

Akrosin pada Semen Kambing Peranakan Etawa (PE) *Pasca Thawing* terhadap Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa

Supplement of Acrosin To The Post Thawing Sperm of Half-Breed Of Etawa Goat (PE) Towards Capacitation and Acrosome Reaction of Spermatozoa

Budi Utomo

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785 Ext 303, Fax. 031-5993015

Email : budi_reprovet@yahoo.com

Abstract

The development of goats population in Indonesia has not reached a satisfactory condition, in East Java in the 2007 population of goats decreased for about 3,24%. The obstacle which is faced in the goats breeding field is involving reproduction, the problem includes failure sperm cell to penetrate zona pellucida on egg cell due to the of less potency enzyme acrosin and this is the first factor which hampers goats reproduction. The experiment was biological test for determining the potency of spermatozoa after thawing supplemented with acrosin at the dosages of 0; 3.0; 4.5 and 6.0 μg for 30 and 60 minutes respectively. This biological test including that capacity and acrosome reaction. The results were, in the first experiment supplement of acrosin dosage 4.5 μg increased capacity and spermatozoa goat acrosom reaction. The conclusion were supplement acrosin with dosage 4.5 μg increased quality of sperm

Keywords : Acrosin, quality sperm, and Biological Potency.

Pendahuluan

Perkembangan populasi ternak kambing di Indonesia belum mencapai keadaan yang mengembirakan, bahkan di Jawa Timur pada tahun 2007 terjadi penurunan populasi ternak kambing 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 kambing tersebut. Namun demikian sejauh ini usaha pemerintah tersebut belum membuahkan hasil yang optimal. Namun demikian sejauh ini usaha pemerintah tersebut belum membuahkan hasil yang optimal. Salah satu faktor utama penyebab turunnya populasi ternak kambing tersebut adalah adanya gangguan reproduksi, terutama gangguan fertilisasi yaitu gagalnya sel spermatozoa untuk menembus sel telur. Kegagalan penetrasi sel spermatozoa 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 (Adel *et al.*, 2004). Di Indonesia penelitian tentang peran dan fungsi akrosin dalam fertilisasi, khususnya penetrasi pada zona pelusida sel telur belum pernah dilaporkan.

Akrosin adalah merupakan enzim akrosomal proteinase yang spesifik pada spermatozoa dan memegang peranan penting pada proses fertilisasi. Enzim ini kadang-kadang terlepas sebelum diejakulasikan atau pada penyimpanan semen beku (Zervos *et al.*, 2005). Penyimpanan semen beku menyebabkan berkurangnya aktivitas akrosin 2-3 kali dibandingkan dengan semen segar/*fresh* semen, enzim ini mampu bekerja secara optimum pada suhu 37°C dan dapat bertahan sampai 6 jam (Kennedy *et al.*, 2006). Kadar yang rendah dari akrosin berhubungan dengan infertilitas, dan aktivitas akrosin ini merupakan indikator penting dari

kualitas spermatozoa. Aktivitas ataupun kadar akrosin berhubungan secara langsung dengan konsentrasi dan motilitas spermatozoa (Cui *et al.*, 2004).

Pada spermatozoa kambing dalam proses fertilisasi dibutuhkan jumlah *akrosin* yang cukup terutama untuk penetrasi dinding zona pelusida (Williams *et al.*, 2001). 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 sampai 30-40% (A.Zalata *et al.*, 2004; Hafez, 2002). Akrosin dibutuhkan dalam menstabilkan membran spermatozoa, sehingga transport aktif zat-zat kimia dapat berjalan dengan baik untuk proses metabolisme sel (Cui *et al.*, 2004). Oleh sebab itu dalam penelitian ini akan dilakukan suplementasi *akrosin* pada spermatozoa kambing dengan melihat kualitasnya, meliputi uji motilitas, viabilitas, abnormalitas, kapasitas dan non kapasitas, reaksi akrosom, uji imunositokimia dan potensi biologisnya yaitu uji penetrasi (lisis) terhadap zona pelusida.

