

Insulin Like Growth Factor-I Complex sebagai Alternatif Antioksidan pada Media Pendewasaan Spermatozoa Kambing

Insulin Like Growth Factor – I Complex as A Antioxidant Alternatif in Capatitaon Medium Of Goat Sperm

Indah Norma Triana, Suherni Susilowati, Gandul Atik Yuliani

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

One of the protein in the seminal plasm of goat is Insulin Like Growth Factor –I (IGF-I) Complex. IGF-I Complex has molecular weight 150,288 kDa which consisted of three protein molecules that were IGF-I (subunit α), IGFBP (subunit β) and ALS (Acid Label Subunit) (subunit γ). The research was done into two phases. First phase concerned with explorative to identify and isolation of IGF-I Complex and second phase was to supplementation of IGF-I into capatitiation medium of goat sperm. The aim of this research was to decreased of MDA concentration. The benefit of this research was to increased of the sperm quality so that can used for in vitro fertilitation. Analysis with varian showed significant different ($P < 0,05$) to MDA concentration. From results above can be concluded that potein of IGF-I Complex can decreased of MDA concentration in sperm capacitation medium.

Keywords : IGF-I Complex, MDA, capacitation

Pendahuluan

Manipulasi spermatozoa ditujukan kepada keberhasilan proses fertilisasi in vitro. Cara manipulasi spermatozoa secara in vitro diantaranya adalah metode sentrifugasi. Pada proses fertilisasi in vitro dibutuhkan adanya ovum yang matang dan spermatozoa yang telah mengalami pendewasaan atau kapasitasi. Proses pendewasaan spermatozoa secara in vitro dapat dicapai dengan menambahkan medium yang sesuai (Hardjopranojoto, 2006). Dampak buruk dari hasil pemisahan plasma seminalis dengan teknik sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh spermatozoa. Adanya peningkatan akumulasi produksi ROS pada spermatozoa yang disentrifugasi diduga merupakan proses yang kompleks dan dapat berasal dari berbagai proses kimia, organel maupun sel bahkan berasal dari luar sel (Agaerwal *et al.*, 2003). Bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralkan oleh system pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau

plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membrane sel spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA selanjutnya terjadi penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995).

Salah satu protein tersebut adalah protein yang terdapat di dalam plasma seminalis kambing. Penelitian biomolekuler membuktikan bahwa dengan penambahan beberapa protein plasma seminalis dapat memperbaiki proses fertilisasi, mempertahankan kehidupan sel dan mempunyai peran positif terhadap proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Beatriz *et al.*, 2000). Protein tersebut adalah *Insulin Like Growth Factor-I* (IGF-I) Complex. Penambahan protein *IGF-I Complex* dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang motil, selain itu juga mengatur fungsi spermatozoa sebelum dan sesudah ejakulasi terutama meningkatkan motilitas dan kapasitasi spermatozoa (Manjunanth *et al.*, 1997). Menurut

pendapat Donald *et al* (1998) yang menyatakan bahwa *IGF I Complex* bertindak sebagai antioksidan. Antioksidan disini mungkin sebagai antioksidan pencegah (preventive antioksidants) pada dasarnya mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini merubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai kesempatan bereaksi, atau dengan mencegah pembentukan radikal bebas baru dari molekul lain. Penelitian tentang *Insulin Like Growth Factor* memang telah banyak dilakukan, namun penelitian tentang *Insulin Like Growth Factor-I Complex* plasma seminalis kambing sebagai alternatif antioksidan pada medium pendewasaan spermatozoa belum pernah diteliti.

Materi dan Metode Penelitian

Bahan penelitian berupa kambing jantan sebanyak 3 ekor yang digunakan untuk sampel. Selain itu juga menggunakan bahan-bahan untuk isolasi dan purifikasi protein. Non Reducing Sample Buffer (Non-RSB), separating gel 12%, stacking gel, Marker High Range SDS –PAGE Standards (Bio Rad). Comassie Blue (Bio Rad), larutan destaining, bahan untuk pemeriksaan konsentrasi protein, bahan untuk pemeriksaan MDA.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi vagina buatan, tabung skala, sentrifus, gelas beker, Erlenmeyer, mikropipet, eppendorf, seperangkat alat gel elektroforesis horizontal, alat elektroelusi, spektrofotometer.

