

STUDI HISTOKIMIA LEKTIN PADA SEL-SEL SPERMATOGENIK TESTIS MUNCAK (*Muntiacus muntjak muntjak*)

*Lectin Histochemical Study of Testicular Spermatogenic Cells in Muntjak (*Muntiacus muntjak muntjak*)*

Sri Wahyuni¹, Srihadi Agungpriyono², I. Ketut Mudite Adnyane², Hamny¹, Muhammad Jalaluddin¹, Gholib³, Muslim Akmal⁴, Mulyadi Adam³, Dwinna Aliza⁵, dan Tongku Nizwan Siregar⁶

¹Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁶Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: sriwahyuni@unsyiah.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi tipe glikokonjugat spesifik dan distribusinya pada sel-sel spermatogenik testis muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) secara histokimia lektin. Organ testis dikoleksi dari satu ekor muncak jantan dewasa berumur 4-5 tahun yang berada pada tahap ranggah keras yang selanjutnya difiksasi menggunakan larutan Bouin dan diproses hingga menjadi preparat histologis. Metode histokimia lektin diaplikasikan untuk mengetahui sebaran glikokonjugat dengan menggunakan enam tipe lektin *biotinylated*, yaitu: *peanut agglutinin* (PNA), *soybean agglutinin* (SBA), *wheat germ agglutinin* (WGA), *ricinus communis agglutinin* (RCA), *concanavalin A* (Con A), dan *ulex europaeus agglutinin I* (UEA I) dengan konsentrasi 20 µg/ml untuk lektin PNA dan 15 µg/ml untuk tipe lektin lainnya. Hasil penelitian menunjukkan keberadaan glikokonjugat terdeteksi dengan seluruh lektin kecuali lektin UEA I pada sel-sel spermatogenik testis terutama pada sel-sel spermatid dengan pola sebaran dan intensitas ikatan lektin yang bervariasi. Jenis residu gula yang ditemukan pada sel spermatid fase golgi-*cap* dan akrosom adalah β-galaktosa, β-glukosa, manosa, N-asetilgalaktosamin, N-asetilglukosamin, dan asam sialat. Residu gula terbanyak adalah N-asetilgalaktosamin yang terdeteksi positif dengan lektin PNA, SBA, dan RCA. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa glikokonjugat dapat dideteksi pada sel-sel spermatid testis muncak yang mengindikasikan pentingnya keberadaan glikokonjugat dalam spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis.

Kata kunci: glikokonjugat, lektin, sel spermatid, spermatozoa, muncak

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the type of specific glycoconjugates and its distribution in testicular spermatogenic cells in muntjak (*Muntiacus muntjak muntjak*) based on lectins histochemistry. An adult male muntjak aged 4-5 years old in hard antler period was used in this study. Testicular tissue was fixed in Bouin solution and processed histologically. Histochemistry method was performed using six types biotinylated lectins such as peanut agglutinin (PNA), soybean agglutinin (SBA), wheat germ agglutinin (WGA), ricinus communis agglutinin (RCA), concanavalin A (Con A), and ulex europaeus agglutinin I (UEA I) with 20 µg/ml of concentration for PNA lectins and 15µg/ml for other type of lectins. The results showed that glycoconjugates were detected by all type of lectins except UEA I in testicular spermatogenic cells with variation in distribution pattern and also the intensity of lectins binding. Glycoconjugates β-galactose, β-glucose, mannose, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine and sialic acid were stained intensely by lectins in golgi-*cap* phase and acrosomal phase of spermatids. Glycoconjugate N-acetylgalactosamine was the sugar residues which distributed abundantly that marked by positive reaction with PNA, SBA, and RCA lectins. In conclusion, glycoconjugates are detected in testicular spermatids cells of muntjak indicated that glycoconjugates have an important role in spermatogenesis particularly in spermiogenesis.

Key words: glycoconjugates, lectins, spermatid, spermatozoa, muntjak

PENDAHULUAN

Muncak merupakan satwa jenis rusa (Cervidae) yang dikenal dengan sebutan kijang. Di Indonesia, muncak terdiri atas beberapa subspecies, yaitu: *M. m. muntjak* (Pulau Jawa), *M. m. montanus* (Pulau Sumatera), *M. m. nainggolani* (Pulau Bali dan Lombok), *M. m. pleicharicus* (Pulau Kalimantan), dan *M. m. robinsoni* (Pulau Bintan dan Kepulauan Linga) (Maryanto *et al.*, 2008). Seluruh subspecies muncak tersebut telah dilindungi pemerintah sejak tahun 1999. Status perlindungan tersebut dimuat dalam Daftar Lampiran Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 1999 (PHKA, 2004).