Bertitik tolak dari permasalahan tersebut, maka tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah untuk melihat potensi biologis spermatozoa setelah dilakukan suplementasi akrosin dalam rangka perbaikan fertilitas ternak, terutama untuk meningkatkan kualitas spermatozoa. Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah penyediaan protein spesifik yaitu *akrosin* untuk meningkatkan populasi ternak.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian tahap pertama termasuk penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan faktorial. 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 gr, sedangkan faktor inkubasi (B) terdiri dari 2 taraf yaitu waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 ulangan.

Penelitian kedua yaitu uji fertilisasi *in-vitro* dengan spermatozoa yang disuplementasi akrosin dosis 0; 3.0; 4.5 dan 6.0 μ g.

a. Status Kapasitas Spermatozoa

Pengujian status kapasitas (kapasitas, reaksi akrosom dan non kapasitas), semen beku setelah dithawing dan disuplementasi akrosin dengan dosis 0 μ g; 3,0 μ g; 4,5 μ g dan 6,0 μ g (dilakukan dengan pewarnaan *Chlortetracycline* (CTC *Staining*). Secara singkat proses preparasi CTC sebagai berikut : (1) 100 μ l semen perlakuan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang telah dibungkus aluminium foil dan ditambah dengan 100 μ l pewarna CTC, vorteks selama 1 menit, dan tambahkan 8 μ l larutan CTC *fixative* vorteks selama 1 menit, (2) Diambil 10 μ l (campuran 1 dan 2) dan ditempatkan di atas *object glass*, ditambahkan dengan 10 μ l larutan DABCO kemudian dicampur dengan tip mikropipet, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan ditekan 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 OPTIP-HOT-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 kapasitas), dan (2) *Fluorescent* terkonsentrasi pada daerah acrosomal yang menandakan spermatozoa mengalami kapasitas (Kaul *et al.*, 1997). Pengamatan status kapasitas dilakukan setelah 24 jam berikutnya.

b. Status Reaksi Akrosom Spermatozoa

Semen perlakuan disuplementasi akrosin dengan dosis 0 μ g; 3,0 μ g; 4,5 μ g dan 6,0 μ g difiksasi dengan 4% *formaldehyde*, kemudian dicuci dengan menambahkan PBS 3 ml dan disentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit, supernatant dibuang dan ditambahkan dengan 0,3 ml FITC (*Flourescent Iso Thio Cyanate*) con. A (Sigma) dengan konsentrasi 10 μ g/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 intact, dan (b) spermatozoa tanpa akrosom. Metode ini merupakan hasil modifikasi peneliti dari metode sebelumnya (Susilawati, 2003).

Analisis Data

Data persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran, kapasitas dan reaksi akrosom diuji dengan Anava pada tingkat kepercayaan 5%, bilamana terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan LSD (*Least Significant Different*). Data dari pemeriksaan maturasi oosit dan cleavage (pembelahan sel) diuji dengan Chi-Square (Steel dan Torrie, 1989).

Hasil dan Pembahasan

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

Hasil penelitian rerata persentase status kapasitas spermatozoa kambing PE tertera pada tabel 1.

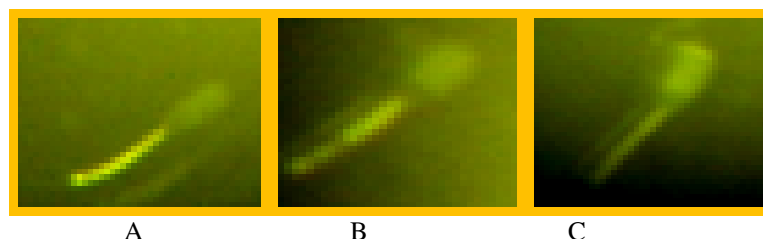
Suplementasi 4.5 µg pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rata-rata persentase kapasitas spermatozoa kambing yang lebih tinggi, dengan demikian maka penambahan suplementasi akrosin 4.5 µg dapat meningkatkan kapasitas spermatozoa kambing. Hal ini karena akrosin berfungsi mempertahankan spermatozoa agar terjadi kapasitas dan mempercepat terjadinya reaksi akrosom pada saat fertilisasi (Mori *et. al.*, 1993; Arcelay *et al.*, 2008).

