

Identifikasi Kualitas Spermatozoa Kambing Pasca-Sexing Dengan Gradien Percoll

Nurul Jadid Mubarakati^{1*}, Trinil Susilawati², M. Sasmito Djati²

¹Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Surabaya, Surabaya, Indonesia.

²Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.

*Corresponding author: nurulumubarakati@unesa.ac.id

ABSTRAK

Sexing spermatozoa bertujuan memisahkan spermatozoa untuk menentukan jenis kelamin anak melalui inseminasi buatan. Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dipilih karena relatif mudah dilakukan dan dapat menghasilkan kualitas spermatozoa yang baik. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perbedaan gradien densitas terhadap profil integritas membran, kapasitas, dan reaksi akrosom spermatozoa serta influks ion kalsium akibat proses *sexing*. Semen kambing yang memenuhi syarat diencerkan dengan andromed, kemudian disentrifugasi menggunakan gradien Percoll. Uji integritas membran dilakukan dengan HOST, sedangkan kapasitas dan reaksi akrosom diamati menggunakan pewarnaan CTC dan FITC-Con A. Konfirmasi influks ion kalsium dilakukan dengan mikroskop konfokal menggunakan Fluo-3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) penggunaan 3, 5, dan 10 gradien Percoll tidak berpengaruh nyata terhadap integritas membran, kapasitas, dan reaksi akrosom; (2) *sexing* dengan dua gradien dapat mempengaruhi kapasitas dan reaksi akrosom, namun tidak integritas membran; (3) jumlah spermatozoa yang kehilangan akrosom lebih tinggi pada pengamatan FITC-Con A dibandingkan CTC; dan (4) profil influks ion kalsium dapat diamati jelas dengan mikroskop konfokal. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dapat digunakan untuk *sexing* spermatozoa tanpa menyebabkan kerusakan membran yang berarti, meskipun beberapa parameter fisiologis seperti kapasitas dan reaksi akrosom tetap perlu diperhatikan.

Kata Kunci: *Sexing*, kualitas spermatozoa, gradien percoll, integritas membran, kapasitas, reaksi akrosom

Pendahuluan

Kemajuan pesat dalam bidang bioteknologi telah mendorong perkembangan berbagai teknik reproduksi modern. Secara khusus, bioteknologi reproduksi menjadi salah satu teknologi strategis dalam upaya meningkatkan produktivitas dan kualitas hasil peternakan melalui berbagai bentuk rekayasa reproduksi. Penerapan teknologi ini berpotensi memperbaiki mutu genetik, meningkatkan efisiensi produksi, dan mendukung pengembangan industri peternakan pada masa yang akan datang. Beberapa teknologi yang banyak digunakan dalam reproduksi ternak antara lain Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE). Di antara kedua teknik tersebut, IB merupakan metode yang relatif mudah diterapkan dan berperan penting dalam meningkatkan keberhasilan usaha budidaya ternak. Pemanfaatan IB akan memberikan hasil yang lebih optimal apabila jenis kelamin anak dapat diarahkan sesuai kebutuhan. Salah satu pendekatan yang dapat digunakan untuk tujuan tersebut ialah pemisahan spermatozoa (*sexing*) berdasarkan kromosom X atau Y sebelum

proses inseminasi. Teknik *sexing* ini terbukti mampu meningkatkan efisiensi reproduksi, memperbaiki mutu genetik, serta memberikan keuntungan ekonomi bagi peternak (Susilawati, 2000).

Perbedaan utama antara spermatozoa X dan Y terletak pada ukuran serta kandungan DNA, di mana spermatozoa X memiliki ukuran lebih besar dan kandungan DNA lebih tinggi dibandingkan spermatozoa Y (Hamano, 2007). Pemisahan kedua jenis spermatozoa tersebut telah dilakukan dengan berbagai metode seperti kolom albumin, *velocity sedimentation*, sentrifugasi gradien densitas percoll, elektroforesis, H-Y antigen, *flow sorting*, dan *sephadex column chromatography* (Hafez & Hafez, 2000; McEvoy, 1992). Namun sebagian metode tersebut memiliki keterbatasan, terutama dari segi biaya alat dan bahan sehingga kurang efisien untuk diadopsi pada tingkat laboratorium. Oleh sebab itu, diperlukan metode alternatif yang lebih ekonomis dan mudah diaplikasikan. Salah satu pendekatan yang memenuhi kriteria tersebut adalah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP).

Percoll memiliki karakteristik yang mendukung proses pemisahan sel, seperti variasi densitas yang mudah disesuaikan, viskositas rendah, tidak toksik, tidak menembus membran sel, dapat disterilkan, serta mampu membentuk gradien secara mandiri ketika disentrifugasi (Samardzija dkk., 2006). Meskipun demikian, metode SGDP juga memiliki kelemahan. Proses sentrifugasi dapat memicu kerusakan membran spermatozoa sehingga menurunkan kualitasnya. Kerusakan ini dapat terjadi akibat hilangnya seminal plasma, perubahan kondisi kimiawi yang meningkatkan produksi radikal bebas, dan efek mekanik berupa benturan antar sel selama proses sentrifugasi (Tucker & Jasen, 2002).

Gesekan antara partikel percoll, dinding tabung, dan permukaan spermatozoa dapat meningkatkan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berpotensi merusak integritas membran (Ollero dkk., 2001). ROS, khususnya radikal hidroksil, merupakan oksidan kuat yang dapat mengganggu struktur membran sel (Edyson, 2003). Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses pencucian semen berulang melalui sentrifugasi dapat meningkatkan produksi ROS jauh di atas normal (Agarwal dkk., 1994; Shekarniz dkk., 1995). Radikal hidroksil diketahui mampu merusak biomembran maupun DNA spermatozoa (Berg, 2005). Kerentanan spermatozoa terhadap kerusakan membran akibat SGDP telah dilaporkan sebelumnya. Susilawati (2000) menemukan bahwa *sexing* menggunakan SGDP pada sapi menyebabkan peningkatan kadar kalsium intraseluler serta kerusakan membran pada bagian kepala dan ekor spermatozoa. Peningkatan Ca^{2+} intraseluler tersebut berkaitan dengan penurunan motilitas, viabilitas, dan integritas membran. Hal ini sejalan dengan laporan Tucker dan Jasen (2002) yang menyatakan bahwa SGDP dapat menyebabkan degradasi struktur membran spermatozoa. Brandeis dan Manual (1993) juga menunjukkan bahwa hasil

pengujian menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST) memperlihatkan adanya kerusakan akrosom setelah proses sentrifugasi. HOST mengevaluasi fungsi membran melalui pembengkakan dan penggulung ekor sebagai tanda membran masih berfungsi normal (Fonseca dkk., 2005).

Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa SGDP berpotensi menurunkan kualitas spermatozoa, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk mengoptimalkan metode pemisahan spermatozoa X dan Y. Kobayashi dkk. (2004) melaporkan keberhasilan pemisahan spermatozoa sapi menggunakan SGDP dengan persentase spermatozoa Y sebesar 52,9% pada fraksi atas dan 44,3% pada fraksi bawah. Perbedaan densitas antara spermatozoa X dan Y menjadi dasar keberhasilan teknik ini, di mana spermatozoa X yang lebih berat cenderung bergerak ke lapisan dengan densitas lebih tinggi (Wolf dkk., 2008). Beberapa penelitian telah menggunakan variasi jumlah gradien percoll seperti 1, 4, 11 (Check dkk., 1991), 3 (Chen & Bongso, 1999), 10 (Susilawati dkk., 1996), dan bahkan 12 gradien (Wolf dkk., 2008). Namun penggunaan gradien yang terlalu banyak dinilai tidak praktis sehingga diperlukan alternatif gradien yang lebih efisien. Atas dasar tersebut, penelitian ini membandingkan efektivitas 3, 5, dan 10 gradien densitas percoll dalam proses sexing spermatozoa kambing. Selain itu, SGDP diketahui dapat memicu kapasitasi dan reaksi akrosom (Susilawati, 2000). Perubahan ini biasanya disertai peningkatan Ca^{2+} intraseluler dan dapat dideteksi melalui pewarnaan Chlortetracycline (CTC) (Fraser dkk., 1995; Neild dkk., 2005). Kapasitasi ditandai oleh meningkatnya permeabilitas membran terhadap ion kalsium (Alvarenga dkk., 2004), yang selanjutnya memicu fusi membran plasma dan membran akrosom luar. Ion kalsium sendiri berfungsi sebagai *second messenger* penting dalam banyak proses seluler, dan perubahan konsentrasinya dapat diamati menggunakan pewarna fluoresen.

Berdasarkan berbagai temuan tersebut, penelitian ini difokuskan pada evaluasi pemisahan spermatozoa kambing menggunakan tiga variasi gradien densitas percoll, yakni 3, 5, dan 10 gradien. Kambing Peranakan Ettawa (PE) dipilih karena merupakan salah satu jenis ternak yang banyak dimanfaatkan di Indonesia. Melalui penelitian ini diharapkan dapat diidentifikasi gradien densitas yang paling efektif dalam menghasilkan kualitas spermatozoa terbaik serta memahami gambaran kapasitasi dan reaksi akrosom pasca *sexing*.

Metode

Sumber Semen dan Persiapan Awal

Semen diperoleh dari seekor pejantan kambing Peranakan Ettawa (PE) berumur 3 tahun. Semen segar dievaluasi terlebih dahulu melalui pemeriksaan makroskopis dan

mikroskopis. Sampel yang memenuhi kriteria kualitas kemudian diencerkan menggunakan Andromed dengan rasio 1:10.

Perlakuan dan Pemisahan Spermatozoa X dan Y

Pemisahan spermatozoa dilakukan menggunakan tiga variasi gradien densitas Percoll, yaitu:

- 3 gradien: 20%, 40%, 60%
 - 5 gradien: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%
 - 10 gradien: 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%
- (Susilawati, 2000).

