

KEMAMPUAN ANTI *MAYOR PHYSIOLOGICAL PROTEIN SUBSTRAT ECTO CYCLIC AMP INDEPENDENT SERIN/THEONIN PROTEIN KINASE (MPS ecto-CIK)* DALAM MENGHAMBAT VIABILITAS SPERMATOZOA KAMBING DAN SAPI

The Ability of Major Physiological Protein Substrat ecto Cyclic AMP Independent Serin/Theonin Protein Kinase (MPS ecto-CIK) in Inhibiting the Viability of Goat and Cattle Sperm

Bayyinatul Muchtaromah¹ dan Sutiman B. Sumitro²

¹Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang

²Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: bayyin_uin@ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh dosis dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK dalam menghambat viabilitas spermatozoa kambing dan sapi. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor yakni dosis pengenceran (0, 5, 10, dan 15 μ l) dan lama inkubasi (5, 30, 60, dan 120 menit) masing-masing 6 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian dua arah, yang dilanjutkan dengan uji jarak Duncan dengan taraf signifikansi 5%. Pemberian anti MPS ecto-CIK membran spermatozoa kambing dengan konsentrasi 0, 5, 10, dan 15 μ l dan lama inkubasi 5, 30, 60, dan 120 menit berpengaruh signifikan terhadap viabilitas spermatozoa kambing dan sapi ($P < 0,05$). Perlakuan anti MPS ecto-CIK pada dosis 15 μ l dan lama inkubasi 120 menit terhadap spermatozoa kambing dan sapi merupakan perlakuan yang paling optimal dalam menghambat viabilitas spermatozoa kambing (45,50 \pm 11,16 dan 44,87 \pm 9,40%) dan sapi (39,08 \pm 14,40 dan 36,67 \pm 11,93%).

Kata kunci: Anti MPS ecto-CIK, viabilitas, spermatozoa

ABSTRACT

The aims of this study was to determine how far a role anti-MPS ecto-CIK in inhibiting the viability of goats and cows sperm. The design of this research was completely randomized design (CRD) with factorial pattern consisting of 2 main factors, dose dilution (0, 5, 10, dan 15 μ l) and time of incubation (5, 30, 60, dan 120 minutes), 6 repetition each. Data were analyzed using two ways analysis of variance and followed by Duncan's multiple Range Test with significance level of 5%. Provision of anti-MPS ecto-CIK treatment from goat sperm membrane with concentration 0, 5, 10, dan 15 μ l and incubation time of 5, 30, 60, dan 120 minutes had significant effect on sperm viability of goat and cow ($P < 0.05$). On anti-MPS ECTO-CIK treatment with 15 μ l and incubation time of 120 minutes against spermatozoa goats and cows of the most optimal treatment in inhibiting the viability of goat spermatozoa (45.50 \pm 11.16 and 44.87 \pm 9.40%) and cow spermatozoa (39.08 \pm 14.40 and 36.67 \pm 11.93%).

Keywords: anti MPS ecto-CIK, viability, spermatozoa

PENDAHULUAN

Program keluarga berencana adalah program untuk merencanakan dan mengatur jarak kelahiran sehingga diharapkan anak akan mendapatkan hak akan kebutuhan gizi, perhatian maupun pendidikan yang baik. Perencanaan keluarga dalam hubungannya dengan program kesehatan reproduksi dalam jangka panjang membutuhkan ketersediaan metode yang dapat mengatur jarak kelahiran dengan aman, efektif, dan lebih ekonomis yaitu vaksin kontrasepsi (Griffin, 1991).

Gamet jantan dan betina masing-masing mempunyai protein pada permukaannya yang bersifat unik, *cell specific*, imunogenik, dan

berhubungan dengan antibodi. Interaksi imunologis dengan molekul tertentu dapat menyebabkan blokade pada penetrasi spermatozoa sehingga mengakibatkan kegagalan fertilisasi (Goldberg, 1990). Alat kontrasepsi memiliki peranan dalam mencegah terjadinya fertilisasi. Fertilisasi adalah serangkaian proses yang dimulai dari peristiwa penetrasi spermatozoa ke dalam sitoplasma oosit sampai terjadinya fusi dari pronukleus jantan dan betina (Yanagimachi, 1994).