Pada garis besarnya penelitian ini terdiri dari dua tahap :

Tahap I adalah penelitian kualitatif eksploratif laboratoris. Pada tahap ini dilakukan identifikasi, isolasi dan klasifikasi protein Insulin Like Growth Factor I Complex (IGF-I Complex) plasma seminalis kambing. Identifikasi untuk mengetahui konstituen protein pada plasma seminalis kambing. Adapun tahapan penelitian tahap I ini terdiri dari preparasi plasma seminalis kambing, Native Polyacrylamide Gel Electriforesis (Native –PAGE) plasma seminalis kambing, penentuan berat molekul protein plasma seminalis, elektroelusi untuk isolasi protein IGF-I Complex, dilanjutkan dengan Western Blott, untuk mengetahui kadar protein diperiksa dengan metode Biuret.

Tahap II adalah aplikasi isolat Insulin Like Growth Factor I Complex yang telah dielusi

pada tahap I pada medium pendewasaan spermatozoa kambing, kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap kadar MDA.

Tahapan Penelitian

1. Penampungan Semen dan Purifikasi Crude Protein

Semen ditampung dari kambing jantan peranakan etawa dengan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen diupayakan pada waktu pagi hari sekitar pukul 08.00-09.00 yang diperkirakan aktifitasnya belum banyak. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, bau, warna, pH dan konsistensi) dan secara mikroskopis (motilitas, viabilitas, konsentrasi). Semen tersebut ditambah dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) kemudian disentrifugasi pada suhu 5°C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya (plasma semen) diambil dengan mikropipet dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Purifikasi dilakukan dengan cara menambahkan PBS dan Phenylmethenesulfonyl fluoride (PMSF) kemudian di homogenkan selama 5 – 10 menit pada suhu 4°C kemudian di homogenkan lagi dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diambil ditambah dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1 dan diendapkan semalam (sampai tidak bau etanol), etanolnya dibuang kemudian peletnya di tambah dengan Tris HCl dengan 1-2 kali volume pellet (Aulani'am, 2005)

2. Identifikasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* dengan metode *Native-PAGE*

Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* dimasukkan ke dalam plate menggunakan mikropipet, permukaan dilapisi dengan menambahkan akuades dan dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* yang telah memadat, setelah itu dipasang sisir untuk membentuk sumuran dan didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. Plate dipasang pada alat *electrophoresis* dan berikutnya buffer PBS dituangkan pada chamber *electrophoresis*.

Limabelas µl sampel ditambah 15 µl Non RSB (*Non Reducing Sample Buffer*). dimasukkan

ke dalam tabung eppendorf, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 µl dimasukkan dalam tiap-tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama dengan sampel. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian $\pm 0,05$ cm dari batas bawah plat gel. Plat dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining *Coomassie Blue R-250* selama 30-60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan *destaining* dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil *electrophoresis* difoto atau discan (Aulani'am, 2005). Selanjutnya untuk mengetahui berat molekul *band-band* yang terbentuk dilakukan perhitungan berat molekul dengan menghitung nilai (Retardation Factor) *Rf* dari masing-masing band.

3. Isolasi Protein Insulin Like Growth Factor –I Complex dengan metode Elektroelusi

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan *band* pada gel *Native-PAGE* ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat *electrophoresis horizontal* (Bio-Rad). Alat *electrophoresis* diisi dengan buffer sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. *Running* elektroelusi dilakukan pada kondisi 130 volt, 30 mA selama 1 jam. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung eppendorf, disimpan pada suhu -70°C, siap dipakai untuk penelitian berikutnya (Aulani'am, 2005).

