

Sebaran Antiaglutinin Spermatozoa dalam Plasma yang Dikoleksi dari *Epididymis* dan Ejakulat Domba

THE DISTRIBUTION OF SPERM ANTIAGGLUTININ IN PLASMA COLLECTED FROM EPIDIDYMIS AND EJACULATE OF RAM

¹MUHAMAD HAVIZ, ²SRIHADI AGUNGPRIYONO, ³ARIEF BOEDIONO,
³MOKHAMAD FAHRUDIN, ⁴M. AGUS SETIADI

¹ Program Studi Pendidikan Biologi STKIP PGRI Sumatera Barat 25142
 Telpon (0751) 705371, fax (0751) 7058302, E-mail:haviz80@yahoo.co.id

² Lab. Histologi Dept. Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH
 Institut Pertanian Bogor, 16680

³ Lab. Embriologi Dept. Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH
 Institut Pertanian Bogor, 16680

⁴ Lab. IVF Dept. Klinik, Reproduksi dan Kebidanan FKH
 Institut Pertanian Bogor, 16680

ABSTRAK

Penelitian untuk mengetahui tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa dan sebaran antiaglutinin dalam plasma asal epididymis dan ejakulat telah dilakukan untuk mengoptimalkan pemanfaatannya dalam fertilisasi *in vitro*. Tingkat aglutinasi dan aktivitas antiaglutinin plasma *epididymis* dan ejakulat domba ditentukan dengan cara menghitung jumlah aglutinasi antarkepala spermatozoa setelah diinkubasikan selama 1, 3, 5 dan 7 jam *in vitro* dalam media Krebs Ringer-HEPES. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ditemukan menurun sesuai dengan pertambahan waktu inkubasi. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa *cauda epididymis* ditemukan nyata ($P<0.05$) lebih rendah jika dibandingkan dengan spermatozoa asal *caput* dan *corpus epididymis* serta ejakulat. Hasil ini mengindikasikan bahwa sebaran antiaglutinin yang ditemukan di *cauda epididymis* lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang ditemukan pada *caput* dan *corpus epididymis* serta ejakulat. Penurunan tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa juga ditemukan pada kultur *in vitro* spermatozoa asal *cauda epididymis* dan ejakulat yang diinkubasikan dalam medium Krebs Ringer-HEPES yang mengandung plasma *cauda epididymis*. Namun demikian, perlu studi lanjut untuk menentukan keberadaan dan pemurnian antiaglutinin dari epididymis domba yang bisa digunakan untuk keperluan persiapan spermatozoa pada fertilisasi *in vitro*.

Kata kunci: aglutinasi, spermatozoa, antiaglutinin, plasma, epididymis

J Vet 2007 8 (1) : 24-31

ABSTRACT

A study to investigate the rate of head-to-head sperm agglutination and the distribution of antiagglutinin in plasma collected from epididymis and ejaculate was carried out in an effort to optimize their use for *in vitro* fertilization. The rate of agglutination and the distribution of antiagglutinin were determined by counting the number of head-to-head sperm agglutination after 1, 3, 5 and 7 hour incubations in Krebs Ringer-HEPES media containing plasma collected from epididymis and ejaculate. The rate of head-to-head sperm agglutination decreased according to the times of incubations. The rate of agglutination was significantly ($P<0.05$) lower on the sperm collected from cauda epididymal than those collected from caput, corpus epididymal and ejaculate. The result also indicated that the distribution of anti-agglutinin be higher in cauda epididymis than that in other areas. The reduction of agglutination was also observed on sperm collected from cauda and ejaculate cultured *in vitro* in KR-HEPES containing the plasma of cauda epididymal. A further investigation is however necessary to confirm whether the antiagglutinin of plasma from cauda epididymis can be used in the sperm preparation for *in vitro* fertilization.

Key words: sperm, agglutination, antiagglutinin, epididymis, plasma

J Vet 2007 8 (1) : 24-31

PENDAHULUAN

Upaya peningkatan populasi ternak dengan menerapkan teknologi reproduksi mutakhir, khususnya fertilisasi *in vitro*, belum dilakukan secara optimal (Boediono *et al.*, 2000a, Djuwita *et al.* 1998). Karena itu, perlu upaya untuk meningkatkan tingkat keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Dalam fertilisasi *in vitro*, spermatozoa biasanya diambil langsung dari *epididymis* atau dari ejakulat yang ditampung menggunakan vagina buatan. Kedua cara ini dapat dilakukan dengan mudah dan murah. Misalnya, pengambilan spermatozoa dari *epididymis* dapat dilakukan dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan, sedangkan penampungan ejakulat dengan bantuan vagina buatan juga menggunakan teknik sederhana dan murah (Rizal *et al.* 2004). Namun, keduanya sering mengabaikan cairan plasmanya yang berperan amat penting sebagai media untuk menjaga kehidupan spermatozoa.

