction in Farm Animal*. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia.
- Jones, G.A.; AG. Sacco and MG. Subramania. 1992. Histology of Female Rabbit Immunized with Deglycosylate Zona Pellucida Macromolleculer of Pig. *J. Reprod. Fert.* 95 : 513-525.
- Kaul. G.; S. Singhs; K.K. Gandhi and S.R. Anand. 1997. Calcium Requirements and Time Course of Capacitation of Goat Spermatozoa Asseted by Clourtetra cycline Assay. *J. Androl.* 29(5): 243-251.
- Liberda J.; M. Kraus; H. Ryslava; V. Vlasakova; V. Jonakova and M. Ticha. 2001. D-Fructosa Binding Proteins in Bull Seminal Plasma, Isolation and Characterization of Biochemistry. Charles University. Czech Republic.
- Lindsay, D.R.; KW. Entwistle and A. Winantea. 1982. *Reproduksi Ternak di Indonesia*. Fakultas Peternakan dan Perikanan. Unibraw Malang.
- Mc.Donald, LE. and MH. Pineda. 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Macpherson, ML., et al. 2002. Acrosin and Pro-acrosin Binding Protein 2 and 5 Goat Seminal Plasma. Association with Sperm Characteristics and Fertility. *Biology Reproduction.* 67 : 648-654.
- Mattioli, M.; B. Barboni; F. Lucini and E. Seren. 1996. Identification of Capacitation in Boar Spermatozoa by Chlortetracycline Staining. *Theriog* 4: 331-373.

- Maxwell, W.M.C. and P.F. Watson 1996. Recent Progress in Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*. 42: 231-240
- Mori, K.; T.Daiton; M. Kumada; M. Maeda; M. Maegawa and K. Hirano. 1993. European Society of Human Reproduction and Embryology. Departement of Obstetrics and Gynecology. School of Medicine. University of Tokushima . Japan.
- Nur, Z.; I. Dogan; U. Gunay and M.K. Soylu. 2005. Relationships between Sperm Membrane Integrity and other Semen Quality Characteristics of the Semen of Saanen Goat Bucks. *Bull Vet Inst Pulawy*. 49: 183-187.
- Polakoski KL and Zaneveld LJD. 2000. Proteinase and protein inhibitor in andrology. Human semen and fertility regulation in men. CV Mosby Company, St Louis London. P564.
- Rosatti, M.I.; M.T. Beconi; and M. Cordoba. 2003. Proacrosin -acrosin activity in capacitated and acrosome reacted - sperm from cryopreserved bovine semen. School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires. Argentina. *J. Biocell*, 28 (3): 311-316. 2003
- Rigau, T., M. Rivera, M.J. Palomo, J.M. Fernandez, T. Mogas, J. Ballester, J.J. Guinovart and J.E. Rodriguez. 2002. Differential Effects of Glucose and Fructose on Hexose Metabolism in Dog Spermatozoa. *Reproduction*. 123 : 579-591.
- Said, S.; E.M. Kaiin; F. Afiani; M. Gunawan and B. Tappa. 2004. Pengaruh Metode dan Lama Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI.
- Saili, T. 1999. Efektifitas Penggunaan Albumin sebagai Medium Separasi dalam upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Salisbury, G.W dan N.L. Van Demark. 1996. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. 269-371.
- Sarantina, 2006. Analisa Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa pada Berbagai Bangsa Sapi Menggunakan Computer Assisted Semen Analysis (CASA). Thesis Pascasarjana Unibraw. Malang.
- Steel, RGD and H. Torrie. 1989. Principles and Procedures of Statistics. International Student Edition. McRaw-Hill Kogakusha, Ltd. Tokyo. Japan.
- Suhana, Nana, Rafiah dan Siti R. 2002. Defereinsiasi Embriologi Dalam Tingkat Seluler, Subseluler dan Molekuler. Penerbit FK Universitas Indonesia Jakarta. 374.

- Sum, A.K.; R. Faller and J.J. de Pablo. 2003. Moleculer Simulation Study of Phospholipid Bilayer and Insights of the interactions with Disaccharides. *J. Biophys.* 85 : 2830-2844.
- Suryadi; T.Susilawati dan N. Isnaini. 2004. Uji Coba Produksi Semen Beku Kerjasama Teknis antara Fapet Unibraw dan Proyek Pembinaan Peningkatan Produksi Peternakan, Malang.
- Susilawati, T. 2003. Fisiologi Spermatozoa; Kapasitas; Reaksi Akrosom dan Fertilisasi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati, T. 2007. Peran Insulin Like Growth Factor 1 Complex Plasma Seminalis Kambing Terhadap Potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. Program Pascasarjana Unair Surabaya.
- Sumitro, SB.; dan T. Susilowati. 1998. Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistem dan Inverted. Laboratorium Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Unibraw Malang.
- Toelihere, RM. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa. Bandung
- Tambing, SN.; MR. Toelihere; TL. Yusuf dan IK. Sutana. 2000. Pengaruh Gliserol dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing PE. Pusat Penelitian Peternakan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Deptan. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. Vol. 5 no. 2.
- Wabershi, A.C.; WC. Ford. 1994. The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa. *J.Androl* 6(4) : 22-32.
- Wicaksono, L. 1999. Kapasitas Spermatozoa Kambing Pada Keadaan Penghilangan Seminal Plasma dan Penambahan Seminal Plasma sapi. Thesis. Program Pascasarjana. Unibraw malang.
- Williams, RM; JK. Graham and RH. Hammerstedt.2001. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to under go the acrosome reaction and penetrate ova. *J. Biology of Reproduction*. Biochemistry Program, Pennsylvania State University. vol 44 1080-1091.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization in : *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. Raven Press. New York, NY, USA. V.1, 189-317.
- Zamanti, D. 2003. Uji Reversibilitas Kapasitas Spermatozoa Sapid an Kambing dengan Perbedaan Konsentrasi D-Fruktosa. Tesis Pascasarjana. Unibraw malang.
- Zenichiro, K; Herliantin; Sarastina. 2002. Technology of Frozen Semen Processing for Cattle. Balai Inseminasi Buatan Singosari. Malang.

Zervos, IA; MP. Tsantarliotou; G. Vatzias; P Goulas and IA. Taitzoglou, 2005; Effects of dietary vitamin A intake on acrosin and plasminogenactivator activity of ram spermatozoa; *J. Reproduction and Fertility*, 129: 707-715 Nov.2005.