

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2014



PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN)
TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG)
PADA FERTILISASI IN-VITRO

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Oleh :

Dr. Budi Utomo, M.Si., drh. NIDN 0018055904
Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phill., drh. NIDN 0005025103

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2014 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Desentralisasi
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Nomor : 965/UN3/2014, Tanggal 28 Februari 2014

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEPTEMBER 2014

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2014



PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN)
TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG)
PADA FERTILISASI IN-VITRO

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Oleh :

Dr. Budi Utomo, M.Si., drh. NIDN 0018055904

Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phill., drh. NIDN 0005025103

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2014 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Desentralisasi
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Nomor : 965/UN3/2014, Tanggal 28 Februari 2014

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEPTEMBER 2014

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Pengaruh penambahan enzim *α serine protease* (akrosin) terhadap perolehan embrio domba ekor gemuk (EG) pada fertilisasi in-vitro

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Budi Utomo, M.Si.,drh.

NIDN : 0018055904

Jabatan Fungsional : Lektor Kepala/IV-a

Program Studi : Kedokteran Hewan

No. HP : 081553160631

Alamat e-mail : budi_reprovet@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., drh.

NIDN : 0005025103

Perguruan Tinggi : Fak. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Alamat Institusi : Fakultas Kedokteran Hewan Kampus C Unair

Telp/Fax/E-mail : 031-5992785 / 031-5993015 / fkh@unair.ac.id

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,-

Biaya Keseluruhan : Rp. 100.000.000,-

Mengetahui
Dekan Fak. Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga


Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D,drh.
NIP. 195312161978062001

Surabaya, 31 Oktober 2014
Ketua Peneliti,



Dr. Budi Utomo, MSI, drh.
NIP. 195905181987011002

Menyetujui
Ketua L.FPM
Universitas Airlangga


Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.
NIP. 195908051987011001

PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN) TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG) PADA FERTILISASI IN-VITRO

RINGKASAN

Perkembangan populasi ternak di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan, bahkan di Jawa Timur pada tahun 2007 terjadi penurunan populasi beberapa jenis ternak yaitu domba sebesar 3,24 %, sedangkan ternak yang lain mengalami kenaikan yang masih jauh dari harapan. (Anonimous, 2007). Pemerintah melalui program inseminasi buatan berusaha mengatasi penurunan populasi ternak domba tersebut. Namun demikian sejauh ini usaha pemerintah tersebut belum membuahkan hasil yang optimal.

Salah satu faktor utama penyebab turunnya populasi ternak domba tersebut adalah adanya gangguan reproduksi, terutama gangguan fertilisasi yaitu gagalnya sel sperma untuk menembus sel telur. Kegagalan penetrasi sel sperma kedalam sel telur, disebabkan oleh berkurangnya potensi enzim yang ada pada spermatozoa tersebut, khususnya enzim akrosin yang berfungsi dalam penetrasi zona pelusida pada sel telur. Di Indonesia penelitian tentang peran dan fungsi akrosin dalam fertilisasi, khususnya penetrasi pada zona pelusida sel telur belum pernah dilaporkan.

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah mengetahui peran akrosin terhadap potensi dan kualitas spermatozoa serta peran akrosin terhadap penetrasi zona pelusida. Sedangkan tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah penyediaan protein spesifik berupa akrosin untuk perbaikan fertilitas ternak khususnya domba.

Penelitian tahun kedua suplementasi akrosin sperma domba EG dosis 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μ g terhadap penetrasi zona pelusida. Hasilnya yaitu : suplementasi akrosin 3,0 μ g selama inkubasi 30 menit sudah cukup untuk pembelahan sel (cleavage).

Kata kunci : akrosin, fertilitas ternak, zona pelusida, fertilisasi in-vitro & cleavage

PRAKARTA

Pertama-tama kami panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan berkah, rahmad, taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan kemajuan penelitian ini. Shalawat dan salam selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing umat manusia dari kebodohan menuju kemuliaan.

Saya ucapkan terimakasih kepada Pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Nasional melalui Dit. Litabmas, Ditjen Dikti. Kemendikbud.

Dengan selesainya penulisan laporan kemajuan penelitian ini, perkenankan saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
4. Saya ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan bagian Ilmu Kemajiran Dr. Herry Agoes Hermadi, drh., M.Si.; Rimayanti, drh., M.Kes.; Indah Norma Triana, drh., M.Si.; Hermin Ratnani, drh., M.Kes.

Saya menyadari sepenuhnya "tiada gading yang tak retak", bahwa meskipun telah diusahakan disusun dengan sebaik-baiknya, namun diyakini masih banyak kekurangan pada laporan kemajuan penelitian ini. Untuk itu masukan, kritik dan saran untuk perbaikan sangat diharapkan. Semoga laporan kemajuan penelitian ini dapat bermanfaat bagi dunia ilmu pengetahuan maupun bagi masyarakat. Amien.....

**SISTEMATIKA LAPORAN KEMAJUAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**

DAFTAR ISI

	Halaman
1. HALAMAN SAMPUL.....	o
2. HALAMAN PENGESAHAN.....	i
3. RINGKASAN.....	ii
4. PRAKARTA.....	iii
5. DAFTAR ISI.....	iv
6. DAFTAR TABEL.....	v
7. DAFTAR GAMBAR.....	vi
8. DAFTAR SINGKATAN.....	viii
9. BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
10. BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
11. BAB 3. METODE PENELITIAN.....	12
12. BAB 4. HASIL YANG DICAPAI.....	19
13. BAB 5. PEMBAHASAN.....	25
14. BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Rerata Persentase Keberhasilan Maturasi Oosit Domba.....	19
Tabel 4.2. Rerata Persentase Pembelahan Sel Hasil Fertilisasi In-vitro Setelah Suplementasi Akrosin	21

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Domba Ekor gemuk Jantan Dewasa.....	4
Gambar 2.2. Tiga enzim dominan yang ada pada spermatozoa.....	9
Gambar 4.1. Rerata Persentase Keberhasilan Maturasi Oosit Domba Pada Maturasi ke 1, 2, 3, dan 4 Pada Media TCM	20
Gambar 4.2. Oosit Sebelum dan Sesudah Maturasi Dengan Media Maturasi TCM 199 Selama 24 jam	21
Gambar 4.3. Rerata Persentase Pembelahan Sel Pada Oosit Domba Setelah Di Fertilisasi In-vitro Selama 24 jam.....	22
Gambar 4.4. Hasil Fertilisasi In-vitro Pada Oosit Domba EG Dengan Suplementasi Akrosin	23

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Perkembangan populasi ternak di Jawa Timur belum mencapai keadaan yang menggembirakan, bahkan pada tahun 2007 terjadi penurunan populasi beberapa ternak yaitu domba & domba sebesar 2,24 %, sapi 1,86 % dan kerbau 3 % sedangkan ternak yang lain mengalami kenaikan yang masih jauh dari harapan (Anonymous, 2007). Program pemerintah untuk meningkatkan populasi ternak domba & domba yaitu melalui inseminasi buatan (IB) & kawin alam (KA)

Pada tahun 2007 secara nasional jumlah cembe (anak domba & domba) yg dilahirkan melalui Inseminasi Buatan (IB) maupun Kawin Alam (KA) masih dibawah satu juta ekor (Tjeppy Soedjana, 2008). Kendala yang sering dihadapi dalam peningkatan populasi ternak domba & domba adalah gangguan fertilisasi yang meliputi gagalnya sel sperma untuk menembus sel telur (Hafez, 2002)

Kegagalan penetrasi sel sperma terhadap zona pelusida sel telur adalah berkurangnya potensi enzim α *serine protease* (*akrosin*), kegagalannya mencapai 20-30% (Zalata, 2004; Hafez, 2002). *Akrosin* adalah enzim protease yang terdapat pada akrosomal sperma dan sangat penting untuk proses fertilisasi. *Akrosin* dikeluarkan selama reaksi akrosom, ini ditunjukkan dengan penetrasi spermatozoa kedalam zona pelusida ovum.

Bertitik tolak dari permasalahan tersebut, maka tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah uji potensi biologis protein spesifik (*akrosin*) yang terdapat pada akrosom spermatozoa domba EG dan suplementasi dari *akrosin* sebagai bahan *bioaktif* untuk perbaikan fertilitas ternak, yaitu dengan fertilisasi in-vitro. Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah penyediaan protein spesifik dari *akrosin* dalam perbaikan fertilitas ternak terutama untuk keperluan *embrio transfer*.