Untuk menjaga kehidupannya saat dipakai dalam proses fertilisasi *in vitro*, spermatozoa biasanya diinkubasikan dalam media tertentu sehingga kehidupan, daya tahan dan kapasitasnya terjaga sebelum diinkubasikan bersama dengan sel telur (Boediono *et al.* 2000a). Secara alami, spermatozoa yang dibiarkan dalam media tertentu akan mengalami proses aglutinasi atau penggumpalan. Secara tidak langsung, proses aglutinasi akan menurunkan tingkat efisiensi spermatozoa dalam membuahi sel telur. Penambahan heparin pada medium inkubasi (Thundathil *et al.* 1998) dilaporkan dapat meningkatkan kapasitas spermatozoa untuk membuahi sel telur dan dapat mengurangi tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa. Namun, ada yang melaporkan bahwa spesies hewan berpengaruh terhadap efisiensi peng-

gunaan heparin untuk meningkatkan efisiensi atau kualitas spermatozoa. Selain itu, mekanisme kerja heparin belum diketahui secara jelas, apakah senyawa ini khusus menghambat reaksi aglutinin atau menghambat kerja semua jenis protein pada akrosom spermatozoa. Jika kerjanya menghambat semua jenis protein, maka heparin juga akan mengganggu kerja protein pengikat zona pelusida dari ovum. Dengan demikian diperlukan cara khusus untuk meng-hambat kerja aglutinin sehingga tidak mengganggu kerja protein lainnya. Penghambatan aglutinasi tampaknya dapat dilakukan dengan antiaglutinin. Salah satu sumber antiaglutinin adalah plasma *epididymis* (Harayama *et al.* 1994) sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan kapasitas spermatozoa dalam fertilisasi *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penyiapan Plasma dari *Epididymis* dan *Seminalis*

Epididymis domba yang dipakai dalam penelitian ini diambil dari rumah potong hewan tradisional dan kemudian dibawa ke laboratorium. Cairan plasma diambil dari bagian *caput*, *corpus* dan *cauda epididymis* menggunakan *syringe*. Sementara itu, ejakulat domba ditampung dengan bantuan vagina buatan. Sampel cairan dimasukan ke dalam tabung berukuran 1.5 ml dan disentrifugasi (Kokusen H-26F Corp. Tokyo, Japan) pada kecepatan 700 g (*epididymis*) dan 500 g (ejakulat) selama 5 menit pada suhu ruangan. Untuk mendapatkan plasma, cairan supernatan diambil dan disentrifigasi ulang (Kokusen H-1500DR Corp. Tokyo, Japan) dengan kecepatan 10000 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Cairan plasma kemudian diambil dan disimpan pada suhu 4 °C.

Sebaran Antiaglutinin dengan Kajian Aglutinasi Spermatozoa

Untuk mengetahui sebaran antiaglutinin di daerah *caput*, *corpus*, *cauda epididymis* dan ejakulat, dipakai rancangan acak lengkap faktorial dengan 4 jenis perlakuan dan 5 kali ulangan setiap perlakuan. Sebaran antiaglutinin di keempat daerah tersebut ditentukan dengan menghitung tingkat aglutinasi spermatozoa yang diinkubasi-kan secara *in vitro* selama 1, 3, 5 dan 7 jam.

Cairan yang diperoleh dari bagian *caput*, *corpus* dan *cauda epididymis*, serta dari ejakulat diencerkan (1:50) dengan medium Krebs Ringer-HEPES (KR-HEPES) dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38.5 °C selama 1, 3, 5 dan 7 jam. Sebanyak 10 µl cairan dari setiap perlakuan diambil dengan mikropipet dan dibuat preparat ulas pada gelas objek berukuran 76.2 x 25.4 x 1.2 mm. Preparat difiksasi dengan glutaraldehid 0.25% dalam NaCl Fisiologis (1:1), dikering-anginkan dan diwarnai dengan Giemsa 10% (Merck, Darmstadt Germany). Frekuensi aglutinasi ditentukan dengan menghitung jumlah aglutinasi (perlekatan) antarkepala spermatozoa pada 10 lapang pandang mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali.