Akrosin menyebabkan proses kapasitas meningkat secara bertahap meliputi peningkatan fluiditas membran, efluk kolesterol, aliran ion yang mengakibatkan perubahan potensial membran, peningkatan protein fosforilasi tirosin, induksi hiperaktif, perubahan keadaan protein fosforilasi, peningkatan pH intraseluler dan level kalsium (Nas *et al.*, 2004; De Los Reyes, M *et al.*, 2009). Menurut Gadella dan Visconti

Tabel 1. Rerata Persentase Status Kapasitas Spermatozoa Kambing PE Setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (µg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Status Kapasitas Spermatozoa Kambing (%)	Anova
0	30	64.100 ± 2.3798 ^a	F _w : 3.797
	60	65.210 ± 2.8855 ^a	p : .059
3.0	30	63.420 ± 3.3767 ^a	F _{ak} : 190.068 p : 0.000
	60	64.230 ± 2.8084 ^a	
4.5	30	79.760 ± 3.0076 ^b	F _{w*ak} : 0.244 p : 0.865
	60	80.600 ± 3.1876 ^b	
6.0	30	57.470 ± 2.5168 ^c	
	60	59.600 ± 3.0415 ^c	

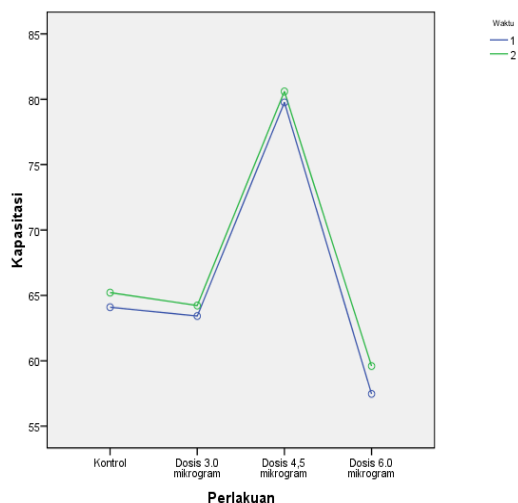
Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 1. Hasil pengamatan status kapasitas spermatozoa kambing PE pada proses pengenceran dengan pewarnaan CTC menggunakan mikroskop epifluorescence (Bar = ½ µm), keterangan : A. Non Kapasitas, B. Kapasitas, dan C. reaksi akrosom.

(2006) secara molekuler, proses kapasitasasi diawali dengan reorganisasi lipid di dalam membran plasma, influk ion dan peningkatan fosforilasi tirosin pada protein yang kemudian menginduksi hiperaktivasi dan reaksi akrosom.

Flesch dan Gadella (2000) menyatakan bahwa kapasitasasi pada beberapa jenis ternak dapat bersifat *reversible* karena dalam seminal plasmanya mengandung makro molekul yang berperan sebagai faktor kapasitasasi. 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 kapasitasasi mampu untuk melakukan fertilisasi (Maxwell dan Watson, 1996; Ba'a, 2009).



Gambar 2. Grafik suplementasi akrosin terhadap kapasitasasi spermatozoa

Keterangan :

- *sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin*
- *sumbu ordinat (vertikal) : persentase kapasitasasi membran spermatozoa*
- *Warna biru : lama inkubasi 30 menit*
- *warna hijau : lama inkubasi 60 menit*

2. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Status Akrosom Spermatozoa Kambing PE

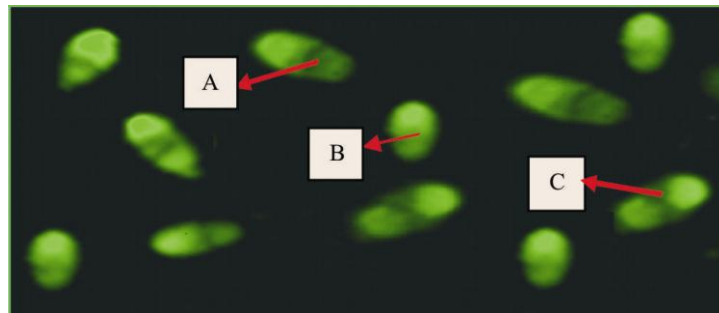
Suplementasi akrosin 4.5 µg pada lama inkubasi 30 menit menghasilkan rata-rata persentase reaksi akrosom spermatozoa kambing yang tinggi, sehingga lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini karena suplementasi akrosin 4.5 µg dengan inkubasi 30 menit dapat mempercepat kapasitasasi dan reaksi akrosom (Liberda *et al.*, 2001). Suplementasi akrosin 4.5 µg pada inkubasi 60 menit terjadi penurunan reaksi akrosom, karena banyak spermatozoa yang telah mengalami kerusakan dan mati.