Pada bagian luar spermatozoa terdapat membran sel yang menyelaputi kepala sampai ekor. Membran tersebut memiliki susunan sangat kompleks baik komposisi molekuler maupun secara fungsional. Membran pada

bagian kepala spermatozoa memegang peranan pada saat kapasitasi, reaksi akrosom, dan penetrasi zona pelusida ovum saat fertilisasi, sedangkan membran bagian ekor berfungsi untuk mendapatkan substrat energi akibat adanya proses fosforilasi membran protein spermatozoa oleh mitokondria sehingga dihasilkan ATP dan digunakan untuk energi dalam pergerakan spermatozoa (Grudzinskas dan Yovich, 1995).

Pengenalan antara spermatozoa-ovum (*sperm-egg recognition*) melibatkan perlekatan membran spermatozoa terutama dari bagian kepala dengan permukaan luar zona pelusida ovum. Membran spermatozoa terdiri dari dua lapisan fosfolipid yang susunannya adalah kepala lapisan fosfolipid hidrofilik membentuk permukaan membran bagian luar, sedangkan permukaan membran bagian dalam berupa lapisan fosfolipid yang bersifat hidrofobik. Di antara lapisan tersebut terdapat protein globular dan protein fibrous dengan distribusi yang bervariasi mulai dari permukaan membran sampai menembus membran sebagai jembatan (Darnel *et al.*, 1990).

Dey dan Majumder (1990) menemukan letak ecto-CIK pada permukaan luar spermatozoa kambing yang menyebabkan fosforilasi beberapa protein. Penelitian berikutnya oleh Nath (1997) menemukan bahwa ecto-CIK secara fungsional penting bagi fisiologi spermatozoa, yaitu berperan terhadap regulasi motilitas dan reaksi akrosom tetapi tidak berperan terhadap *inisiasi* motilitas. Selain itu, ecto-CIK ini juga berperan dalam regulasi dan pemeliharaan velositas (kecepatan) yang penting bagi gerakan progresif spermatozoa. Antibodi MPS ecto-CIK juga diketahui menghambat reaksi akrosom dan rilis dari enzim acrosin.

Maiti *et al.* (2004) untuk pertama kalinya berhasil melakukan purifikasi dan karakterisasi *major physiological protein substrat dari ecto-CIK* (MPS ecto-CIK) dari membran plasma spermatozoa di kauda epididimis kambing. Protein MPS ecto-CIK adalah monomer dengan berat molekul 100 kDa yang mempunyai bentuk sama pada titik isoelektrik (pI) yang berbeda yaitu 6,37; 6,05; dan 5,14. Protein MPS ecto-CIK terbukti merupakan substrat dari ecto-CIK karena mengalami fosforilasi oleh ecto-CIK spermatozoa utuh serta bertindak sebagai substrat ecto-CIK yang potensial karena mempunyai afinitas 30 kali lebih tinggi dibanding substrat protein yang lain.

Proses fosforilasi dari protein membran spermatozoa merupakan aspek penting dalam hubungannya dengan kapasitasi spermatozoa, hiperaktivasi motilitas, zona pelusida binding serta reaksi akrosom. Penelitian ekstensif telah dilakukan untuk mengetahui beberapa hal yang terlibat dalam proses fosforilasi protein membran spermatozoa selama kapasitasi. Tiga hal yang terlibat di dalamnya yaitu siklik adenosin monophosphat (cAMP) atau protein kinase A (PKA), reseptor tirosin kinase, dan non reseptor tirosin kinase (Naz dan Preeti, 2004).