Penambahan Plasma pada Spermatozoa *Cauda Epididymis* dan Ejakulat

Penelitian tentang efektifitas penambahan plasma pada spermatozoa asal *cauda epididymis* dan spermatozoa ejakulat dilakukan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan 5 perlakuan dan setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Keefektifannya ditentukan dengan melihat tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa yang diinkubasi bersama plasma secara *in vitro* selama 1,

3, 5 dan 7 jam.

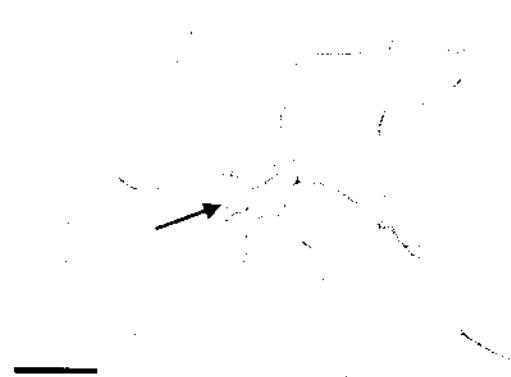
Spermatozoa segar diambil dari *cauda epididymis* dengan menyayat dan menyedotnya menggunakan *syringe* berukuran 10 ml dan dari ejakulat pejantan yang diambil dengan menggunakan vagina buatan. Spermatozoa segar kemudian diencerkan 200 kali dengan medium KR-HEPES dan disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruangan dengan kecepatan 700 g (spermatozoa *cauda epididymis*) dan 500 g (spermatozoa ejakulat). *Pellet* spermatozoa yang diperoleh dan sampel plasma dari stok serta medium KR-HEPES (1:1:50) dicampur ke dalam tabung berukuran 15 ml (Nunc^T), kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38.5 °C. Setelah inkubasi selama 1, 3, 5 dan 7 jam, 10 µl dari setiap campuran diambil dan dibuat preparat ulas pada gelas objek berukuran 76.2 x 25.4 x 1.2 mm. Selanjutnya, preparat difiksasi dengan glutaraldehid 0.25% dalam NaCl fisiologis (1:1), dikering-anginkan dan diwarnai dengan Giemsa 10%. Frekuensi aglutinasi ditentukan dengan menghitung jumlah aglutinasi antarkepala spermatozoa pada 10 lapang pandang mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji sidik ragam dan adanya perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji Tukey (Steel dan Torrie 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebaran Antia-aglutinin dengan Kajian Aglutinasi Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ditemukan makin menurun seiring dengan pertambahan waktu inkubasi

(Tabel 1, Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Harayama dan Kato (2002) bahwa tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa meningkat pada diinkubasi pada suhu 38.5°C selama 1 jam, tetapi mengalami penurunan kembali dengan makin lamanya waktu inkubasi.



Gambar 1 Aglutinasi antarkepala spermatozoa domba (!). Bar: 50 μ m

Selama inkubasi 1 jam, tingkat aglutinasi tertinggi ditemukan pada spermatozoa asal *corpus epididymis* dengan tingkat aglutinasi 36.77%, sedangkan terendah dan berbeda nyata ($P<0.05$) ditemukan di spermatozoa asal *cauda epididymis* dengan tingkat aglutinasi 25.77%. Hasil ini menunjukkan bahwa tampaknya secara tidak langsung antiaglutinin mempunyai afinitas

tertinggi terhadap spermatozoa asal *cauda epididymis* dan terendah terhadap spermatozoa asal *corpus epididymis*. Hasil yang sama juga ditemukan pada waktu inkubasi 3, 5, dan 7 jam. Menurut Harayama *et al.* (2000) antiaglutinin merupakan sejenis protein yang disekresikan oleh sel-sel epitel lumen *corpus* dan dialirkan ke *cauda epididymis*. Protein ini terikat pada akrosom spermatozoa dan sel-sel epitel *epididymis* yang aktif mensekresikan cairan ini dan dibutuhkan oleh spermatozoa selama berada di *epididymis* (Okamura *et al.* 1995). Secara tidak langsung, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa sebaran antiaglutinin tertinggi ditemukan di *cauda epididymis* dan terendah ditemukan di *corpus epididymis*. Ada dugaan bahwa protein plasma diikat oleh spermatozoa selama perjalannya di *epididymis* yang diperlukan untuk perubahan struktur dan morfologi spermatozoa.