1.2. Tujuan Penelitian

1.2.1. Tujuan Umum

1. Untuk mengetahui suplementasi enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG (Ekor Gemuk) terhadap peningkatan kualitas dan potensi spermatozoa.
2. Untuk mengetahui pengaruh suplementasi enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG terhadap peningkatan fertilisasi in-vitro.

1.2.2. Tujuan Khusus

1. Memanfaatkan enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG sebagai *media kapasitas* spermatozoa pada proses *fertilisasi*
2. Enzim α *serine protease* (*akrosin*) dapat mempertahankan kualitas spermatozoa domba EG sehingga dapat digunakan untuk *meningkatkan kualitas dan potensi spermatozoa*
3. Enzim α *serine protease* (*akrosin*) yang diisolasi sebagai bahan (produk) *bioaktif* dapat digunakan untuk perbaikan fertilitas ternak domba *sehingga dapat meningkatkan populasi melalui transfer embrio*.

1.3. Luaran

Penelitian ini diharapkan dipublikasikan pada Jurnal Ilmiah Nasional serta sebagai Bahan Ajar bagi mahasiswa semester VII Fakultas Kedokteran Hewan Unair

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Domba Ekor Gemuk (EG)

Sejarah mencatat bahwa domba ekor gemuk yang ada di Indonesia kemungkinan berasal dari Afrika yang dibawa oleh pedagang Arab, Spanyol pada abad ke 17, serta dibawa oleh pemerintah Hindia Belanda di abad ke 18. Banyak yang menganggap bahwa domba ekor gemuk merupakan domba asli Indonesia yang berasal dari Jawa Timur. Karakteristik Domba Ekor Gemuk

1. Berukuran sedikit lebih besar dibandingkan dengan domba lokal,
2. Memiliki pola warna tubuh putih, wool kasar tetapi rapi, kepala ringan dengan bentuk muka melengkung (*concaf*), tipe telinga kecil dengan arah menyamping dan mendatar,
3. Kebanyakan Pejantannya tidak bertanduk dan hanya sedikit yang mempunyai tanduk kecil, sedangkan betinanya tidak bertanduk.
4. Memiliki ekor dengan ukuran yang tebal dan lebar.
5. Domba ini merupakan *domba pedaging* atau *domba potong* , berat jantan dewasa antara 40–60 kg, sedangkan berat badan betina dewasa 25–35 kg.
6. Tinggi badan pada jantan dewasa antara 60 – 65 cm, sedangkan pada betina dewasa 52 – 60 cm.

Domba Ekor Gemuk ini mampu beradaptasi pada kondisi kering dan panas dimana penyimpanan cadangan makanan dalam tubuh dilakukan dibagian ekor dan dimanfaatkan apabila diperlukan. Di daerah seperti Sumenep, Pamekasan, Situbondo, Probolinggo, dan Pasuruan. Wilayah penyebaran tersebut merupakan daerah pantai dengan curah hujan yang relatif kurang. Lahan-lahan dengan tanaman rumput yang berukuran pendek yang menjadi kesukaan domba masih cukup banyak.



Gambar 2.1. Domba Ekor Gemuk Jantan Dewasa

Masa pubertas Domba EG dimulai pada umur 7 bulan. Masa pubertas ini umumnya dipengaruhi oleh faktor keturunan, iklim dan makanan. Walaupun domba EG jantan sudah mencapai pubertas pada umur 6-8 bulan, namun menurut Sarwono (2002) sebaiknya perkawinan dilakukan setelah mencapai umur 10-18 bulan.

2.2. 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*) diatas 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 ke tujuh 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.*

2.3. 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.

2.4. Tinjauan Tentang Akrosin

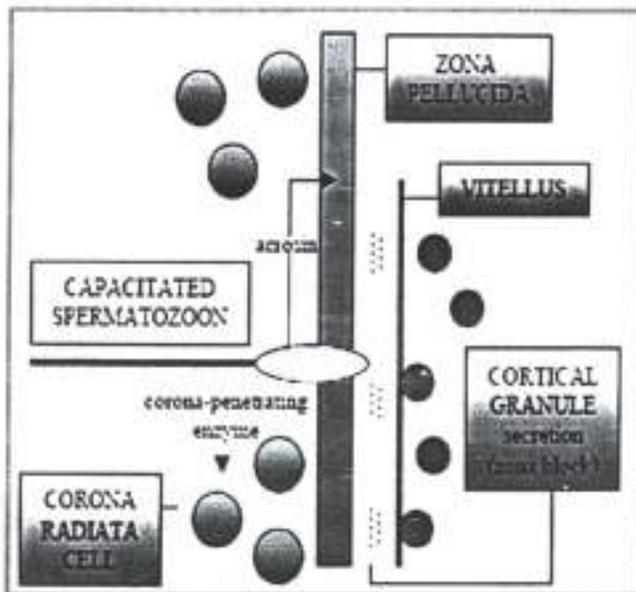
Pada testis mamalia (termasuk domba) terdapat spermatozoa yg mengandung beberapa sistem enzim, salah satu satunya adalah proacrosin yg berfungsi mengaktifkan akrosin dan memegang peranan penting dalam fertilisasi terutama dalam penetrasi zona pelusida sel telur. Akrosin disebut juga enzim *proteinase*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



2.5. 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 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 diselimuti oleh reseptor yang konfigurasiya berkomplemen dengan molekul yang menyelimuti 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.

2.6. Kapasitas dan Reaksi Akrosom

Kapasitasi dan reaksi akrosom adalah dua proses yang sangat fundamental dalam proses fertilisasi. Secara fisiologis kapasitasi 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; Gordon, 2000). Kapasitasi adalah suatu komplek 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 (Gordon, 2000). Pada saat kapasitasi secara molekuler terjadi modifikasi kalsium ion intraseluler dan ion-ion lainnya, perubahan lipid dan fosfolipid membran, perubahan fosforilasi protein dan aktivitas 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_2^- , K^+ . Tingginya konsentrasi ion-ion intraseluler akan merangsang terjadinya reaksi akrosom. Komponen yang dapat merangsang kapasitasi adalah bicarbonat (CO_2) 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 ZP_3 . 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-nolekul pada segmen equatorial spermatozoa yang diikuti dengan fusi dari membran spermatozoa dengan oolema dari oosit. Mekanisme berpindahnya molekul-nolekul 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).

BAB 3 METODE PENELITIAN

Pada penelitian suplementasi akrosin spermatozoa domba ekor gemuk terhadap potensi biologis spermatozoa hasil sentrifugasi, dilakukan pemeriksaan terhadap spermatozoa yang meliputi : motilitas, viabilitas, membran plasma utuh spermatozoa (MPU), tudung akrosom utuh (TAU) (penelitian tahun pertama), kapasitas dan reaksi akrosom. Fertilisasi in-vitro dilakukan dengan spermatozoa yang sudah disuplementasi *akrosin* maupun tanpa *akrosin* dan dilihat angka keberhasilan fertilisasinya (penelitian tahun kedua).

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung 2 bulan, dan dilakukan di 3 tempat, yaitu aplikasi isolat akrosin pada potensi biologis spermatozoa domba hasil sentrifugasi dilakukan di laboratorium kemajiran FKH Unair. Fertilisasi in-vitro dilakukan di Laboratorium In-Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Unair.

3.2. Penelitian suplementasi akrosin terhadap potensi dan kualitas spermatozoa dilanjutkan dengan fertilisasi in-vitro

Pada penelitian suplementasi akrosin terhadap potensi biologis spermatozoa adalah untuk mengetahui peran akrosin pada spermatozoa domba ekor gemuk terhadap persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), kapasitas, reaksi akrosom spermatozoa hasil sentrifugasi. Fertilisasi in-vitro dilakukan dengan dan tanpa suplementasi akrosin kemudian dilihat angka keberhasilan fertilisasinya.

3.2.1. 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 pemberian medium BO, akrosin 3,0 µgram, 4,5 µgram dan 6,0 µgram. Sedangkan faktor inkubasi (B) terdiri dari 2 taraf yaitu waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit. Masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ulangan.