Untuk menuju suatu penemuan tentang vaksin kontrasepsi bagi pria, diperlukan penelitian-penelitian dasar mengenai hal tersebut. Sebagai langkah awal penelitian ini, akan dilakukan uji hambatan anti MPS ecto-CIK terhadap viabilitas spermatozoa kambing dan sapi. Dari penelitian pendahuluan diketahui bahwa anti MPS ecto-CIK ini mampu bereaksi silang dengan spermatozoa sapi. Artinya anti MPS ecto-CIK berpeluang untuk digunakan dalam menghambat viabilitas spermatozoa mamalia lain sehingga pertemuan spermatozoa-sel telur menurun atau akan terjadi hambatan fertilisasi. Atas dasar penelitian yang telah dilakukan perlu diketahui peranan anti MPS ecto-CIK dengan pemberian suatu perlakuan konsentrasi dan lama inkubasi tertentu dalam menghambat viabilitas spermatozoa kambing dan sapi secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor yakni dosis pengenceran (0, 5, 10, dan 15 μ l) dan lama inkubasi (5, 30, 60, dan 120 menit), masing-masing 6 kali ulangan.

Prosedur Kerja

Isolasi anti MPS ecto-CIK

Isolasi protein membran spermatozoa kambing dilakukan dengan metode modifikasi dari Jayendran *et al.* (1984), Hinsch *et al.* (1999), dan Gatti *et al.* (2000). Selanjutnya, dilakukan elektroforesis SDS-PAGE dan elektroelusi dari protein MPS ecto-CIK dengan berat molekul 100 kDa. Setelah itu dilakukan koleksi protein MPS ecto-CIK yang kemudian disuntikkan pada kelinci untuk imunisasi. Pemanenan antibodi anti MPS ecto-CIK dilakukan sesuai jadwal dan selanjutnya dilakukan pengujian viabilitas.

Penampungan semen

Vagina buatan disiapkan pada suhu 36 °C. Pejantan disiapkan dengan mendekati pada pemancing. Penampungan semen dilakukan setelah *false mounting* 3-5 kali. Uji kualitas semen segar secara mikroskopis dan makroskopis di laboratorium sesuai dengan standar Balai Inseminasi Buatan Singosari.

Perlakuan pemberian anti MPS ecto-CIK

Semen kambing dan sapi diencerkan 2 kali dengan PBS dan dibagi dalam 4 eppendorf tip masing-masing 80 µl semen (P1+ 0 µl anti MPS ecto-CIK, P2+5 µl anti MPS ecto-CIK, P3+10 µl anti MPS ecto-CIK, P4+15 µl anti MPS ecto-CIK). Masing-masing tip dibagi menjadi 4 bagian dan masing-masing bagian diinkubasi 5, 30, 60, dan 120 menit.

Pengamatan prosentase viabilitas spermatozoa

Seluruh spermatozoa pada preparat apusan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Sampel yang diambil dari viabilitas spermatozoa adalah 5 lapangan pandang yang diambil 100 ekor spermatozoa hidup dan mati. Semua sampel yang diambil menggunakan sistem *sample random sampling*. Persentase viabilitas spermatozoa merupakan jumlah persentase spermatozoa hidup dan mati dari jumlah total tiap lapangan pandang per 100 spermatozoa yang diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali.

Analisis Data

Data yang diperoleh melalui hasil pengamatan ditabulasi dan dianalisis secara statistik dengan Uji ANOVA dua jalur, jika hasil dari analisis tersebut terdapat pengaruh yang nyata maka akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan dengan taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa Kambing dan Sapi pada Semen Segar

Hasil pemeriksaan semen segar kambing dan sapi yang meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, dan konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semen segar yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam kisaran normal. Volume semen kambing per ejakulasi pada penelitian ini didapatkan 0,65±0,21 cc sedangkan menurut Toelihere (1985) semen kambing di daerah tropis berkisar 0,5-1,0 atau 0,3-1,5 cc (Garner dan Hafez, 2000). Volume semen sapi per ejakulasi yang diperoleh berkisar antara 7,8±1,53 cc. Hal ini sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) dan Toelihere (1993) yang mendapatkan volume semen sapi bervariasi antara 5-8 dan 1-12 cc per ejakulasi.