Penambahan Plasma pada Spermatozoa Cauda Epididymis

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa secara nyata ($P<0.05$) menurun seiring dengan pertambahan waktu

Tabel 1 Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa asal *caput*, *corpus*, *cauda epididymis* dan ejakulat domba pada kultur *in vitro*

Asal Spermatozoa	Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa setelah inkubasi (%)			
	1 jam	3 jam	5 jam	7 jam
Caput Epididymis	32.80 ± 1.06 ^{aB}	20.93 ± 0.37 ^{bB}	9.80 ± 0.94 ^{cB}	5.10 ± 0.30 ^{dA}
Corpus Epididymis	36.77 ± 1.22 ^{aA}	22.67 ± 1.09 ^{bA}	12.10 ± 0.55 ^{eAB}	6.60 ± 0.73 ^{dA}
Cauda Epididymis	25.77 ± 1.21 ^{aC}	16.90 ± 1.23 ^{bC}	7.10 ± 0.91 ^{eC}	2.03 ± 0.52 ^{dB}
Ejakulat	33.20 ± 1.20 ^{aB}	23.00 ± 1.35 ^{bA}	11.40 ± 1.13 ^{eA}	3.23 ± 0.39 ^{dB}

Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a-d: $P<0.05$)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A-C: $P<0.05$)

Tabel 2 Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa *cauda epididymis* domba dengan penambahan plasma pada kultur *in vitro*

Penambahan Plasma	Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa setelah inkubasi (%)			
	1 Jam	3 Jam	5 Jam	7 Jam
Caput epididymis	48.80 ± 3.56 ^{aAB}	31.10 ± 3.34 ^{bA}	15.67 ± 1.27 ^{cA}	5.87 ± 1.68 ^d
Corpus epididymis	53.10 ± 3.70 ^{aA}	33.00 ± 2.60 ^{bA}	16.23 ± 3.34 ^{cA}	6.03 ± 0.98 ^d
Cauda epididymis	41.30 ± 4.71 ^{aB}	20.53 ± 2.87 ^{bB}	6.60 ± 3.23 ^{cB}	4.83 ± 1.10 ^c
Ejakulat	48.27 ± 3.21 ^{aAB}	22.97 ± 2.69 ^{bB}	10.63 ± 2.88 ^{cA}	5.03 ± 1.62 ^c
Tanpa plasma (kontrol)	59.23 ± 9.23 ^{aA}	35.73 ± 10.06 ^{bA}	12.93 ± 2.42 ^{cA}	6.50 ± 0.68 ^d

Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a-d: P<0.05)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A-C: P<0.05)

inkubasi (Tabel 2). Dalam penelitian ini juga ditemukan adanya interaksi antara perlakuan waktu inkubasi dan penambahan plasma. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa asal *cauda epididymis* dalam medium KR-HEPES dengan penambahan plasma asal *cauda epididymis* selama 1, 3 dan 5 jam (41.30%, 20.53%, 6.60%) nyata lebih rendah (P<0.05) jika dibandingkan dengan kontrol (59.23%, 35.73%, 12.93%) (Tabel 2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan plasma *cauda epididymis* di spermatozoa *cauda epididymis* lebih efektif bekerja dibandingkan dengan plasma lain. Diduga protein antiaglutinin yang terdapat di plasma *cauda epididymis* juga efektif menghalangi perlekatan antarkepala spermatozoa dibanding plasma lain. Hasil ini juga memperlihatkan bahwa hanya protein plasma *cauda epididymis* saja yang mampu diikat spermatozoa asal *cauda epididymis* sampai waktu inkubasi 5 jam. Diduga struktur membran spermatozoa *cauda epididymis* yang masih labil akan mengganggu pengikatan protein plasma, karena fluiditas dan permeabilitas

membran spermatozoa meningkat setelah mengalami proses pematangan dan disimpan sementara di dalam *epididymis*. Hal ini terjadi seiring dengan perubahan komposisi penyusun membran plasma.

Adanya protein lain yang masih terikat pada membran spermatozoa ketika berada *cauda epididymis*, seperti protein untuk mencegah terjadinya reaksi akrosom dini (Hunter *et al.* 1978) juga diduga sebagai penyebab terjadi hal tersebut. Faktor-faktor lain diduga berpengaruh adalah jumlah, konsentrasi dan keberadaan protein (Arts *et al.* 1997), polarisasi protein (Hunnicut *et al.* 1997), kandungan kolesterol, asam lemak jenuh dan tidak jenuh (Nolan dan Hammersted 1997) sehingga keefektifan pengikatan protein anti-aglutinin oleh spermatozoa *cauda epididymis* kurang baik.