Skema rancangan penelitian: peran enzim *α serine protease (akrosin)* pada spermatozoa domba ekor gemuk terhadap *potensi biologis* spermatozoa dan *fertilisasi in-vitro*

Skema rancangan penelitian tahun ke 2 : peran enzim *proteinase (akrosin)* pada spermatozoa kambing peranakan etawa terhadap penetrasi *zona pelusida sel telur*

Perlakuan	Medium	Pengamatan Penetrasi zp
Fertilisasi In-vitro	Sel telur + Spz Sel telur + Spz + 3,0 µg Akr Sel telur + Spz + 4,5 µg Akr Sel telur + Spz + 6,0 µg Akr	

Keterangan :

- Spz : Spermatozoa
- ZP : Zona Pelusida
- Akr : Enzim *α serine proteinase/akrosin*

3.2.2. Bahan Dan Alat Penelitian

3.2.2.1. Bahan Penelitian

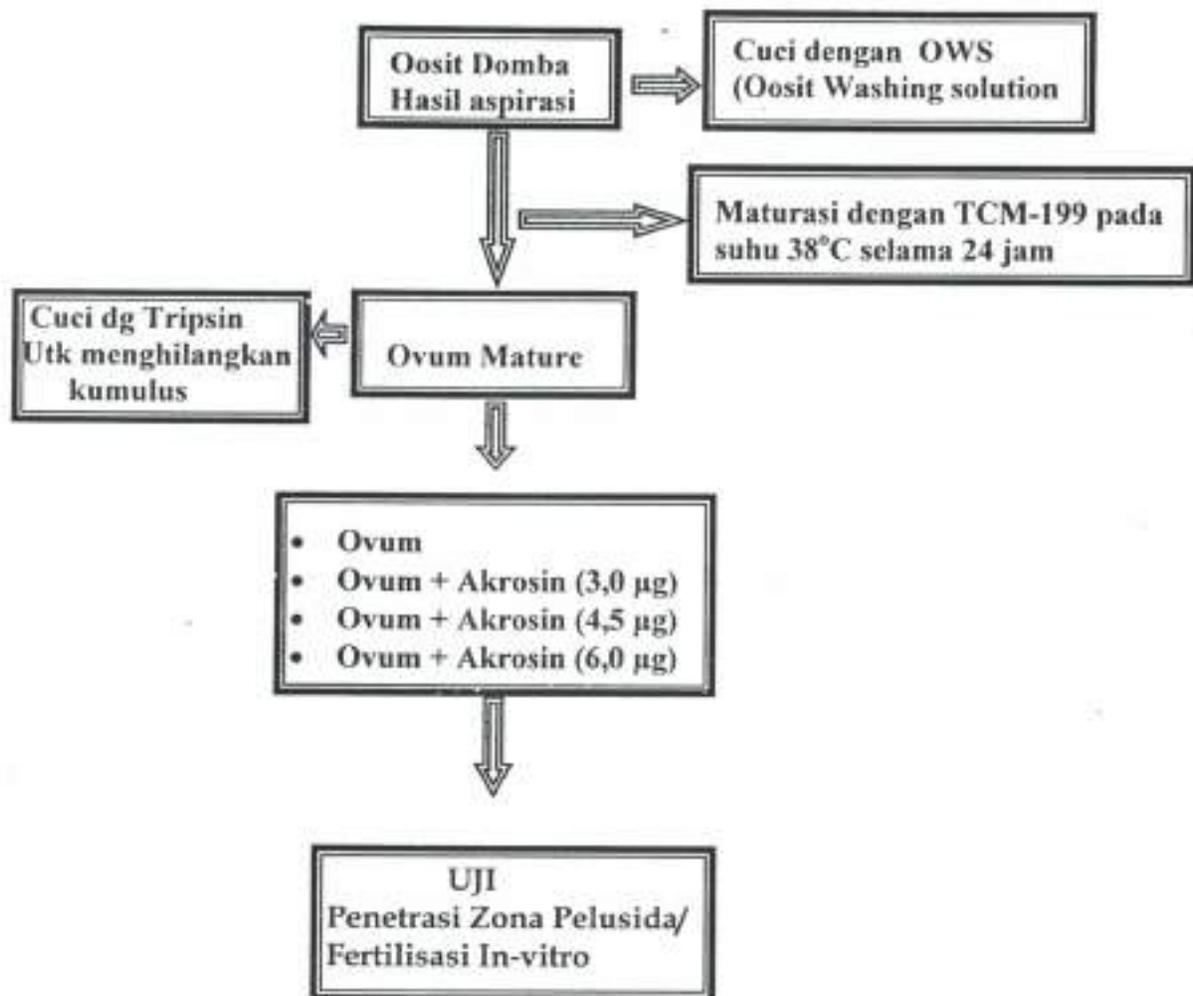
Bahan yang digunakan adalah enzim akrosin dari spermatozoa domba ekor gemuk (EG) hasil elusi, semen domba yang ditampung dari domba EG dalam kondisi sehat dan mempunyai libido tinggi, larutan hipoosmotik 0,032 M (7,35 g Natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan ke dalam 1 liter akuades), formalin, eosin negrosin, NaCl 3%, NaCl fisiologis, pewarnaan Chlortetracyclin (CTC) terdiri dari : (CTC Fixative, DABCO, asam trikloroasetat

20%, HCl 1N, Natrium thiobarbiturat 1%), nitrogen cair, egg yolk sitrat, pewarnaan FITC (Fluorescen Iso Thio Cyanate) , media maturasi (TCM₁₉₉=Culture Tissue Medium +SE=Serum Estrus), media fertilisasi(TCM₁₉₉=Tissue Culture Medium+FCS=Foetal Calf Serum), media BO (Brackett and Olliphant), media pencuci oosit (OWS= Oocyte Washing Solution) dan media kapasitasi spermatozoa (EBSS = Early Balanced Salt Solution)

3.2.2.2. Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah tabung berskala, tabung sentrifus, alat sentrifus, gelas objek, gelas penutup, inkubator anaerob, mikroskop fase kontras, mikroskop epifluoresen, spektrofotometer, container straw, straw domba EG, cawan petri, spuit dan jarum suntik 18G, laminar floor, lemari es, water bath, timbangan analitik, pH meter, pengaduk magnetik, eppendorf, pipet eppendorf, foto digital.

4.2.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahun ke 2 : Uji akrosin terhadap potensi biologis spermatozoa hasil sentrifugasi



Penelitian Tahun ke 2

a. Aspirasi Oosit dan Pengamatannya

Prosedur Aspirasi Oosit

Sebelum melakukan aspirasi oosit, lantai dan meja tempat bekerja harus dihapus hama terlebih dahulu dengan menggunakan alkohol 70%. Ovarium dicuci sebanyak 2-3 kali menggunakan larutan garam fisiologik bersuhu 30°C, kemudian

ovarium ditempatkan dalam gelas baker dan disimpan dalam waterbath dengan suhu 38°C (Djuwita, dkk. 2005). Selanjutnya spuit (alat suntik) diisi dengan 1-1,5 ml media Oosit Washing Solution (OWS), kemudian jarum suntik ukuran 18G ditusukkan ke bagian parenkim ovarium dekat folikel. Dilakukan aspirasi folikel berdiameter 2-5 mm yang berada dekat titik tusuk jarum (tanpa harus mencabut jarum terlebih dahulu), setelah cairan folikel terhisap semua atau apabila isi alat suntik (spuit) telah mencapai 3-4 ml maka cairan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang steril dan disimpan di dalam waterbath. Saat menghisap cairan atau memindahkan dalam cawan harus dilakukan dengan hati-hati agar tidak merusak kumulusnya. Dalam setiap pengambilan, rata-rata dapat ditampung 4-5 oosit, sedangkan setiap kali melakukan fertilisasi in vitro diperlukan 60-80 ovum.