Informasi mengenai aspek biologi reproduksi muncak jantan diperlukan untuk mendukung upaya pengembangbiakan satwa tersebut di Indonesia.

Beberapa aspek biologi reproduksi muncak jantan dari subspecies *Muntiacus muntjak muntjak* telah dilaporkan oleh Wahyuni *et al.* (2011), Wahyuni *et al.* (2012a), Wahyuni *et al.* (2012b), dan Wahyuni *et al.* (2013). Namun demikian, kajian histokimia lektin untuk mengetahui peran glikokonjugat pada proses fisiologis spermatogenesis untuk menghasilkan spermatozoa pada tubuli seminiferi testis muncak belum pernah dilaporkan.

Glikokonjugat merupakan senyawa karbohidrat yang berikatan dengan protein dalam bentuk proteoglikan dan glikoprotein serta yang berikatan dengan lemak yang disebut glikolipid. Senyawa-senyawa tersebut terdistribusi di dalam jaringan tubuh, terutama ditemukan di permukaan sel dan sitoplasma serta di matriks ekstrasel (Kiernan, 1990). Glikokonjugat berperan penting pada proses

diferensiasi dan maturasi sel (Damjanov, 1987), pengenalan dan adhesi terhadap sel (Sharon dan Lis, 1989), serta interaksi antar sel (Wassarman, 1989). Distribusi glikokonjugat pada jaringan tubuh hewan telah diteliti secara luas dengan menggunakan metode histokimia lektin. Lektin telah dikenal sebagai suatu protein yang memiliki afinitas spesifik terhadap residu gula dari karbohidrat (Kiernan, 1990).

Beberapa penelitian tentang distribusi glikokonjugat pada jaringan testis hewan ternak telah diaplikasikan untuk mengetahui keterlibatan senyawa tersebut pada proses fisiologis spermatogenesis dan urutan proses glikosilasi perkembangan akrosom spermatozoa (Arya dan Vanha-Perttula, 1985; Kurohmaru *et al.* 1991). Aplikasi yang sama juga dilakukan pada rodensia laboratorium (Söderström *et al.*, 1987), testis manusia (Arenas *et al.*, 1998), babi (Calvo *et al.*, 2000), dan babi rusa (Agungpriyono *et al.*, 2007). Dari data yang diperoleh pada penelitian terdahulu, ditemukan adanya modifikasi yang luas pada saat pembentukan spermatozoa yang diekspresikan oleh perbedaan pola ikatan antara glikokonjugat dan lektin. Namun demikian, penelitian untuk mendapatkan data tentang karakter, sebaran dan pola ikatan antara glikokonjugat dan lektin pada jaringan testis muncak belum dilaporkan.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan seekor muncak jantan dewasa yang telah menjalani siklus ranggah (ranggah keras, tanpa ranggah atau *casting*, dan ranggah lunak atau *velvet*). Muncak jantan sebagai obyek penelitian berada pada tahap ranggah keras, berumur antara 4-5 tahun dengan berat badan 19 kg. Muncak tersebut secara klinis dinyatakan sehat dan telah memperlihatkan aktivitas reproduksi. Muncak diperoleh dari Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah, dengan izin tangkap berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kehutanan Republik Indonesia Nomor: SK. 23/Menhut-II/2011.

Pembuatan Preparat Histologis Testis

Testis muncak diperoleh setelah muncak dilakukan *exanguinasi*. Sebelum prosedur *exanguinasi*, muncak terlebih dahulu dianestesi dengan xylazin HCl dan ketamin HCl dengan dosis masing-masing 1 mg/kg bobot badan. Prosedur *exanguinasi* dilakukan dengan cara mengeluarkan darah dari arteri *Carotis communis* dan diperfusi dengan mengalirkan larutan paraformaldehid 4% melalui arteri tersebut setelah

darah keluar secara sempurna. Pengambilan testis dilakukan secara laparotomi medianus. Setelah dilakukan *preparir*, testis difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam. Jaringan testis dipotong menjadi bagian kecil berukuran 0,5 x 0,5 cm dan selanjutnya didehidrasi dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%, dan absolut). Tahap berikutnya adalah perendaman jaringan dalam larutan silol, infiltrasi dalam parafin cair dan penanaman jaringan (*embedding*) dalam parafin. Proses dilanjutkan dengan pembuatan blok jaringan testis (*blocking*), dan penyayatan blok jaringan (*sectioning*) dengan ketebalan sayatan 4 µm. Hasil sayatan diletakkan di permukaan gelas obyek (*slide*) dan selanjutnya diwarnai dengan enam jenis lektin (Tabel 1).