Motilitas individu semen kambing yang diperoleh 68,75±8,50%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Garner dan Hafez, (2000) bahwa motilitas semen kambing berkisar 60-80% per ejakulasi dan motilitas individu semen sapi berkisar 73,75±18,86%. Menurut Toelihere (1985) dan Garner dan Hafez (2000) bahwa motilitas semen sapi berkisar antara 50-75%. Warna semen kambing pada umumnya krem keputihan (Evans dan Maxwell, 1987) atau bervariasi sampai krem kekuningan karena banyak mengandung riboflavin dari sekresi kelenjar vesikula (Partodihardjo, 1992). Konsentrasi spermatozoa kambing yang diperoleh sebesar 2495,50±331,17 (10⁶/ml). Konsentrasi tersebut masih dalam kisaran normal sesuai dengan pendapat Davendra dan Burns (1994) bahwa konsentrasi semen segar kambing per ejakulat sebesar 1,8-4 (10⁹/ml) dan konsentrasi spermatozoa sapi sebesar 1213,50±178,65 (10⁶/ml). Konsentrasi ini masih dalam kisaran normal yakni antara 800-2000 (10⁶/ml) (Garner dan Hafez, 2000).

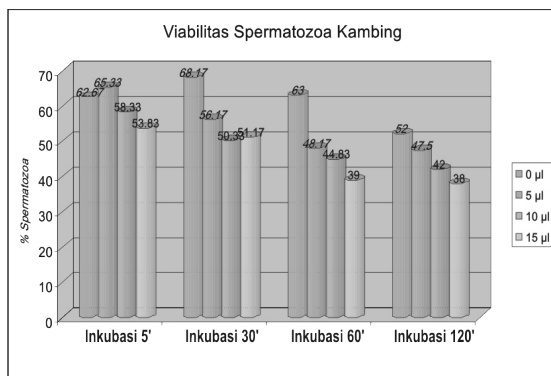
Tabel 1. Hasil pemeriksaan semen segar kambing dan sapi

Parameter	Kambing (±SD)	Sapi (±SD)
Volume (ml)	0,65±0,21	7,8±1,53
Motilitas Individu (%)	68,75±8,50	73,75±18,86
Motilitas massa	2+	2+
Viabilitas	61,46±11,01	63,63±15,51
Warna	krem	putih susu
Viskositas	kental	sedang
Konsentrasi (× 10	2495,50±331,17	1213,50±178,65

Perlakuan Anti MPS ecto-CIK terhadap Viabilitas Spermatozoa Kambing.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian perlakuan anti MPS dengan konsentrasi 0, 5, 10, dan 15 µl dan lama inkubasi 5, 30, 60, dan 120 menghambat viabilitas spermatozoa kambing dengan hasil yang signifikan ($P < 0,05$) sedangkan interaksi antara pemberian konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK terhadap spermatozoa kambing menunjukkan hasil yang tidak signifikan ($P > 0,05$).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa semakin besar pemberian konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK terhadap spermatozoa kambing, maka semakin besar daya hambat viabilitas spermatozoanya. Artinya dengan semakin tinggi konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK maka persentase hidup spermatozoa kambing semakin rendah. Perlakuan konsentrasi 15 µl ($45,50 \pm 11,16\%$) dan lama inkubasi 120 menit ($44,87 \pm 9,40\%$) menghasilkan hambatan yang paling signifikan. Berikut disajikan grafik hasil presentase viabilitas spermatozoa kambing setelah pemberian perlakuan anti MPS ecto-CIK.



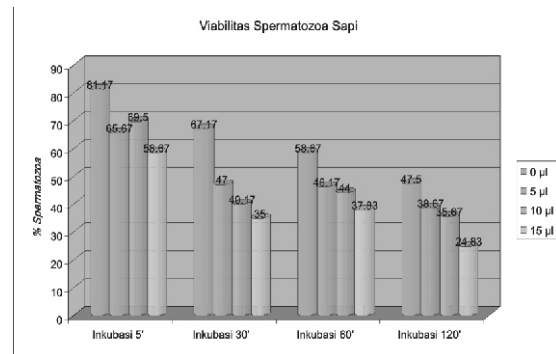
Gambar 1. Grafik hasil persentase viabilitas spermatozoa kambing setelah pemberian perlakuan anti MPS ecto-CIK