Pengamatan dan Klasifikasi Oosit

Cairan aspirasi dengan isinya dituang dari tabung reaksi ke dalam cawan petri diameter 90 mm. Kemudian disiapkan cawan petri kecil berdiameter 35 mm yang berisi media OWS untuk pencucian oosit, setelah itu oosit diambil dengan pipet pasteur yang diameter ujungnya lebih besar sedikit dibandingkan dengan diameter oosit (hati-hati agar sel kumulus tidak rusak). Oosit dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media OWS dan dicuci sebanyak 2-3 kali, selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop untuk membuat klasifikasi. Hanya oosit berkumulus yang ditanam dalam TCM₁₉₉.

b. Pematangan Oosit In-Vitro

Semua oosit terlebih dahulu dicuci sebanyak 2-3 kali dalam cawan petri yang berisi TCM₁₉₉ sebanyak 2,5-3 ml. Kemudian dipindahkan ke dalam medium

maturasi (pematangan) TCM₁₉₉ yang ditambah serum 10%. Mula-mula 80 oosit dimasukkan ke dalam medium tetes 500 µl, kemudian medium diisi tetes 100 µl masing-masing sebanyak 20-25 oosit dan diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ kelembaban 95-100%, suhu 38°C selama 20-24 jam.

C. Pencucian Oosit

Oosit yang sudah diinkubasi selama 20 – 24 jam dikeluarkan dari inkubator CO₂, kemudian dilakukan pencucian sekitar 20 menit sebelum fertilisasi. Untuk mencuci oosit setelah maturasi digunakan larutan OWS (*Oosit Washing Solution*). Tiap kelompok (20-25 oosit) dicuci sebanyak 2-3 kali, kemudian dihitung jumlah oositnya yang mature (matang).

d. Fertilisasi In Vitro pada Media TCM₁₉₉

Prosesnya berlangsung sama seperti inseminasi, namun yang dimasukkan adalah sel oositnya. Pertama-tama tetes spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi 1 jam pada media TCM₁₉₉ dikeluarkan dari inkubator CO₂. Kemudian ke dalam tetes spermatozoa yang sudah disuplementasi akrosin dosis 0; 3.0; 4.5 dan 6.0 µg dimasukkan sebanyak 20-25 oosit tiap tetesnya dan diinkubasi ke dalam inkubator CO₂ selama 24 jam pada suhu 38,5°C.

e. Pencucian Oosit Setelah Dibuahi Pada Media TCM₁₉₉

Cawan petri dikeluarkan dari inkubator CO₂ dan oosit diambil untuk dicuci 2 kali menggunakan media OWS. Selanjutnya oosit dipindahkan ke dalam cawan petri

berdiameter 35 mm berisi media TCM₁₉₉ sesuai dosis akrosin 0; 3.0; 4.5; dan 6.0. Kemudian dihitung masing-masing keberhasilan fertilisasinya.

3.2.5. Variabel Penelitian

Variabel bebas : lama inkubasi, dosis akrosin

Variabel tergantung : angka fertilisasi in-vitro.

Variabel kendali : kecepatan dan lama sentrifugasi, medium, kualitas semen beku

3.2.7. Analisa Data

Data persentase angka keberhasilan fertilisasi diuji dengan Anava pada tingkat kepercayaan 5%, bilamana terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan Uji BNJ (Beda Nyata Jujur)

BAB 4

HASIL PENELITIAN

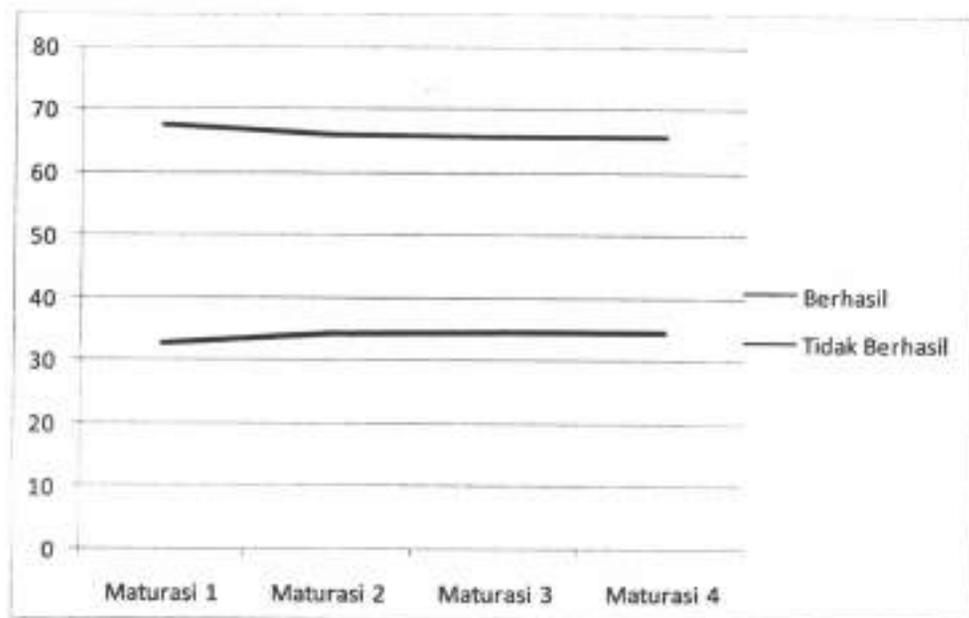
4.1.1. Hasil maturasi oosit domba selama 24 jam pada inkubator CO₂

Dari 2 kali aspirasi pada folikel ovarium domba sebanyak 78 ovarium didapatkan 76 oosit yang siap untuk dimaturasi selama 24 jam pada inkubator CO₂. Hasil dari maturasi tersebut dapat dilihat pada tabel 5.10. di bawah ini

Tabel 4.1. rerata persentase keberhasilan maturasi oosit domba

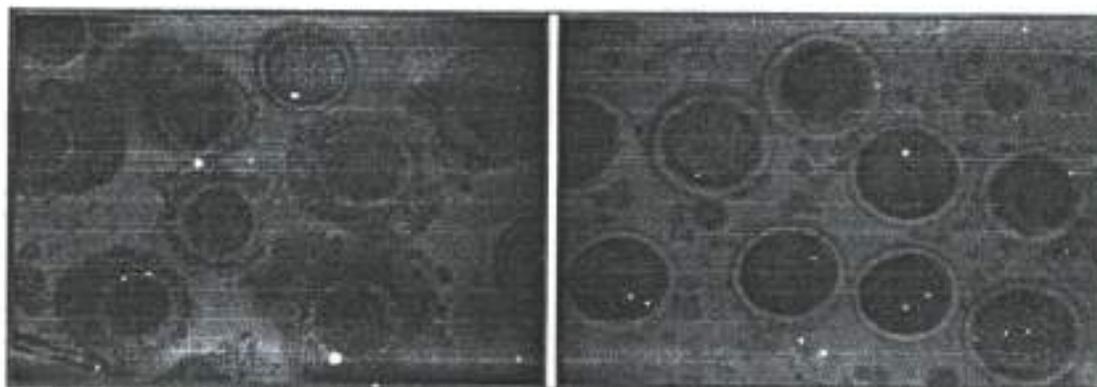
Maturasi	Jumlah oosit yang dimaturasi	Hasil maturasi oosit	Persentase Maturasi	χ^2
Maturasi 1	40	27	67,50	$\chi^2 : 0.099$ $B : 0.922$
Maturasi 2	38	25	65,79	
Maturasi 3	35	23	65,71	
Maturasi 4	32	21	65,62	
Jumlah	145	96	rerata 66,16	

Dari tabel 5.10. di atas tampak bahwa rata-rata persentase keberhasilan maturasi hari pertama dan kedua adalah 66.16%. Angka tersebut sedikit dibawah dari yang dilakukan oleh Yanagimachi (1994) pada maturasi sapi yaitu 75.60%. Pada umumnya keberhasilan maturasi ditentukan oleh lingkungan, media maturasi dan peralatan yang dipakai (Supriatna dan Pasaribu 2002). Variabel terpenting dalam seleksi peralatan adalah : keandalan (*dependability*), dapat diulang (*reproducibility*) dan berfungsi dengan baik (*service*). Media maturasi tergantung dari komposisi dan cara membuatnya, sedangkan yang dimaksud dengan lingkungan adalah kondisi dimana ovarium diperoleh yaitu di rumah potong hewan (RPH) dan sudah berapa lama domba tersebut dipotong.