Penambahan Plasma pada Spermatozoa Ejakulat

Interaksi antara perlakuan waktu inkubasi dan penambahan plasma ditemukan pada penelitian ini. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ditemukan menurun secara nyata

Tabel 3. Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ejakulat domba dengan penambahan plasma pada kultur *in vitro*

Penambahan Plasma	Tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa setelah inkubasi (%)			
	1 Jam	3 Jam	5 Jam	7 Jam
Caput epididymis	24.10 ± 1.05 ^{aD}	14.00 ± 0.54 ^{bC}	7.37 ± 0.46 ^{cBC}	3.23 ± 0.70 ^d
Corpus epididymis	33.20 ± 0.72 ^{aB}	19.00 ± 1.93 ^{bB}	9.87 ± 1.72 ^{cAB}	3.47 ± 0.38 ^d
Cauda epididymis	21.70 ± 1.40 ^{aD}	13.60 ± 1.61 ^{bC}	6.97 ± 0.60 ^{cC}	2.77 ± 0.81 ^d
Ejakulat	28.87 ± 2.04 ^{aC}	15.80 ± 0.84 ^{bC}	10.37 ± 2.41 ^{cAB}	3.83 ± 0.77 ^d
Tanpa plasma (kontrol)	47.33 ± 2.55 ^{aA}	25.03 ± 1.65 ^{bA}	12.43 ± 2.78 ^{cA}	4.54 ± 1.31 ^d

Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a-d: P<0.05)

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A-D: P<0.05)

(P<0.05) seiring dengan pertambahan waktu inkubasi (Tabel 3).

Analisis lebih lanjut terhadap pengaruh penambahan plasma menunjukkan bahwa tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa pada penambahan plasma *cauda epididymis* selama 1, 3, dan 5 jam (21.70%, 13.60%, 6.97%) nyata lebih rendah (P<0.05) jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol dengan waktu inkubasi yang sama (47.33%, 25.03%, 12.43%). Berbeda dengan spermatozoa *cauda epididymis*, tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ejakulat dengan penambahan plasma *cauda epididymis* nyata (P<0.05) lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan penambahan plasma *caput*, *corpus epididymis* dan plasma ejakulat. Meskipun hanya diinkubasikan dalam kultur selama 5 jam, hasil ini mengindikasikan bahwa antiaglutinin yang terdapat pada plasma *cauda epididymis* diduga bekerja lebih efektif dalam menurunkan tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa ejakulat jika dibandingkan dengan plasma lainnya. Spermatozoa ejakulat memiliki struktur membran yang stabil karena

sudah dilapisi oleh senyawa pelindung yang dapat mencegah terjadinya reaksi akrosom prematur (Gilbert 1988) sehingga memudahkan pengikatan protein.

Penyiapan spermatozoa yang memadai diperlukan dalam proses fertilisasi *in vitro*. Dalam proses ini spermatozoa diseleksi dengan cara mencuci, disentrifugasi dan diinkubasi dan proses ini disebut dengan *swim up* (Yovich, 1995). Pada fertilisasi *in vitro*, spermatozoa dicuci dengan medium kapasitasi dan kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5 % dengan suhu 38.5 °C. Spermatozoa yang dipakai dalam fertilisasi *in vitro* hanya yang motil saja (Boediono *et al.* 2000a; 2000b). Teknik penyiapan spermatozoa (Inaudi *et al.* 2002; Zavos *et al.* 2000) yang digunakan dalam penelitian diduga dapat menyebabkan penurunan tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa. Proses pencucian dan inkubasi spermatozoa (Suzuki *et al.* 1994) bahkan bisa menyebabkan penurunan persentase kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Rathi *et al.* 2001; Yanagimachi 1994). Meskipun dengan suhu yang sama,

makin lama waktu inkubasi menyebabkan makin banyaknya ikatan antarkepala spermatozoa yang terlepas dan secara tidak langsung juga menyebabkan penurunan tingkat aglutinasi. Suhu inkubasi akan berhubungan langsung dengan reaksi akrosom (Zou dan Yang 2000), hipermotilitas (Mortimer *et al.* 1998) dan kematian spermatozoa.

Sebaran antiaglutinin yang tertinggi ditemukan di *cauda epididymis* sehingga untuk keperluan fertilisasi *in vitro*, inkubasi spermatozoa sebaiknya diencerkan dalam medium KR-HEPES yang plasmanya berasal dari *cauda epididymis*. Namun, untuk mengetahui sejauh mana keefektifannya untuk mencegah aglutinasi antar kepala sperma perlu penelitian lanjutan.