Pewarnaan Histokimia Lektin

Pewarnaan histokimia lektin diawali dengan deparafinisasi sayatan jaringan sebanyak enam *slide* untuk diwarnai dengan enam jenis lektin *biotinylated* (PNA, SBA, WGA, RCA, Con A, dan UEA I) dan satu *slide* sebagai kontrol negatif. Jenis dan spesifisitas lektin ditampilkan pada Tabel 1. Seluruh *slide* diinkubasi dengan 0,3% H₂O₂ dalam 0,01 M *phosphate buffered saline* (PBS, pH 7,4) selama 10 menit dalam temperatur ruangan, diikuti proses inkubasi dengan 2% *normal goat serum* selama 30 menit. Selanjutnya *slide* jaringan testis diinkubasi dengan *biotinylated lectin* yang telah diencerkan dengan 0,01 M PBS (pH 7,4) selama 60 menit, sedangkan *slide* kontrol negatif (K-) hanya ditetesi PBS. Konsentrasi (dosis) lektin yang digunakan adalah 20 µg/ml untuk PNA, dan 15 µg/ml untuk jenis lektin lainnya (Tabel 1). Tahap berikutnya adalah pembilasan sayatan dengan PBS dan selanjutnya diinkubasi dengan kit *avidin biotin complex peroxidase/ABC* kit (Vector Lab.) selama 30 menit. Visualisasi hasil pewarnaan dilakukan dengan melakukan inkubasi *slide* jaringan menggunakan 3.3' *diaminobenzidine* yang telah dicampur dengan 0,05 M *tris buffer* HCl dan 0,003% H₂O₂ selama 5 menit. Hasil pewarnaan selanjutnya dilakukan *counterstain* (pewarnaan latar jaringan) dengan Meyer's hematoksilin dan dilanjutkan dengan proses rehidrasi *slide* jaringan dan perekatan (*mounting*) dengan Entelan®. Pengamatan terhadap hasil pewarnaan diamati dengan mikroskop cahaya, dan difoto dengan mikroskop yang dilengkapi kamera digital.

Reaksi positif adanya ikatan glikokonjugat dengan lektin pada permukaan jaringan testis divisualisasikan dengan terbentuknya warna coklat. Interpretasi kualitatif terhadap intensitas warna hasil ikatan lektin

Tabel 1. Jenis, spesifisitas ikatan lektin dengan residu gula, dan dosis lektin

Jenis Lektin	Singkatan	Spesifisitas	Dosis lektin(µg/ml)
<i>Peanut agglutinin</i>	PNA	GalNAc	20
<i>Soybean Agglutinin</i>	SBA	GalNAc	15
<i>Wheat germ agglutinin</i>	WGA	GlcNAc, asam sialat	15
<i>Ricinus communis Agglutinin</i>	RCA	Gal, GalNAc	15
<i>Concanavalin A</i>	Con A	man, glc	15
<i>Ulex europaeus Agglutinin I</i>	UEA I	fucose	15

GalNAc= N-asetilgalaktosamin, GlcNAc= N-asetilglukosamin, Glc= β-glukosa, Gal= β-galaktosa, Man= Manosa

ditentukan berdasarkan kriteria sebagai berikut: (-) hasil negatif, (±) intensitas lemah, (+) intensitas sedang, (++) intensitas kuat, dan (+++) intensitas sangat kuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Distribusi Glikokonjugat pada Testis Muncak

Pola ikatan lektin yang mendeteksi sebaran glikokonjugat pada jaringan testis muncak disajikan pada Tabel 2. Keenam jenis lektin memperlihatkan variasi pola ikatan spesifik dengan glikokonjugat pada sel-sel germinal epitel tubuli seminiferi, sel Sertoli, membran basal tubuli, dan sel Leydig pada jaringan interstisial testis. Lektin PNA, RCA, WGA, Con A, dan SBA memperlihatkan reaksi lektin positif dengan intensitas pewarnaan bervariasi. Lektin UEA I menunjukkan hasil negatif pada seluruh tipe sel germinal, sel Sertoli, dan sel Leydig. Pada slide kontrol negatif (K-), tidak terjadi reaksi atau hasil negatif.