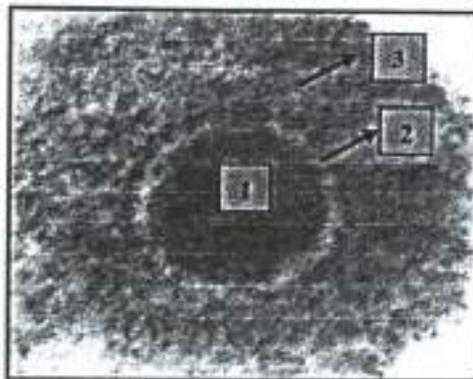
Gambar 4.1. Rerata Persentase Keberhasilan Maturasi Oosit Domba EG Pada Maturasi ke 1, 2, 3 dan 4 Pada Media TCM₁₉₉ selama 24 jam

Setelah dilakukan uji Chi-Square maka tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p \geq 0.05$) antara persentase hasil maturasi 1, 2, 3 dan 4 (lampiran 8). Data di atas menunjukkan bahwa setiap melakukan maturasi oosit kambing akan mendapatkan hasil yang sama, untuk lebih jelasnya hasil maturasi dapat dilihat pada gambar 5.2.17 di bawah ini :

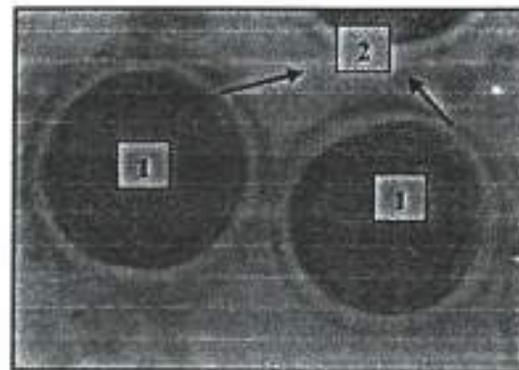


Oosit Domba Hasil Aspirasi Sebelum dimaturasi perbesaran 400x

Oosit Domba Hasil Maturasi Selama 24 jam



Gambar A



Gambar B

Gambar 4.2. Oosit sebelum dan sesudah maturasi dengan media maturasi TCM 199 selama 24 jam perbesaran 400x

Keterangan :

- Gambar A : Ovum yang berkumulus (belum dimaturasi)
- Gambar B : Ovum yang tidak berkumulus (hasil maturasi)
- Nomer 1 : Materi Inti
- Nomer 2 : Zona Pelusida
- Nomer 3 : Kumulus Oophorus

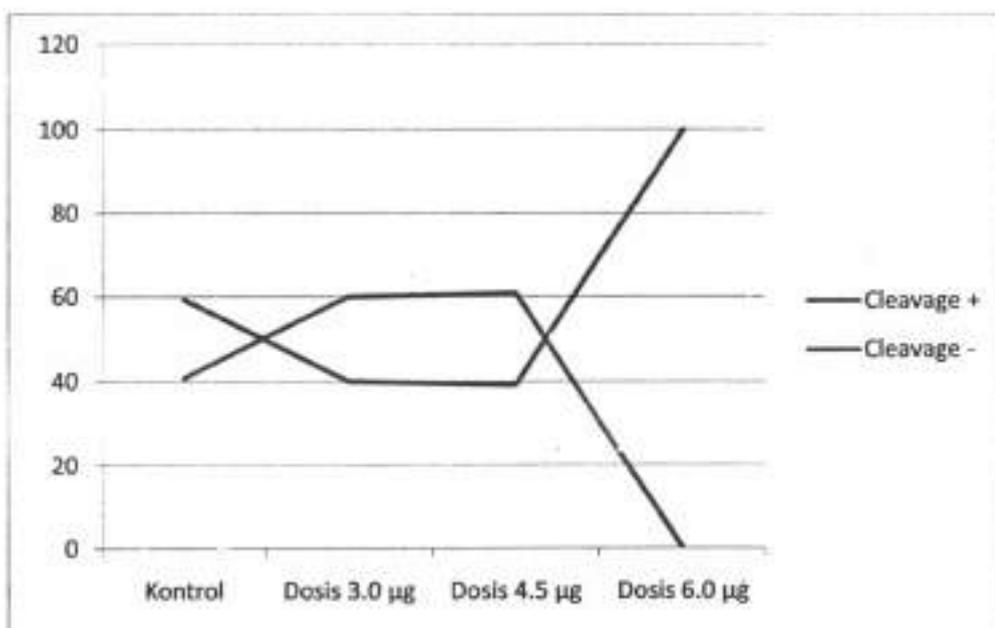
4.2.1. Persentase keberhasilan pembelahan sel (*cleavage*) pada fertilisasi *in vitro* setelah disuplementasi akrosin

Setelah dilakukan fertilisasi selama 24 jam pada masing-masing dosis akrosin 0; 3.0; 4.5 dan 6.0 maka persentase *cleavage* (pembelahan) yang terjadi dapat dilihat pada tabel 4.2. berikut ini :

Tabel 4.2. Rerata persentase *cleavage* (pembelahan sel) hasil fertilisasi *in vitro* setelah suplementasi akrosin

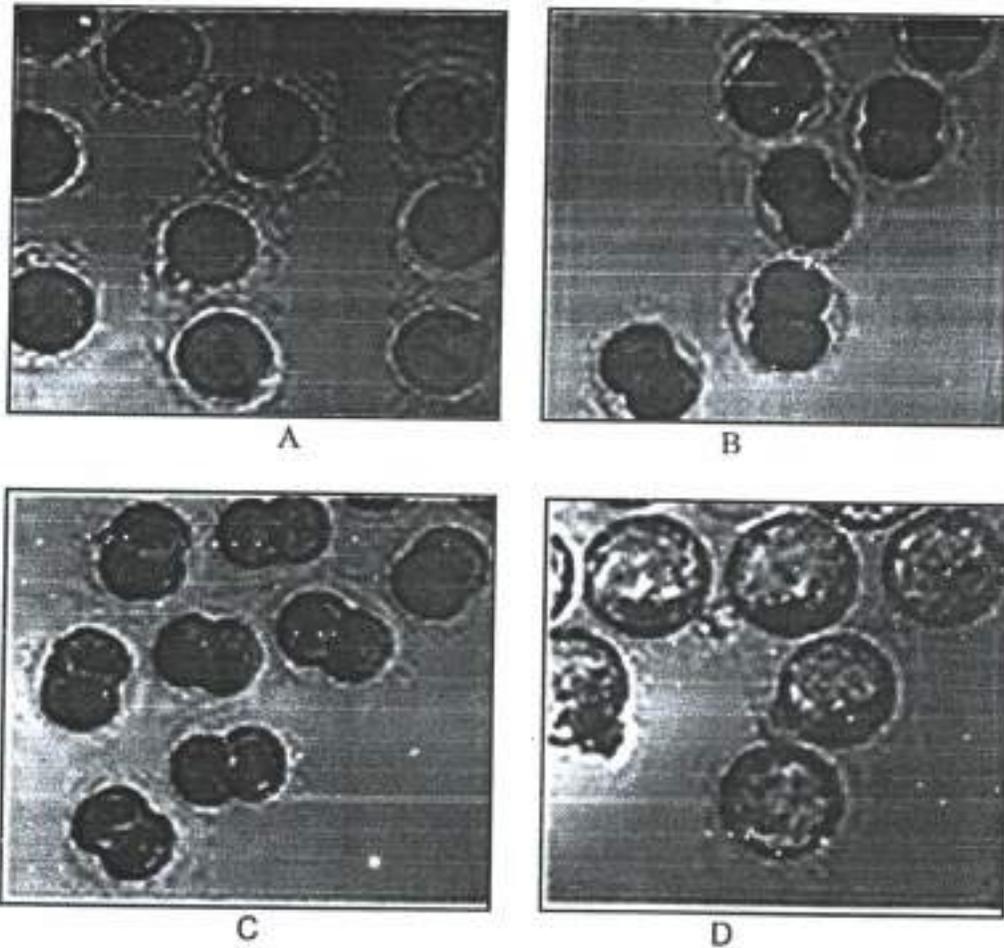
Perlakuan	Jumlah Oosit yg di Fertilisasi <i>in-vitro</i>	Hasil Fertilisasi <i>in-vitro</i>	Persentase Fertilisasi <i>in-vitro</i>	χ^2
Kontrol	27	11	40,74	$\chi^2 : 23.429$ $P : 0.000$
Perlakuan 3,0 μg	25	15	60,00	
Perlakuan 4,5 μg	23	14	60,87	
Perlakuan 6,0 μg	21	0	0	
Jumlah	96	40		

Dari tabel di atas tampak bahwa pada dosis akrosin 3,0 dan 4.5 µg terjadi persentase pembelahan (cleavage) paling besar dibandingkan dengan dosis akrosin yang lain, hal ini menunjukkan bahwa dosis akrosin 4.5 µg merupakan dosis optimum, sedangkan dosis 3,0 µg sudah cukup untuk menghasilkan *cleavage*. Pada dosis 6.0 µg tidak terjadi *cleavage*, dan justru terjadi lisis pada hampir semua zona pelusida. Data tersebut menunjukkan bahwa akrosin sangat penting dan diperlukan untuk terjadinya lisis (proteolisis) pada zona pelusida sel telur (Adel, *et al.* 2004).



