

SUPLEMEN BUNGKIL INTI SAWIT TEPUNG DAUN KATUK BERPOTENSI MENINGKATKAN KUALITAS SPERMATOZOA PADA KAMBING PERANAKAN ETTAWA

Palm Kernel Meal-Sauropus androgynus L. Merr Supplement Have Potency to Increase the Quality of Sperm on PE Goat

Muslim Akmal¹, Teuku Reza Ferasyi², Hamdani Budiman³, Razali², Azhari², Anwar⁴, Fitra Aji Pamungkas⁴,
Saddat Nasution⁴, T. Armansyah⁵, Muhammad Hambal⁶, Syafruddin⁷, dan Arman Sayuti⁷

¹Laboratorium Embriologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

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

⁴Loka Penelitian Kambing Potong Sei Putih, Sei Putih, Sumatera Utara

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

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

⁷Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: muslim_akmal70@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian suplemen bungkil inti sawit (BIS), tepung daun katuk (KAT), dan kombinasi bungkil inti sawit dan tepung daun katuk (BISKAT) terhadap peningkatan kualitas spermatozoa kambing jantan peranakan Ettawa (PE). Dalam penelitian ini digunakan 20 ekor kambing jantan PE, berumur 1,5 tahun dengan berat badan antara 15-20 kg dan dibagi atas empat kelompok yakni P0, P1, P2, dan P3 yang masing-masing diberi akuades, BIS 100 g/hari/ekor, kombinasi BIS 100 g/hari/ekor dan KAT 15 g/hari/ekor, dan KAT 15 g/hari/ekor. Pemberian perlakuan dilakukan selama 35 hari. Pada hari ke-36 dilakukan kastrasi dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa yang meliputi motilitas, viabilitas, integritas membran, dan abnormalitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplemen kombinasi BISKAT dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, integritas membran, dan menurunkan abnormalitas spermatozoa dibanding kelompok kontrol. Disimpulkan bahwa pemberian suplemen kombinasi BISKAT berpotensi meningkatkan kualitas spermatozoa kambing PE.

Kata kunci: bungkil inti sawit, tepung daun katuk, spermatogenesis, kualitas spermatozoa, kambing PE

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of palm kernel meal-Sauropus androgynus L. Merr to increase the quality of sperm on PE goat. This study used 20 PE goats, aged 1-1.5 years weighing between 15-20 kg and divided into 4 groups (P0, P1, P2, and P3). P1 was given distilled water, P2 was fed with 100 g of palm kernel meal/one/day (BIS), P3 was fed with 100 g of palm kernel meal/one/day + 15 g of Sauropus androgynus L. Merr (BISKAT)/one/day, and P4 was fed with 15 g of Sauropus androgynus L. Merr/one/day. Five PE goats of each group were castrated then the quality of sperm (motility, viability, integrity of membrane, and abnormality) was evaluated. The result showed that the supplementation of BISKAT can increase the motility, viability, integrity of membran, and reduce the abnormality of sperm. It can be concluded that BISKAT supplement is potential to increase the quality of sperm of PE goat.

Key words: palm kernel meal, Sauropus androgynus L. Merr, spermatogenesis, quality of sperm, PE goat

PENDAHULUAN

Sumatera Utara merupakan salah satu provinsi penghasil kelapa sawit terbesar di Indonesia dengan luas perkebunan sawit mencapai 6.700.000 ha atau sekitar 25% dari total luas lahan sawit nasional (Badan Pusat Statistik, 2008). Sejumlah besar hasil kelapa sawit di daerah Sumatera Utara langsung diolah menjadi minyak. Dari pengolahan tersebut terdapat hasil ikutan berupa limbah yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Salah satu diantaranya adalah bungkil inti sawit (BIS, *palm kernel meal*) yang dapat dijadikan sebagai sumber pakan penguat (suplemen protein dan energi) (Amizi *et al.*, 2012).

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa pemberian BIS dapat meningkatkan bobot badan sapi 0,5-1,2 kg/ekor/hari (Jalan *et al.*, 1991), sedangkan

pada kambing potong dapat meningkatkan bobot badan 54-62 g/ekor/hari. Namun sampai saat ini, masih sedikit laporan penelitian tentang pengaruh BIS terhadap peningkatan kualitas spermatozoa kambing.