Lektin PNA, RCA, WGA, dan SBA beraksi positif dengan glikokonjugat spesifik dengan intensitas pewarnaan berbeda pada sel spermatid yang mengalami perkembangan. Warna coklat yang menandai reaksi positif adanya glikonjugat dengan intensitas sangat kuat (+++) dapat dideteksi oleh lektin PNA dan WGA pada bagian akrosom sel spermatid (fase golgi cap), dan tahap akhir dari fase akrosom. Namun demikian, intensitas sedang (+) dari kedua lektin tersebut (PNA dan WGA) ditemukan pada fase maturasi dan sitoplasma spermatid. Lektin RCA dan SBA juga menunjukkan hasil positif pada fase akrosom (golgi cap dan akrosom) dan positif sedang (+) pada fase maturasi spermatid dan sitoplasma sel spermatid. Selanjutnya lektin Con A memperlihatkan reaksi positif yang menyebar di seluruh sel germinal, terutama di bagian sitoplasma dengan intensitas kuat (++) dan sedang (+), serta negatif (-) pada fase maturasi akrosom.

Lektin WGA, SBA dan Con A tervisualisasi positif kuat (++) pada sitoplasma sel spermatosit, dan bereaksi sedang (+) dengan lektin PNA dan RCA. Reaksi negatif (-) pada sel spermatogonia diperlihatkan oleh lektin PNA dan WGA, positif sedang (+) dengan lektin RCA dan Con A, dan positif lemah (±) dengan lektin SBA. Sitoplasma sel Sertoli bereaksi negatif (-) dengan PNA, positif sedang (+) dengan RCA, WGA, dan Con A, serta positif kuat (++) dengan lektin SBA. Pada sel Leydig, reaksi

positif dengan intensitas kuat (++) diperlihatkan oleh lektin RCA, intensitas sedang (+) oleh Con A dan PNA, dan melemah (±) dengan lektin WGA. Membran basal tubuli seminiferi juga terdeteksi positif kuat (++) dengan lektin PNA dan SBA, positif sedang (+) dengan RCA, dan Con A. Selain positif kuat (++) dengan membran basal, lektin SBA juga mewarnai dinding buluh darah dengan intensitas kuat pada jaringan interstisial, namun sebaliknya bereaksi negatif terhadap lektin SBA. Lektin WGA negatif (-) pada membran basal dan jaringan interstisial.

Distribusi glikokonjugat pada sel-sel spermatogenik dan sel intertubuli seminiferi testis dapat dideteksi dengan PNA, SBA, RCA, WGA, dan Con A. Hasil tersebut mengindikasikan adanya sebaran residu gula galaktosa, N-asetilgalaktosamin, N-asetilglukosamin, manosa, dan glukosa, sedangkan residu gula fukosa tidak terdeteksi menggunakan lektin UEA 1. Pola sebaran tersebut secara umum juga dilaporkan pada kambing (Kurohmaru *et al.*, 1991), babi (Calvo *et al.*, 2000), kuda (Verini-Supplizi *et al.*, 2000), dan babirusa (Agungpriyono *et al.*, 2007).

Pada sel-sel spermatogenik testis muncak, lektin PNA, SBA, dan RCA secara umum berhasil melokalisasi residu gula tipe D-galaktosa, N-asetil galaktosamin, dan N-asetil glukosamin. Reaksi positif dengan intensitas pewarnaan kuat ditemukan pada fase golgi-cap dan akrosom dari sel spermatid. Namun demikian, pada tahap akhir dari perkembangan sel spermatid (fase maturasi), intensitas reaksi menurun. Hal ini mengindikasikan bahwa glikokonjugat sangat diperlukan pada fase awal dari diferensiasi spermatid. Pola sebaran glikokonjugat pada muncak tersebut mirip dengan pola sebaran pada jaringan testis tikus (Arya dan Vanha-Perттtula, 1986), dan babirusa (Agungpriyono *et al.*, 2007).

