

**IDENTIFIKASI EKSPRESI OVIDUCT SPECIFIC GLYCOPROTEIN  
(OVGP) PADA TESTIS KAMBING (*Capra aegagrus*) SECARA  
IMUNOHISTOKIMIA DAN PENGARUH SUPLEMENTASI  
OVIDUCT SPECIFIC GLYCOPROTEIN (OVGP) PADA  
PENGENCER SEMEN KAMBING TERHADAP  
INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**ILHAM AKBAR HELMY KURNIAWAN**  
135130101111019



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

IDENTIFIKASI EKSPRESI OVIDUCT SPECIFIC GLYCOPROTEIN (OVGP)  
PADA TESTIS KAMBING (*Capra aegagrus*) SECARA IMUNOHISTOKIMIA  
DAN PENGARUH SUPLEMENTASI OVIDUCT SPECIFIC GLYCOPROTEIN  
(OVGP) PADA PENGECER SEMEN KAMBING TERHADAP  
INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA

**Oleh:**  
**ILHAM AKBAR HELMY KURNIAWAN**  
**135130101111019**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 4 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Dra. Herawati, MP.**  
NIP. 19580127 198503 2 001

**drh. Herlina Pratiwi, M.Si**  
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ilham Akbar Helmy Kurniawan  
NIM : 135130101111019  
Program Studi : Kedokteran Hewan  
Penulis Skripsi berjudul : IDENTIFIKASI EKSPRESI OVIDUCT  
SPECIFIC GLYCOPROTEIN (OVGP) PADA  
TESTIS KAMBING (*Capra aegagrus*)  
SECARA IMUNOHISTOKIMIA DAN  
PENGARUH SUPLEMENTASI OVIDUCT  
SPECIFIC GLYCOPROTEIN (OVGP) PADA  
PENGECER SEMEN KAMBING  
TERHADAP INTEGRITAS MEMBRAN  
SPERMATOZOA

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 4 Januari 2018

Yang menyatakan,

(ILHAM AKBAR H. K.)

**Identifikasi Ekspresi Oviduct Specific Glycoprotein Pada Testis Kambing (*Caprae aegagrus*) Secara Imunohistokimia dan Pengaruh Suplementasi Oviduct Specific Glycoprotein Pada Pengencer Semen Kambing Terhadap Integritas Membran Spermatozoa**

**ABSTRAK**

*Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) diketahui dapat meningkatkan fisiologis dan fluiditas membran serta membantu peningkatan ion kalsium ke dalam membran yang merangsang ikatan membran dengan cAMP intraseluler sehingga meningkatkan integritas membran utuh spermatozoa. Melihat potensi dari OVGP tersebut maka dilakukan penelitian tentang pengaruh suplementasi OVGP pada pengencer semen kambing yang diharapkan dapat digunakan dalam pembuatan semen beku dan mengurangi kejadian polispermi sehingga membantu meningkatkan populasi ternak kambing di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi OVGP pada testis kambing dan pengaruh suplementasi OVGP pada pengencer semen kambing terhadap integritas membran spermatozoa kambing. Pengamatan ekspresi OVGP pada testis dilakukan dengan metode imunohistokimia dan pengamatan integritas membran dilakukan dengan membagi media pengencer spermatozoa menjadi tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok P0 sebagai kontrol (tanpa suplementasi OVGP), kelompok P2 (OVGP dosis 5 µg/mL), dan kelompok P2 (OVGP dosis 10 µg/mL) dengan metode pemeriksaan HOS Test. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi OVGP pada testis kambing terlihat pada bagian sel-sel basis dari tubulus seminiferus yaitu sel spermatogonium dan sel spermatosit serta pada sel interstitial yaitu sel leydig. Suplementasi OVGP berpengaruh terhadap integritas membran secara signifikan ( $P < 0,05$ ) pada dosis 5 µg/mL dan 10 µg/mL dibandingkan dengan tanpa suplementasi OVGP. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat ekspresi OVGP pada organ testis kambing serta terdapat peningkatan integritas membran spermatozoa yang disuplementasi oleh OVGP pada pengencer semen kambing.

**Kata kunci:** *Oviduct Specific Glycoprotein*, Integritas membran spermatozoa, Imunohistokimia.

repository.ub.ac.id

**Identification expression the oviduct specific glycoprotein in the testes goat (*Caprae aegagrus*) in immunohistochemistry and the effect of oviduct specific glycoprotein supplementation in goat semen on Membrane integrity.**

**ABSTRACT**

Oviduct Specific Glycoprotein (OVGP) is known to improve physiological and membrane fluidity and helps increase calcium ions into membranes that stimulate membrane bonding with intracellular cAMP thus enhancing the integrity of intact membranes of spermatozoa. Considering the potential of OVGP, research on the effect of OVGP supplementation on goat semen dilution is expected to be used in the manufacture of frozen semen and reduce the incidence of polyspermy thus helping to increase the population of goats in Indonesia. This study was conducted to determine the expression of OVGP in goat testis and the effect of OVGP supplementation on goat semen diluent on goat spermatozoa integrity membrane. Observation of OVGP expression in the testis was done by immunohistochemical method and membrane integrity observation was done by dividing the spermatozoa dilution medium into three treatment groups ie group P0 as control (without OVGP supplementation) ( $50,31 \pm 3,37$ ), group P2 (OVGP dose  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) ( $53.12 \pm 1.57$ ), and P2 group (OVGP dose  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) ( $54.81 \pm 1.64$ ) with HOS Test method. The results showed that OVGP expression in goat testis was seen in the base cells of seminiferous tubules of spermatogonium and spermatocyte cells and in interstitial cells of leydig cells. OVGP supplementation significantly affected membrane integrity ( $P < 0.05$ ) at doses of  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  compared with no OVGP supplementation. Based on these results it can be concluded that there is an expression of OVGP in goat testis organ and there is increased integrity of membrane spermatozoa supplemented by OVGP on goat semen diluent.

**Keywords:** Oviduct Specific Glycoprotein, Integrity of spermatozoa membrane, Immunohistochemistry

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir /skripsi yang berjudul “Identifikasi Ekspresi Oviduct Specific Glycoprotein Pada Testis Kambing (*Caprae aegagrus*) Secara Imunohistokimia dan Pengaruh Suplementasi Oviduct Specific Glycoprotein Pada Pengencer Semen Kambing Terhadap Integritas Membran Spermatozoa”. Penelitian ini adalah bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh Dr. Dra. Herawati, MP. dan didanai oleh BOPTN. Serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada :

1. Dr. Dra. Herawati, MP. sebagai pembimbing 1 tugas Sarjana ini atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
2. Drh. Herlina Pratiwi, M.Si. sebagai pembimbing 2 tugas Sarjana ini atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
3. Drh. Aulia Firmawati, M.Vet. sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
4. Drh. Desi Wulansari, M.Vet. sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.

5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Ketua Program Pendidikan Dokter Hewan dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
6. Dr. Dra. Herawati, MP., Drh. Aulia Firmawati, M.Vet, dan Drh. Herlina Pratiwi, M.Si sebagai dosen payung penelitian bagi penulis yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian.
7. Keluarga yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan studi serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
8. Seluruh dosen yang telah membimbing dan memberikan ilmu selama menjalankan studi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
9. Latiffatul 'Ainiyah, Joseph Moses, dan Regi Abdul Rozzaaq atas kontribusi, bantuan dan inspirasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
10. Seluruh teman dan sahabat di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan teman-teman angkatan 2013 pada umumnya khususnya Theresa Lidya P.
11. Teman-teman asisten laboratorium Reproduksi dan Embriologi yang telah memberikan dukungan kepada penulis.

Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan informasi yang sebaik-baiknya khususnya bagi penulis sendiri dan rekan-rekan mahasiswa yang lain. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut dan mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun untuk hasil yang lebih baik.

Malang, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan .....	5
1.5 Manfaat .....	6
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Anatomi dan Fisiologi Reproduksi Kambing Betina .....	7
2.1.1 <i>Oviduct Specific Glycoprotein (OVGP)</i> .....	9
2.2 Testis kambing .....	11
2.3 Semen kambing .....	12
2.3.1 Cairan semen .....	12
2.3.2 Spermatozoa .....	13
2.3.2.1 Membran plasma utuh spermatozoa .....	15
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b> .....	16
3.1 Kerangka Konseptual .....	16
3.2 Hipotesis Penelitian .....	18
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b> .....	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
4.2 Alat dan Bahan .....	19
4.3 Tahapan Penelitian .....	20
4.4 Prosedur Kerja .....	23
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	28
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	39
<b>LAMPIRAN</b> .....	44





## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Spermatozoa.....	13
4.1 Spermatozoa yang terpapar pada medium hiposmotik .....	24
5.1 Ekspresi OVGP pada testis .....	28
5.2 Integritas membran .....	31



## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Pemeriksaan mikroskopis semen suplementasi OVGP.....	33
5.2	Hasil pemeriksaan HOS Test .....	34



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Kerangka Operasional.....	44
2. Rancangan Penelitian.....	46
3. Data hasil pemeriksaan mikroskopis semen kambing .....	47
4. Uji Statistik menggunakan SPSS .....	48
5. Uji lanjutan dengan menggunakan tukey.....	52



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
ATP	Adenosin Trifosfat
ANOVA	<i>Analisis of variant</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HOS	<i>Hypoosmotic Swelling</i>
IB	Inseminasi Buatan
kg	Kilogram
mL	Mililiter
mg	Miligram
NaCl	Natrium Klorida
OVGP	<i>Oviduct Specific Glycoprotein</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
RPH	Rumah Potong Hewan
SDS-Page	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ZP	Zona Pellucida



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Salah satu komoditas peternakan yang memenuhi kriteria dalam membantu pembangunan perekonomian nasional di sektor pertanian, peternakan dan agrobisnis adalah komoditas kambing. Upaya pengembangan komoditas ternak apapun, termasuk pengembangan dan peningkatan produktivitas kambing, tidak terlepas dari visi dan misi pembangunan nasional di sektor peternakan yang telah ditetapkan sebagai arah dalam upaya pengembangan setiap komoditas ternak. Potensi untuk mengembangkan kambing di Indonesia sangat terbuka lebar, karena kurang lebih 30 persen kebutuhan pangan di sektor pertanian, peternakan dan agrobisnis dipenuhi oleh ternak, sehingga keberadaan ternak menjadi sangat strategis dalam hidup dan kehidupan manusia. Maka dari itu pemerintah terus berupaya untuk mendorong peternak dalam menerapkan teknologi tepat guna dalam rangka meningkatkan daya saing produk hasil peternakan dan untuk meningkatkan populasi serta status kesehatannya (Ditjen Peternakan, 2006).