Semen sebanyak 2 ml ditambahkan ke dalam tabung berisi gradien Percoll, kemudian disentrifugasi pada 2250 rpm selama 7 menit. Setelah itu, masing-masing 2 ml fraksi atas dan bawah diambil, dicuci dengan 3 ml Andromed, lalu disentrifugasi kembali pada 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan 2 ml suspensi spermatozoa.

Uji Kualitas Semen

1. Motilitas Massa

Pengamatan dilakukan dengan mengambil semen menggunakan ose, kemudian diletakkan pada gelas objek dan diamati pada mikroskop dengan pembesaran 100x. Penilaian mengikuti lima kategori gerakan massa spermatozoa menurut Toelihere (1979), yaitu:

4+ (gelombang tebal dan sangat cepat),

3+ (gelombang tebal dan cepat),

2+ (gelombang tipis dan sedang),

1+ (lemah), dan 0 (tanpa gerakan).

2. Motilitas Individu

Semen segar maupun pasca perlakuan diamati pada pembesaran 400x. Motilitas diklasifikasikan berdasarkan persentase spermatozoa progresif (Toelihere, 1979), mulai dari 0% (immotil) hingga 100% (progresif sangat cepat).

3. Viabilitas dan Abnormalitas

Pemeriksaan dilakukan menggunakan pewarna eosin-negrosin sesuai Partodihardjo (1992). Spermatozoa hidup tampak tidak berwarna, sedangkan spermatozoa mati berwarna merah. Abnormalitas diamati pada bagian kepala dan ekor.

4. Konsentrasi Spermatozoa

Pengukuran dilakukan menggunakan haemocytometer. Semen diencerkan dalam NaCl fisiologis menggunakan pipet eritrosit hingga skala 101, kemudian dihomogenkan. Suspensi

ditetaskan ke kamar hitung Neubauer untuk dihitung pada lima kotak besar secara diagonal (Partodihardjo, 1992).

5. Integritas Membran (HOST)

Sebanyak 100 μ l semen dicampur dengan 1 ml larutan hipoosmotik 125 mOsm/l (campuran natrium sitrat dan fruktosa), lalu diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Spermatozoa dengan membran utuh akan menunjukkan pembengkakan dan ekor menggulung (Correa dkk., 1996; Fonseca dkk., 2005).

6. Status Kapasitasi dan Reaksi Akrosom (CTC Staining)

Pewarnaan CTC dilakukan pada semen segar dan perlakuan. Campuran semen-CTC difiksasi menggunakan larutan fixatif, kemudian diaplikasikan pada gelas objek dan ditutup dengan DABCO. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop epi-fluorescence. Interpretasi pola fluoresensi (Fraser dkk., 1995; Susilawati, 2000):

1. Kepala terang seluruhnya → non-kapasitasi
2. Setengah kepala terang → kapasitasi
3. Cincin terang di tengah kepala → reaksi akrosom

7. Status Akrosom dengan FITC-Con A

Spermatozoa difiksasi menggunakan formaldehid 4% dan dicuci dengan PBS. Pelet ditambahkan larutan FITC-Con A 30 μ g/ml dan diinkubasi 25 menit, kemudian dicuci ulang. Preparat diamati dengan mikroskop fluoresen. Interpretasi:

1. Kepala berfluoresensi → membran akrosom utuh
2. Kepala gelap → membran akrosom hilang (kapasitasi / reaksi akrosom)

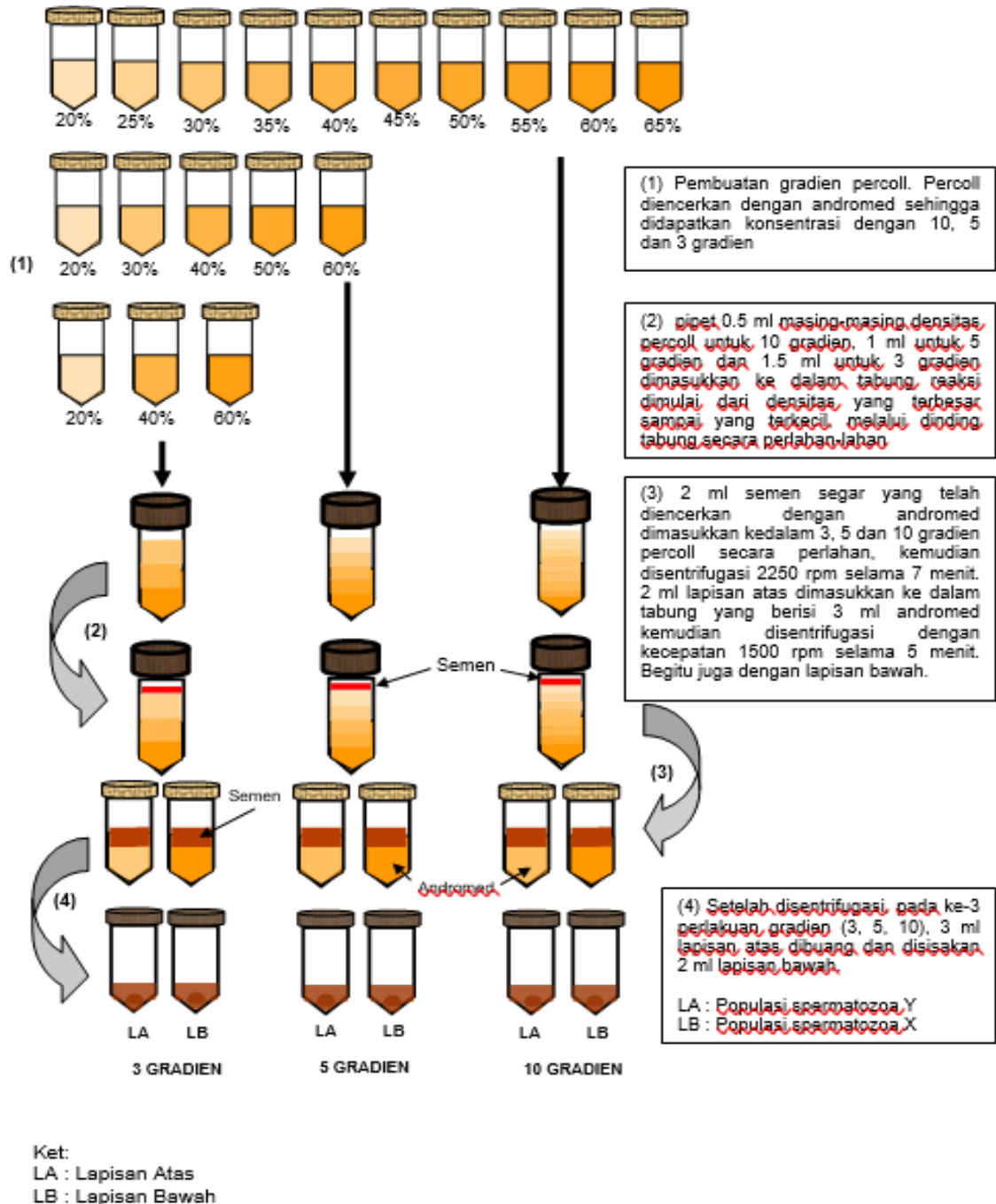
Influks Ca^{2+} Intraseluler (Fluo-3)

Fluo-3 (400 μ M) diencerkan dengan PBS (1:10), kemudian dicampurkan dengan suspensi semen. Sampel diamati menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) pada pembesaran 400–1000x untuk melihat intensitas fluoresensi ion kalsium (Gillan dkk., 2005).

Analisis Data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan tiga ulangan. Data persentase ditransformasi ke arcsine (Kemas, 1995). Analisis dilakukan dengan menggunakan ANOVA untuk melihat pengaruh perbedaan gradien terhadap semua variabel kualitas spermatozoa, dilanjutkan DMRT bila terdapat perbedaan. Uji t berpasangan untuk membandingkan nilai sebelum dan sesudah *sexing* pada masing-masing variabel.

Prosedur Pemisahan Spermatozoa X Dan Y



Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Segar Kambing

Kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian harus memenuhi standar kelayakan awal. Semen diperoleh dari seekor kambing Peranakan Ettawa (PE) berumur 3

tahun, kemudian dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi penilaian volume ejakulat, warna, pH, dan konsistensi. Sementara itu, pemeriksaan mikroskopis mencakup motilitas individu, motilitas massa, abnormalitas morfologi, dan konsentrasi spermatozoa. Selain itu, dilakukan pula pengujian integritas membran, status kapasitas, dan reaksi akrosom untuk memastikan kualitas fisiologis spermatozoa sebelum perlakuan. Semen yang memenuhi persyaratan dan digunakan dalam penelitian memiliki karakteristik berwarna putih kekuningan, pH sekitar 7, motilitas massa berkisar 2-3+, motilitas individu $\geq 70\%$, serta persentase spermatozoa hidup sebesar 68%. Data hasil evaluasi semen segar yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan semen segar kambing

No	Parameter	Rerata $\pm$ SD
1	Volume ejakulasi (ml / ejakulasi)	1.23 $\pm$ 0.23
2	Warna	Putih Kekuningan
3	pH	7 $\pm$ 0
4	Konsistensi	Kental
5	Konsentrasi spermatozoa (Juta/mL)	448.67 $\pm$ 21.94
6	Motilitas massa	3+
7	Motilitas individu (%)	76.67 $\pm$ 5.77
8	Viabilitas (%)	68 $\pm$ 6.08
9	Abnormalitas (%)	3.16 $\pm$ 1.18
10	Integritas Membran (%)	51.67 $\pm$ 10.12
11	CTC	
	■ Kapasitas (%)	75 $\pm$ 2.08
	■ Reaksi akrosom (%)	11.67 $\pm$ 1.73
	■ Non-kapasitasi (%)	9.33 $\pm$ 1.53
12	FITC-Con A	
	■ Akrosom (%)	37 $\pm$ 11.53
	■ Tanpa akrosom (%)	53 $\pm$ 11.53

Pemeriksaan kualitas semen segar segera setelah penampungan merupakan tahap penting sebelum dilakukan proses lanjutan. Evaluasi awal meliputi pengukuran volume, konsentrasi, warna, bau, motilitas, serta viabilitas spermatozoa. Berdasarkan Tabel 1, volume semen kambing per ejakulasi pada penelitian ini adalah 1,23 $\pm$ 0,23 cc dengan konsentrasi 448,67 $\pm$ 1,94 juta/ml. Pemeriksaan konsentrasi diperlukan karena parameter ini dapat memberikan gambaran awal mengenai potensi fertilitas pejantan.