Gambar 4.3. Rerata persentase cleavage (pembelahan sel) pada oosit domba EG setelah difertilisasi in vitro selama 24 jam

Hasil uji Chi-Square menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0.01$) pada persentase cleavage antara dosis akrosin 0; 3.0; 4.5 dan 6.0 µg. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin dosis 3.0 dan 4.5 mampu meningkatkan angka fertilisasi in-vitro, sedangkan dosis 6.0 tidak terjadi cleavage, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 4.4. di bawah ini :



Gambar 4.4. Hasil Fertilisasi In Vitro Pada Oosit Domba EG Dengan Suplementasi Akrosin perbesaran 400x

Keterangan

- A. Hasil fertilisasi in vitro tanpa suplementasi akrosin
- B. Hasil fertilisasi in vitro dengan suplementasi akrosin 3.0 μg
- C. Hasil fertilisasi in vitro dengan suplementasi akrosin 4.5 μg
- D. Hasil fertilisasi in vitro dengan suplementasi akrosin 6.0 μg

Dari data di atas terlihat bahwa ada hubungan kuadratik pada pemberian akrosin terhadap *cleavage*. Mula-mula meningkat, tetapi semakin besar dosisnya semakin

menurun. Penambahan akrosin diperlukan untuk meningkatkan potensi penetrasi zona pelusida pada oosit, sehingga angka keberhasilan fertilisasi *in vitro* menjadi meningkat (Adel, *et al*, 2004; Primakoff & Myles, 2004). Dosis akrosin 6.0 μg menyebabkan kerusakan (lisis) pada hampir semua dinding zona pelusida, sehingga menyebabkan kegagalan fertilisasi. Penelitian yang telah dilakukan terdahulu menunjukkan bahwa jumlah *akrosin* berkorelasi positif dengan angka kejadian fertilisasi, kadar *akrosin* yang rendah pada spermatozoa menyebabkan kegagalan penetrasi dinding zona pelusida (Adel, *et al*. 2004; Hafez, 2002).

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1. Hasil maturasi oosit spermatozoa domba selama 24 jam

Rata-rata persentase keberhasilan maturasi hari 1, 2, 3 dan 4 adalah 66.16%, angka tersebut sedikit di bawah dari yang dilakukan oleh Yanagimachi (1994) pada maturasi oosit kambing yaitu 70.60%. Pada umumnya keberhasilan maturasi ditentukan oleh lingkungan, media maturasi dan peralatan yang dipakai (Supriatna dan Pasaribu 2002). Variabel terpenting dalam seleksi peralatan adalah : keandalan (*dependability*), dapat diulang (*reproducibility*) dan berfungsi dengan baik (*service*).

Proses maturasi oosit meliputi maturasi inti, sitoplasma dan membran, yang kemudian diikuti dengan terjadinya perubahan struktur inti sel yang merupakan bagian yang terpenting dalam proses persiapan oosit untuk dapat dibuahi (Whitaker, 1996; Hermadi, HA., 2009). Terjadinya perubahan struktur inti sel, disebabkan karena terjadinya transkripsi RNA dalam inti (Wassarman, 1990). Secara intra seluler, maturasi oosit dimulai dengan terjadinya pembengkakan kromosom tersebut yang disebut *Germinal Vesicle Breakdown (GVB)*, selanjutnya kromosom menyusun diri pada suatu ekuator di perifer sitoplasma untuk memulai pembentukan metafase I, anafase I dan telofase I yang diikuti dengan pelepasan polar bodi, kromosom akan bergerak untuk menyusun diri di daerah perifer sitoplasma dan ekuator untuk menyelesaikan tahap metafase II. Hormon FSH-LH langsung bekerja pada reseptor FSH di sel granulosa dan reseptor LH di sel theka berperan pada pertumbuhan oosit pada

saat maturasi. Pertumbuhan oosit dipengaruhi oleh *Growth Factor (GF)* yang meliputi *Somatic* dan *Oosit Derived Growth Factor (ODGF)* untuk pertumbuhan oosit. *Somatic growth factor (SGF)* berpengaruh langsung pada proses perkembangan sel granulosa (Hermadi, 2009). Selain itu terjadi aktivasi dari P450 aromatase di sel granulosa untuk berperan pada proses steroidogenesis untuk dapat menghasilkan hormon steroid seperti estrogen. *Somatic Derived Factor (SDF)* meliputi *Anti Mulerian Hormone (AMH)*, *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Retino Blastoma Protein (RBP)* dan *basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF)*. Adanya *ODGF* meliputi *IGFBP* berpotensi untuk memacu sel granulosa untuk memproduksi *IGF1* yang berperan dalam mengaktivasi proliferasi dan diferensiasi sel oosit (Fleming, 2000). Selain *IGF1*, hormon lain yang diproduksi oleh sel granulosa adalah *activin* yang berperan merangsang pertumbuhan sel *theca* agar dapat menghasilkan hormon androgen.

Estrogen yang dihasilkan oleh sel granulosa dapat berubah menjadi estrogen inaktif dan saat ini oosit tumbuh menjadi *mature* (matang) dan inhibin yang dihasilkan oleh sel granulosa menghambat aktivitas FSH. Ion kalsium (Ca^{2+}) dalam *calcium wave* bekerjasama dengan adenil siklase dan cAMP sebagai energi, Ca^{2+} berperan untuk signaling respon spermatozoa saat fertilisasi agar tidak terjadi *poly spermia* (cheung, et al., 2000; Fleming, 2000). *ODGF* lain yang banyak berperan di dalam pertumbuhan oosit adalah *Oocyte Derived Growth Differentiation Factor (ODGDF)*, *Defferentiation Bone Morphogenetic Protein (DBMP)*, *Transforming Growth Factor (TGF) β* dan *Tyrosine Kinase Receptor (TKR)* (Hermadi, HA. 2009; Picton et al., 2008).

Beberapa faktor yang mempengaruhi maturasi oosit *in vitro* diantaranya adalah kualitas oosit muda, medium maturasi, suhu dan lamanya maturasi. Pada umumnya medium yang digunakan untuk maturasi adalah *Tissue Culture Medium* (TCM 199) selama periode 24 jam. Saat ini untuk meningkatkan angka kematangan oosit beberapa ahli telah menambahkan hormon gonadotropin FSH-LH, steroid hormon dan PMSG (Mahaputra dkk, 1997; Yuliani, 2000). Oosit yang berkualitas baik ditandai dengan lapisan sel kumulus yang mengelilingi kompleks. Fukui dan Ono (1989), membuktikan keberadaan sel kumulus yang mengelilingi oosit sangat mempengaruhi kesempurnaan maturasi inti dan sitoplasma oosit secara *in vitro*. Maturasi inti dan sitoplasma berpengaruh terhadap pembentukan pronukleus jantan dan betina untuk dapat berkembang hingga tahap blastosis. Oosit yang belum matang, dengan germinal vesikel yang masih utuh tidak dapat timbul dekondensasi kromatin spermatozoa. Kegagalan dalam pembentukan pronukleus setelah penetrasi spermatozoa dapat disebabkan karena oosit yang tidak matang (Fleming, 2000; Utomo B. 1997).