SIMPULAN DAN SARAN

Sebaran antiaglutinin yang ditemukan di *cauda epididymis* lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang ditemukan pada *caput* dan *corpus epididymis* serta ejakulat. Penurunan tingkat aglutinasi antarkepala spermatozoa juga ditemukan pada kultur *in vitro* spermatozoa asal *cauda epididymis* dan ejakulat yang diinkubasikan dalam medium Krebs Ringer-HEPES yang mengandung plasma *cauda epididymis*.

Namun demikian, perlu studi lanjut untuk menentukan keberadaan dan pemurnian antiaglutinin dari epididymis domba yang bisa digunakan untuk keperluan persiapan spermatozoa pada fertilisasi *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Penelitian Hibah Pascasarjana, Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Institut Pertanian Bogor Tahun 1 2005/2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Arts EGJM, Wijchman JG, Jager S, Hoekstra D. 1997. Protein involvement in the fusion between the equatorial segment of acosome-reacted human spermatozoa and liposomes. *Biochem J* 325: 191-198.
- Berg DK, Asher GW. 2003. New development reproductive technologies in deer. *Theriogenology* 59: 189–205.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Muhammad K, Djuwita I, Herliati. 2000a. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner* 7: 11-17.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Djuwita I, Muhammad K, Godke RA. 2000b. Kloning embrio dengan pembuatan kembar identik melalui rekayasa embrio. *Prosiding Bioteknologi Pertanian*: 28-35.
- Djuwita I, Rusiyantono Y, Kusdiantoro M, Purwantara B, Sukra Y. 1998. Pengaruh serum homolog dan heterolog terhadap proses pematangan dan pembuahan oosit domba di dalam medium biakan *in vitro*. *Media Veteriner* 5: 7-10.
- Gilbert SF. 1988. *Developmental Biology*. 2nd Ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, Publ: 33-74.

- Harayama H, Kato S. 2002. Relationship between bicarbonat and cyclic nucleotide in the promoting effects on head-to-head agglutination in boar spermatozoa. *Asian J Androl* 4: 83-86.
- Harayama H et al. 2000. Biochemical characterization of sialoprotein anti-agglutinin purified from boar epididymal and seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 55: 96-103.
- Harayama H, Miyano T, Miyake M, Kusunoki H, Kato S. 1994. Identification of anti-agglutinin in epididymal plasma of boar. *Mol Reprod Dev* 37: 436 (Abstract).
- Hunnicut G, Koppel DE, Myles DG. 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperma maturation in the epididymis. *Dev Biol* 191: 146-159.
- Hunter RHF, Holtz W, Hermann H. 1978. Stabilizing role of epididymal plasma in relation to the capacitation time of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1: 161-166.
- Inaudi P, Petrilli S, Joghzapour A, Trusso P, Petraglia F. 2002. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of procedure: simplified one-step swim-up method versus classic swim up. *Human Reprod* 17: 1288-1291.
- Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. 1998. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reprod* 13: 2139-2146.
- Nolan JP, Hammersted RH. 1997. Regulation of membrane stability and the acosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11: 670-682.
- Okamura N et al. 1995. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific a-mannosidase. *Mol Reprod Dev* 42: 141-148.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 65: 462-470.
- Rizal M, Herdis, Boediono A. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5° C). *J Anim Product* 6: 30-36.
- Steel RGD, JH Torrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Terjemahan edisi-2. Jakarta: PT Gramedia Utama.
- Suzuki K, Ebihara M, Nagai T, Clarke NGE, Harrison RAP. 1994. Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes in vitro, and synergism with caffeine. *Reprod Fertil Dev* 6: 211-227.
- Thundathil JAT, Palasz AD, Barth S, Mapletoft RJ. 1998. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 50: 328-333.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editor. *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd: 189-317.
- Yovich JL. 1995. Sperm preparation for assisted conception. In: Grudzinskas JG, Yovich JL. *Gametes The Spermatozoon*. New York: Cambridge University Press: 268-281.
- Zavos PM, Abdallah A, Aslanis MJr, Correa, Zavos PN. 2000. Use of the multi-ZSC one-step standaridized swim-up method; recovery of high quality spermatozoa for intrauterine insemination or other forms of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 74: 834-835.
- Zou CX, Yang ZM. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. *Theriogenology* 53: 1477-1488.