Semen segar yang diperoleh umumnya berwarna putih kekuningan dengan konsistensi kental. Evans dan Maxwell (1987) menyatakan bahwa warna semen kambing berkisar dari krem hingga krem kekuningan, yang dipengaruhi oleh kandungan riboflavin yang dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis. Tingkat kekentalan atau konsistensi juga berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa, di mana semen yang lebih pekat menunjukkan jumlah sel yang lebih tinggi.

Motilitas individu semen pada penelitian ini mencapai 76,67%. Garner dan Hafez (2000) melaporkan bahwa motilitas semen kambing umumnya berada dalam kisaran 60–85%, sehingga nilai yang diperoleh dapat dikategorikan tinggi. Motilitas yang baik diperlukan agar spermatozoa mampu bertahan dan tetap fungsional selama proses pemisahan.

Persentase spermatozoa hidup pada semen segar mencapai $68 \pm 6,08\%$. Triana (2006) menyebutkan bahwa persentase hidup spermatozoa yang layak digunakan untuk inseminasi buatan (IB) berada dalam rentang 40–90%. Sementara itu, rata-rata abnormalitas spermatozoa sebesar $3,16 \pm 1,18\%$, yang masih berada dalam batas normal, mengingat abnormalitas tidak boleh melebihi 20% (Hafez dan Hafez, 2000).

Tahap berikutnya adalah pemeriksaan fisiologis spermatozoa yang mencakup integritas membran, kapasitas, reaksi akrosom, serta influks ion kalsium. Rata-rata persentase spermatozoa dengan membran utuh adalah $51,67 \pm 10,12\%$. Hasil ini sejalan dengan temuan Nur dkk. (2005), yang melaporkan bahwa semen segar kambing dievaluasi menggunakan HOS test menunjukkan persentase integritas membran sebesar $53,7 \pm 11,3\%$.

Evaluasi status kapasitas dan reaksi akrosom dilakukan menggunakan pewarnaan CTC. Rata-rata persentase spermatozoa yang telah mengalami kapasitas, reaksi akrosom, serta yang masih dalam kondisi non-kapasitasi sebelum perlakuan masing-masing sebesar $75 \pm 2,08\%$, $11,67 \pm 1,73\%$, dan $9,33 \pm 1,53\%$. Nilai ini menunjukkan bahwa sebagian spermatozoa telah mengalami kapasitas segera setelah proses penampungan. Kondisi tersebut berkaitan dengan kecenderungan spermatozoa kambing mengalami kapasitas lebih cepat (kapasitas dini) sejak berada di saluran reproduksi jantan. Salah satu penyebabnya adalah kandungan D-Fruktosa dalam plasma seminal kambing yang lebih rendah dibandingkan sapi; menurut Garner dan Hafez (2000), konsentrasi D-Fruktosa pada semen sapi berkisar 460–600 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan pada semen kambing hanya sekitar 250 $\mu\text{g/mL}$.

Selain CTC, analisis akrosom juga dilakukan menggunakan pewarnaan FITC-Con A untuk menilai keberadaan membran akrosom. Rata-rata persentase spermatozoa yang masih memiliki akrosom adalah $37 \pm 11,53\%$, sedangkan yang telah kehilangan akrosom mencapai $53 \pm 11,53\%$. Kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini tergolong baik, dan pemilihan semen berkualitas tinggi bertujuan agar spermatozoa mampu mempertahankan

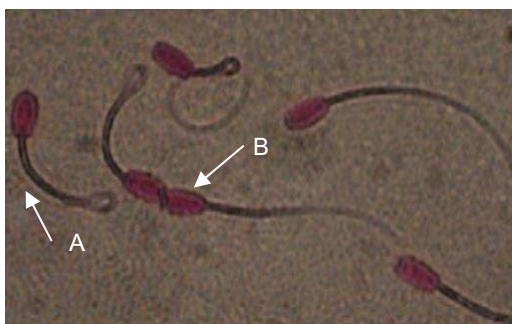
viabilitas dan struktur fisiologisnya selama proses pemisahan menggunakan metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll.

Pengaruh Pemisahan Spermatozoa Kambing Setelah Perlakuan Gradien yang Berbeda Terhadap Integritas Membran, Kapasitasi dan Reaksi Akrosom

Untuk mengevaluasi apakah metode pemisahan spermatozoa menggunakan gradien densitas Percoll berpengaruh terhadap integritas membran, kapasitasi, dan reaksi akrosom, digunakan variasi gradien 3, 5, dan 10 lapisan yang masing-masing diamati pada fraksi atas dan fraksi bawah.

1. Integritas Membran Spermatozoa

Pengujian integritas membran dilakukan dengan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Pada uji ini, spermatozoa dengan membran plasma yang masih berfungsi ditandai dengan melengkungnya atau menggulungnya bagian ekor akibat masuknya air ke dalam sel ketika berada dalam larutan hipoosmotik. Sebaliknya, spermatozoa dengan membran rusak mempertahankan ekor dalam keadaan lurus karena tidak mampu merespons perubahan tekanan osmotik. Metode ini bertujuan menilai kemampuan membran dalam mempertahankan transpor air sebagai indikator keutuhan membran. Menurut Correa dkk. (1996), larutan hipoosmotik memicu pergerakan air masuk ke dalam spermatozoa sehingga terjadi pembengkakan pada sel dengan membran yang masih aktif, sedangkan spermatozoa dengan kerusakan membran tidak menunjukkan perubahan tersebut. Berikut hasil pengamatan integritas membran spermatozoa kambing disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Spermatozoa kambing dengan membran intact (ekor melingkar, A) dan membran rusak (ekor lurus, B), pengamatan dilakukan pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x; 1 bar = 5µm.

Rata-rata persentase integritas membran spermatozoa setelah pemisahan menggunakan gradien densitas Percoll pada fraksi atas dan bawah tercantum pada Tabel 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan jumlah gradien (3, 5, atau 10) tidak

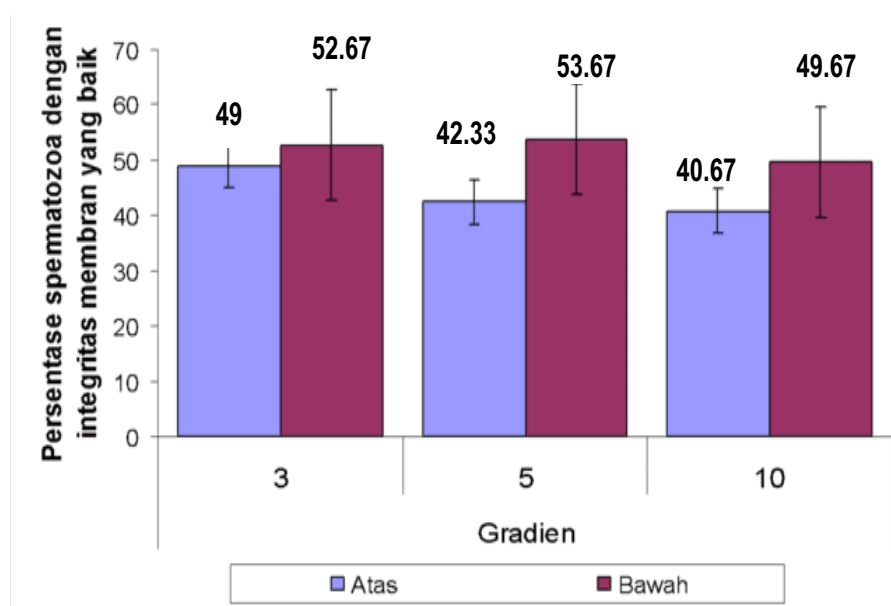
memberikan pengaruh yang signifikan terhadap integritas membran, baik pada fraksi atas maupun fraksi bawah.

Tabel 2. Rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*

Lapisan	Gradien	Rerata $\pm$ SD
Atas	10	40.67 $\pm$ 18.45 ^{tn}
	5	42.33 $\pm$ 9.07 ^{tn}
	3	49 $\pm$ 12.17 ^{tn}
Bawah	10	49.67 $\pm$ 10.97 ^{tn}
	3	52.67 $\pm$ 4.04 ^{tn}
	5	53.67 $\pm$ 11.37 ^{tn}

(Ket: berdasarkan ANOVA, nilai = rerata $\pm$ SD ; tn = tidak berbeda nyata, $p > 0.05$)

Namun demikian, pola yang muncul menunjukkan bahwa fraksi bawah cenderung memiliki nilai rata-rata lebih tinggi dibandingkan fraksi atas pada semua jenis gradien. Pada Gambar 2 terlihat bahwa perlakuan 5 gradien pada fraksi bawah menghasilkan proporsi spermatozoa dengan membran utuh tertinggi, yaitu 53.67%. Dominannya spermatozoa bermembran utuh pada lapisan bawah mengindikasikan bahwa spermatozoa yang bermotil – dan dengan demikian memiliki membran sel yang masih berfungsi – lebih banyak terakumulasi di fraksi tersebut. Wolf dkk. (2008) menyatakan bahwa lapisan bawah yang memiliki densitas Percoll lebih tinggi dapat menyeleksi spermatozoa bermotil lebih baik.