Teknologi inseminasi buatan (IB) dan teknik pembuatan semen beku dan semen cair merupakan teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi kekurangan bibit ternak, efisiensi biaya pemeliharaan pejantan unggul yang mahal serta dapat sesegera mungkin meningkatkan populasi bibit unggul dengan biaya yang relative terjangkau. Pada kambing penggunaan inseminasi buatan masih jarang dilakukan karena inseminasi buatan pada kambing membutuhkan dua kali inseminasi buatan, hal ini dikarenakan waktu birahi yang panjang pada kambing.

Selain itu masalah lain yang sering timbul adalah terjadinya kejadian polispermi pada kambing.

Gardner *and* Evans (2006) menyebutkan mamalia memiliki beberapa mekanisme untuk mengurangi kejadian polispermi. Dikatakan bahwa kapasitas, transit spermatozoa melalui beberapa bagian saluran betina (yaitu: serviks, *uterotubal junction*), serta *reservoir* spermatozoa dalam oviduk mengatur jumlah spermatozoa yang mencapai tempat fertilisasi pada berbagai spesies. Pada babi khususnya, paparan gamet terhadap sel epitel oviduk dan sekresi oviduk dapat mengurangi polispermi. Selain melibatkan saluran reproduksi betina, sel telur sendiri melakukan blok terhadap polispermi untuk mencegah fertilisasi oleh spermatozoa lain setelah sel telur mengalami fertilisasi pertama. Hambatan polispermi pada sel telur terjadi pada dua tingkatan yakni: 1) pada tingkat plasma membran sel telur (*oolema/membran vitelin*) dan 2) pada lapisan luar sel telur yang disebut zona pelusida (ZP) pada mamalia. Pada tingkat zona pelusida, pertahanan ini sering disebut zona blok (*zona reaction*) yang melibatkan eksositosis kortikal granul setelah penetrasi oosit oleh spermatozoa, sedangkan pada tingkat vitelin disebut vitelin blok yang melibatkan  $Ca^{2+}$  signalling (Coy *and* Aviles, 2010).

McCauley *et al.*, (2003) menyebutkan *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) terlokalisasi di zona pelusida, ruang perivitelin, dan plasma membran oosit yang diambil dari oviduk (*in vivo*) serta embrio. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan peran OVGP dalam fertilisasi dan awal perkembangan embrio. Glikoprotein oviduk (OVGP) selain memiliki keterkaitan dengan zona

pelusida juga terlokalisasi pada ruang perivitellin (*perivitelline space*) (Buhi, 2002). Keberadaannya pada ruang perivitellin ini mungkin berhubungan dengan mekanisme Blok polispermi yakni Vitelin Blok. *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) yang disekresikan oleh sel epitel oviduk diduga dapat berperan dalam peristiwa prefertilisasi seperti kapasitas spermatozoa, ikatan spermatozoa dengan zona pelusida, dan proses penetrasi spermatozoa ke dalam sel telur (Hamny, 2014).

Penambahan protein ke dalam pengencer semen beku yang berhubungan dengan perbaikan fertilitas spermatozoa telah banyak diteliti (Bergeron *et al.*, 2004). Salah satu diantaranya dalam penelitian Goncalves *et al.*, (2006) menambahkan protein bernama osteopontin (OPN). Namun penelitian yang menyatakan penambahan *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) dalam spermatozoa guna meningkatkan angka fertilitas dan meminimalisir terjadinya polispermi pada kambing belum banyak dilakukan. Penambahan *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) pada spermatozoa diharapkan dapat meminimalisir kerusakan membran plasma utuh yang dikarenakan adanya zat yang bersifat toksik dari spermatozoa yang telah mati maupun dari pengencer yang telah mengalami oksidasi. Membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa mulai kehilangan motilitasnya dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi (Septiyani, 2012). Hal ini yang mendasari penulis dalam melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh suplementasi *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) dalam spermatozoa dalam meningkatkan kualitas dari spermatozoa dilihat dari integritas

membran spermatozoa dan ekspresi *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing guna mengurangi kejadian polispermi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat ekspresi *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing?
2. Apakah suplementasi *Oviduct-specific glycoprotein* (OVGP) pada semen kambing dapat mempengaruhi integritas membran spermatozoa kambing?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) dengan berat molekul 65 kDa dikoleksi dari oviduk yang diperoleh dari kambing betina usia pubertas yang dipotong tidak lebih dari 3 jam di Rumah Potong Hewan (RPH) kambing Gadang Malang dan sebelum dibawa ke laboratorium untuk dipreparasi dimasukkan dalam NaCl fisiologis dan diberi es batu serta dimasukkan dalam *cooling box* (Pratiwi, *et al.*, 2017).
2. Semen kambing segar diperoleh dengan mengoleksi semen menggunakan metode vagina buatan yang dilakukan di Balai Besar Inseminasi Buatan



(BBIB) Singosari Malang dan ditambahkan pengencer sederhana berupa *skim milk* dan NaCl fisiologis sebelum dilakukan kapasitasi .

3. Proses kapasitasi spermatozoa dilakukan dengan penambahan OVGP dengan tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok P0 sebagai kontrol (media pengencer tidak ditambahkan OVGP), kelompok P1 (media pengencer ditambahkan OVGP sebanyak 5  $\mu\text{g/mL}$ ), kelompok P2 (media pengencer ditambahkan OVGP sebanyak 10  $\mu\text{g/mL}$ ).
4. Pengamatan integritas membran spermatozoa kambing dengan metode HOS Test.
5. Ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing diamati menggunakan metode Imunohistokimia.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing secara Imunohistokimia.
2. Mengetahui pengaruh suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada semen kambing terhadap integritas membran spermatozoa.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah penggunaan suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) terhadap integritas membran spermatozoa dan sebagai informasi mengenai ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing secara Imunohistokimia.
2. Hasil penelitian ini dapat menjadikan *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) sebagai tambahan pada semen kambing yang dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Anatomi dan Fisiologi Reproduksi Kambing Betina

Ovarium kambing dewasa berbentuk bulat, oval atau memanjang dengan ukuran yang berbeda- beda, terpanjang sampai 2,2 cm pada kambing Eropa. Berat ovarium berkisar antara 1,8 – 3,5 gram tergantung jumlah korpus luteum. Pada fase folikuler ovarium tampak licin mengkilat, dan folikel yang besar sering terlihat terang tembus atau kebiruan, diameternya 1,2 cm. Jika didapatkan banyak folikel yang besar, seolah ovarium kambing seperti buah anggur sedang ovarium kanan biasanya lebih aktif daripada yang kiri (Hardijanto dkk., 2009).

Tuba Fallopii umumnya disebut juga dengan istilah oviduk, *tuba uterin*, *salpinx* atau saluran telur. Tuba fallopii adalah saluran sempit dengan dinding otot licin yang berfungsi untuk menerima ovum yang telah diovulasikan dan sebagai tempat terjadinya pembuahan (fertilisasi). Sel telur yang telah dibuahi hingga akhirnya terbentuk *zygote* (gamet) akan diteruskan ke uterus sebagai akibat sebagai kontraksi dinding tuba fallopii. Perjalanan embryo dari tuba fallopii ke uterus tidak sama pada semua hewan. Pada babi, domba, kambing dan kucing berjalan 3 hari, pada sapi antara 3 – 5 hari, anjing 2 hari, kuda 3 hari. Dalam perjalanan ke uterus dapat juga terjadi proses pembelahan sel telur tersebut. Secara histoanatomik tuba fallopii dibagi menjadi :

1. *Infundibulum tubae* yang mempunyai pintu ke rongga abdominal disebut *Osteum tubae abdominale*.
2. *Ampulla tubae* adalah tempat terjadinya fertilisasi

3. *Itsmus* mempunyai rongga sempit dan berkelok-kelok serta sangat panjang.

*Extremitas uterinae* dengan *osteum tubae uterinae* yang bermuara pada kornua uteri. Pada osteum ini terdapat benjolan-benjolan atau papila yang disebut *papila uterinae*, khususnya pada kuda dan anjing memiliki jumlah yang besar (Utomo, 2012).