Lektin WGA dengan residu gula N-asetil-D-glukosamin memperlihatkan afinitas ikatan berbeda dengan jenis lektin sebelumnya. Reaksi positif ditemukan mulai dari tahap awal hingga tahap akhirdari tahap diferensiasi spermatid, walaupun pada tahap maturasi intensitasnya sedikit menurun. Pola tersebut juga ditemukan pada testis kuda (Verini-Supplizi *et al.*, 2000), namun berbeda dengan pola ikatan pada testis babirusa dan babi. Afinitas ikatan antara lektin Con A dan residu gula manosa dan glukosa hanya ditemukan pada fase golgi-cap dan akrosom, dan negatif pada fase

Tabel 2. Pola ikatan lektin dan glikokonjugat pada sel-sel spermatogenik testis muncak periode ranggah keras

Lektin	Spermatid				Spermatosit	Spermatogonia	Sel Sertoli	Sel Leydig
	Akrosom (fase)							
	Golgi-cap	Akrosom	Maturasi	Sitoplasma				
PNA	+++	+++	+	+	+	-	-	+
SBA	++	+++	+	++	-	-	++	-
WGA	+++	+++	++	++	+++	-	+	±
RCA	++	++	+	++	+	+	+	++
Con A	++	++	-	+++	++	+	+	+
UEA I	-	-	-	-	-	-	-	-
K-	-	-	-	-	-	-	-	-

Intensitas ikatan lektin +++= Sangat kuat; ++= Kuat; += Sedang; ±= Lemah; dan -= Negatif. PNA= *Peanut agglutinin*; SBA= *Soy bean agglutinin*; WGA= *Wheat germ agglutinin*; RCA= *Ricinus communis*; Con A= *Concanavalin A*; UEA I= *Ulexeuropaeus agglutinin*; dan K-= Kontrol negatif

maturasi. Adapun lektin UEA dengan residu gula fukosa tidak ditemukan pada seluruh sel-sel spermatogenik muncak. Hal yang sama juga dilaporkan pada babirusa dan babi, namun berbeda dengan sapi (Arya dan Vanha-Perttula, 1985). Gambaran pola sebaran glikokonjugat pada fase awal perkembangan spermatid menunjukkan keterlibatan glikokonjugat pada saat pembentukan tudung akrosom. Pada fase maturasi dan tahap akhir perkembangan spermatid, peran glikokonjugat tidak atau kurang diperlukan.

Afinitas lektin tertentu dengan intensitas sedang ditemukan pada sel-sel spermatosit, spermatogonia, sel Sertoli, dan sel Leydig. Glikokonjugat dengan residu gula N-asetilgalaktosamin bereaksi kuat pada sel Sertoli dan sel Leydig, tetapi negatif pada spermatosit. Positif sangat kuat diperlihatkan dari hasil ikatan lektin WGA dengan residu gula N-asetilglukosamin pada spermatosit, negatif pada spermatogonia, dan positif sedang pada sel Sertoli, serta positif lemah pada sel Leydig. Hal ini mengindikasikan, bahwa secara umum kehadiran glikokonjugat dengan residu gula N-asetilgalaktosamin juga diperlukan walaupun jumlahnya sedikit. Namun demikian pada spermatosit, residu gula N-asetilglukosamin sangat diperlukan untuk membantu proses diferensiasi sel spermatosit.

Peran glikokonjugat pada sel Sertoli dan sel Leydig diperlihatkan dari reaksi positif kuat dengan lektin SBA (residu gula N-asetilgalaktosamin dan galaktosa), tetapi melemah pada sel Leydig. Pola tersebut juga dilaporkan pada babi (Calvo *et al.*, 2000) dan babirusa (Agungpriyono, 2007). Kebutuhan glikokonjugat dalam porsi kecil pada sel Sertoli diduga berhubungan erat dengan kemampuan fagositosis dan proses pembentukan *residual bodies* pada tahap akhir spermatogenesis (Arya dan Vanha-Perttula, 1985).

Glikoprotein yang tersebar pada sel-sel spermatogenik muncak dapat dideteksi menggunakan lima jenis lektin (PNA, SBA, RCA, WGA, dan Con A) yang memiliki spesifisitas tertentu terhadap residu gula dari glikokonjugat. Oleh karena itu, metode histokimia lektin sangat tepat diaplikasikan dalam mempelajari fisiologi spermatogenesis pada testis muncak pada periode ranggah berbeda.