Gambar 2. Rata-rata persentase integritas membran spermatozoa kambing setelah perlakuan *sexing* spermatozoa dengan gradien yang berbeda.

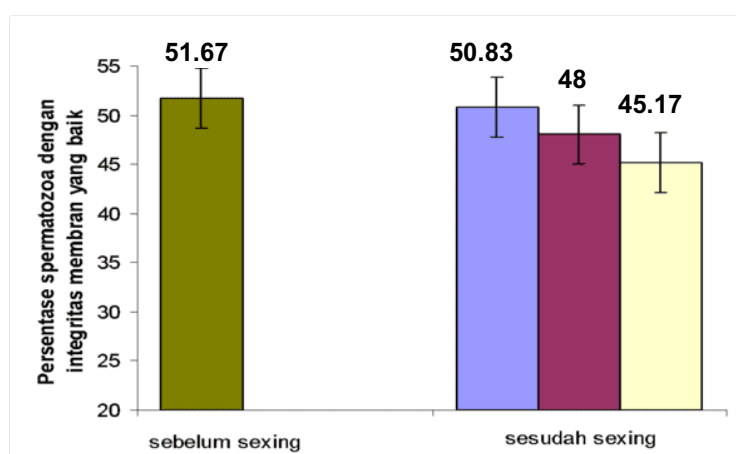
Berdasarkan analisis uji T pada tabel 3 bahwa tidak terdapat perbedaan integritas membran yang baik saat sebelum dan sesudah *sexing* ($p>0.05$). Berdasarkan rerata jumlah spermatozoa yang mengalami kerusakan membran terjadi peningkatan setelah proses *sexing* (Gambar 3).

Tabel 3. Rataan persentase integritas membran spermatozoa kambing sebelum dan sesudah *sexing*

Sebelum <i>sexing</i>	Sesudah <i>sexing</i>		
	3	5	10
51.67 ±9.05	50.83±8.35 ^{tn}	48±11.10 ^{tn}	45.17±14.44 ^{tn}

(Ket: berdasarkan uji T, nilai = rerata±SD ; tn = tidak berbeda nyata, $p>0.05$)

Susilawati (2000) juga menjelaskan bahwa sentrifugasi gradien densitas Percoll dapat memengaruhi keutuhan membran spermatozoa. Gaya sentrifugal selama proses tersebut dapat menimbulkan gesekan antar sperma maupun antara sperma dengan partikel Percoll dan dinding tabung, sehingga mengakibatkan destabilisasi membran (Susilawati, 2005). Kerusakan membran akan berdampak pada gangguan fungsi mitokondria dan lisosom. Disfungsi mitokondria dapat menurunkan metabolisme energi dan memengaruhi motilitas, sedangkan kerusakan lisosom dapat memicu keluarnya enzim proteolitik yang berpotensi merusak biomembran dan bahkan DNA (Berg, 2005). Tucker dan Jasen (2002) juga melaporkan bahwa sentrifugasi berulang dalam proses *sexing* dapat meningkatkan kerusakan membran spermatozoa.



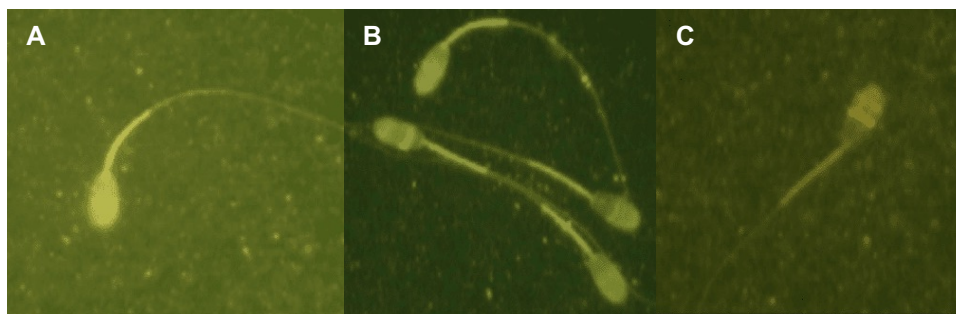
Gambar 3. Rataan persentase spermatozoa dengan integritas membran yang baik sebelum dan sesudah *sexing* berdasarkan Uji T. (Ket : ■ = kontrol; ■ = 3 gradien; ■ = 5 gradien; ■ = 10 gradien)

Kerusakan membran juga dapat memengaruhi regulasi ion, terutama peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler. Kenaikan ion kalsium diketahui dapat memicu proses kapasitasi, karena Ca^{2+} mengaktivasi adenyl cyclase yang kemudian meningkatkan pembentukan cAMP. Molekul cAMP mengaktifkan protein kinase A (PKA) yang mendorong

terjadinya fosforilasi protein, salah satunya aktin menjadi F-actin. Pada tahap reaksi akrosom, F-actin mengalami depolimerisasi sehingga memungkinkan fusi antara membran plasma dan membran akrosom luar. Fusi ini akan memicu pelepasan enzim akrosin yang kemudian menginisiasi terjadinya reaksi akrosom (Jonge, 2000).

Kapasitasi dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing

Kapasitasi merupakan proses perubahan struktural dan fungsional yang terjadi pada spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina sehingga meningkatkan kemampuan fertilisasinya (Alvarenga dkk., 2004). Evaluasi status kapasitasi pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode pewarnaan Chlortetracycline (CTC). Prinsip kerja CTC didasarkan pada kemampuannya berikatan dengan ion kalsium pada membran plasma spermatozoa, di mana pola fluoresensi yang muncul pada kepala spermatozoa dapat digunakan sebagai indikator status kapasitasi dan reaksi akrosom. Hasil pengamatan spermatozoa kambing setelah pewarnaan CTC menggunakan Mikroskop epifluoresence dengan pembesaran 400x terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil pengamatan spermatozoa kambing setelah pewarnaan CTC dengan menggunakan mikroskop epifluoresen. perbesaran 400x.

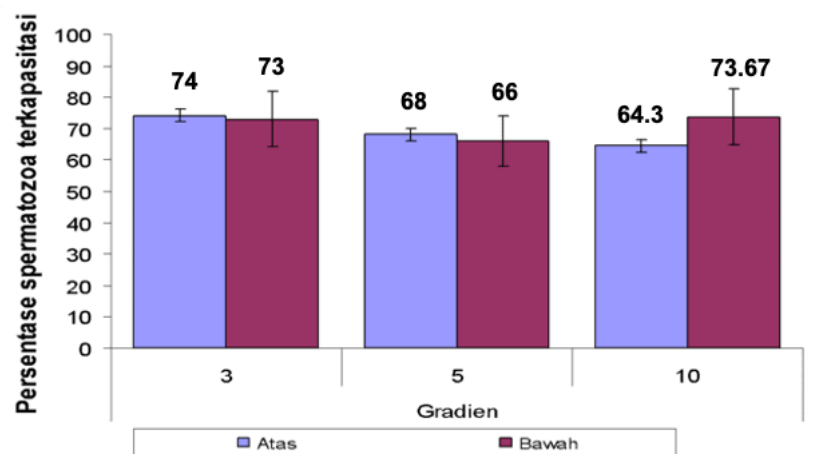
(Ket : A = Normal; B = Kapasitasi; C = Reaksi Akrosom); 1 bar = 5µm

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa variasi jumlah gradien Percoll, baik pada fraksi atas maupun fraksi bawah, tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap persentase spermatozoa yang mengalami kapasitasi maupun reaksi akrosom (Tabel 4 dan Tabel 5). Meskipun demikian, kecenderungan data menunjukkan bahwa perlakuan dengan 10 gradien menghasilkan proporsi spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom sedikit lebih rendah dibandingkan 3 dan 5 gradien.

Tabel 4. Rataan persentase spermatozoa kambing yang terkapasitasi pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*

Lapisan	Gradien	Rerata $\pm$ SD
Atas	10	64.33 $\pm$ 13.50 ^{tn}
	5	68 $\pm$ 9.17 ^{tn}
	3	74 $\pm$ 4.58 ^{tn}
Bawah	5	66 $\pm$ 6.56 ^{tn}
	3	73 $\pm$ 2 ^{tn}
	10	73.67 $\pm$ 2.08 ^{tn}

(Ket: berdasarkan ANOVA, nilai = rerata $\pm$ SD ; tn = tidak berbeda nyata, $p>0.05$)

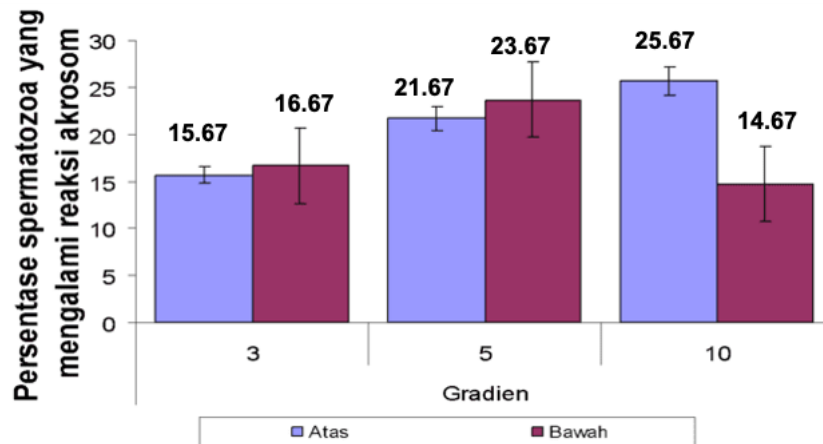
**Gambar 5.** Rataan persentase spermatozoa yang terkapasitasi pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*.**Tabel 5.** Rataan persentase spermatozoa kambing mengalami reaksi akrosom pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*