Reaksi akrosom merupakan reaksi pelepasan enzim-enzim dari akrosom untuk menembus lapisan-lapisan oosit dengan diinduksi oleh protein-protein zona. Salah satu enzim yang utama adalah *serine glycoproteinase* atau disebut akrosin (Aditi *et al.*, 2000). Enzim akrosin ini merupakan bentuk aktif dari proakrosin (bentuk inaktif) (Jonge, 2000). Menurut Susilawati T. (2003), reaksi akrosom merupakan proses eksositosis yang melibatkan fusi antara membran plasma dengan membran luar akrosom dan ditandai dengan peningkatan konsentrasi Ca^{2+} pada daerah equator membran kepala spermatozoa sehingga

Tabel 2. Rerata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing PE Setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (µg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing (%)	Akrosin
0	30	5.10 ± 0.77 ^a	F _W : 12.83
	60	6.22 ± 0.86 ^a	p : 0.001
3.0	30	5.06 ± 0.48 ^a	F _A : 0.99
	60	6.22 ± 0.78 ^a	p : 0.40
4.5	30	5.72 ± 0.47 ^b	F _{W*A} : 5.86
	60	5.55 ± 0.48 ^b	p : 0.002
6.0	30	5.40 ± 0.37 ^a	
	60	5.39 ± 0.43 ^a	

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



Gambar 3. Hasil pengamatan kapasitasi spermatozoa kambing PE dengan pewarnaan FITC menggunakan mikroskop epifluorescence (Bar = $\frac{1}{2}$ μ m), keterangan : A. Kapasitasi, B. Non Kapasitasi, C. Reaksi -Akrosom

spermatozoa menjadi labil dengan terlepasnya enzim-enzim yang ada di akrosom.

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 T, 2003; Ba'a, 2009).

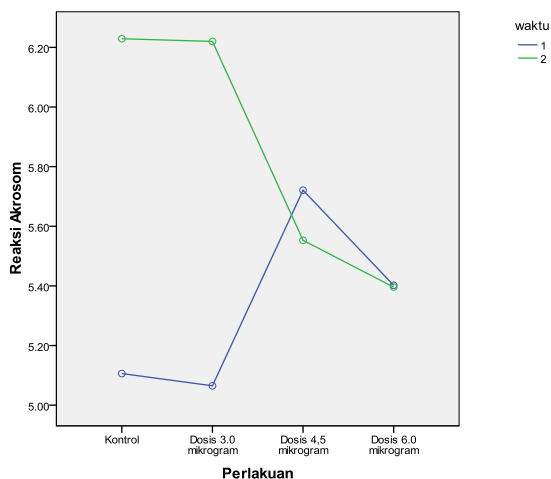
Peristiwa reaksi akrosom pada spermatozoa adalah yang pertama agregasi reseptor yang distimulasi oleh ZP3 dan progesteron. Agregasi reseptor diikuti oleh aliran dari membran dan perubahan sistolik terjadi pada reaksi akrosom spermatozoa mamalia (Puronit *et al.*, 1999). Salah satu agen yang bisa menginisiasi reaksi akrosom adalah ion kalsium. Spermatozoa tidak bisa mengalami reaksi akrosom ketika tidak ada ion kalsium. Disaat menjalani reaksi akrosom pada waktu dan tempat yang tepat, spermatozoa harus mampu bertahan cukup lama dan konsentrasi K^+ intraseluler dijaga tetap tinggi dan pada saat yang sama konsentrasi Na^+ dan Ca^{2+} intraseluler dijaga tetap rendah, karena sangat penting bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Keadaan ini diatur oleh ikatan Na^+ -K-ATPase (memompa ion Na^+ keluar dan ion K^+ masuk ke dalam sel) dan Ca^{2+} -K-ATPase

(memompa Ca^{2+} keluar dari sel) (Baldi *et al.*, 2001; Zi J *et al.*, 2006).