4. Aplikasi Protein IGF-I Complex pada Medium Pendewasaan Spermatozoa

Semen yang berkualitas baik, sebanyak 0,5 ml ditambah medium BO sebanyak 1 ml dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Dihitung 3×10^6 spermatozoa untuk diberi perlakuan. Spermatozoa hasil sentri-

fugasi masing-masing dibagi 3 yaitu tabung I diisi dengan spermatozoa dan medium BO, tabung II diisi dengan spermatozoa, medium BO dan IGF-I Complex 12 ng. Tabung III diisi dengan spermatozoa dan *IGF-I Complex* 12 ng. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode test Thiobarbiturat Acid (TBA) yang dikembangkan oleh Alvarez and Story (1995). Sebanyak 100 µl kit MDA dengan konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7,8,0 µg/ml kemudian ditambahkan 550 µl akuades dan 100 µl asam trichlorasetat 20% dan dilakukan homogenisasi selama 30 detik kemudian ditambahkan dengan 250 µl HCl 1 N, dihomogenkan ditambah 100 µl natrium thiobarbiturat 1%, dihomogenkan kemudian disentrifus dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil diinkubasi pada waterbath 100° C selama 30 menit dan dibiarkan pada suhu ruangan. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 533 nm. Diperoleh nilai absorbansi standar dan kurva standar MDA.

Pengukuran MDA pada sampel adalah sebagai berikut : 20 µl supernatan ditambahkan dengan 80 µl tris HCl, ditambahkan 550 µl akuades dan 100 µl asam trikloroasetat 20% dan dihomogenkan selama 30 detik kemudian ditambahkan dengan 250 µl HCl, dihomogenkan, ditambah 100 µl natrium thiobarbiturat 1% dihomogenkan kemudian disentrifus dengan kecepatan 500 rpm 10 menit. Supernatan diambil, diinkubasi pada water bath 100° C selama 30 menit dan dibiarkan pada suhu ruangan. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 533 nm. Penilaian kadar MDA dilakukan dengan cara mengkonversikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan nilai kurva baku standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Selanjutnya nilai hasil perkalian pada kurva standar baku, dikalikan lagi dengan faktor pengenceran yang digunakan. Konsentrasi MDA diukur berdasarkan jumlah µg atau nmol atau ppm MDA pada setiap ml suspensi spermatozoa.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak kelompok dan analisis data

dilakukan dengan menggunakan Uji Anava, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan Duncan Test (Santoso dan Fandy, 2001).

Hasil dan Pembahasan

Kualitas semen segar kambing yang digunakan untuk uji suplementasi IGF-I Complex harus memenuhi kriteria. Hasil yang layak digunakan untuk penelitian adalah sebagai berikut : warna semen berwarna putih kekuningan, pH 7, motilitas massa +++ (sangat baik), motilitas individu $\geq 70\%$ dan hidup spermatozoa $\geq 70\%$ (Toelihere, 1985).

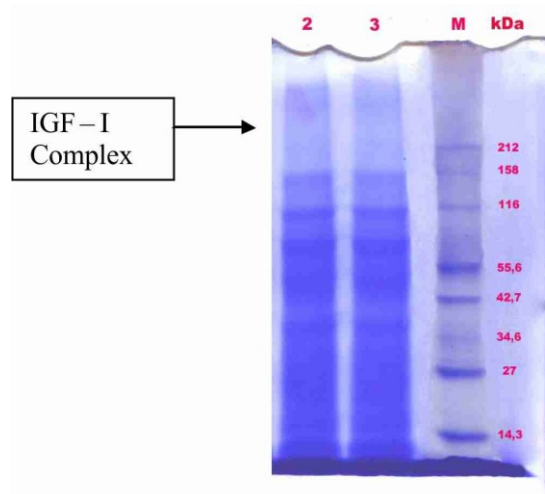
Hasil penelitian menunjukkan bahwa semen yang ditampung berwarna putih kekuningan, bau khas, konsistensi kental, pH ± 7.00 , volume 1,1 ml, konsentrasi 397×10^6 , motilitas masa +++ (pergerakan membentuk gelombang besar dan banyak), motilitas individu bergerak progresif (maju kedepan), rerata viabilitas $90 \pm 8,4\%$ dan spermatozoa yang terkapasitasi $10,85 \pm 87\%$. Dari hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa kualitas semen me-

enuhi persyaratan untuk digunakan sebagai penelitian.

Native-PAGE plasma seminalis kambing

Identifikasi konstituen-konstituen protein plasma seminalis kambing dilakukan dengan *Native-PAGE* (*Native-Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) konsentrasi 12% dalam elektrophoresis set mini protein gel (Bio Rad). Sebagai marker digunakan *High Range SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad) dan pewarnaan hasilnya dengan *Comassie Blue stain SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad).