Hasil penelitian Dias (2010) menunjukkan bahwa pemberian BIS dapat memengaruhi kadar *volatile fatty acids* (VFA) pada hewan ternak. Selain itu, pemberian BIS juga memengaruhi aktivitas internal testis pada kambing dan domba, namun belum mampu memengaruhi libido, perilaku kawin, dan kualitas semen (Yaakub *et al.*, 2011).

Selain BIS, sejumlah hasil penelitian menunjukkan bahwa tepung daun katuk (KAT) juga berpotensi meningkatkan kualitas spermatozoa. Pemberian KAT mampu meningkatkan konsentrasi VFA di dalam vena porta sebesar 20-55% lebih tinggi dari normal pada domba betina dan mampu memengaruhi peningkatan

aktivitas sistem reproduksi pada hewan jantan (Suprayogi, 2005). Pemberian KAT 9% dalam ransum pada ayam lokal dapat meningkatkan konsentrasi hormon estradiol dan mempercepat umur dewasa kelamin (Subekti, 2003). Pemberian KAT pada kambing jantan mampu menginduksi aktivitas pembelahan *spermatogonial stem cell* untuk membelah menjadi spermatisit dan spermatid serta mampu meningkatkan produksi testosteron (Ferasyi *et al.*, 2012).

Berdasarkan hal tersebut, pemberian suplemen kombinasi BIS dan KAT (BISKAT) diprediksi akan mampu meningkatkan kualitas spermatozoa kambing jantan PE. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian BISKAT terhadap peningkatan kualitas spermatozoa kambing jantan PE. Dari hasil penelitian ini diharapkan BISKAT dapat dijadikan sebagai bahan suplemen alternatif dalam upaya meningkatkan penampilan reproduksi kambing jantan PE.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 20 ekor kambing jantan PE, berumur 1,5 tahun dengan berat badan antara 15-20 kg dan dibagi atas empat kelompok yakni P0, P1, P2, dan P3 yang masing-masing diberi akuades, BIS 100 g/hari/ekor, kombinasi BIS 100 g/hari/ekor dan KAT 15 g/hari/ekor, dan KAT 15 g/hari/ekor. Pemberian perlakuan dilakukan selama 35 hari. Pada hari ke-36 dilakukan kastrasi dan koleksi kauda duktus epididimis untuk pemeriksaan kualitas spermatozoa yang meliputi motilitas, viabilitas, integritas membran, dan abnormalitas.

Penyiapan Suplemen BIS dan KAT

Limbah BIS akan dikumpulkan dari tempat pengolahan minyak sawit yang ada di Provinsi Sumatera Utara, sedangkan KAT segar diperoleh dari kebun pembibitan di wilayah Aceh Besar. Selanjutnya bahan-bahan tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 60° C selama semalam. Daun yang telah dikeringkan dijadikan tepung dengan cara diblender (Ferasyi *et al.*, 2011).

Koleksi Spermatozoa dari Kauda Epididimis

Testis dan epididimis dibersihkan dengan larutan 0,9% natrium klorida (NaCl) ditambah dengan 0,06 g/l penisilin (Sigma-Aldrich. Inc, P-4687) dan 0,1 g/l streptomisin (Sigma-Aldrich. Inc, S-9137), lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik, ditutup rapat, dan ditempatkan dalam wadah *polystyrene* untuk dibawa ke laboratorium. Setelah berada di laboratorium, bagian kauda epididimis dipisahkan dari testis dan jaringan ikat lainnya. Untuk menghindari kontaminasi darah, pembuluh darah dipotong dan dikeluarkan. Koleksi spermatozoa dilakukan dengan membuat beberapa sayatan pada kauda epididimis menggunakan pisau skalpel dan meletakkannya pada cawan petri yang berisi pengencer *triladyl* selama 3

menit, lalu dimasukkan ke dalam tabung 15 ml untuk proses evaluasi.

Parameter Evaluasi Karakteristik Spermatozoa

Sampel spermatozoa dari kauda epididimis dievaluasi karakteristiknya meliputi motilitas progresif spermatozoa, viabilitas, integritas membran spermatozoa, dan abnormalitas spermatozoa yang ditentukan dengan pewarnaan eosin negrosin.