Menurut Hillier, *et al.* (2001), perkembangan maturasi sel telur secara *in vitro* akan menghasilkan sel telur yang matang, hal ini disebabkan sel telur mengalami proses maturasi akhir yang sempurna. Pemberian bahan makanan dari sel kumulus pada sel telur melalui penjuluran sel kumulus. Proses maturasi sel telur yang seragam ini sangat berhubungan dengan angka keberhasilan fertilisasi dan keberhasilan viabilitas embrio yang dihasilkan. Funahashi dan Day (2003) mengatakan bahwa proses maturasi oosit secara *in vitro* diinduksi

oleh rangsangan *gonadotropin preovulatory* melalui sel granulosa dan ekspansi kumulus diinduksi oleh FSH dan LH. Penambahan konsentrasi hormon selama proses maturasi ini penting untuk aktivitas sekresi dari sel kumulus dan sel granulosa (Roche, 2006).

5.2. Persentase keberhasilan pembelahan sel (*cleavage*) pada fertilisasi *in vitro* setelah disuplementasi akrosin menggunakan media TCM₁₉₉

Kerhasilan terbentuknya *cleavage* pada pembuahan *in vitro* tergantung pada berbagai media yang digunakan pada saat fertilisasi *in vitro*. Media biakan yang digunakan untuk maturasi oosit dan fertilisasi pada penelitian ini menggunakan medium kultur jaringan (TCM₁₉₉). Penambahan hormon gonadotropin pada medium *in vitro* akan meningkatkan persentase maturasi oosit dan tingkat perkembangan embrio setelah pembuahan *in vitro* (Trounson, *et al*, 1997).

Dalam penetrasi sel spermatozoa terhadap zona pelusida pada sel telur dibutuhkan kadar enzim akrosin yang cukup. Pada kondisi kadar enzim akrosin yang kurang maka tidak terjadi lisis pada zona pelusida, hal ini menyebabkan kegagalan fertilisasi 30-40 % (Hafez, 2002). Sebaliknya apabila terjadi kelebihan dosis enzim akrosin maka akan terjadi lisis pada zona pelusida sampai 80%, hal ini menyebabkan terjadinya polispermi (banyak sel spermatozoa) yang masuk pada sel telur tersebut. Polispermi berakibat kematian pada embrio tersebut (Aitken, 1995). Pada penelitian ini suplementasi akrosin 0.3 µg pada spermatozoa kambing PE sudah dapat memberikan penetrasi zona pelusida sel telur.

Penambahan akrosin diperlukan untuk meningkatkan potensi penetrasi zona pelusida pada oosit, sehingga angka keberhasilan fertilisasi in vitro menjadi meningkat (Adel, *et al*, 2004; Primakoff & Myles, 2004). Menurut Kennedy, *et al* (2006) penyimpanan semen beku menyebabkan berkurangnya kadar akrosin 2-3 kali dibandingkan dengan semen segar/fresh semen, hal ini menyebabkan kemampuan penetrasi terhadap zona pelusida saat fertilisasi menjadi menurun. Suplementasi akrosin dosis 3.0 dan 4.5 μg dapat meningkatkan angka keberhasilan fertilisasi in vitro menjadi 60% dibandingkan kontrol yang hanya 40%. Penelitian yang telah dilakukan terdahulu menunjukkan bahwa jumlah akrosin berkorelasi positif dengan angka kejadian fertilisasi, kadar akrosin yang rendah pada spermatozoa menyebabkan kegagalan penetrasi dinding zona pelusida (Adel, *et al*. 2004; Hafez, 2002).

Fertilisasi merupakan proses penggabungan yang kompleks antara sel gamet jantan (spermatozoa) dan gamet betina (oosit) sehingga jumlah kromosom kembali normal (diploid) dan dilanjutkan dengan pembelahan dan perkembangan membentuk individu baru. Keberhasilan fertilisasi in vitro pada kambing telah banyak dilaporkan namun masih belum diperoleh waktu yang tepat kapan spermatozoa yang dikapasitasi mampu menembus kumulus dan zona pelusida dari oosit sampai tepat waktu terjadi singami (Hafez. 2002; Yi, *et al*, 2006; Hemadi, 2009). Penetrasi spermatozoa terhadap ovum secara sempurna membutuhkan waktu 8 jam (Yuliani, 2000; Duan, *et al*. 2007). Selama proses penembusan zona pelusida, kepala spermatozoa menembus ruang perivitelin menuju ke vitelus kemudian secara bertahap keduanya bergabung.

Saat ovum telah masak dan mengalami luteinasi oleh pengaruh LH, maka Ca^{2+} dalam *calcium wave* berperan untuk signaling respon spermatozoa saat fertilisasi (Cheung, *et al.* 2000; Fleming, 2000; Hermadi, 2009). Setelah penetrasi melalui zona pelusida, aktivasi spermatozoa akan mengakibatkan oosit melepaskan benda kutub II. Posisi pronukleus jantan dan betina yang berhadapan di pusat oosit merupakan prasyarat bagi pembentukan kromosom paternal dan maternal pada *spindle* pertama. Duplikasi kromatin terjadi dalam kedua pronukleus secara bersamaan dan menjelang profase dari *cleavage* pertama. Komplemen kromatin paternal dan maternal mengalami kondensasi pada posisi berhadapan. Setelah menghilangnya membrane kedua pronukleus, terjadi kombinasi krososom paternal dan maternal membentuk sebuah inti baru yang diploid. Selanjutnya kromosom tertata pada bidang ekuatorial (*plate methafase*) dari kutub spindle yang diorganisasi oleh sentromer dan mikrotubulus di daerah sitoplasma. Fertilisasi melibatkan proses aktivasi oosit oleh spermatozoa sehingga oosit mampu menyempurkan pembentukan pronukleus betina dan setelah terjadi penggabungan (singami) antara pronukleus betina dan pronukleus jantan akan membentuk sigot. Sigot sebagai hasil penggabungan pronukleus jantan dan betina selanjutnya akan diikuti pembelahan (*cleavage*) secara mitosis (Yuliani, 2000; Madyawati, 2007).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

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

- Suplementasi *akrosin* dosis 3.0 μg dengan lama inkubasi 30 menit pada semen domba *EG* dapat meningkatkan potensi spermatozoa yaitu terjadinya *cleavage* (pembelahan sel) pada fertilisasi *in vitro*.

6.2. Saran

- Suplementasi *akrosin* dosis 3.0 dan 4.5 μg dengan lama inkubasi 30 menit dapat digunakan untuk meningkatkan potensi biologis spermatozoa domba *EG*, sehingga dapat dipakai untuk fertilisasi *in-vitro* pada domba.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 2007. Kondisi Peternakan di Indonesia saat ini. Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta.
- 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 Bio-chemistry, Calcutta University College of Science, 35, Bally gunge Circuler Road, Calcutta 700019 India. J. Biology of Reproduction. Vol 13: 571-578*
- Aitken, R.J. 1995. Asessment of Sperm Function for IVF. *Human Reprod.* 3:89-95.
- Aulani'am. 2004. Dasar-Dasar Biomolekul. FMIPA. Universitas Brawijaya Press. Malang. 20-23
- Aulani'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 53-85
- Ax RL., MR. Dally, BA. Didion, RW. Lenz, CC. Love, DD. Varmer and Hafez, ESE. 2000. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animal. Awollers Kltiwer Company. Philadelphia.
- Baldi, E; L. Michael; B. Lorella; M. Monica and F. Gianni. 2000. Intracelluler Event and Signaling Pathways Involved In Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity and Acrosom Reaction. *Frontier in Bioscience.* 5:110-123.
- Bailey, L., and B.T. Storey. 2001. Calcium Influx into Mouse Spermatozoa Activated by Solubilized Mouse Zona Pelusida, Monitored with the Calcium Fluorescent Indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pelusida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol.Reprod. Dev.* 39: 297-308.
- Bearden, HJ. and JW. Fuquay. 1997. Applied Animal Reproduction. 4nd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bergeron, A; M.H. Crete; Y. Bridle and P. Manjunath. 2004. Low Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg York 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., RH. Foote and CC. Brockett. 1993. Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurin and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology*. 30: 123-137.
- Chen. Y., MJ. Cann, TN. Litvin, V. Lourgenko, ML. Sinclair and J. Buck. Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*, 289: 625-628.
- Dauzier, L. and Thibault. C. 1995. Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biol. Reprod.* 2: 128-158.
- Darnell. J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2nd Edition. Sci.Am.Books : 141-527.
- Davendra, C. dan M.Burns. 1994. *Produksi Domba di Daerah Tropis*. Penerbit ITB, Bandung. 21-28, 119-120.
- Donald's, Mc. 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th 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 HumanReproduction*. Vol 5 : 314 -329
- Evans. WH and JM. Graham. 1989. *Membran Structure and Function*. IRL Press. Oxford University. Oxford: 11-28.
- Flesh. FM. and BM. Gadella. 2000. Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in The Process of Fertilization. *Biochim Biohys Acta*. 1469: 197-235
- Ford, WCL. 2006. Glycolysis and Sperm Motility : does a Spoonful of Sugar Help the Flagellum go Round. *Human Reprod.* 12 (3) : 267-274.
- Gadella. BM. and PE. Visconti. 2006. *Regulation of Capacitation in The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Ed. By C.P. De Jonge and CLR. Barratt. Cambridge University Press.
- Garner and Hafez, ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Philadelphia, Baltimore, New York, London.