Plasma seminalis kambing dalam proses *electrophoresis* dengan *Native-PAGE* menghasilkan 7 band. Berdasarkan urutan Berat Molekulnya selanjutnya ketujuh band tersebut berturut-turut adalah band pertama (BM 150,288 kDa), band kedua (BM 103,486 kDa), band ketiga (BM 76,155 kDa), band keempat (BM 53,249), band kelima (BM 35,378 kDa), band keenam (BM 14,099kDa) dan band ketujuh (BM 11,492 kDa) (Gambar 1).



Gambar 1. Gel hasil Analisis dengan Native – PAGE 12 % pada plasma seminalis kambing (M: marker, 2, 3 : sampel plasma seminalis kambing).

Tabel 1. Rerata dan SD kualitas spermatozoa kambing sebelum dan sesudah sentrifugasi

Parameter	Sebelum sentrifugasi	Sesudah sentrifugasi
Motilitas spz (%)	94,55 $\pm$ 6,25	79,65 $\pm$ 5,55
Viabilitas spz (%)	97,25 $\pm$ 8,30	84,20 $\pm$ 4,25
Membran plasma utuh (%)	86,75 $\pm$ 7,80	76,50 $\pm$ 4,50
Kapasitasi (%)	10,80 $\pm$ 4,90	56,15 $\pm$ 5,10

Tabel 2. Rerata dan SD persentase spermatozoa yang terkapasitasi dan kadar MDA spermatozoa kambing hasil sentrifugasi setelah suplementasi dengan 3 macam medium dengan waktu inkubasi 15 menit

Medium	Waktu inkubasi 15 menit	
	Kapasitasi (%)	MDA (ppm)
P0 (BO)	57, 25 ± 1,35 ^c	1506,6515 ± 25,1911 ^c
P1 (BO+IGF-I Complex)	60,20 ± 1,90 ^b	1225,1613 ± 21,1930 ^b
P2 (IGF-I Complex)	76, 10 ± 1,55 ^a	900,1033 ± 9, 1075 ^a

Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Keterangan :

BO : Bracket and Oliphant,s

IGF-I Complex : Insulin Like Growth Factor-I Complex

Terjadi penurunan kualitas spermatozoa sesudah sentrifugasi dimana sebelum sentrifugasi motilitas spermatozoa dari $94,55 \pm 6,25\%$ menjadi $79,65 \pm 5,55\%$, viabilitas spermatozoa dari $97,25 \pm 8,30\%$ menjadi $84,20 \pm 4,25\%$, membrane plasma utuh dari $86,75 \pm 7,80\%$ menjadi $76,50 \pm 4,50\%$ dan spermatozoa yang terkapasitasi dari $10,80 \pm 4,90\%$ menjadi $56,15 \pm 5,10\%$

Pemeriksaan suplementasi Insulin Like Growth Factor –I Complex terhadap spermatozoa yang terkapasitasi dan kadar MDA setelah sentrifugasi

Kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa diamati dengan menggunakan pewarnaan *Chlortetracyclin* (CTC). Dengan pewarnaan chlortetracyclin, spermatozoa yang mengalami kapasitasi nampak 2/3 bagian equator kepala spermatozoa berwarna kuning lebih terang karena distribusi Ca^{+} yang lebih banyak, spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom tidak berwarna dan hanya pita berwarna kuning pada bagian ekuator kepala spermatozoa. Pengamatan kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluorescen pembesaran 400x.

Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan kualitas spermatozoa setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Fitri (2002) bahwa spermatozoa setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 G selama 10 menit menunjukkan adanya kerusakan membrane plasma dan tudung akrosom spermatozoa sapi Madura. Demikian hasil penelitian Susilawati

(2000) yang membuktikan adanya penurunan motilitas spermatozoa sapi yang sangat bermakna setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradient densitas percoll 10 tingkat dengan kecepatan 2250 rpm selama 5 menit. Menurut Dasrul (2005) menurunnya kualitas spermatozoa tersebut karena akibat pengaruh bahan kimiawi dalam medium dan pengaruh mekanik seperti gesekan permukaan membrane dengan partikel medium atau tabung. Sentrifugasi menyebabkan deformasi matriknya ekstraseluler spermatozoa termasuk perubahan komposisi lipid membrane spermatozoa (Guzman *et al.*, 2001)