Perlakuan Anti MPS ecto-CIK terhadap Viabilitas Spermatozoa Sapi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian perlakuan anti MPS ecto-CIK dengan konsentrasi 0, 5, 10, dan 15 µl dan lama inkubasi 5, 30, 60, dan 120 menghambat viabilitas spermatozoa sapi dengan hasil yang signifikan ($P < 0,05$) sedangkan interaksi antara pemberian konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK terhadap spermatozoa sapi menunjukkan hasil yang tidak signifikan ($P > 0,05$).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa semakin besar pemberian konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK terhadap

spermatozoa sapi semakin besar pula daya hambat yang diberikan terhadap viabilitas spermatozoanya. Hal ini berarti, semakin tinggi konsentrasi dan lama inkubasi anti MPS ecto-CIK maka semakin rendah persentase hidup spermatozoa. Perlakuan konsentrasi 15 µl dengan nilai rata-rata 39,08% dan lama inkubasi 120 menit dengan nilai rata-rata 36,67% menghasilkan hambatan viabilitas spermatozoa tertinggi. Gambaran presentase viabilitas spermatozoa sapi setelah pemberian perlakuan anti MPS ecto-CIK disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik hasil persentase viabilitas spermatozoa sapi setelah pemberian perlakuan anti MPS ecto-CIK

Pengaruh pemberian anti MPS ecto-CIK terhadap menurunnya viabilitas juga diduga dipengaruhi oleh proses kapasitasi spermatozoa mulai dari epididimis hingga sperma diejakulasikan. Semen kambing memiliki volume lebih sedikit dibanding dengan semen sapi pasca penampungan, hiperaktivasi spermatozoa kambing sebagai tahap awal menuju kapasitasi lebih dini dibanding dengan spermatozoa sapi (Susilawati, 2005), sehingga perlakuan pemberian anti MPS ecto-CIK terhadap spermatozoa kambing akan lebih cepat menurunkan viabilitas dibanding dengan spermatozoa sapi.

Laporan hasil penelitian pada beberapa spesies, seminal plasma kemungkinan berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa. Hasil ini umumnya didasarkan atas observasi bahwa spermatozoa mati jika konsentrasi seminal plasma turun oleh dilusi atau pencucian. Seminal plasma juga dilaporkan sangat penting untuk pemeliharaan motilitas spermatozoa sapi dan peningkatan viabilitas spermatozoa domba (Visconti *et al.*, 1998).

Protein seminal plasma merupakan suatu sekresi kompleks yang bersumber sebagian besar dari kelenjar asesoris dan sedikit epididimis. Protein dari seminal plasma diikat

ke permukaan membran spermatozoa selama ejakulasi, dan selanjutnya diatur kembali selama tahapan fertilisasi. Ikatan protein seminal plasma pada permukaan membran spermatozoa kemungkinan berperan dalam depositnya di oviduct, kapasitas spermatozoa, pengenalan oosit dan ikatan spermatozoa terhadap oosit (Harrison dan Miller, 1996).

Menurut Istanti dan Triastono (1999) persentase hidup mati spermatozoa dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu tingkat permeabilitas membran dan proses menuju kapasitas dan reaksi akrosom. Spermatozoa yang sudah tua akan mengalami pengurangan permeabilitas pada membrannya, hal ini diakibatkan adanya denaturasi yaitu perubahan struktur protein membran sehingga transpor aktif dan transpor pasif melalui membran spermatozoa tidak terjadi secara terpadu, akibatnya semua materi yang ada di luar membran masuk memenuhi intra sel sehingga sel akan mati.

Proses penting yang terjadi pada spermatozoa adalah kapasitas dan reaksi akrosom. Keduanya berlangsung secara berurutan mulai dari terjadinya kapasitas yang ditandai dengan perubahan *adenylate cyclase*, metabolisme, serta ion-ion intraseluler yang menyebabkan hilangnya kendali penjagaan gradien ion Na^+/K^+ di sepanjang membran plasma spermatozoa sehingga terjadi arus masuk besar-besaran dari Ca^{++} ekstraseluler melalui membran kepala spermatozoa yang menyulut terjadinya reaksi akrosom. Pada spermatozoa yang hampir mati atau mati, ion-ion intraseluler akan mengalir keluar dan ion-ion eksternal sel berpenetrasi dengan bebas ke dalam sel. Hal ini disebabkan oleh non aktifnya ATP-ase sehingga akrosin dan enzim-enzim akrosomal lainnya akan menyerang membran spermatozoa yang mengakibatkan hilangnya sebagian atau seluruh pembungkus akrosom (Naz dan Preeti, 2004).