Kambing merupakan hewan poliestrus yang memperlihatkan gejala birahi secara teratur dengan jarak waktu yang tertentu. Di daerah yang beriklim sedang keadaan birahi kambing sangat dipengaruhi oleh musim, sedang di daerah tropis seperti di Indonesia rupanya tidak demikian sehingga kegiatan reproduksinya dapat berlangsung sepanjang tahun. Namun pengaruh musim terhadap reproduksi kambing di daerah tropis mungkin terjadi, akibat kekurangan pakan pada musim kering yang panjang dan bukan lamanya waktu siang hari. Siklus birahi kambing yang normal akan terulang setiap 18 sampai 21 hari dan lamanya berkisar antara 24 – 48 jam. Siklus birahi kambing dibedakan menjadi siklus birahi yang normal (15-28 hari), sedang yang panjang bila waktunya lebih dari 28 hari dan yang pendek bila kurang dari 15 hari. Siklus birahi kambing yang pendek sering terjadi kurang dari 12 hari, bahkan hanya antara 5-7 hari dan sering dialami oleh kambing betina muda. Dalam keadaan birahi umumnya kambing selalu mengembik, menggosokkan bagian tubuhnya pada dinding kandang, selalu ingin dekat dengan kambing jantan, membiarkan tubuhnya dinaiki dan bersedia dikawini. Dalam keadaan birahi yang sempurna sering alat kelaminnya membengkak, berwarna merah, agak basah dan sedikit lebih hangat (Muchlido, 2007).

### 2.1.1 *Oviduct Specific Glycoprotein (OVGP)*

*Oviduct Specific Glycoprotein (OVGP)* telah diidentifikasi sebagai protein yang disekresikan dari sel epitel sekretoris tidak bersilia pada oviduk. Glikoprotein ini telah ditandai sebagai molekul tertentu yang terkait dengan *zona pellucida* dan / atau ruang perivitelline pada oosit serta permukaan spermatozoa di berbagai mamalia, termasuk manusia. Sejak OVGP menunjukkan homologi molekul yang tinggi pada seluruh spesies dan sekresinya diatur oleh hormon reproduksi, hal ini menimbulkan pertanyaan mengenai signifikansi fisiologis molekul dalam proses fertilisasi pada mamalia. Dari sudut pandang klinis, oviduk secara luas dianggap penting untuk reproduksi manusia, kecuali sebagai saluran untuk gamet, karena program fertilisasi *in vitro*/ transfer embrio tidak terpapar ulang untuk setiap faktor yang berasal dari oviduk. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa hubungan gamet dengan OVGP memiliki peran positif dalam proses fertilisasi. Pada sapi misalnya, fertilisasi oosit ditingkatkan dipersiapkan diperkaya di OVGP, hal ini kemungkinan memberikan efek langsung pada oosit dan spermatozoon. Paparan OVGP sebelum dan selama fertilisasi menurunkan kejadian polispermia pada oosit. Perlakuan ini juga dapat menurunkan jumlah spermatozoa yang terikat dan meningkatkan perkembangan *post-cleavage* menjadi blastula pada babi, meskipun pengaruh positif dari OVGP pada fertilisasi dianggap sebagai sistem yang sangat homogen, yaitu diperlukan gamet dan OVGP dari spesies yang sama (Araki *et al.*, 2003).

Hasil penelitian dari Kouba *et al.* (2000) pada oosit babi yang dipapar *Oviduct Specific Glycoprotein (OVGP)* pada fertilisasi *in vitro* menunjukkan

bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka tingkat penetrasi spermatozoa terhadap oosit semakin rendah sehingga semakin tinggi konsentrasi OVGP yang dipapar dapat menurunkan kejadian polispermi. Pengaruh OVGP pada kelarutan zona pelusida terhadap pronase (*enzymatic digestion*) menunjukkan semakin tinggi konsentrasi OVGP yang dipaparkan maka waktu yang digunakan untuk menghancurkan zona pelusida oleh pronase semakin lama.

Menurut Coy *et al.*, (2008), mekanisme molekuler interaksi gamet dan lingkungan oviduk seutuhnya belum dimengerti. Dalam penelitiannya menunjukkan bahwa oosit babi yang dilakukan proses maturasi oosit *in vitro* dan diinkubasi menggunakan OVGP membuat zona pelusida resisten terhadap pencernaan proteolitik, menurunkan ikatan antara zona pelusida dan spermatozoa, dan meningkatkan kejadian monospermi. Hal ini jelas menunjukkan bahwa regulasi oviduk merupakan faktor yang penting dalam proses fertilisasi.

## 2.2 Testis Kambing

Testis merupakan organ reproduksi primer pada hewan / ternak jantan yang memiliki fungsi ganda yaitu sebagai penghasil hormon (fungsi endokrinologi) dan penghasil sel sperma (fungsi reproduksi / sitologi) (Utomo, 2014). Testis terdiri dari beberapa jaringan yaitu :

1. Tubulus seminiferus. Epitel tubulus terdiri dari dua macam sel yang berbeda, yaitu:

a. Sel sertoli adalah berbentuk panjang dan kadang-kadang seperti piramid.

Sel ini terletak dekat atau diantara sel-sel germinatif. Sel ini bersifat fagosit karena mereka memakan sel-sel mani yang telah mati atau yang

telah mengalami degenerasi, selain dia sendiri memberi makan kepada sel-sel mani yang masih muda.

b. Sel germinatif yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis, sebelum pembuahan (fertilisasi). Tingkat perkembangannya adalah mulai dari spermatogonia (sel paling muda) akan mengalami mitosis beberapa kali menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer akan membagi diri menjadi spermatosit sekunder yang akan membagi dirinya lagi menjadi spermatid dan pada saat ini jumlah kromosom menjadi separuhnya (haploid). Tiap-tiap sel spermatid akan mendewasakan diri menjadi sel-sel spermatozoa.

2. Sel stroma atau tenunan pengikat di luar tubulus seminiferus. Pada jaringan ini terdapat pembuluh darah, limfe, sel saraf dan sel makrofag.
3. Sel-sel interstitial dan sel-sel leydig. Sel leydig dapat menghasilkan hormon testosteron. Namun hormon testosteron ini juga dapat dihasilkan oleh ovarium dan kelenjar adrenal.

### **2.3 Semen Kambing**

Semen merupakan cairan reproduksi yang dihasilkan oleh ternak jantan yang mengandung gamet jantan yang akan dideposisikan ke dalam saluran reproduksi betina. Semen mengandung dua unsur utama yaitu cairan semen dan spermatozoa. Cairan semen merupakan cairan yang sebagian besar disekresikan oleh kelenjar vesikularis dan dalam jumlah kecil disekresikan oleh testis. Cairan semen kambing umumnya berwarna kuning yang disebabkan oleh adanya sekresi



riboflavin. Semen mengandung 75% air dan prostaglandin lebih dari 40  $\mu\text{g/mL}$  dan bersifat isotonik (Kostaman, 2004).

### 2.3.1 2.3.1 Cairan Semen

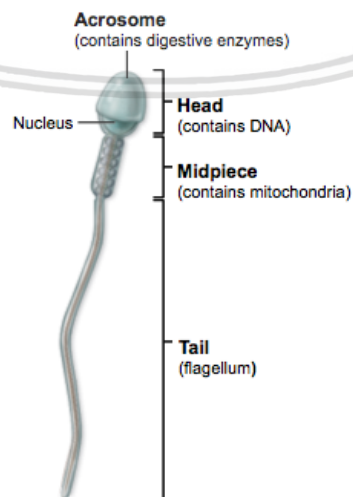
Cairan semen merupakan komposisi dari semen yang mengandung enzim yang disebut egg-yolk coagulating enzim (Fosfolipase A) yang disekresikan oleh kelenjar bulbo-urethralis. Cairan semen tersusun atas fruktosa 213.5 mg/mL, asam sitrat 68.8 mg/100mL dan progesteron 1337 pg/mL. Beberapa unsur mineral yang ada pada cairan semen antara lain sodium, potasium, klorida, dan magnesium. Peranan dari cairan semen adalah sebagai media atau pembawa spermatozoa dari kelenjar reproduksi jantan selama ejakulasi, mengaktifasi medium untuk spermatozoa non-motil, dan sebagai penyangga yaitu medium kaya nutrisi yang berperan untuk membantu spermatozoa agar tetap hidup setelah dideposisikan di dalam saluran reproduksi betina (Setiadi, 2000).

### 2.3.2 Spermatozoa

Spermatozoa terdiri dari tiga segmen khusus. Segmen-segmen ini meliputi: kepala, leher dan ekor. Kepala terdiri dari tudung akrosom dan daerah post-akrosomal. Ekor terdiri dari bagian *principal* dan bagian ujung atau *terminal*. Kepala spermatozoa mengandung DNA yang padat dan kompak. Bentuk kepala dari spermatozoa mamalia berupa datar dan berbentuk oval. Namun, pada tikus, hamster, tikus gunung, dan sekitar 11 sub family lain dari rodensia memiliki bentuk kepala yang melipat ke belakang sehingga bentuknya seperti kait, dan disebut sebagai kait apikal. Spermatozoa ayam juga berbeda dengan spermatozoa hewan ternak lain, spermatozoa ayam memiliki bentuk kepala yang memanjang sehingga bentuk spermatozoa menyerupai tombak (Saenz, 2003).

Spermatozoa memiliki bentuk khas memanjang, dilengkapi dengan ekor/flagellum yang kuat untuk mendorong spermatozoa melalui media cair namun tidak memiliki organel sitoplasma seperti ribosom, retikulum endoplasmik, apparatus golgi, yang tidak dibutuhkan dalam tugas mengirim DNA ke sel telur. Spermatozoa mengandung mitokondria yang ditempatkan secara strategis sehingga mitokondria dapat secara efisien memberikan tenaga pada ekor. Ekor spermatozoa berfungsi mendorong spermatozoa ke arah sel telur dan membantu spermatozoa dalam menembus mantel sel telur, sedang kepala spermatozoa mengandung nukleus haploid yang sangat terkondensasi.

*Deoxyribonucleic Acid* (DNA) nukleus terbungkus dengan sangat rapat, untuk meminimalisir volumenya saat dalam perjalanan menuju oosit, selain itu proses transkripsi juga dihentikan. Kromosom spermatozoa sangat kurang kandungan histon dibandingkan sel-sel somatik, dan dibungkus oleh protein yang sangat sederhana dan bermuatan positif yang disebut protamin (Albert *et al.*, 2008).