Lapisan	Gradien	Rerata $\pm$ SD
Atas	3	15.67 $\pm$ 3.06 ^{tn}
	5	21.67 $\pm$ 9.29 ^{tn}
	10	25.67 $\pm$ 13.50 ^{tn}
Bawah	10	14.67 $\pm$ 2.08 ^{tn}
	3	16.67 $\pm$ 2.08 ^{tn}
	5	23.67 $\pm$ 6.03 ^{tn}

(Ket: berdasarkan ANOVA, nilai = rerata $\pm$ SD ; tn = tidak berbeda nyata, $p>0.05$)

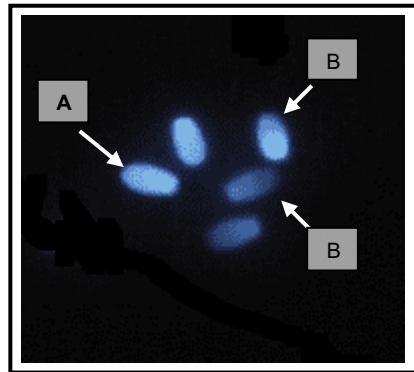
Untuk mengetahui ada atau tidaknya akrosom pada kepala spermatozoa maka dilakukan evaluasi dengan pewarnaan FITC-Con A. Pewarnaan ini pada prinsipnya adalah lektin yang mengikat glukosa atau D-Mannose yang ada pada *inner acrosomal membrane* sehingga spermatozoa yang masih terdapat akrosom akan memancarkan *fluorecent*.

Penggunaan pewarnaan lektin seperti FITC-Con A dapat digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi perubahan komponen membran plasma dan juga status akrosom (Baker, *dkk*, 2004). Hasil pengamatan kondisi spermatozoa kambing setelah pewarnaan FITC-Con A terlihat pada gambar 7.



Gambar 6. Rataan persentase spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*.

Analisis varian menunjukkan bahwa gradien densitas 3, 5 dan 10 pada masing-masing lapisan tidak berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa yang mempunyai akrosom (tabel 5 dan tabel 6). Nilai rata-rata persentase jumlah spermatozoa yang mempunyai akrosom terbanyak pada 10 gradien lapisan bawah (gambar 8).



Gambar 7. Kondisi fisiologis spermatozoa kambing setelah pewarnaan FITC-Con A yang diamati menggunakan mikroskop epifluoresen pada perbesaran 400×. (Ket : A = ada akrosom; B = tanpa akrosom); 1 bar = 5µm.

Berdasarkan nilai rata-rata spermatozoa, 10 gradien menghasilkan spermatozoa yang terkapasitasi, reaksi akrosom dan yang mempunyai akrosom lebih sedikit dibandingkan dengan 3 dan 5 gradien. Hal ini menunjukkan bahwa 10 gradien mampu menghasilkan kualitas spermatozoa yang baik. Wolf, *dkk* (2008) mengatakan bahwa semakin banyak gradien

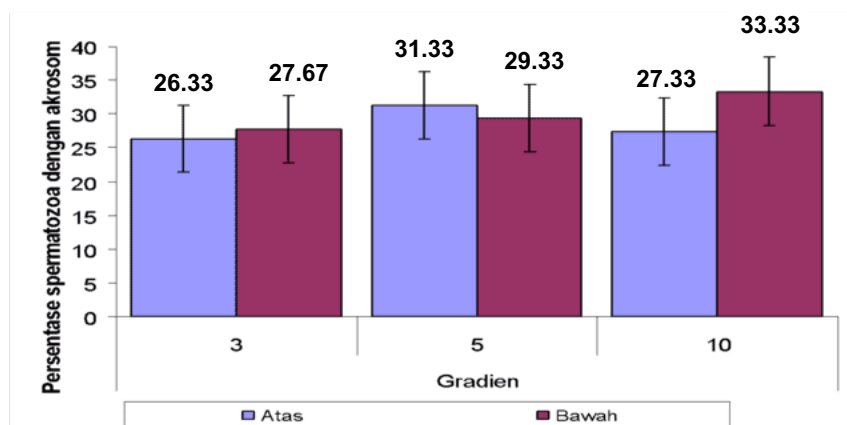
yang digunakan maka akan lebih melindungi spermatozoa dari proses *sexing* dan semakin banyak gradien maka spermatozoa akan terseparasi dengan sempurna.

Tabel 6. Rataan persentase spermatozoa kambing dengan akrosom pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*

Lapisan	Gradien	Rerata $\pm$ SD
Atas	3	26.33 $\pm$ 9.24 ^{tn}
	10	27.33 $\pm$ 7.77 ^{tn}
	5	43.67 $\pm$ 12.70 ^{tn}
Bawah	3	27.67 $\pm$ 9.07 ^{tn}
	5	29.33 $\pm$ 14.64 ^{tn}
	10	33.33 $\pm$ 19.73 ^{tn}

(Ket: berdasarkan ANOVA, nilai = rerata $\pm$ SD ; tn = tidak berbeda nyata)

Berdasarkan hasil uji T yang disajikan pada Tabel 7, terdapat perbedaan yang signifikan pada persentase spermatozoa terkapasitasi pada perlakuan 5 gradien ($p < 0,05$), sedangkan untuk reaksi akrosom menunjukkan perbedaan pada 3 gradien ($p < 0,05$) dan 5 gradien ($p < 0,01$) sebelum dan sesudah *sexing*. Spermatozoa yang tanpa akrosom tidak menunjukkan perbedaan yang nyata setelah dilakukan *sexing* (gambar 8).



Gambar 8. Rataan persentase spermatozoa kambing dengan akrosom pada perlakuan gradien densitas setelah proses *sexing*.

Pada gambar 9 juga terlihat bahwa jumlah spermatozoa yang kehilangan akrosom (*acrosome reacted*) pada pengamatan FITC-Con A lebih tinggi dibandingkan identifikasi CTC staining pada 3, 5 dan 10 gradien. Hal ini bertolak belakang dengan hasil penelitian Kohn, dkk (1997) bahwa pada pewarnaan FITC-Con A, jumlah spermatozoa yang *acrosome reacted* lebih sedikit, karena lektin ini hanya berikatan dengan sempurna ketika membran akrosom dalam terekspos dan spermatozoa telah kehilangan akrosom. Selain itu, terdapat perbedaan

dalam hal metode analisis, yaitu Kohn, dkk (1997) menganalisis spermatozoa yang *acrosome reacted* menggunakan mikroskop *fluorescence*, sedangkan dalam penelitian ini menggunakan mikroskop *Epi-fluorescence*. Perbedaan analisis tersebut menghasilkan gambaran spermatozoa yang berbeda pula.

Tabel 7. Rataan persentase spermatozoa yang terkapasitasi, reaksi akrosom dan tanpa akrosom sebelum dan sesudah sexing

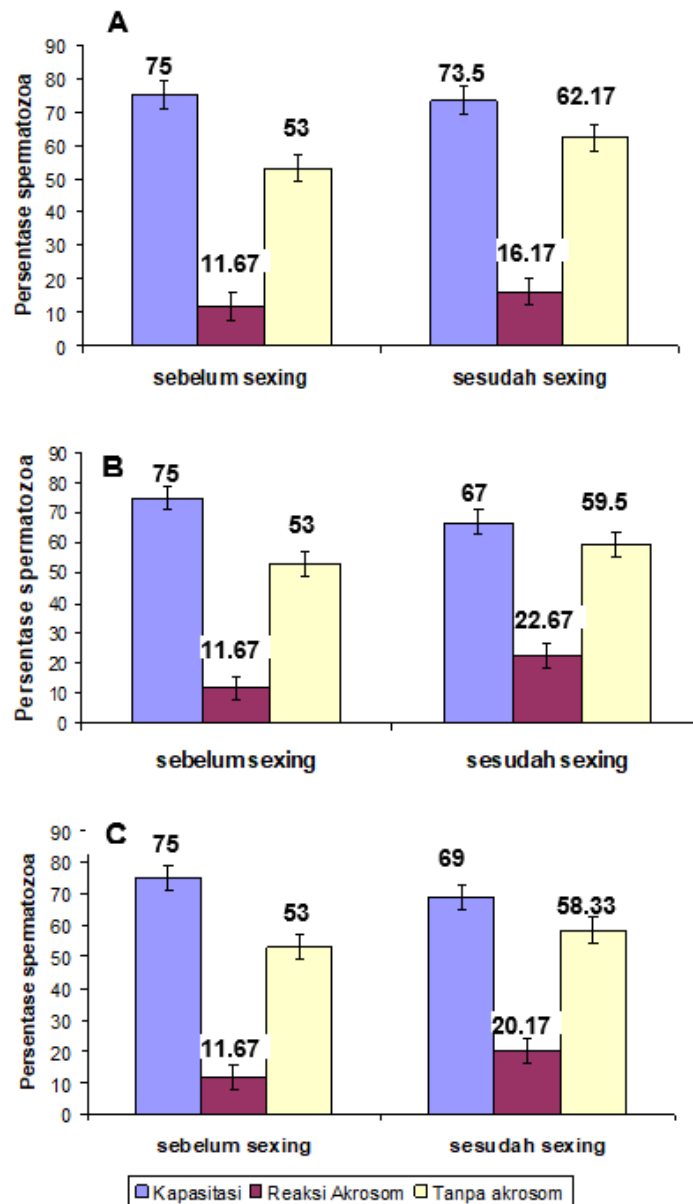
Parameter	Sebelum sexing	Sesudah sexing		
		3	5	10
Kapasitasi	75 ± 1.55	73.5 ± 3.21 ^{tn}	67 ± 7.21 *	69 ± 10.04 ^{tn}
Reaksi akrosom ¹	11.67 ± 1.37	16.17 ± 2.40 *	22.67 ± 7.09 **	20.17 ± 10.53 ^{tn}
Tanpa akrosom ²	53 ± 10.32	62.17 ± 16.39 ^{tn}	59.5 ± 22.67 ^{tn}	58.33 ± 16.84 ^{tn}