Sentrifugasi menyebabkan membrane rusak sehingga lalu lintas ion-ion terganggu. Kolesterol dan fosfolipid merupakan komponen lipid membrane yang sangat penting dalam mempertahankan integritas membrane. Hilangnya plasma seminalis juga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa, hal ini karena plasma seminalis selain berfungsi sebagai transport bagi spermatozoa juga mengandung komponen elektrolit yang dapat menstimulir metabolisme spermatozoa. Penurunan motilitas spermatozoa berhubungan dengan peningkatan kerusakan integritas membrane spermatozoa yang terjadi selama sentrifugasi. Akibat kerusakan struktur membrane, maka sejumlah fungsi membrane terganggu, sehingga terjadi peningkatan influk Ca^{2+} di dalam sel meningkat. Peningkatan Ca^{2+} di dalam sel akan mengaktifkan enzim-enzim di dalam spermatozoa sehingga akan menghasilkan asam lemak yang berlebihan (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa sentrifugasi juga menyebabkan terjadinya kapasitasi pada spermatozoa, hal ini disebabkan adanya deformasi matriks spermatozoa yang menyebabkan pengurangan ratio kolesterol dan fosfolipid pada membran plasma spermatozoa. Kolesterol membran penting dalam hal mempertahankan fluiditas membran yang berperan penting dalam hal kapasitasi dan reaksi akrosom

Secara molekuler selama kapasitasi terjadi modifikasi kalsium ion intraseluler dan ion-ion lainnya, perubahan lipid dan fosfolipid membran spermatozoa, perubahan fosforilasi protein dan aktivitas protein kinase (Baldi *et al.*, 2003). Kapasitasi adalah penut Pengaturan kembali biokimia membran spermatozoa dimana menurut Parish *et al* (1993) saat kapasitasi terjadi peningkatan level Ca^{2+} intraseluler. Meningkatnya aktivitas Ca^{2+} akan mengaktifkan pergerakan spermatozoa (hiperaktivasi).

Reseptor *IGF-I* adalah reseptor tyrosin kinase type II (Weiqun Li *et al.*, 1998). *IGF-I* Complex merangsang reseptor *IGF-I* pada membran plasma spermatozoa yang akan menyebabkan otofosforilasi dan terjadi fosforilasi molekul-molekul sinyal seperti shc, PI3K, Grb2, Grb 10, IRS 1, Interleukin 4 phosphorylated substrat I (IRS-I). Protein kinase mengatur Ca^{2+} intraseluler yang akan mengaktifkan *adenyl cyclase* untuk memproduksi cAMP yang selanjutnya akan mengaktifkan protein kinase A untuk membuka kanal kalsium pada membran akrosom luar sehingga kalsium sitosol bertambah dan akan mengaktifkan fosfolipase C (Breitbart and Naor, 1997). Aktivitas protein kinase A (PKA) lebih tinggi pada spermatozoa yang mengalami kapasitasi dari pada spermatozoa yang tidak mengalami kapasitasi dan level cAMP akan menurun tetapi aktivitas *Posphodiesterase* (PDE) masih tetap konstan selama kapasitasi.

Pada penelitian ini ternyata kadar *malondildehyde* (MDA) dalam suspensi spermatozoa hasil sentrifugasi yang disuplementasikan dengan *IGF-I* Complex kadarnya paling rendah jika dibandingkan dengan suplementasi medium BO dan kombinasi medium BO dan *IGF-I*

Complex. Hal ini sesuai dengan pendapat Donald *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa *IGF-I* *Complex* bertindak sebagai antioksidan. Menurut Suryohudoyo (2000) antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan termasuk enzim dan protein pengikat logam. *IGF-I* *Complex* kemungkinan sebagai antioksidan pemutus rantai (chain-breaking antioxidant) dimana antioksidan ini berfungsi meredam dampak negatif dari senyawa oksigen reaktif dengan cara mencegah reaksi rantai. Antioksidan disini mungkin juga sebagai antioksidan pencegah (preventive antioxidants) pada dasarnya mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai kesempatan bereaksi, atau dengan mencegah pembentukan radikal bebas baru dari molekul lain.