Kalsium yang masuk akan menyebabkan kadar kalsium intrasel meningkat atau akan mengisi tempat penyimpanan kalsium. Selain itu, ikatan ligand dengan reseptor tertentu akan menghasilkan *second messenger* IP₃ yang akan berikatan dengan ROCC pada akrosom dan menyebabkan dikeluarkannya kalsium menuju sitoplasma. Peningkatan kadar kalsium dalam sitosol akan menghambat kemampuan IP₃ untuk mengaktivasi kanal. Kalsium dalam sitoplasma yang meningkat akan masuk ke dalam mitokondria dan digunakan untuk berbagai enzim oksidasi fosforilasi untuk sintesa ATP. Di samping itu, kalsium juga akan berikatan dengan berbagai reseptor protein dalam sel, seperti proteinkinase C (Breitbart dan Noar, 2006; Jonge, 2000).

Membran akrosom juga terdapat sistem transport yang membutuhkan energi untuk memasukkan kalsium ke dalam akrosom. Kalsium yang berasal dari akrosom akan berikatan dengan Phospholipase C (PLC)-fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP₂)-Diacylglycerol (DAG) dan selanjutnya mempengaruhi membran plasma untuk membuka sehingga mengakibatkan masuknya kalsium ke sitoplasma. Kalsium yang berasal dari akrosom akan mempengaruhi aktivitas *capacitative* Ca^{2+} entry (CCE) pada membran plasma yang menyebabkan kalsium dapat masuk melalui jalur ini. Reseptor pada membran sel akan mengaktivasi enzim PLC untuk mengubah molekul prekursor PIP₂ menjadi DAG dan

inositol (1,4,5) trifosfat (IP3). DAG yang juga berperan sebagai *second messenger* akan merangsang aktivitas protein kinase C (PKC), sedangkan IP3 menyebabkan pelepasan kalsium pada akrosom. Peningkatan ion kalsium yang terjadi di akrosom akan mengaktifkan aktin sebagai *F-actin barrier* untuk membawa komponen akrosom yaitu enzim akrosin, kemudian membran spermatozoa akan melakukan fusi dengan membran oosit (Breitbart dan Noar, 2006; Jadid M. 2009). Akrosin merupakan enzim protease yang dapat menghancurkan glikoprotein pada zona pelusida. Peristiwa ini disebut reaksi akrosom. Mekanisme ini terjadi ketika IP3 melepaskan kalsium intrasel yang melibatkan interaksi antara reseptor spesifik pada membran akrosom dan pembukaan kanal kalsium akrosom (Jonge, 2000).



Gambar 4. Grafik suplementasi akrosin terhadap reaksi akrosom

Keterangan :

-sumbu absis (*horizontal*) : pemberian dosis akrosin

-sumbu ordinat (*vertikal*) : persentase reaksi akrosom spermatozoa

-garis biru : lama inkubasi 30 menit

-garis hijau : lama inkubasi 60 menit

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut Suplementasi *akrosin* dosis 4.5 µg pada semen kambing *PE* dapat meningkatkan kualitas

spermatozoa yaitu : kapasitas dan reaksi akrosom.