**Gambar 2.1.** Struktur Spermatozoa (Guyton *and* Hall, 2006).

Menurut Albert *et al.*, (2008) pada kepala spermatozoa bagian tepi anterior dari pembungkus nukleus, terdapat vesikel sekretori yang disebut dengan vesikel akrosom. Vesikel ini mengandung enzim hidrolitik yang dapat membantu spermatozoa berpenetrasi pada selubung luar oosit. Saat spermatozoa kontak dengan zona pelusida, kandungan vesikel akrosom akan dikeluarkan dengan eksositosis yang disebut reaksi akrosom. Reaksi ini dibutuhkan untuk spermatozoa berikatan dengan zona pelusida, menembus zona, dan kemudian berfusi dengan membran sel telur. Ekor motil dari spermatozoa berupa flagella panjang, axonema pusat dari flagella ini keluar dari basal bodi yang terletak tepat di belakang nukleus. Axonema terdiri dari dua mikrotubulus pusat yang dikelilingi sembilan pasang mikrotubulus. Gerakan aktif spermatozoa disebabkan oleh pasangan mikrotubulus yang saling berdekatan, yang dikendalikan protein motor *dynein*, yang menggunakan energi dari hidrolisis ATP untuk mendorong mikrotubulus. Adenosin Trifosfat (ATP) dihasilkan dari sejumlah besar mitokondria khusus yang terkonsentrasi pada bagian anterior ekor spermatozoa, tempat ATP dibutuhkan. Tujuan dan fungsi spermatozoa sama pada berbagai mamalia. Tujuan spermatozoa adalah membawa DNA kepada oosit sehingga sel yang sebelumnya haploid (spermatozoa dan ovum) dapat bergabung untuk membentuk individu baru untuk melanjutkan perkembangbiakan (Saenz, 2003).

**2.3.2.1 Membran Plasma Utuh Spermatozoa**

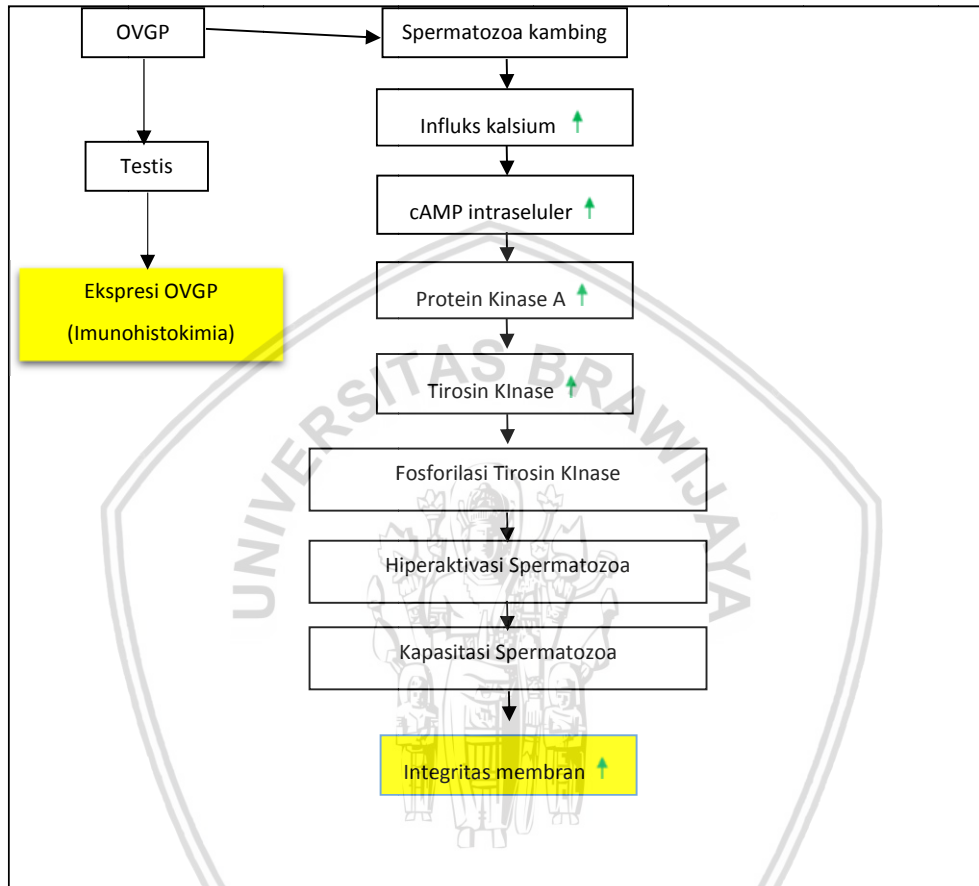
Integritas membran adalah suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap transport ion,

sehingga cairan di luar sel tidak dapat memasuki sel. Membran plasma rusak maka proses metabolisme akan terganggu, sintesa ATP tidak berjalan dengan normal dan berakibat fatal bagi spermatozoa yaitu menurunnya motilitas maupun daya tahan hidup spermatozoa itu sendiri (Sukmawati, 2014).

Membran plasma yang utuh merupakan hal yang mutlak harus dimiliki spermatozoa yang baik karena membran plasma memegang peranan yang sentral dalam mengatur seluruh proses biokimia yang terjadi di dalam sel. Keutuhan membran plasma menentukan hidup dan matinya spermatozoa. Sehingga nilai persentase membran plasma utuh seharusnya tidak jauh berbeda dari nilai persentase spermatozoa hidup. Evaluasi terhadap spermatozoa dengan membran plasma yang utuh dapat diuji dengan menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling* (HOS) test (Septiyani, 2012).

### BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

: Variabel tergantung

→ : menstimulasi

↑↓ : efek OVGP

Suplementasi OVGP kedalam media pengencer semen kambing akan menyebabkan terjadinya ikatan spesifik antara OVGP dengan membran spermatozoa. Membran spermatozoa terdiri atas fosfolipid dan kolesterol yang berfungsi mempertahankan fluiditas dan permeabilitas membran. penambahan cairan oviduk pada spermatozoa mengakibatkan peningkatan fosforilasi protein tirosin kinase pada spermatozoa secara signifikan. Proses fosforilasi tirosin kinase terjadi secara fisiologis dalam sel spermatozoa melalui serangkaian signal transduksi yang diawali dengan aktifnya enzim adenilat siklase membran spermatozoa untuk mengubah adenosin triphosphat (ATP) menjadi cyclic adenosin monophosphat (cAMP). Meningkatnya cAMP akan menginduksi protein kinase yang semula inaktif menjadi aktif (PK A). Selanjutnya PK A akan mengaktivasi tirosin kinase yang ada pada bagian ekor spermatozoa sebagai biokatalisator dalam proses fosforilasi tirosin kinase. Selain itu PK A akan menstimulasi pembukaan channel voltage gated dependent  $Ca^{2+}$  sehingga menyebabkan masuknya ion  $Ca^{2+}$  ke dalam sel. Produk fosforilasi tirosin kinase akan menyebabkan hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa dan diikuti dengan terjadinya kapasitasi. Membran plasma spermatozoa yang utuh menunjukkan spermatozoa masih hidup sehingga fungsi membran sebagai pengatur transportasi zat serta ion dari luar ke dalam sel atau sebaliknya masih berjalan normal, maka proses signal transduksi dan metabolisme sel juga normal. Ekspresi dari *Oviduct Specific Glycoprotein* pada jaringan testis tervisualisasi dengan warna kecoklatan yang merupakan hasil reaksi antara OVGP yang berikatan dengan antibodi primer

(OVGP1) dan antibodi sekunder berlabel HRP biotin (Goat-anti Rabbit IgG HRP) serta substrat diamino benzidine (DAB).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Penambahan *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada semen kambing dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa.
2. Terdapat ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada testis kambing.



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2016 hingga Oktober 2017. Pengambilan organ reproduksi kambing betina untuk sampel diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kambing Gadang Malang, koleksi *Oviduct Specific Glycoprotein* dari cairan dan cacahan jaringan epitel dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Sonikasi dilakukan di Laboratorium LSIH Universitas Brawijaya Malang, SDS-Page, elektroelusi dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, koleksi semen kambing dilakukan di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang, proses pembuatan preparat testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Malang, proses imunohistokimia dan analisa hasil imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya..

### 4.2 Alat dan Bahan

#### 4.2.1 Alat

*Cooling box*, *ice gel*, plastik bening, *disecting set*, cawan petri, gelas objek, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, tabung apendorf, rak apendorf, tabung sentrifus, sentrifugator, kertas label, gunting, digital sonifier, gelas ukur, gelas kaca penutup, lemari es, *freezer*, plat kaca, alat elektroforesis, mikrotube, chamber elektroelusi, vagina buatan, tabung reaksi, *water bath*, mikroskop.



#### 4.2.2 Bahan

Oviduk kambing betina, kambing jantan, testis kambing jantan, NaCl fisiologis, PBS tween 0,05%, alkohol absolut, tisu, gel, buffer, larutan *destaining*, aquades, buffer blotting, kertas saring, Skim milk 5%, antibodi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP1), substrat *Western Blue*, *phosphat buffer* (PB), ethanol absolut, alkohol 70%, larutan asam asetat, paraffin, vaselin, larutan etanol, aquades, methanol, PBS, goat serum 10%, larutan Tris buffer, diaminobenzidin (DAB), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Larutan HOS (0,09 g NaCl/50 mL aquades), antibodi sekunder (goat-anti rabbit IgG H&L (HRP)).