(Ket : berdasarkan Uji T, nilai = rerata±SD ; tn = tidak berbeda nyata, p>0.05; * = berbeda nyata, p<0.05; ** = berbeda sangat nyata. p<0.01 ; ¹ = CTC ; ² = FITC-Con A)

Dalam hasil penelitian ini mengapa persentase *acrosome reacted* spermatozoa setelah pewarnaan FITC-Con A lebih tinggi dibandingkan dengan CTC. Hal ini dimungkinkan karena yang teramati adalah gabungan proses *acrosome reacting* dan *acrosom reacted*, sedangkan pada CTC, reaksi akrosom sebenarnya adalah *acrosome reacted* sehingga lebih sedikit. Menurut Guérin, dkk (1999) gambaran pewarnaan CTC yaitu dari spermatozoa yang *uncapacited* → *capacited* dan *acrosome intact* (*acrosome reacting*) → *capacited* dan *acrosome reacted*. Menurut Cheng, dkk (1996) *fluorecent* pada ujung akrosom yang tidak rata karena adanya fusi membran plasma dengan *outer membran acrosom*, hal ini menandakan bahwa spermatozoa menuju ke proses reaksi akrosom, sehingga disebut *acrosome reacting*. Akhir dari reaksi akrosom adalah hilangnya akrosom dimana *fluorecent* terdapat pada bagian ekuator atau sama sekali tidak ber-*fluorecent* maka peristiwa ini disebut *acrosome reacted* (gambar 10).

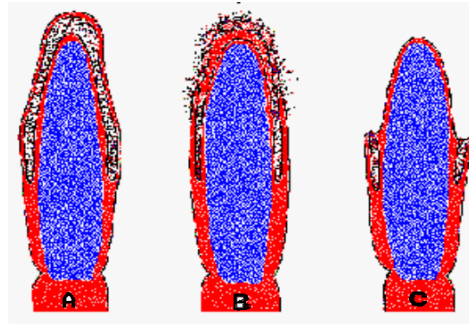
Beberapa peneliti seperti Casey, dkk (1993) menyebutkan bahwa CTC digunakan untuk mengidentifikasi spermatozoa terkapasitasi sedangkan FITC-Con A hanya spesifik untuk mengamati reaksi akrosom sehingga kedua *tool* tersebut saling melengkapi tergantung dari tujuan dari penelitian tersebut. Menurut Visconti, dkk (1998) antibiotik CTC digunakan sebagai *probe floresen* untuk menguji status fungsional dan memonitor proses kapasitasi dan reaksi akrosom. CTC akan berikatan dengan ion kalsium intersel membentuk kompleks CTC-Ca²⁺, kemudian kompleks tersebut berikatan pada *hydrophobic regions* sehingga menjadi berfloresen. Jika pengikatan ini tidak spesifik maka akan menjadi kesalahan dalam interpretasi hasil. Karakteristik pola fluoresensi CTC pada spermatozoa memungkinkan identifikasi tiga kondisi fisiologis, yaitu spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi (*uncapacitated*), spermatozoa yang telah terkapasitasi tetapi masih mempertahankan akrosom

(*capacitated with intact acrosome*), serta spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom (*capacitated and acrosome-reacted*).



Gambar 9. Rataan persentase spermatozoa yang terkapasitasi, reaksi akrosom dan tanpa akrosom sebelum dan sesudah *sexing* pada 3 gradien (A), 5 gradien (B) dan 10 gradien (C) berdasarkan Uji T.

Fluorecein Isothiocyanate Conjugated Canavalia ensiformis Agglutinin (FITC-Con A) merupakan *fluoresen* yang dilabel dengan lektin dari tanaman *Canavalia ensiformis*. Lektin ini merupakan protein yang mampu mengenali glikoprotein spesifik pada membran akrosom dalam yaitu D-Mannose pada *inner acrosome membrane* sehingga spermatozoa yang masih terdapat akrosom akan memancarkan *fluorecent* (Kohn, dkk., 1997).

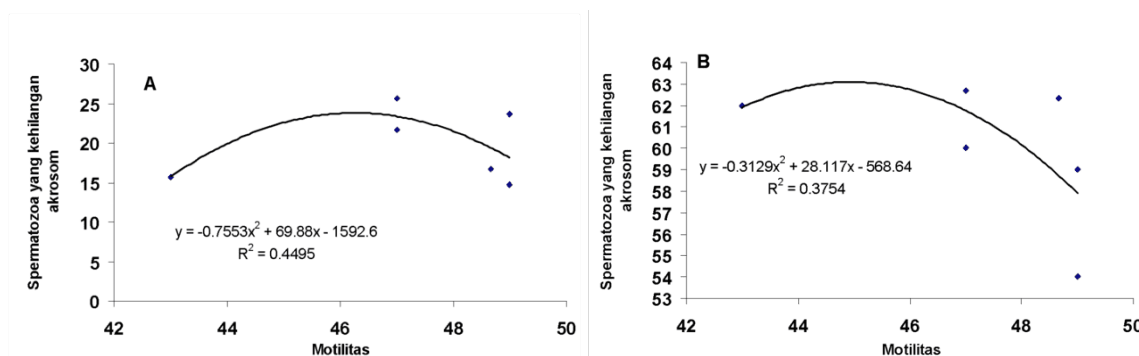


Gambar 10. Diagram ilustrasi proses reaksi akrosom. A. spermatozoa "intact"; B. awal reaksi akrosom yaitu fusi antara membran plasma dengan membran akrosom yang diikuti dengan pengeluaran *acrosomal contents* (enzim hidrolisis); C. akhir reaksi akrosom yaitu spermatozoa yang "*acrosome-reacted*" (Baldi, dkk., 1996).

Beberapa peneliti menyebutkan bahwa kedua pewarnaan baik CTC maupun FITC-Con A belum bisa membedakan spermatozoa *true acrosome reaction* dan *false acrosome reaction*. Spermatozoa akan mengalami reaksi akrosom secara fisiologis (*true acrosome reaction*), akan tetapi membran mengalami kerusakan (*false acrosome reaction*) yang dapat terjadi selama proses sentrifugasi.

Hubungan antara motilitas dengan *acrosome-reacted* (CTC dan FITC-Con A)

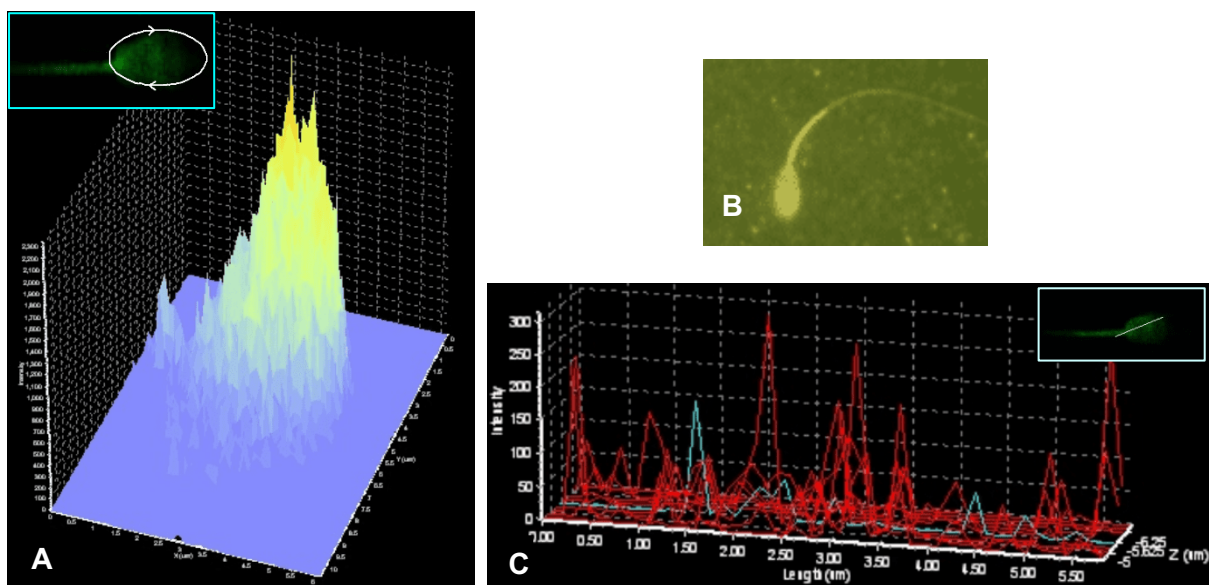
Spermatozoa harus mengalami kapabilitas sebelum melakukan fertilisasi. Selama kapabilitas, spermatozoa mengalami perubahan fisiologis berupa hiperaktivasi dan reaksi akrosom. Berdasarkan gambar 11 menunjukkan terjadi peningkatan motilitas yang diikuti dengan penurunan jumlah spermatozoa yang kehilangan akrosom. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa mengalami reaksi akrosom secara degeneratif. Hilangnya akrosom secara degeneratif ini disebabkan oleh adanya kerusakan membran pada saat proses sentrifugasi. Menurut Cummins, dkk (1991) dan Susilawati (2005) reaksi akrosom secara fisiologis adalah spermatozoa yang kehilangan akrosom dan masih dalam keadaan hidup, sedangkan reaksi akrosom secara degeneratif adalah spermatozoa yang kehilangan akrosom dan telah mati.