- Gilbert, S.F. 1998. *Developmental Biology*, 2 nd ed. Sinauer Association, Inc Publisher, Sunderland, Massachusetts. P.313-330.
- Goodpasture JC., KL Polakoski and JD Zaneveld .2000. Acrosin, Proacrosin and Acrosin Inhibitor of human spermatozoa. Department of Physiology and Bio- physics, University of Illinois. USA. *American Society of Andrology*, Vol1 (3): 16-27
- Grudzinskas. JG. and JL. Yovich. 1995. *Gametes The Spermatozoa*. Cambridge University Press. Perth. Australia.
- Hafez, E.S.E. 2002. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia. USA. p 260-282.
- Hammerstedt, R.H.; J.K. Graham and P. Noland. 2000. Cryopreservation of Mammalian Sperm : What we ask them to survive. *J. Androl.* 2:151-156.
- 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 Contraceptive Research*. Family Health International.
- Jainudeen. MR., H. Wahid and ESE. Hafez. 2000. *Sheep and Goats in Reproduction in Farm Animal*. Hafez. B and Hafez. ESE. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Awollers Kltiwer Company. Philadelphia.
- Jones. GA., AG. Sacco and MG. Subramania. 1992. Histology of Female Rabbit Immunized with Deglycosylate Zona Pellucida Macromollecular of Pig. *J.Reprod. Fert.* 95:513-525.
- Kaul. G., S. Singhs, KK. Gandhi and SR. Anand. 1997. Calcium Requirement and Time Course of Capacitation of Goat Spermatozoa Assested by Clourtetracycline Assay. *J.Androl.* 29(5): 243-251.
- Kenneth Polakoski and Robert A. Mc Rorrie. 1983. Purification and Preliminary Characterization of a Proteinase (acrosin) from Boar Sperm Acrosomes. *Reproduction Research Laboratory of the Biochemistry Department, University of Georgia, Attens. Georgia. Journal of Biological Chemistry*, vol. 248 : 8178-8182.

- La Ode Ba'a. 2009. Peran D-fruktosa dan Kuning Telur Dalam Proses Penghambatan Kapasitas dan Kerusakan Membran Spermatozoa domba. Disertasi. Unibraw. Malang. 2009.
- Liberda. J., M.Kraus, H.Rysiava, V.Viasakova, V.Jonakova and M.Ticha. 2001. D-fructosa-Binding Proteins in Bull Seminal Plasma.: Isolation and Characterization of Biochemistry. Charles University. Czech Republic.
- Mattioli. M., B. Barboni, F. Lucini and E. Seren. 1996. Identification of Capacitation in Boar Spermatozoa by Chlortetracycline Staining. *Theriog.* 4 : 331-373.
- Maxwell. WMC. And PF. Watson. 1996. Recent Progres in Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science.* 42 : 261-275
- Mc.Donald, LE. and MH. Pineda. 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction.* Lea and Febiger. Philadelphia.
- Mori. K., T. Dalton, M. Kumada, M. Maeda, M. Maegawa, K. Hirano and T. Aono. 1993. European Society of Human Reproduction and Embriology. Department Of Obstetrics and Gynaecology. School of Medicine. University of Tokushima, Jepang.
- Nur. Z., I. Dogan, U. Gunay and MK. Soylu. 2005. Relationships between Sperm Membrane Integrity and other Semen Quality Characteristics of the Semen of Saanen Goat Bucks. *Bull Vet Inst Pulawy.* 51 : 183-187.
- Mulyono, W. 2000. *Cara Beternak Domba.* PT. Aneka Ilmu. Semarang.
- Polakoski KL and Zaneveld LJD. 2000. Proteinase and protein inhibittor in andrology. Human semen and fertility regulation in men. CV Mosby Company, St Louis London. P584.
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imuhologi.* Airlangga University Press. 145-147.
- Rao, J.F. and Hart, C.F. 1988. Mammalian Fertilization in Vitro : Sperm-Induced Preparation of The Zona Pellucida of Golden Hamster Ova for Final Binding. *J. Reprod. Fert.* 37: 433-445.
- Richard F. Parrish and Kenneth L. Polakoski. 1986. Purification and characterization of the initial active enzyme resulting from conversion of boar pro-acrosin to acrosin. Department of Obstetrics and Gynaecology. Washington University of Medicine, St. Louis, Missouri. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 253: 8428 – 8432.

- Rigau, T., M. Rivera, MJ. Palomo, JM. Fernandez, T. Mogas and JE. Rodriguez. 2002. Differential Effects of Glucose and Fructose on Hexose Metabolism in Dog Spermatozoa. *Reproduction*. 123: 579-591
- 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
- Salisbury, G.W dan N.L. Van Demark. 1978. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. 269-371.
- Said, K., EM. Kalin, F. Afiani, M. Gunawan dan B. Tappa. 2004. Pengaruh Metode dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Prosiding Seminar Industri Peternakan Modern. Makasar.
- Saili, T. 1999. Efektifitas Penggunaan Albumin sebagai Medium Separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Sarastina. 2006. Analisis Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa Pada Berbagai Bangsa Sapi Menggunakan Computer Assisted Semen Analysis (CASA) Tesis Pascasarjana. Unibraw. Malang
- Sarwono. B. 2002. Beternak Domba Unggul. Cetakan X. Penebar Swadaya. Jakarta. 30-37, 64.
- Setiawan, T dan Arsa B. 2003. Beternak Domba Perah Peranakan Ettawa. Cetakan I. Penebar Swadaya. Jakarta. 3-13, 31-35.
- Steel, RGD and H. Torrie. 1989. Principles and Procedures of Statistics. International Student Edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. Tokyo. Japan.
- Suhana, Nana, Rafiah dan Siti R. 2002. Deferensiasi Embriologi Dalam Tingkat Seluler, Subseluler dan Molekuler. Penerbit FK Universitas Indonesia Jakarta. hal 374.
- Sum, AK., R.Faller and JJ. Pablo. 2003. Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayer and Insights of the Interactions with Disaccharides. *J. Biophys*. 85: 2830-2844.
- Sumitro, SB. dan T. Susilawati. 1998. Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistem dan Inverted. Laboratorium Biologi. FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.

- Susilawati, T. 2000. Analisa Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Setrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Unair. Surabaya.
- Susilawati, T. 2003. Fisiologi Spermatozoa, Kapasitas, Reaksi Akrosom dan Fertilisasi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang
- Susilawati, T. 2005. Teknologi Reproduksi. Buku 2. Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati, T. 2007. Fungsi IGF-1 Complex Plasma Seminalis Domba Terhadap Integritas membran dan Viabilitas Spermatozoa. Unibraw. Malang.
- Susilowati, S. 2007. Peran Insulin Like Growth Factor-1 Complex Plasma Seminalis Domba Terhadap Potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. Disertasi S3 Pascasarjana Unair.
- Williams, RM; JK. Graham and RH. Hammerstedt.2001. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *J. Biology of Reproduction*. vol 44 : 1080-1091.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol.1 Raven Press, New York, NY. USA. 1: 189-217.
- Zervos, IA; MP. Tsantarliotou; G. Vatzias; P Goulas and IA. Taitzoglou, 2005; Effects of dietary vitamin A intake on acrosin and plasminogen – activator activity of ram spermatozoa; *J. Reprod. and Ferti*. 129: 707-715.