Penilaian Motilitas Spermatozoa

Penilaian persentase motilitas spermatozoa ditentukan dengan cara menempatkan satu tetes spermatozoa yang telah diencerkan dengan larutan 0,9% NaCl pada obyek gelas dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan terhadap spermatozoa yang bergerak progresif dilakukan secara subyektif pada enam lapang pandang yang berbeda di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Penilaian yang diberikan mulai 0% (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100% (semua spermatozoa bergerak ke depan).

Penilaian Viabilitas Spermatozoa

Penentuan persentase viabilitas dari spermatozoa dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan eosin-negrosin dengan komposisi pewarna eosin-negrosin untuk 300 ml air mili-Q terdiri atas 3,3 g eosin *yellow* (Wako Pure Chemical Industries, 058-00062), 20 g nigrosin (Sigma-Aldrich, 198285) dan 1,5 g natrium sitrat menurut prosedur Barth dan Oko (1989). Sebanyak 10 µl sampel semen dan 40 µl eosin negrosin dicampur di atas obyek gelas, kemudian dibuat preparat ulas dan dikeringkan menggunakan lampu spiritus selama 15 detik sebelum dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang dikategorikan hidup adalah spermatozoa yang tidak menyerap zat warna sehingga pada bagian kepala spermatozoa tidak terwarnai (putih), sedangkan spermatozoa yang dikategorikan mati adalah spermatozoa yang menyerap zat warna sehingga pada bagian kepalanya akan berwarna merah. Persentase viabilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan perbandingan antara jumlah spermatozoa hidup dengan jumlah total spermatozoa. Jumlah total spermatozoa yang dihitung adalah 200 spermatozoa.

Penilaian Integritas Membran Spermatozoa

Penilaian persentase integritas membran spermatozoa diperiksa menggunakan *hypoosmotic swelling test* (HOS-test) dengan komposisi larutan HOS untuk 10 ml air mili-Q ditambah dengan 0,135 g fruktosa (Merck, Germany) dan 0,0735 g trisodium sitrat 2H₂O. Sampel semen sebanyak 20 µl diencerkan dengan 80 µl larutan HOS dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Untuk keperluan pengamatan, diteteskan 10 µl sampel semen pada obyek gelas yang ditutup dengan gelas penutup dan evaluasi dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Perhitungan dilakukan pada lima lapang pandang

secara acak terhadap spermatozoa yang mempunyai ekor melingkar (membran plasma utuh) maupun yang mempunyai ekor lurus (membran plasma tidak utuh). Jumlah total spermatozoa yang dihitung adalah 200 spermatozoa (Jetendran *et al.*, 1984).

Penilaian Abnormalitas Spermatozoa

Pengamatan abnormalitas menurut Ridwan (2009) yaitu terhadap abnormalitas spermatozoa sekunder (kepala normal yang terputus dan ekor yang membengkak) yang terjadi selama proses penyimpanan atau kriopreservasi spermatozoa. Pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dilakukan pada 200 spermatozoa.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan kualitas spermatozoa dianalisis dengan menggunakan rancangan varian satu arah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data pengamatan terhadap kualitas spermatozoa kambing PE setelah perlakuan disajikan pada Tabel 1. Rataan motilitas spermatozoa tertinggi terlihat pada P1 dan terendah terlihat pada P3. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian BIS sebesar 100 g/hari/ekor cenderung lebih baik untuk menginduksi peningkatan motilitas spermatozoa bila dibandingkan dengan pemberian kombinasi BISKAT maupun pemberian KAT secara tunggal, meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi BISKAT juga mampu meningkatkan motilitas spermatozoa kambing PE lebih baik dari kelompok P0 dan pemberian KAT secara tunggal, meskipun masih kurang baik bila dibandingkan dengan pemberian BIS secara tunggal.

Berdasarkan pengamatan diketahui bahwa motilitas spermatozoa dalam penelitian ini adalah baik. Motilitas spermatozoa di atas 70% mempunyai daya tahan hidup yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan motilitas spermatozoa di bawah 70% (Susilawati, 2011). Motilitas spermatozoa merupakan salah satu karakteristik biologis spermatozoa (Anerao *et al.*, 2010) dan merupakan salah satu indikator yang penting dalam menentukan kualitas spermatozoa yang diejakulasikan baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Elzanaty dan Malm, 2007). Motilitas merupakan potensi gerak maju (progresif) spermatozoa. Daya gerak progresif spermatozoa sangat dibutuhkan pada saat berada dalam saluran reproduksi betina untuk mencapai tempat

fertilisasi (Hafez, 1993).