Gambar 11. Hubungan antara motilitas dengan *acrosome-reacted* pada pewarnaan CTC (A) dan FITC-Con A (B).

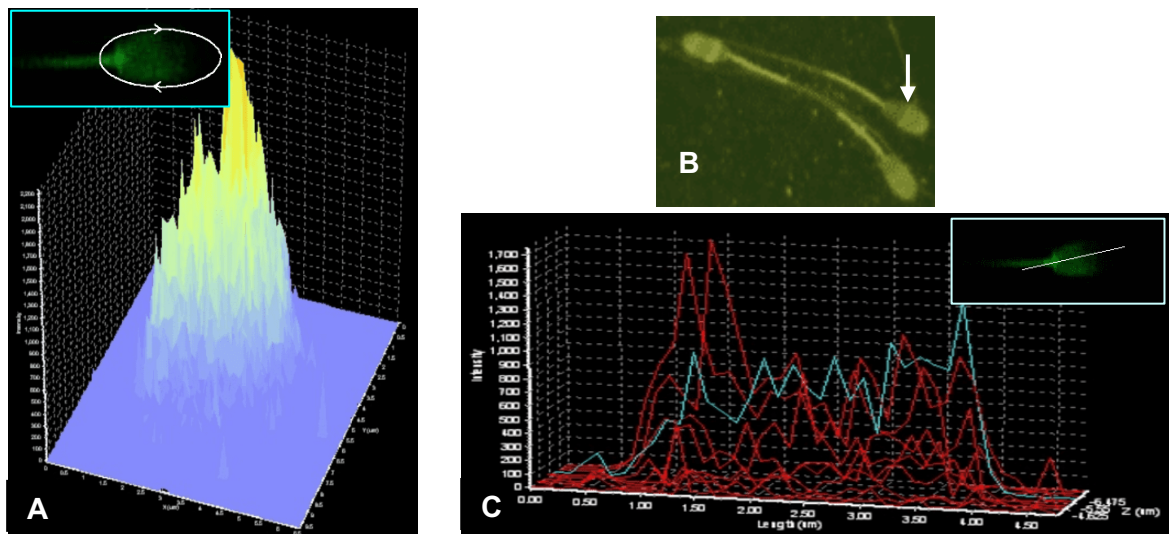
Gambaran Influk Ca^{2+} Intraseluler pada Spermatozoa Kambing

Hasil pengamatan spermatozoa yang terkapasitasi dan mengalami reaksi akrosom juga dikonfirmasi intensitas kalsium melalui Mikroskop *confocal* (CLSM) (Gambar 12; 13; 14). Gambar 12 memperlihatkan bahwa gambaran influk kalsium pada spermatozoa yang belum terkapasitasi menunjukkan intensitas *fluorecent* yang rendah, sedangkan gambar 13 menunjukkan gambaran spermatozoa yang mengalami kapasitasi yang ditandai dengan peningkatan influk kalsium. Gambaran influk Ca^{2+} seperti ini diperlihatkan dengan adanya peningkatan influk kalsium pada 2/3 bagian akuator kepala spermatozoa (Gambar 13 B). Akhir kapasitasi ditandai dengan terjadinya reaksi akrosom yaitu adanya gambaran *fluorecent* yang tinggi pada bagian akuator kepala spermatozoa (Gambar 14 B), hal ini ditunjukkan pada gambaran influk kalsium pada gambar 14. Profil influk ion kalsium pada saat spermatozoa belum kapasitasi dan kapasitasi juga dilaporkan oleh Garcia dan Meizel (1999) bahwa terjadi peningkatan konsentrasi ion kalsium intrasel selama proses kapasitasi.



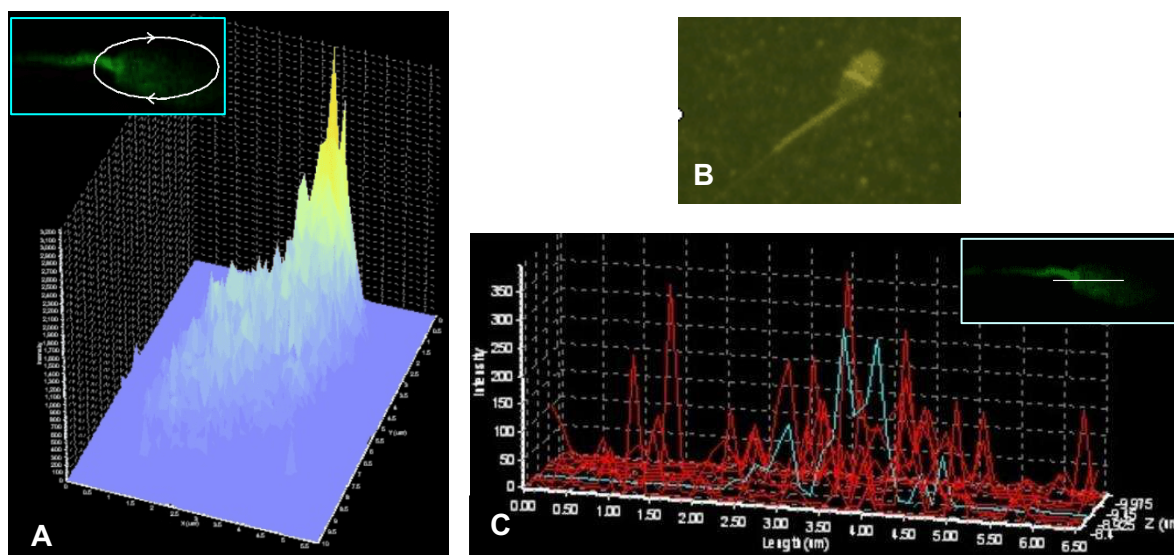
Gambar 12. Gambaran influk kalsium intraseluler pada kepala spermatozoa yang belum terkapasitasi. A. Histogram intensitas kalsium; B. Gambaran spermatozoa hasil CTC; C *Lineseries* intensitas kalsium dengan Fluo-3.

Perubahan pada mekanisme pengaturan ion kalsium di membran spermatozoa dapat terjadi akibat gesekan mekanis selama proses sexing menggunakan sentrifugasi gradien densitas Percoll. Gangguan mekanis tersebut mengakibatkan proses keluar-masuknya ion kalsium tidak berlangsung secara normal, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler (Gambar 13). Susilawati (2000) menjelaskan bahwa akumulasi ion kalsium yang berlebihan di dalam sel spermatozoa dapat menghambat fungsi fisiologis sel, yang selanjutnya menurunkan motilitas dan mengganggu integritas membran.



Gambar 13. Gambaran influk kalsium intraseluler pada kepala spermatozoa yang terkapasitasi. A. Histogram intensitas kalsium; B. Gambaran spermatozoa hasil CTC; C *Lineseries* intensitas kalsium dengan Fluo-3.

Peningkatan $[Ca^{2+}]_i$ selama kapasitasi telah dikaji dalam beberapa spesies mamalia. Dalam keadaan normal, konsentrasi kalsium di dalam sel lebih rendah dibandingkan diluar sel. Untuk itu pertukaran Na^+/Ca^{2+} berperan penting dalam Ca^{2+} intrasel selama kapasitasi dan reaksi akrosom. Di dalam spermatozoa, Ca^{2+} diregulasi oleh Ca^{2+} -ATPase (channel yang mengeluarkan Ca^{2+}) dalam membran plasma. Ketika ion channel terbuka dengan bantuan ATPase yang mengubah ATP menjadi ADP maka kalsium diluar sel akan masuk ke dalam sehingga terjadi peningkatan kalsium. Peningkatan kalsium ini akan mengaktifkan *adenyl cyclase* (AC), yang kemudian meningkatkan pembentukan cAMP dengan bantuan ATP. cAMP akan mengaktifkan *protein kinase A* (PKA) kemudian akan mengaktifkan protein melalui mekanisme fosforilasi protein (*phosphorylation cascade*). Adanya proses fosforilasi ini akan mengubah protein yang tidak aktif menjadi aktif. Ketika sinyal dari luar terhenti maka *protein fosfatase* akan *men-switch off* sinyal transduksi dengan cara menghilangkan gugus fosfat dari protein. Aktivitas regulasi protein melalui fosforilasi ini tergantung dari keseimbangan aktivasi molekul kinase dan fosfatase (Gadella dan Visconti, 2006). Kalsium yang masuk dalam sel dapat mengaktifkan sinyal transduksi secara langsung ataupun dengan berikatan dengan suatu protein seperti *calmodulin*. *Calmodulin* akan aktif ketika berikatan dengan kalsium sehingga menjadi kompleks Ca^{2+} -*calmodulin* kemudian *calmodulin* akan berikatan dengan protein lain seperti protein kinase ataupun dengan fosfatase (Gadella dan Visconti, 2006).



Gambar 14. Gambaran influk kalsium intraseluler pada kepala spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom. Histogram intensitas kalsium; B. Gambaran spermatozoa hasil CTC; C Lineseries intensitas kalsium dengan Fluo-3.