KESIMPULAN

Pemberian anti MPS dari ecto-CIK konsentrasi 15 μl merupakan perlakuan yang paling optimal dalam menghambat viabilitas spermatozoa sedangkan lama inkubasi 120 menit merupakan perlakuan yang paling optimal dalam menghambat viabilitas spermatozoa kambing dan sapi. Interaksi konsentrasi dan lama inkubasi tidak menghambat viabilitas spermatozoa kambing dan sapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Darnell, J., H. Lodish, and H. Baltimore. 1990. **Molecular Cell Biology**. 2nd ed. Sci. Am. Books.
- Davendra, C. dan M. Burns. 1994. **Produksi Kambing di Daerah Tropis**. Penerbit ITB, Bandung.
- Dey, C.S. and G.C. Majumder. 1990. Type I and II cAMP dependent ecto protein kinases in goat epididymal spermatozoa and their enriched activities in forward motile spermatozoa. **Biochem. Cell Biol.** 68:459-470.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In **Reproduction in Farm Animal**. 7th ed., E.S.E. Hafez (ed). Lea and Febiger Publishing, Philadelphia.
- Gatti, J.L., X. Druat, P. Syntin, Y. Guerin, J.L. Dacheux, and F. Dacheux. 2000. Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoprotein. **Biology of Reproduction**. 62:950-958.
- Goldberg, E. 1990. **Gamete Interaction. Prospects for Immunocontraception**. P.D. Alexander, J.M. Griffin, and G.M.H. Waites (eds). Wiley-Liss, New York.
- Griffin, P.D. 2003. **Contraceptive Vaccines**. Special Programme of Research. Development and Research Training in Human Reproduction. WHO.1211 Geneva, Switzerland.
- Grudzinskas, J.G. and J.L. Yovich. 1995. **Gametes the Spermatozoon**. Cambridge University Press.
- Harrison, R.A.P. and N.G.A. Miller. 1996. CAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. **Mol. Reprod. Dev.** 55:220-228.
- Hinsch, E., S. Oehringer, W.B. Schill, and K.D. Hinsch. 1999. Specificity of human and murin anti ZP3 synthetic peptide antisera and use of antibodies for localization and identification of ZP3 or ZPC domains of functional significance. **Hum. Reprod. Feb.** 14(2):419-28.
- Istanti, A. dan Triastono. 1999. **Biologi Sel**. Universitas Negeri Malang. Fakultas Matematika dan IPA Jurusan Biologi. Malang.
- Jayendran, R.S., H.H. Van der van, and M. Perz-Pelaez. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** 70:219-228.

- Maiti, A., K.P. Mishra, and G.C. Majumder. 2004. **Identification of Goat Sperm Ecto-Cyclic AMP Independent Protein Kinase Substrate Localized on Sperm Outer Surface**. Department of Atomic Energy, Bhabha Atomic Research Centre. Mumbai. India.
- Nath, D. 1997. Characterisation of a Cyclic AMP-Independent Protein Kinase of Sperm Plasma Membrane and Its Role in Sperm Biology. **Thesis**. Javadpur University.
- Naz, R.K. and Preeti, B.R. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation /acrosome erection. **Reprod. Biol. Endo.** 2:1-12.
- Partodihardjo, S. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Mutiara Sumber Widya, Jakarta.
- Susilawati, T. 2005. **Fisiologi Spermatozoa: Kapasitas, Reaksi Akrosom dan Fertilisasi**. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya, Malang.
- Toelihere, M.R. 1985. **Fisiologi Reproduksi pada Ternak**. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M.R. 1993. **Analisis Kualitas Semen pada Ternak**. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Visconti, P.E., H. Calantino, G.D. Horner, J.L. Moore, J.L. Bailey, X. Ning, M. Fornes, and S.K. Gregory. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. **J.Androl.** 19: 242-248.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. In **The Physiology Of Reproduction**. Knobil, E. and J.D. Neill (eds). Raven Press Ltd, New York.