#### 4.3 Tahapan Penelitian

##### 4.3.1 Rancangan Penelitian Integritas Membran

Pemeriksaan integritas membran spermatozoa dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, yaitu: kelompok P0 sebagai kontrol (media pengencer tidak ditambahkan OVGP); kelompok P1 (media pengencer ditambahkan OVGP sebanyak 5 µg/mL); kelompok P2 (media pengencer ditambahkan OVGP sebanyak 10 µg/mL); Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus  $[t(n-1) \geq 15]$  (Kusriningrum, 2008).

$$t(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t: jumlah kelompok perlakuan

n: jumlah sampel yang diperlukan

Berdasarkan pada perhitungan di atas, dilakukan 3 macam kelompok perlakuan, ulangan yang dibutuhkan 6 kali dalam setiap kelompok perlakuan. Sehingga, jumlah minimal media pengencer yang digunakan sebanyak 3 buah media pengencer, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini 18 media pengencer.

#### 4.3.2 Rancangan Penelitian Ekspresi OVGP pada Testis

Pemeriksaan ekspresi OVGP pada testis dilakukan dengan populasi (N) tidak diketahui. Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$n = (Z_{\frac{1}{2}\alpha} + Z_{\beta})^2$$

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7.$$

Keterangan:

n = besar sampel masing-masing kelompok.

$Z_{\frac{1}{2}\alpha}$  = nilai standar normal, yang besarnya tergantung  $\alpha$ .

$$\text{Bila } \alpha = 0,05 \rightarrow Z_{\frac{1}{2}\alpha} = 1,645.$$

$Z_{\beta}$  = nilainya tergantung  $\beta$  yang ditentukan (berdasarkan tabel).

$\delta$  = error untuk menerima  $H_0$ , bila  $H_0$  salah.

$$\text{Bila } \beta = 0,08 \rightarrow Z_{\beta} = 0,842$$

$\delta$  = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan

$\sigma$  = standar deviasi

Berdasar rumus didapatkan jumlah sampel minimal adalah tujuh buah. Dalam penelitian ini digunakan tujuh buah testis untuk setiap kelompok observasinya, sehingga telah memenuhi batas minimal sampel (Steel dan Torrie, 1980).

### 4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : Suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP).

Variabel Tergantung : Peningkatan integritas membran spermatozoa dan ekspresi OVGP pada testis kambing.

Variabel kendali : kualitas semen, suhu ruangan, jenis kambing

## 4.4 Prosedur Kerja

### 4.4.1 Suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada pengencer semen kambing

Penambahan isolat OVGP pada semen kambing (kualitas semen yang baik) dengan metode inkubasi dan menentukan dosis optimum penambahan OVGP pada semen cair kambing.

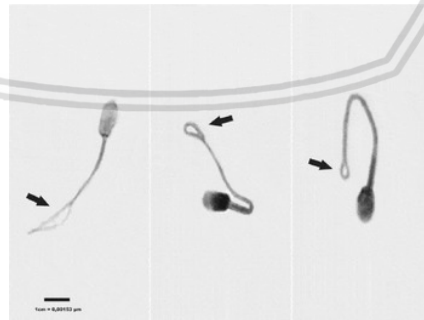
Semen segar kambing dalam tabung erlenmeyer dimasukkan kedalam waterbath, kemudian dilakukan inkubasi selama lima menit dalam waterbath dengan suhu 37°C dengan penambahan OVGP pada larutan pengencer NaCl yaitu (P0): tanpa suplementasi OVGP (hanya ditambah NaCl); (P1): OVGP 5 µg/mL, (P2): OVGP 10 µg/mL (Kouba, 2000). Setelah itu dilakukan pemeriksaan integritas membran dengan menggunakan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah sebanyak 200 spermatozoa atau 10 kali lapang pandang.

#### 4.4.3 Pemeriksaan Integritas Membran Spermatozoa dengan HOS Test

*Hypoosmotic Swelling* (HOS) Test mulai diperkenalkan pada tahun 1963 oleh Drevious yang menemukan bahwa spermatozoa yang terpapar pada medium hiposmotik akan mengalami pembengkokan ekor sehingga seperti spiral. Pembengkokan ini adalah akibat dari gangguan kontraksi-relaksasi ekor oleh karena adanya aliran ion atau bahan yang berat molekulnya rendah dari ekor ke medium hiposmotik tersebut (Jeyendran *and* Zaneveld, 1992).

Prinsip HOS Test yaitu untuk melihat status dari membran spermatozoa, karena integritas membran berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa (Lenchniak *et al*, 2002). Spermatozoa dengan membran utuh, jika ditempatkan pada media hiposmotik akan berusaha meningkatkan volume air didalam tubuhnya agar cairan yang ada di dalam dan di luar spermatozoa tetap seimbang, upaya ini menyebabkan terjadinya penyempitan ruang pada membran yang menyelimuti ekor sehingga memaksa ekor spermatozoa melingkar didalam membran spermatozoa. Proses menggelembung diawali pada bagian ujung ekor dilanjutkan bagian tengah dan kepala sehingga menyebabkan kepala menggelembung atau melingkar yang memberi arti bahwa membran spermatozoa tersebut utuh atau spermatozoa motil (Susilawati, 2011). Sebaliknya spermatozoa dengan membran plasma yang rusak atau permeabilitasnya meningkat, larutan hiposmotik dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas dan tidak terperangkap sehingga spermatozoa tidak menggelembung atau ekor terlihat tetap lurus (Mafruchati, 2000).

Uji kualitas spermatozoa berupa integritas membran spermatozoa setelah dilakukan perlakuan dengan menggunakan metode *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOS Test). *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOS Test) merupakan suatu uji yang dapat dilakukan untuk mengetahui membran plasma utuh spermatozoa, Parameter penilaian integritas membran spermatozoa dengan metode hos test diantaranya spermatozoa yang mempunyai integritas membran plasma utuh dan hidup ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor menggulung dengan pancaran warna terang, sedang spermatozoa yang mempunyai membran plasma rusak dan hidup ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna terang dan bila spermatozoa mati serta tidak memiliki membran plasma rusak ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna merah (Madyawati, 2008). Spermatozoa dengan membran plasma utuh yang terpapar pada medium hipoosmotik akan terlihat adanya pembengkakan dan penggulangan pada ekor (**Gambar 4.1**) (Gramajo-Buhler, 2013).



**Gambar 4.1** Spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik (Gramajo-Buhler, 2013).

Prosedur pemeriksaannya adalah sebanyak 20  $\mu\text{l}$  semen dicampurkan ke dalam 80  $\mu\text{l}$  medium HOS (0,09 g NaCl/50 mL aquades) lalu diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah sebanyak 200 spermatozoa atau 10 kali lapang pandang. Semen yang diperiksa akan terlihat adanya perubahan morfologik bila diinkubasi pada medium HOS (Achmadi, 2001).

#### 4.4.3 Ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* pada testis kambing dengan imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan suatu teknik untuk menentukan keberadaan suatu antigen atau protein target dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Teknik ini diawali dengan prosedur histoteknik, yaitu suatu prosedur pembuatan irisan jaringan yang kemudian diamati di bawah mikroskop. Setelah terbentuk suatu irisan jaringan, selanjutnya dapat dilakukan prosedur imunohistokimia. Interaksi antara antigen dan antibodi merupakan suatu reaksi kimia yang tidak kasat mata, sehingga diperlukan visualisasi adanya ikatan tersebut dengan melabel antibodi yang digunakan dengan enzim atau fluorokrom. Enzim yang digunakan untuk melabel selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen, yaitu substrat yang menghasilkan produk akhir berwarna dan tidak larut, yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Pengecatan imunohistokimia yang menggunakan fluorokrom untuk melabel antibodi, dapat langsung diamati tanpa harus direaksikan dengan bahan-bahan yang menghasilkan warna di bawah mikroskop *fluorescence* (Winata, 2013).

Testis kambing dipotong dengan tebal empat mikrometer, kemudian ditempelkan pada gelas objek yang sebelumnya telah dilapisi *poly-L-lysine*. Kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama satu malam. Deparafinisasi dengan *xylene* sebanyak tiga kali, masing-masing tiga menit. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95% dan etanol 70%, masing-masing selama lima menit, lima menit, lima menit dan terakhir dengan aquades selama satu menit. Preparat yang telah dideparafinisasi dibilas dengan PBS pH 7.4 kemudian diinkubasi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit pada suhu ruang. Selanjutnya preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan *blocking* preparat dengan BSA 1% atau skim milk 1% dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak tiga kali kemudian ditetesi dengan antibodi primer (OVGP1) (1:200) dalam BSA 1% atau skim milk 1% dan didiamkan overnight. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak tiga kali selanjutnya ditetesi dengan antibodi sekunder terlabel biotin (1:400) dalam PBS pH 7.4 diinkubasi selama satu jam. Selanjutnya preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 selama tiga kali kemudian ditetesi dengan SA-HRP (1:1000) dalam PBS pH 7.4 dan diinkubasi selama 40 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak tiga kali selanjutnya ditetesi dengan Diamino benzidine (DAB) dan diinkubasi selama 20 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7.4 sebanyak tiga kali selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *hematoxilen* atau *methyl green* pada suhu ruang selama 5 menit kemudian direndam dengan air kran selama 10 menit. Selanjutnya preparat dibilas akuades dan dikeringkan semalam. Kemudian preparat dilakukan

*Mounting* dengan entellan. Preparat ditutup dengan *coverslip*. Diamati ekspresi *oviduct specific glycoprotein* menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x (Winata, 2013). Metode imunohistokimia pada testis kambing akan menghasilkan suatu ekspresi dari OVGP yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan yang merupakan hasil reaksi antara OVGP yang berikatan dengan antibodi primer (OVGP1) dan antibodi sekunder berlabel HRP biotin (Goat-anti Rabbit IgG HRP) serta substrat diamino benzidine (DAB) pada bagian testis diantaranya pada sel-sel yang berada di dalam tubulus seminiferus atau pada sel-sel di luar tubulus seminiferus yang akan dianalisa ekspresi dari OVGP yang ada pada jaringan testis.