Membran akrosom memiliki sistem transpor yang memerlukan energi untuk memindahkan ion kalsium ke dalam ruang akrosom. Kalsium yang dilepaskan dari akrosom akan berinteraksi dengan fosfolipase C (PLC), yang bekerja pada fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2) untuk menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP_3). Aktivasi jalur ini selanjutnya memengaruhi membran plasma sehingga membuka kanal yang memungkinkan masuknya kalsium ke dalam sitoplasma. Kalsium yang berasal dari akrosom juga dapat menstimulasi mekanisme *capacitative calcium entry* (CCE) pada membran plasma, sehingga meningkatkan aliran kalsium melalui jalur tersebut. Ikatan agonis pada reseptor spesifik di membran sel mengaktifkan PLC, yang kemudian memecah PIP_2 menjadi DAG dan IP_3 . DAG berperan sebagai *second messenger* yang mengaktifasi protein kinase C (PKC), sedangkan IP_3 memicu pelepasan kalsium dari akrosom. Proses ini berlangsung melalui interaksi IP_3 dengan reseptor kalsium di membran akrosom, yang pada akhirnya membuka kanal kalsium dan memungkinkan terjadinya pelepasan ion dari kompartemen tersebut (Breitbart & Naor, 1999).

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan gradien Percoll gradien 3, 5, dan 10 tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap integritas membran, status kapasitas, maupun reaksi akrosom spermatozoa. Namun demikian, proses *sexing* dengan 3 dan 5 gradien menunjukkan perubahan pada parameter fisiologis, terutama peningkatan kejadian kapasitas dan reaksi akrosom, tanpa memengaruhi keutuhan membran sel. Pengamatan menggunakan pewarnaan FITC-Con A menghasilkan persentase kehilangan

akrosom yang lebih tinggi dibandingkan penilaian dengan pewarnaan CTC, menunjukkan bahwa kedua teknik memiliki sensitivitas yang berbeda dalam mendeteksi kondisi akrosomal. Selain itu, dinamika influks ion kalsium selama proses kapasitasi dan reaksi akrosom dapat divisualisasikan secara jelas melalui mikroskop konfokal, sehingga mendukung interpretasi perubahan fisiologis spermatozoa selama proses pemisahan.

Daftar Pustaka

- Agarwal, A., I. Ikemoto dan Loughlin, K.R. 1994. Levels Of Reactive Oxygen Species Before And After Sperm Preparation: Comparison Of Swim Up And L4 Filtration Methods. *Arch androl.* 32: 169-174.
- Alvarenga, F.C. Landim, Graham, J.K., Alvarenga, M.A dan Squires, E.L.. 2004. Calcium Influx Into Equine And Bovine Spermatozoa During In Vitro Capacitation. *Anim. Reprod.* 1(1) : 96-105.
- Baker, S.S., Thomas, M dan Thaler, C.D. 2004. Sperm Membrane Dynamics Assessed by Changes in Lectin Fluorescence Before and After Capacitation. *Journal of Andrology.* 25(5).
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C dan Forti, G. 1996. Human Sperm Activation During Capacitation And Acrosome Reaction: Role Of Calcium, Protein Phosphorylation And Lipid Remodelling Pathways. *Frontiers In Bioscience.* 1: 189-205.
- Berg, K. 2005. Oxidative Stress And The Ischemic Heart. A Study In Patients Undergoing Coronary Revascularization. Norwegian University Of Science And Technology Faculty Of Medicine. 1-100
- Breitbart, H dan Z. Noar. 1999. Protein Kinase In Mammalian Sperm Capacitation Reaction. Reviews of Reproduction. *Journals of Reproduction And Fertility.* 1359-60044: 151-159
- Casey, P.J., Hillman, RB., Robertson, K.R dan A.I. Yudin, 1993. Validation Of An Acrosomal Stain For Equine Sperm That Differentiates Between Living And Dead Sperm. *Journal Of Andrology.* Vol 14: 289-297.
- Check, J.H., Nowroozi, K., Cooper, S.O., Shanis, B.S dan Bollendorf, A. 1991. Laboratory Methods of Achieving Human Sex Preselection (Chapter 8). In: Assisted Human Reproductive Tecnology, E.S.E Hafez.
- Chen, M.J dan Bongso, A. 1999. Comparative Evaluation Of Two Density Gradient Preparations For Sperm Separation For Medically Assisted Conception. *Human Reproduction.* 14(3): 759-764.
- Cheng F.P., Fazeli A., Voorhout, W.F., Marks, T A., Bevers M.M., dan Colenbrander, B. 1996. Correa, J.R., Heershe, G dan P.M. Zavos. 1996. Sperm Membrane Functional Integrity And Response Of Frozen Thawed Bovine Spermatozoa During The *Hypoosmotic Swelling Test* Incubation At Varying Temperatures. *Theriogenology.* 47: 715-723
- Cummins, J.M., S.M. Pember, A.M. Jequier, J.L. Yovich dan Hartmann, P.E. 1991. A Test of the Human Sperm Acrosome Reaction Following Ionophore Challenge. Relationship to Fertility and Other Seminal Parameters. *Journal of Andrology.* 12(2): 8-103.
- Edyson. 2003. Pengaruh Pemberian Kombinasi Vitamin C dan E terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) pada Eritrosit Rattus norvegicus Galur Wistar yang diInduksi L-Tiroksin. *JBP.* 5(3).
- Evan G dan Maxwell. 1987. Salomons Artificial Inseminations of Shee and Goat. Butherworrthe, Sydney: 8-16.
- Fonseca, J.F., Torres, C.A.A., Maffili, V.V., Borges, A.M., Santos, A.D.F., Rodrigues, M.T dan R.F.M., Oliveira. 2005. The Hypoosmotic Swelling Test In Fresh Goat Spermatozoa. *Anim. Reprod.* 2: 139-144.

- Fraser, LR, Ebeydeera LR, dan Niwa K. 1995. Ca ++ Regulating Mechanism That Modulate Bull Sperm Capacitation And Acrosomal Exocytosis As Determined By Chlortetracycline Analysis. *Mol-Reprod Dev.* 40: 233-241.
- Gadella, B.M dan Visconti, P. E. 2006. Regulation of Capacitation. In: The Sperm Cell, Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Jonge, C.J.D dan Barratt, C.L.R (Ed). New York: Cambridge University Press
- Garcia, M.A dan S. Meizel. 1999. Progesterone-Mediated Calcium Influx and Acrosome Reaction of Human Spermatozoa: Pharmacological Investigation of T-Type Calcium Channels. *Biology Of Reproduction.* 60: 102-109.
- Garner, D.L. dan E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Reproduction in Farm Animal. Hafez, E.S.E. (Ed.) Six Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Guérin P, Ferrer M, Fontbonne A, Bénigni L, Jacquet M, Ménéz Y, 1999. In Vitro Capacitation Of Dog Spermatozoa As Assessed By Chlortetracycline Staining. *Theriogenology.* 52: 617-628.
- Hafez, B. dan E.S.E. Hafez. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In: Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Hafez, E.S.E. (Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamano, K.I. 2007. Sex Preselection In Bovine By Separation Of X- And Y-Chromosome Bearing Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development.* 53(1): 27-38.
- Jonge, C.J.D. 2000. Human Fertilization. In: Assisted Reproduction Laboratory. Keel, B.A, May, J.V dan Jonge, C.J.D (Ed). CRC Press: New York
- Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H dan E., Sato. 2004. Assessment of Bovine X- And Y-Bearing Spermatozoa In Fractions By Discontinuous Percoll Gradients With Rapid Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal of Reproduction And Development.* 50(4).
- Kohn, F.M., Mack, S.R., Schill, W.B dan L.J.D, Zaneveld. 1997. Detection of Human Sperm Acrosome Reaction: Comparison Between Methods Using Double Staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and Transmission Electron Microscopy. *Human Reproduction.* 12(4): 714-721
- Mc Evoy JD. 1992 Alteration of the sex ratio. *Anim Breed Abst.* 60:97-111.
- Neild, D.N., Gadella, B.M, Agüero A., Stout, T.A.E dan Colenbrander, B. 2005. Capacitation Acrosome Function And Chromatin Structure In Stallion Sperm. *Animal Reproduction Science.* 89: 47-56.
- Nur, Z., Dogan, I., Gunay, U dan Soylu, M.K. 2005. Relationships Between Sperm Membrane Integrity And Other Semen Quality Characteristics Of The Semen Of Saanen Goat Bucks. *Bull vet inst pulawy.* 49: 183-187
- Ollero, M., E. Guzman, M.C Lopez, R.K Sharma, A. Agarwal, K. Larson, D. Evanson, AJ. Thomas dan J.G Alvarez. 2001. Characterization Of Subsets Of Human Spermatozoa At Different Stages Of Maturation: Implication In The Diagnosis And Treatment Of Male Infertility. *J. Human Reprod.* 16(9): 1912-1921
- Samardžija, M., Dobranić, T., Karadjole, M., Getz, I., Vince, S., Gračner., Maćešić, N dan Filaković, I. 2006. The Efficacy of Gradient Percoll On Bull Sperm Separation For In Vitro Fertilization. *Veterinarski Arhiv.* 76 (1): 37-44.
- Shekarniz, M., A.J. Thomas dan A. Agarwal. 1995. A Method Of Human Semen Centrifugation To Minimize The Latrogenic Sperm Injuries Caused By Reactive Oxygen Species. *Eur Urol.* 28: 31-35.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex Dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Desertasi pasca sarjana unier Surabaya.
- Triana, I.N. 2006. Pengaruh Waktu Inseminasi Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Pascainseminasi Pada Kambing. Berk. Penel. *Hayati.* 11: 147-150.

- Tucker, K.E dan C.A.M., Jansen. 2002. Sperm Separation Techniques: Comparison And Evaluation Of Gradient Product. Proceedings 2th International Workshop For Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART Lab.
- Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Ning, J.L.B.X dan G.S, Kopf. 1998. The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *Journal of Andrology*. 19(2).
- Wolf, C.A., Brass, K.E., Rubin, M.I.B., Pozzobon, S.E., Mozzaquatro, dan F.D. De La Corte. 2008. The Effect Of Sperm Selection By Percoll Or Swim-Up On The Sex Ratio Of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Anim. Reprod*. 5(3/4): 110-115.