Kemampuan gerak progresif spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti fungsinya secara baik lingkungan epididimis dan kelenjar seks tambahan (Elzanaty *et al.*, 2002). Analisis motilitas spermatozoa berperan penting dalam mengevaluasi fertilitas pria (jantan). Rendahnya persentase spermatozoa yang motil akan menurunkan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi sel telur (Chemes dan Rawe, 2003). Selain itu, motilitas spermatozoa merupakan faktor penting dalam mengevaluasi potensi fertilisasi spermatozoa terhadap sel telur (Bongso *et al.*, 1989).

Rataan viabilitas spermatozoa tertinggi terlihat pada P1 dan terendah terlihat pada P3. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian BIS sebesar 100 g/hari/ekor cenderung mampu menginduksi peningkatan viabilitas spermatozoa lebih baik bila dibandingkan dengan pemberian kombinasi BISKAT maupun pemberian KAT secara tunggal, meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Selain itu, hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemberian kombinasi BISKAT cenderung lebih baik dari P0 dan P3 dalam menginduksi peningkatan viabilitas spermatozoa pada kambing PE.

Viabilitas spermatozoa merupakan salah satu indikator kualitas semen yang penting untuk meningkatkan fertilisasi. Untuk mengetahui viabilitas spermatozoa digunakan pewarnaan eosin negrosin. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara viabilitas spermatozoa dengan keberhasilan fertilisasi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa viabilitas spermatozoa merupakan faktor penting dalam memengaruhi keberhasilan fertilisasi (Simmons dan Fitzpatrick, 2012).

Menurut Partodihardjo (1992), prinsip pewarnaan spermatozoa adalah perbedaan afinitas dalam menyerap warna antara sel spermatozoa yang hidup dan yang mati. Pada spermatozoa yang hidup terlihat tidak menyerap warna sehingga pada bagian kepala spermatozoa akan berwarna jernih. Hal tersebut disebabkan permeabilitas membran spermatozoa masih normal, sedangkan sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna sehingga bagian kepala spermatozoa berwarna merah. Hal tersebut disebabkan rusaknya membran spermatozoa sehingga tidak mampu mencegah masuknya zat warna ke dalam kepala spermatozoa.

Rataan integritas membran spermatozoa tertinggi terlihat pada P2 dan terendah terlihat pada P0. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian BISKAT

Tabel 1. Kualitas spermatozoa kambing PE setelah pemberian bungkil inti sawit dan tepung daun katuk

Kelompok	Motilitas spermatozoa (%)	Viabilitas spermatozoa (%)	HOS-test (%)	Abnormalitas spermatozoa (%)
P0	71,40±2,07 ^a	80,60±11,37 ^a	70,40±17,84 ^a	25,80±9,0 ^a
P1	75,00±5,00 ^a	85,00±5,14 ^a	76,60±2,96 ^{ab}	25,40±3,20 ^a
P2	73,02±2,04 ^a	82,80±6,53 ^a	92,00±7,54 ^b	22,00±4,89 ^a
P3	71,20±8,92 ^a	80,20±1,48 ^a	72,60±13,39 ^a	25,60±7,23 ^a

^{a, ab, b}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) (P0= akuades; P1= bungkil inti sawit 100 g/hari/ekor; P2= kombinasi bungkil inti sawit 100 g/hari/ekor dan tepung daun katuk 15 g/hari/ekor; P3= tepung daun katuk 15 g/hari/ekor)

sebesar 100 g/hari/ekor mampu menginduksi peningkatan integritas membran spermatozoa secara nyata ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan P0 dan P3 (pemberian KAT). Sampai saat ini, belum pernah dilaporkan oleh peneliti lain bahwa pemberian pakan kombinasi BISKAT dapat menginduksi secara nyata peningkatan integritas membran spermatozoa. Oleh karena itu, hasil penelitian ini merupakan penelitian pertama yang melaporkan tentang peningkatan integritas membran spermatozoa akibat pemberian pakan kombinasi BISKAT.