#### 4.5 Analisa Data

Data hasil pemeriksaan integritas membran spermatozoa dengan metode HOS test berupa angka persentase (kuantitatif) kemudian dianalisa secara statistika menggunakan uji sidik ragam *one way analysis of variance* (ANOVA) dan apabila ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat ada tidaknya perbedaan nyata. Sedangkan hasil pengamatan ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* pada testis kambing secara imunohistokimia dalam bentuk gambar dianalisa secara deskriptif dan dalam bentuk data angka persentase dianalisis menggunakan *software immunoratio*.



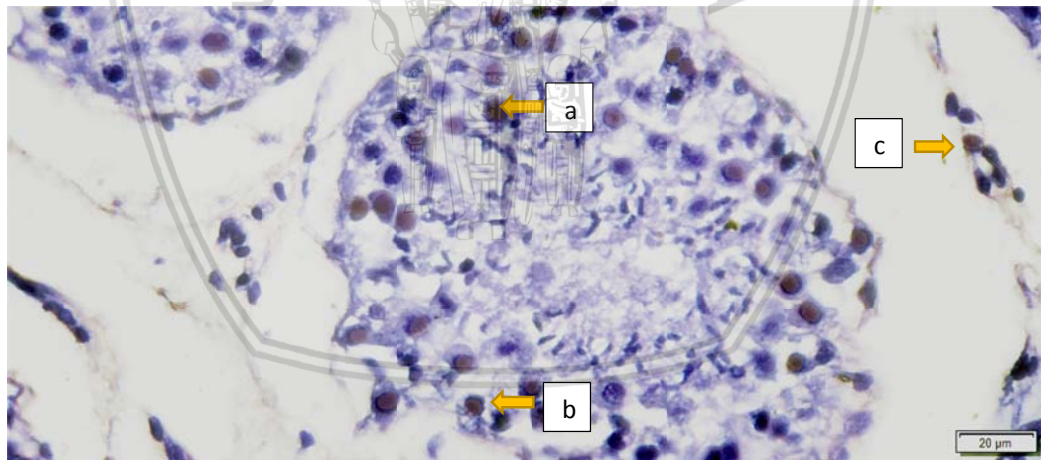


## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* pada Testis Kambing

Organ reproduksi jantan berupa testis yang telah diambil selanjutnya diproses untuk dijadikan preparat dan kemudian dilakukan proses imunohistokimia dengan menggunakan antibodi primer (*anti-OVGPI*) yang selanjutnya diikat dengan antibodi sekunder berlabel HRP biotin (Goat-anti Rabbit IgG HRP) serta substrat diamino benzidine (DAB) yang kemudian menghasilkan warna coklat sebagai visualisasi dari ekspresi OVGP pada testis.

Ekspresi OVGP pada testis dengan proses pewarnaan imunohistokimia ditandai dengan adanya warna coklat pada nukleus sel yang ditunjukkan dengan tanda panah pada **Gambar 5.5**.



**Gambar 5.1** Ekspresi OVGP pada testis kambing ditunjukkan dengan warna coklat dan tanda panah (a) spermatosit, (b) spermatogonium, (c) leydig

Hasil analisa dari imunohistokimia pada testis menunjukkan adanya ekspresi pada spermatogonium, spermatosit, dan sel leydig. Tingkat ekspresi OVGP dilakukan dengan pengukuran presentase area menggunakan *software*

*Immunoratio* dengan hasil persentase sebesar 32,43%. Intensitas warna dari ekspresi OVGP pada testis dengan hasil rata-rata  $210,6 \pm 50,2$ . Hal ini menunjukkan bahwa OVGP disintesis dan disekresikan dalam testis dan dapat diasumsikan bahwa OVGP dibutuhkan oleh sel-sel germinal selama terjadinya proses spermatogenesis.

*Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) yang terekspresikan dalam spermatogonium, spermatisit, dan sel Leydig menunjukkan bahwa OVGP memiliki peran dalam proses spermatogenesis. Menurut Laheri (2017), OVGP memiliki beberapa ekspresi diluar oviduk diantaranya terekspresikan pada testis, epididimis, dan ovarium tetapi tidak pada uterus, serviks, vagina, vesikula seminalis dan kelenjar prostat. OVGP terlokalisasi pada sel dibagian basis dari tubulus seminiferus. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa protein OVGP dapat ditemukan dan terekspresikan pada sel-sel yang ada di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis merupakan suatu proses aktif pembentukan spermatozoa di dalam testis. Tahapan spermatogenesis terdiri dari dua tahapan yaitu tahap spermatositogenesis dan spermiogenesis. Pada tahapan spermatositogenesis terjadi pembentukan spermatisit dari spermatogonium yang membelah secara mitosis. Spermatogonium yang membelah menghasilkan satu spermatogonium dan satu spermatogonia. Spermatogonia kemudian membelah secara mitosis menghasilkan spermatisit primer. Spermatisit primer membelah secara mitosis menghasilkan spermatisit sekunder. Ekspresi OVGP yang terlihat pada sel-sel spermatogonium dan spermatisit menandakan bahwa diduga OVGP berperan dalam tahapan spermatositogenesis bersama dengan *Follicle Stimulating*

*Hormone* (FSH) untuk meningkatkan aktivitas pembelahan sedangkan ekspresi yang terlihat pada sel leydig menunjukkan bahwa OVGP juga berperan bersama dengan testosteron yang dihasilkan oleh sel leydig dalam proses spermatogenesis.

## **5.2 Pengaruh Suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Kambing**

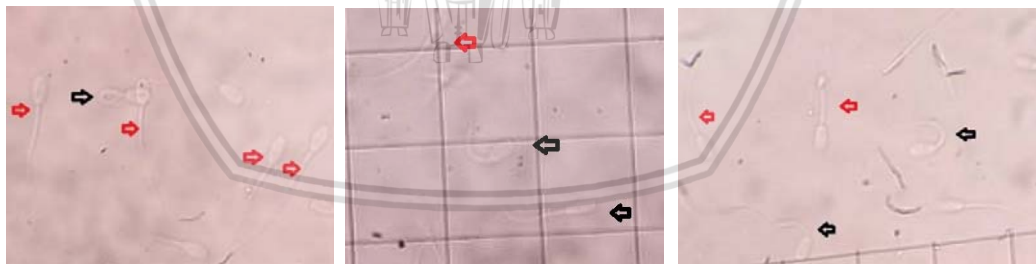
Membran plasma adalah selaput dinding sel yang berfungsi untuk mengatur keluar masuknya beberapa zat yang diperlukan dalam proses metabolisme dan aktifitas hidup sel. Selain itu membran plasma yang dibentuk oleh protein, karbohidrat, lemak, dan fosfolipid dapat bertindak sebagai reseptor untuk beberapa zat tertentu. Jika terjadi kerusakan pada membran plasma spermatozoa maka proses Osmosis sel spermatozoa akan terganggu sehingga akan menyebabkan kerusakan plasma membran yang selanjutnya akan berakibat pada terganggunya proses atau kemampuan untuk membuahi sel telur.

Integritas membran spermatozoa kambing dapat diamati berdasarkan tingkat keutuhan membran dengan menggunakan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) yang diamati dengan mikroskop cahaya. Metode HOS Test berfungsi untuk menguji utuh tidaknya membran yang masih berfungsi dengan aktif. Spermatozoa yang dimasukkan ke dalam larutan hipoosmotik akan menyebabkan terjadinya transport air masuk ke dalam membran spermatozoa untuk menyesuaikan tekanan osmosisnya. Masuknya cairan ke dalam sel melalui membran plasma untuk mencapai keseimbangan antara ruang intraseluler dan ekstraseluler secara fungsional dan mengakibatkan membengkaknya sel serta ditandai dengan adanya ekor yang menggulung. Spermatozoa yang mempunyai

membran yang rusak atau tidak aktif, tidak dapat menyesuaikan tekanan osmotiknya sehingga tidak terjadi adanya transport cairan yang masuk maka mengakibatkan sel spermatozoa tidak mengalami pembengkakan dan penggulungan ekor spermatozoa.

Sebelum dilakukan suplementasi OVGP pada pengencer semen kambing dilakukan pemeriksaan mikroskopis pada spermatozoa kambing segar sebagai kontrol kualitas sebelum perlakuan dengan penambahan media pengencer bersuplementasi OVGP. Kemudian dilakukan suplementasi OVGP dengan dosis 5  $\mu\text{g/mL}$  dan 10  $\mu\text{g/mL}$  selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikroskopis. Data pemeriksaan kualitas spermatozoa segar dan spermatozoa dengan suplementasi OVGP pada media pengencer semen dapat dilihat pada **lampiran 3**.


Pemeriksaan kualitas (mikroskopis) pada spermatozoa kambing yang telah dilakukan suplementasi OVGP dapat dilihat pada **gambar 5.2**.



**Gambar 5.2** Integritas membran spermatozoa kambing yang diamati dengan HOST menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400X. (a) gambar P0 (tanpa suplementasi). (b) gambar P1 (suplementasi OVGP 5 $\mu\text{g/mL}$ ). (c) gambar P2 (suplementasi OVGP 10 $\mu\text{g/mL}$ ).