KESIMPULAN

Glikokonjugat terdeteksi pada sel-sel spermatid testis muncak mengindikasikan pentingnya keberadaan glikokonjugat dalam spermatogenesis terutama pada tahap spermiogenesis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Universitas Syiah Kuala, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, yang telah membiayai penelitian ini

melalui pelaksanaan penelitian Dosen Muda Nomor: 2343/UN11/LK-PNBP/2012. Ucapan yang sama disampaikan kepada Kementerian Kehutanan Republik Indonesia atas izin penggunaan muncak dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono, S., M. Kurohmaru, W.E. Prasetyaningtyas, L. Kaspe, K.Y.G. Leus, M. Sasaki, N. Kitamura, J. Yamada, A.A. MacDonald. 2007. A lectin histochemical study on the testis of the babirusa, *Babyroussa babyroussa* (Suidae). **Anat. Histol. Embryol.** 36:343-348.
- Arenas, M.I., J.F. Madrid, F.R. Bethencourt, and F.B. Paniagua. 1998. Lectin histochemistry of the human testis. **Int. J. Androl.** 21:332-342.
- Arya, M. and T. Vanha-Perttula. 1985. Lectin-binding pattern of bull testis and epididymis. **J. Androl.** 6:230-242.
- Arya, M. and T. Vanha-Perttula. 1986. Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. **Am. J. Anat.** 175:449-469.
- Calvo, A., L.M. Pastor, S. Bonet, E. Pinart, and M. Ventura. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. **J. Reprod. Fert.** 120:325-335.
- Damjanov, I. 1987. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. **Lab. Invest.** 57:5-19.
- DeMott, R.P., R. Lefebvre, and S.S. Suarez. 1995. Carbohydrate mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. **Biol. Reprod.** 52:1396-1403.
- Kiernan, J.A. 1990. **Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice.** 2nd ed. Pergamon Press, England.
- Kurohmaru, M., Y. Kanai, and Y. Hayashi. 1991. Lectin binding patterns in the spermatogenic cells of the Shiba goat testis. **J. Vet. Med. Sci.** 53:893-897.
- Maryanto, I., A.S. Achmadi, dan A.P. Kartono. 2008. **Mamalia Dilindungi Perundang-undangan Indonesia.** Prijono, S.N. dan M. Noerdjito (Eds.). LIPI Press, Cibinong.
- PHKA. 2004. **Peraturan Perundang-undangan Bidang Perlindungan Hutan dan Pelestarian Alam.** Sekretariat Dirjen PHKA Departemen Kehutanan. Jakarta.
- Sharon, N. and H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. **Science.** 246:227-234.
- Söderström, K.O., R. Malmi, and K. Karjalaine. 1984. Binding of fluorescein isothiocyanate lectins to rat spermatogenic cells in tissue section. **Histochemistry.** 80:475-479.
- Verini-Supplizi, A.G., G. Stradaoli, O. Agioli, and F. Parillo. 2000. Localization of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. **Res. Vet. Sci.** 69:113-118.
- Wahyuni, S., L.E.M. Manik, S. Agungpriyono, M. Agil, T.L. Yusuf, Hamny, dan I.K.M. Adnyane. 2013. Morfologi kelenjar aksesoris kelamin muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) Jantan. **Act. Vet. Indones.** 1:81-90.
- Wahyuni, S., S. Agungpriyono, M. Agil, dan T.L. Yusuf. 2012a. Histologi dan histomorfometri testis dan epididimis muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) pada periode ranggah keras. **J. Vet.** 13:211-219.
- Wahyuni, S., S. Agungpriyono, M. Agil, Hamny, N. Idawati, and T.L. Yusuf. 2012b. Spermatogenesis and semen quality of male muntjak (*Muntiacus muntjak muntjak*) during antler growth periods. **Proc. Ann. Int. Con. Syiah Kuala University.** Banda Aceh:86-90.
- Wahyuni, S., S. Agungpriyono, M. Agil, dan T.L. Yusuf. 2011. Morfologi dan morfometri pertumbuhan ranggah velvet muncak jantan (*Muntiacus muntjak muntjak*). **J. Ked. Hewan.** 5(2):17-22.
- Wassarman, P.M. 1989. Role of Carbohydrates in Receptor-Mediated Fertilization in Mammals. In **Carbohydrate in Recognition in Cellular Function.** Bock, G. and S. Harnett (Eds.). Willey, USA.