Kesimpulan

Penambahan *IGF-I* *Complex* plasma seminalis ke dalam media pendewasaan spermatozoa dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, kapasitasi dan dapat menurunkan kadar MDA

Daftar Pustaka

- Agarwal, A; RA. Saleh and MA Bedalwy, 2003. Role of Sperm Parameter to level of Reactive Oxpecies in Semen Specimens. Urol. 152 : 107-110
- Alvarez, J.G and BT Storey, 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid from Phospholipid of Human Spermatozoa Mol. Reprod.Dev. 42: 334-345.
- Aulani'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 53
- Balboni, G.C, B.G. Vannelli, T. Barni, C.Orlando, A. Natali and M. Serio, 1988. Insulin-like growth factor -I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testes : an immunohistochemical study. Ferti Steril. 49(4) : 666-9.
- Baldi, E, Michaelal, Lorella, 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.
- Birkenmeier, G., H.J. Glander, J. Kratzsch and C. Weisbrich. 1996. Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma. *Human Reprod.* 11(11): 2454-60
- Brandies, V.T and M.T .Manuel. 1993. Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J.Assist. Reprod Genet.* Aug : 10(6): 409-416.
- Breibart, H. and Z. Naor, 1997. Protein kinases in mammalian capacitation and The Acrosom Reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 3(3) : 195-202.
- Castellini, C, A. Minelli and M.Moroni. 2001. Isolation and purification of the IGF-I protein complex from rabbit Seminal Plasma effect on sperm motility and viability. *J.Exp.* 2001 . aug.1 : 290 (3) :279-290.
- Cebrian, P., J.A. Beatriz, P. Rosaura, C. Margareta, T. Agustin, O. Jesus and M.B.Teresa. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on ram Sperm Membrane . *Biol.Reprod.* 63: 1531-1537.
- Clenmons, D.R. and J.L. Jones. 1995. Insulin-Like Growth factors and Their binding protein biological actions. *Endocr.Rev.* 16 : 3-34.
- Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2thed. Sci. Am.Books.
- Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif Dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Djojosoebagio, S. 1991. DNA Rekombinan, Hewan Transgenik dan Keamanan Biologi. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor
- Drolonis, E.Z., D.F. Katz and J.W. Overstreet. 1989. Factors Regulating Mammalian Sperm Migration through the Female Reproductive Tract and Oocyte Vestments. *Gamete Res.* 22: 443-469
- Fitri, T.A. 2002. Pengaruh Kecepatan Dan Sentrifugasi Terhadap Keutuhan Membran Plasma dan Tudung Akrosom Spermatozoa Sapi Madura Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Gray, S.L., M.H. Donald, J.K. Andrew, R.L. Brett and R.B. William. 1998. Identification of Insulin -Like Growth Factor I in Bovine Seminal plasma and Its Receptor on Spermatozoa : Influence on Sperm Motility. *Biol of Reprod.* 59: 330-337.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction in Farm Animal*, Edisi 6. Lea and Febiger. Philadelphia, Usa. 188-213
- Hardjopranojoto, S. 1987. Pembuahan In Vtro dan Transfer Embrio. Pidato Pengukuhan Guru Besar fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition Oxford : Oxford University Press.
- Hunter, R.H.F. 1985. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press. Limited School of Agriculture, University of Edinburgh
- Laron, Z. 2001. Insulin Like Growth Factor (IGF-I) : a Growth Hormon. *J. Clinical Mol Pathol.* 54: 311-316
- Roser, J.F. and M.F. Hess. 2001. The Effects of age and fertility status on plasma and intratesticular insulin – like growth factor –I Concentration in stallion. *Therio-genology* : 56 : 723- 733.
- Santoso, S. dan T. Fandy. 2001. Riset Pemasaran. Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. P.T. Gramedia Jakarta.
- Suryohudoyo, P. 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Cetakan Pertama. Jakarta. CV Sagung Seto. 31-47.

- Suhana, N. dan R.T. Rafiah. 1982. Diferensiasi-Embriolog Dalam Tingkat Selluler, Sub-selluler, Molekuler. Penerbit Fakultas kedokteran. Universitas Indonesia.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadexs dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Priseriasi Pascasarjana Unair Surabaya.
- Toelihere, MR, 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.