Daftar Pustaka

- Anonimous, 2007. Kondisi Peternakan di Indonesia saat ini. Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta.
- Adel A. Zalata, H Ashraf, Ahmed and H Frank 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, Ballygunge Circular Road, Calcutta 700019 India. J. Biology of Reproduction.* Vol 13: 571-578
- Arcelay, E. ;JG. Alvarez and BT Storey. 2008. Assessment of Sperm Function for IVF. *Human Reprod.* 3:89-95.
- Baldi, E; M Luconi, L Bonaccorsi, C Krausz and G. Forti. 2001. Human Sperm Activation During Capacitation And Acrosome Reaction: Role Of Calcium, Protein Phosphorylation And Lipid Remodelling Pathways. *Frontier In Bioscience* 1. 189-205.
- Breitbart, H. and Z. Noar. 2006. Protein Kinase In Mammalian Sperm Capacitation Reaction. *Reviews of Reproduction. Journal of Reproduction and Fertility.* 1359-60044. 151-159.
- Cui H., M. Yun; Z. Rui Lan; Q. Wang and ZY. Zhang. 2004. Determination of Sperm Acrosin Activity for Evaluation of Male Fertility. *Asian J. Androl.* 2: 229-232.
- Darnell. J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology.* 2nd Edition. *Sci.Am.Books* : 141-527.
- De Los Reyes, M. , Medina, G., Palomino, J. 2009. Western blot analysis of proacrosin/acrosin in frozen dog sperm during in vitro capacitation. *Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile, PO Box 2, Correo 15, Santiago, Chile. Reproduction in Domestic Animals.* Volume 44, July 2009, Pages 350-353

- 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
- 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.
- Grudzinskas. JG. and JL. Yovich. 1995. Gametes The Spermatozoa. Cambridge University Press. Perth. Australia.
- Hafez, ESE. 2002. Asisted Reproductive Technology. Ovulation Manipulation, In vitro Fertilization/Embryo Transfer (IVF/ET). in *Reproduction in Farm Animal*. Hafez, B and Hafez, ESE. 7th ed. Lippincott Williams and Wikins. Awollers Kluwer Company. Philadelphia.
- Higgins, J.E. and A.P.Klinbaun, 1985. Design Methodology For Randomized Clinical Trial With an Emphasis on Contraceptive Research. *Family Health International*.
- Jadid, M.N., 2009. Perubahan Integritas Membran, Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing Menggunakan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Sexing Dengan Gradien Yang Berbeda. Program Pascasarjana Unibraw. Malang.
- Jonge, C.J.D. 2000. Human Fertilization. In: *Assisted Reproduction Laboratory*. Keel, BA, May, JV, and Jonge CJD (Ed). CRC Press, New York.
- Kaul. G., S. Singhs, KK. Gandhi and SR. Anand. 1997. Calcium Requirement and Time Course of Capacitation of Goat Spermatozoa Asseted by Clour-tetracycline Assay. *J.Androl*. 29(5): 243-251.
- Kennedy, WP.; JM. Kaminski; HH. Van Der Ven and LJD. Zaneveld. 2006. A Simple, Clinical Assay to Evaluate The Acrosin Activity of Human Spermatozoa. *Journal of Andrology*. Vol. 20 No. 3. 221- 234.
- La Ode Ba'a. 2009. Peran D-fruktosa dan Kuning Telur Dalam Proses Penghambatan Kapasitas dan Kerusakan Membran Spermatozoa kambing. Program Pasca Sarjana. 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.
- Maxwell. WMC. And PF. Watson. 1996. Recent Progres in Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*. 42 : 261-275
- 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.
- Naz, RK. and Ahmed. 2004. Moleculer Identifies of Human Sperm Proteins That Bind Human Zona Pellucida: Nature of Sperm-Zona Interaction. Tyrosine Kinase Activity and Involvement of FA-1. *Mol. Reprod*. 39, 397-408
- Puronit, SB., M. Laloraya and Kumar. 1999. Role of Ion and Ion Channel in Capacitation and Acrosome Reaction of Spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*. Sep: 1: 95-107.
- Steel, RGD and H. Torrie. 1989. Principles and Procedures of Statistics. International Student Edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. Tokyo. Japan.
- Sumitro, SB. dan T. Susilawati. 1998. Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistem dan Inverted. Laboratorium Biologi. FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati, T. 2003. Peran Insulin Like Growth Factor-1 Complex Plasma Seminalis Kambing 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 acro-

some reaction and penetrate ova. *J. Biology of Reproduction.* 44 : 1080-1091.

Zi, J., Song, P., Wang, L. 2006. Effect of nitric oxide on acrosome reaction via acrosin in human sperm. Clinical Laboratory, Shenzhen Futian Women and Children Health Care Hospital, Shenzhen 518026, China. *Chinese Journal of Andrology.* Volume 20, 2006, Pages 42-43+47