Keterangan :

Panah **➡** (a) Menunjuk pada spermæ (b) hidup dengan membran (c) utuh

Panah  : Menunjuk pada spermatozoa hidup dengan membran plasma rusak

Panah  : Menunjuk pada spermatozoa mati dengan membran plasma rusak

Penelitian bertujuan untuk mengetahui dosis suplementasi isolat protein OVGP yang baik dan stabil dalam mempertahankan keutuhan membran spermatozoa untuk meningkatkan kualitas spermatozoa agar dapat digunakan sebagai suplementasi semen beku pada kambing.

*Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) merupakan protein yang disekresikan oleh sel epitel tidak bersilia pada oviduk yang telah diketahui pada penelitian sebelumnya pada hewan babi dan sapi dapat meningkatkan kualitas dari spermatozoa. Pada hamster, telah dilaporkan bahwa OVGP memiliki afinitas yang tinggi pada akrosom dan plasma membran ekor yang dapat meningkatkan motilitas, integritas membran serta integritas akrosom (Kan, 2006). OVGP hamster yang terekspresikan pada sel HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) menunjukkan adanya peningkatan fosforilasi tirosin dari protein spermatozoa serta peningkatan tingkat reaksi akrosom secara signifikan (Zhao *et al.*, 2016). Suplementasi OVGP kedalam media pengencer semen kambing akan menyebabkan terjadinya ikatan spesifik antara OVGP dengan membran spermatozoa. Membran spermatozoa terdiri atas fosfolipid dan kolesterol yang berfungsi mempertahankan fluiditas dan permeabilitas membran.

Stabilitas volume sel merupakan proses lanjut dari mekanisme regulasi volume, akumulasi atau pelepasan osmolit dan metabolit organik serta transportasi ion melalui membran plasma. Fungsi sel harus dipertahankan dalam menghadapi perubahan tekanan osmotik. Spermatozoa beberapa mamalia (babi, tikus, banteng

dan manusia) telah ditemukan memiliki kemampuan regulasi volume, dibagi menjadi dua yaitu *regulatory volume decrease* (RVD) merupakan respon terhadap tekanan hipoosmotik dan *regulatory volume increase* (RVI) yaitu sel mampu mengembalikan volumenya setelah mengalami pengerutan karena lingkungan hipertonis (Petrunkina *et al.*, 2007).

Sel spermatozoa akan bereaksi ketika dimasukkan ke dalam larutan hipoosmotik, hal ini terjadi karena larutan hipoosmotik akan masuk ke dalam sel melewati membran plasma. Akibat perbedaan tekanan osmotik dari larutan tersebut dengan tekanan osmotik luar sel lebih tinggi, maka larutan tersebut akan masuk ke dalam sel dan menyebabkan kebengkakan, hal ini terjadi untuk menyeimbangkan tekanan osmotik luar dan dalam sel spermatozoa (Vazquez *et al.*, 1997). Larutan yang masuk tersebut mengakibatkan ruang intraseluler menyempit dan plasma membran menipis sehingga sel spermatozoa membengkak dan ekornya menggulung. Fenomena ini lebih mudah diamati pada ekor spermatozoa daripada kepala karena membran plasma yang mengelilingi ekor tampak lebih longgar (Jeyendran *et al.*, 1992).

Hasil pemeriksaan HOS Test untuk menentukan integritas membran spermatozoa dapat dilihat pada **tabel 5.1** dan **tabel 5.2**.

**Tabel 5.1** Hasil pemeriksaan HOS Test (%)

Parameter	1	2	3	4	5
P0	50	58	65	60	63
P1	60	65	63	67	65
P2	65	65	65	68	71

P0 : Semen segar + pengencer NaCl

P1 : Semen segar + pengencer NaCl + OVGP 5 µg/mL

P2 : Semen segar + pengencer NaCl + OVGP 10 µg/mL

**Tabel 5.2** Hasil Statistik pemeriksaan HOS Test

Parameter	Nilai rata-rata (%) ± SD
P0	50,31 <sup>a</sup> ± 3,37
P1	53,12 <sup>b</sup> ± 1,57
P2	54,81 <sup>b</sup> ± 1,64

Keterangan : superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

Hasil analisa statistik (secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 4**) yang diawali dengan uji normalitas menunjukkan bahwa nilai  $p > 0,05$ . Nilai tersebut membuktikan bahwa data hasil perhitungan integritas membran terdistribusi normal. Analisa statistik selanjutnya menggunakan *Lavene Test* (uji homogenitas) dan didapatkan nilai  $p > 0,05$ . Nilai tersebut membuktikan bahwa data hasil penelitian memiliki varian yang homogen. Berdasarkan hasil uji *One Way ANOVA*, diketahui bahwa terdapat perbedaan nyata antar kelompok penelitian atau dapat dikatakan bahwa terdapat pengaruh suplementasi OVGP terhadap integritas membran pada semen kambing. Hal tersebut dibuktikan melalui nilai  $p < 0,05$  ( $F=4,685$ ), adanya perbedaan tersebut maka diperlukan uji lanjutan dengan Uji Tukey. Berdasarkan Uji Tukey didapat dua notasi berbeda yang menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda nyata dengan kontrol positif. Uji Tukey juga menunjukkan perbandingan antar kelompok, dimana terdapat perbedaan nyata antara perlakuan P0 dengan P1 dan P2 yang mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh dalam pemberian OVGP pada media



pengencer semen kambing terhadap mempertahankan integritas membran spermatozoa sehingga terjadi peningkatan persentase integritas membran dibandingkan dengan kelompok P0 (tanpa ditambahkan OVGP). Namun pada perlakuan P1 tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P2. Hal tersebut dikarenakan antara dosis pemberian OVGP sebanyak 5  $\mu\text{g/mL}$  dengan dosis pemberian OVGP sebanyak 10  $\mu\text{g/mL}$  memiliki perbedaan persentase integritas membran yang tidak terlalu besar sehingga pada dosis pemberian OVGP sebanyak 10  $\mu\text{g/mL}$  tidak dapat meningkatkan nilai integritas membran dari pemberian OVGP dengan dosis 5  $\mu\text{g/mL}$  maka diperlukan penambahan dosis yang lebih tinggi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semen kambing yang disuplementasi dengan OVGP dengan dosis 5  $\mu\text{g/mL}$  dan 10  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan adanya peningkatan presentase membran plasma utuh spermatozoa kambing. Adanya OVGP pada medium pengencer diharapkan dapat melindungi dan mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa dari kerusakan dan menjaga membran spermatozoa menjadi lebih stabil. Semakin tinggi tingkat kerusakan membran spermatozoa akan menyebabkan presentase membran plasma utuh spermatozoa semakin menurun (Rasul *et al.*, 2001). Suplementasi OVGP dalam medium pengencer semen kambing diduga berfungsi menstabilkan membran melalui ikatan hidrogen antara asam amino penyusun protein membran. Adanya interaksi ini akan mencegah denaturasi protein membran yang menurunkan fungsi protein. Apabila terjadi akumulasi denaturasi protein membran akan menyebabkan kematian sel. Fungsi fisiologis protein membran

yaitu sebagai enzim, reseptor, komunikasi sel maupun sebagai channel membran bila terjadi denaturasi akan mengakibatkan kehilangan fungsi sehingga fungsi fisiologis tidak bisa berjalan normal (Isnaini, 2011).

Integritas membran plasma merupakan prasyarat bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Jika membran plasma sudah terganggu atau rusak maka akan mengakibatkan kondisi anisosmotik yang menjadi penyebab terjadinya kebocoran intraseluler diantaranya akan memengaruhi perombakan ATP sehingga memengaruhi motilitas spermatozoa (Bohlooli *et al.*, 2012). Keutuhan membran plasma spermatozoa dapat rusak jika keberadaan zat yang bersifat toksik baik yang berasal dari spermatozoa yang telah mati maupun yang berasal dari zat yang terkandung dari pengencer yang telah mengalami oksidasi akibat penyimpanan dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas. Jika membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa mulai kehilangan motilitasnya dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi karena lepasnya komponen seluler dan inaktivasi protein-protein enzim penting di dalam akrosom. Kejadian ini mengakibatkan kematian spermatozoa yang berdampak pada penurunan viabilitas spermatozoa (Yulnawati dan Agus, 2005). Membran plasma sel yang masih utuh akan memengaruhi organel-organel di dalam sel. Hal ini menyebabkan spermatozoa dapat bergerak progresif dan tetap hidup (*viable*) sehingga mampu melakukan fertilisasi (Kaeoket *et al.*, 2011).

Berdasarkan studi yang telah dilaporkan oleh Kumaresan, *et al* (2012), penambahan cairan oviduk pada spermatozoa mengakibatkan peningkatan

fosforilasi protein tirosin kinase pada membran plasma spermatozoa secara signifikan. Fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapasitasi spermatozoa melalui mekanisme peningkatan influks kalsium yang akan mengaktifkan enzim adenilat siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan cAMP yang akan mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang berpengaruh pada peningkatan tirosin kinase, selanjutnya tirosin kinase akan mengalami fosforilasi. Fosforilasi tirosin kinase yang meningkat akan menyebabkan hiperaktivasi dan kapasitasi spermatozoa.





## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Terdapat ekspresi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada testis yaitu pada bagian sel spermatogonium, sel spermatosit, dan sel leydig yang diduga memiliki peran dalam proses spermatogenesis.
2. Suplementasi *Oviduct Specific Glycoprotein* (OVGP) pada pengencer semen kambing dengan dosis 5  $\mu\text{g/mL}$  dan 10  $\mu\text{g/mL}$  dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa secara signifikan dibanding dengan tanpa penambahan OVGP.

### 6.2 Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui efek serta dosis yang optimal dari suplementasi OVGP pada semen kambing dengan dosis pemberian OVGP yang lebih tinggi dari 10  $\mu\text{g/mL}$  dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi dari OVGP pada testis.



## DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, A.S. 2001. *Kaji Banding Kualitas dan Keutuhan Membran Plasma Semen Beku Sapi Pada Setiap Tahap Jalur Distribusi*. Institut Pertanian Bogor.
- Albert, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walte. 2008. *Molecular Biology of the Cell. 7th ed. Garland Science. USA. 1269-1304.*
- Araki, Y. 2003. *Effect of A Null Mutation of the Oviduct-Specific Glycoprotein Gene on Mouse Fertilization*. *Biochem. J.* (2003) 374, 551–557 (Printed in Great Britain).
- Artika, I. N. D. 2014. *Penentuan Waktu Optimal pengujian integritas membran plasma spermatozoa babi dengan menggunakan hypo-osmotic swelling (HOS) test*. Institut Pertanian Bogor.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, and Manjunath P. 2004. *Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane*. *Biol Reprod.* 70:708–717.
- Bohlooli S, Cedden F, Bozoglu S, Razzaghzadeh S, and Pishjang J. 2012. *Correlation between conventional sperm assay parameters in cryopreserved Ram Semen*. *Ann Biol Res* 3: 884-889.
- Buhi, W.C. 2002. *Characterization and Biological Roles of Oviduct-specific, Oestrogen-dependent Glycoprotein*. *Reproduction* 123: 355-362.
- Ciptadi, G. 2012. *Bioteknologi Sel Gamet dan Kloning Hewan*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Coy P., and M. Aviles. 2010. *What Controls Polispermi in Mammals, the Oviduct or the Oocyte?*. *Biological Reviews* 85: 593–605.
- Coy, P. 2008. *Oviduct-Specific Glycoprotein and Heparin Modulate Sperm–Zona Pellucida Interaction During Fertilization and Contribute to the Control of Polyspermy*. Spain: Universidad de Murcia, Murcia 30071, PNAS.October 14, 2008.vol. 105.no. 41.15809 –15814.
- Ditjennak. 2010. *Pedoman Umum Program Swasembada Daging Sapi 2014*. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan Kementerian Pertanian.

- Djuwita, I. 2001. *Kajian Morfologis dan Fungsi Biologis Oosit Domba Setelah Kriopreservasi dengan Metode Vitrifikasi*. Bogor: Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Erikson, D.W. 2006. *Role of Osteopontin in Bovine Sperm Capacitation and Fertilization* [Thesis]. The Pennsylvania State University. Intercollege Graduate Program in Physiology.
- Fitriasari, A. 2009. *Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Imunositokimia*. Yogyakarta: CCRC UGM.
- Gardner, A.J., and J.P. Evans. 2006. *Mammalian Membrane Block to Polyspermy: New Insight Into How Mammalian Eggs Prevent Fertilisation by Multiple Sperm*. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 53-61.
- Gonçalves R. F. , Bertolla R. P. , Eder I. , Chapman D. A. Killian G. J. 2006. *EFFECT OF FROZEN SEMEN WITH OSTEOPONTIN ON IN VITRO BOVINE FERTILIZATION AND EMBRYO DEVELOPMENT*. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 263-264.
- Gramajo-Buhler, M. C. 2013. *Effect on Sperm quality of different cryoprotectants in sperm of chincilla ianigera*. Cambridge University.
- Guyton, A.C., and J.E. Hall. 2006. *Textbook of medical physiology*. 7<sup>th</sup> ed. Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania. 997-998.
- Hamny. 2014. *Sebaran Glycoconjugate pada Sel Epitel Oviduk Kancil (Tragulus javanicus)*. Aceh: Universitas Syah Kuala.
- Hardijanto., T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati dan T.W. Suprayogi. 2009. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Isnaini, N. 2011. *Viabilitas spermatozoa kambing boer pasca pendinginan dan pembekuan menggunakan pengencer dasar tris dengan level trehalosa yang berbeda*. *J. Ternak tropika* vol. 12 no. 1:27-37.
- Jeyendran, R. S. and L. J. Zanefeld. 1992. *The Hypoosmotic Swelling Test: An Update*. Hemisphere Publishing Corporation.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M, Kunavongkrit A. 2011. *A preliminary study on using autologous and heterologous boar sperm supernatant from freezing processes as post-thawing solution: its effect o sperm motility*. *Trop Anim Health Prod* 43: 1049–1055.



- Kan F. W., Ezperanzate P. W. 2006. *Surface Mapping of binding of oviductin to the plasma membrane golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction*. Mol Reprod Dev 73(6): 756-66.
- Kostaman, T. dan I.K. Utama. 2004. *Karakteristik Semen Kambing Peranakan Etawah dan Boer*. Balai Penelitian Ternak Bogor.
- Kouba, A. J. 2000. *Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development In Vitro*. by the Society for the Study of Reproduction. Biology of Reproduction 63, 242–250 (2000). Inc.ISSN: 0006-3363.
- Kumaresan A., Johannisson A., Saravia F., and A.S. Bergqvist. 2012. *The effect of oviductal fluid on protein tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa differs with the freezing method*. Theriogenology 77(3): 588-99.
- Laheri, S. 2017. *Extra-Oviductal expression of oviductal glycoprotein 1 in mouse: detection in testis, epididymis, and ovary*. India.
- Lechniak D., Kedziesski A., and D. Stainislawski. 2002. *The HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro*. Reprodomest. Animals 37 (6): 379-30.
- Madyawati S. P. 2008. *Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH) Terhadap Kualitas Semen Beku*. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Mafruchati M. 2000. *Korelasi antara membran Spermatozoa dan Motilitas Spermatozoa pada Semen Beku Domba setelah dicairkan (Post Thawing)*. Surabaya.
- McCauley, T.C., W.C. Buhi, G.M. Wu, J. Mao, J.N Caamano, B.A. Didion, and B.N. Day. 2003. *Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization In vitro*. Biology of Reproduction 69: 828–834.
- Muchlido, A. 2007. *Penampilan Reproduksi Kambing Peranakan Ettawa Ras Kaligesing*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Muchtaromah, B. 2012. *Isolasi dan Karakterisasi Protein 100kDa dari Membran Kepala Spermatozoa Kambing*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi. UIN. J.Exp. Life Sci. Vol. 2 No. 1, 2012. ISSN. 2087-2852.

- Petrunkina A.M., Waberski D, Gunzel-Apel A.R., Topfer-Peterson E. 2007. *Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Society for Reprod and Fertil.* 1470-1626.
- Pratiwi, H., Aulia F., Herawati, dan Nurul I. 2017. *ISOLATION AND PROFILLING OVIDUCT SPECIFIC GLYCOPROTEIN IN OVIDUCTAL FLUID OF GOAT KACANG (Capra aegagrus hircus).* Malang: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Rasul, Z., N. Ahmad, dan M. Nazar. 2001. *Changes in motion characteristic. Plasma membran integrity and acrosom morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa.* J. Biol. Reprod. 65:217-224.
- Riwantoro. 2010. *Teknologi pakan lengkap solusi bagi permasalahan pakan ternak Domba dan kambing.* Word Press.
- Saenz, J.R. 2003. *Cryopreservation of White-Tail Deer Epididymal Sperm for Artificial Insemination* [Thesis]. Louisiana State University. Program of Animal and Dairy Sciences.
- Setiadi, B., I. Ketut Utama, P. Situmorang, Supriyati, U. Adiati, I.G.M. Budiarsana, T. Kostaman, Maulana, dan Mulyawan. 2000. *Evaluasi Karakteristik Semen Kambing Calon Bibit.* Laporan Bagian Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan ARMP-II: 74-87. Balai Penelitian Ternak Bogor.
- Setiadi, B. 2002. *Beternak Sapi Perah dan Masalahnya.* Aneka Ilmu: Semarang.
- Septiyani, R. 2012. *Hubungan antara Viabilitas, Motilitas, dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Semen Beku Sapi Limousin.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sukmawati, E. 2014. *Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Pejantan Unggul.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Unni, S. K., Modi D. N., Pathak S. G., Dhabalia J. V., and Bhartiya D. 2009. *Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis.* Cytochem.
- Utomo, B. N. dan W. Ernim. 2012. *Integrasi ternak sapi bali dengan perkebunan kelapa sawit: 1. Introduksi teknologi inseminasi buatan dan sinkronisasi estrus untuk meningkatkan reproduktivitas ternak.* Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner: 224-230.

- Vazquez JM, Martinez EA, and Martinez P. 1997. *Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane*. Theriogenology 47: 913-922
- Wahjuningsih, S., dan M. S. Djati. 2008<sup>a</sup>. *Kajian Pemanfaatan Goat Follicular Fluid (GFF) dalam Medium Maturasi Oosit in Vitro terhadap Ekspansi Sel Kumulus dan Tingkat Metafase II*. Malang: Laporan Hasil Penelitian Fundamental. Universitas Brawijaya.
- Wahjuningsih, S., dan M.S. Djati. 2013<sup>b</sup>. *Ultrastruktur Oosit Kambing Pasca Kriopreservasi dengan Metode Vitrifikasi*. Malang: Universitas Brawijaya. Jurnal Kedokteran Hewan. ISSN : 1978-225X.
- Wattimena, J. dan Veerman, M. 2005. *Pengaruh Serum Domba dan Serum Domba Estrus terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Domba in Vitro*. JITV 10(1): 12-16.
- Winata, I.G.S. 2013. *Eksresi Protein 53 (p53) Tidak Berhubungan dengan Stadium Kanker Ovarium*. Denpasar: Program Pascasarjana. Universitas Udayana.
- Yulnawati dan Agus SM. 2005. *Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C*. Media Kedokteran Hewan 21 (3): 100 – 104.
- Zhao, Y., Yang X., Jia Z., Reid R. L., Leclere P., and Kan F. W. K. 2016. *Recombinant human oviductin regulates protein tyrosine phosphorylation and 2 acrosome reaction*. Reproduction.