Penggunaan paramater konvensional terhadap evaluasi semen nampaknya mempunyai aplikasi yang terbatas karena mereka hanya mampu mengukur integritas struktural daripada sel (Neild *et al.*, 1999). Setiap spermatozoa mempunyai kandungan kompartemen subselular yang beragam dengan fungsi yang berbeda, yakni seluruh dari kompartemen tersebut harus intak agar fertilisasi dapat terjadi (Amann dan Graham, 1993). Evaluasi integritas membran spermatozoa merupakan hal yang sangat penting dalam proses fertilisasi (Lodhi *et al.*, 2008). Jeyendran *et al.* (1984) merupakan ilmuwan yang mengembangkan metode HOS dengan tujuan mengevaluasi fungsi membran spermatozoa pada manusia. Selanjutnya metode tersebut dikembangkan berturut-turut pada sapi (Rota *et al.*, 2000), kuda (Neild *et al.*, 2000), anjing (Rodriguez-Gil *et al.*, 1994), dan babi (Perez-Llano *et al.*, 2001).

Rataan abnormalitas spermatozoa tertinggi terlihat pada P0 dan terendah pada P2. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian BISKAT sebesar 100 g/hari/ekor cenderung lebih baik menurunkan abnormalitas spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok P0, P1, dan P3, meskipun secara statistik tidak berbeda nyata ($P < 0,05$). Pemeriksaan morfologi (abnormalitas) spermatozoa merupakan hal yang penting dalam penilaian suatu kualitas spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa abnormalitas spermatozoa akan menyebabkan terjadinya gangguan terhadap proses pembuahan (Dada *et al.*, 2001). Persentase abnormalitas spermatozoa yang tinggi akan menyebabkan kegagalan spermatozoa mencapai sel telur sehingga menyebabkan kegagalan pembuahan sel telur (Chenoweth, 2005).

Secara umum keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian pakan kombinasi BISKAT dapat menginduksi peningkatan kualitas spermatozoa. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya bahan aktif VFA yang terkandung di dalam BISKAT. Seperti yang ditunjukkan oleh hasil penelitian terdahulu bahwa pemberian BIS dapat mempengaruhi aktivitas internal testis pada kambing dan domba, namun belum mampu memengaruhi libido, perilaku kawin, dan kualitas semen (Yaakub *et al.*, 2011). Namun pada penelitian ini, pemberian pakan suplemen kombinasi BISKAT ternyata dapat meningkatkan kualitas semen (kualitas spermatozoa).

Peningkatan kualitas spermatozoa akibat pemberian pakan suplemen BISKAT mungkin berkaitan dengan

terjadinya ekspresi dua molekul penting pada jaringan testis, yaitu *cAMP-response element binding protein* (CREB) dan *cAMP-responsive element modulator* (CREM), yang dikenal sebagai master regulator spermatogenesis. Faktor transkripsi CREB famili dibutuhkan pada regulasi ekspresi gen dalam rangka merespon sejumlah *signaling pathways* (Fimia *et al.*, 1999). Molekul CREB dibutuhkan dalam mengontrol spermatogenesis (Walker *et al.*, 1995). Faktor transkripsi CREM terekspresi secara langsung di dalam testis dan berperan dalam pematangan spermatozoa (Peri dan Serio, 2000). Protein CREM berperan esensial terhadap diferensiasi sel germinal haploid pada pria (Behr dan Weinbauer, 1999). Hasil penelitian Blendy *et al.* (1996) menunjukkan bahwa pada mencit yang mengalami defisiensi CREM akan memengaruhi ekspresi protamin, sehingga menyebabkan terjadinya infertilitas akibat terjadinya gangguan maturasi *round spermatid*. Menurut Oliva (2006) molekul protamin berperan penting dalam fertilisasi ovum oleh spermatozoa. Selain itu, protemin juga berperan sebagai molekul *check point* spermatogenesis (Carrell *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Berdasarkan serangkaian penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian pakan kombinasi BISKAT mempunyai potensi dalam menginduksi peningkatan kualitas spermatozoa khususnya dalam menjaga integritas membran kepala spermatozoa kambing jantan PE.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Pendidikan Tinggi, Rektor, dan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala atas kepercayaan yang diberikan kepada penulis melalui Hibah Master Plan Percepatan Pertumbuhan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) Tahun Anggaran 2013 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala dan staf Loka Penelitian Kambing Potong, Sei Putih, Galang Sumatera Utara yang telah banyak membantu kegiatan penelitian ini sehingga penelitian dapat berjalan secara baik, lancar, dan sukses.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann, R.P. and J.K. Graham. 1993. Spermatozoal function. In **Equine Reproduction**. Mcinnon, A.O. and J.L. Voss (Eds.). Lea and Febiger, London.
- Amizi, M.A., M.A. Islam, C.F. Komilus, dan A. Kamu. 2012. Palm Kernel Cake (PKC): A Potential High Energy Feed for Farm Animals. **Proceeding of the 2nd International Seminar on Animal Industry**. Jakarta:479-483.
- Anerao, A.M., R.C. Sharma, R. Mansee, and A.K. Gangawane. 2010. Studies on human sperm motility and viability when treatment with rock salt (Saindhav). **J. Pathol. Research**. 1(1):1-10.
- Badan Pusat Statistik. 2008. **Statistik Indonesia**. BPS Jakarta-Indonesia 2008.
- Behr, R. and G.F. Weinbauer. 1999. Germ cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator

- expression in rodent and primate testis is maintained despite gonadotropin deficiency. **Endocrinol.** 140(6):2746-2754.
- Blendy, J.A., K.H. Kaestner, G.F. Weinbauer, F. Nieschlag, and G. Schütz. 1996. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. **Nature.** 380:162-165.
- Bongso, T.A., Ng S.C., H. Mok, M.N. Lim, H.L. Teo, P.C. Wong, and S.S. Ratnam. 1989. Effect of sperm motility on human in vitro fertilization. **Arch. Androl.** 22:185-190.
- Carrell, D.T., B.R. Emery, and S. Hammoud. 2007. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: What is the link? **Hum. Reprod. Update.** 13(3):313-327.
- Chemes, H.E. and V.Y. Rawe. 2003. Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology: Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. **Hum. Reprod. Update.** 5:405-428.
- Dias, F.N. 2010. Supplementation of Palm Kernel Expeller to Grazing Dairy Farms in New Zealand. **Thesis.** The degree of Doctor of Philosophy in Animal Science. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Elzanaty, S. and J. Malm. 2007. Effects of ejaculation-to-analysis delay on levels of markers of epididymal ad accessory sex gland functions and sperm motility. **J. Androl.** 28(6):847-852.
- Elzanaty, S., J. Richthoff, J. Malm, and A. Giwercman. 2002. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Hum. Reprod. Update.** 17:2904-2911.
- Ferasyi, T.R., B. Hamdani, dan A. Suprayogi. 2011. Pemanfaatan Sediaan Ekstrak Daun Katuk Sebagai Suplemen Perangsang Aktivitas Testis untuk Meningkatkan Kemampuan Reproduksi Kambing Kacang Jantan Lokal. **Laporan.** Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Ferasyi, T.R., B. Hamdani., dan A. Suprayogi. 2012. Pemanfaatan Sediaan Ekstrak Daun Katuk Sebagai Suplemen Perangsang Aktivitas Testis untuk Meningkatkan Kemampuan Reproduksi Kambing Kacang Jantan Lokal. **Laporan.** Lembaga Penelitian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Fimia, G.M., D. De Cesare, and P. Sassone-Corsi. 1999. CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. **Nature.** 398:165-169.
- Hafez, E.S.E. 1993. **Reproduction in Farm Animals.** 5th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Jelan, Z. A., Y. Ishak, and T. Yaakub. 1991. Feedlotting of Cattle based on Palm Kernal Cake in Smallholders Farming System. In Recent Innovation in the Animal and Animal Product Industry. **Proceeding of 14th Malaysian Society of Animal Production Annual Conference.** 8-9th May 1991. Pahang: 99-102.
- Jeyendran, R.S., H.H. Vander-Ven, M. Perez-Pelaez, B.G. Crabo, and L.J.D. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. **J. Reprod. Fertil.** 70:219-228.
- Lodhi, L.A., M. Zubair., Z.I. Qureshi, I. Ahmad, and H. Jamil. 2008. Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and sahiwal cow bull semen. **Pakistan Vet. J.** 28(4):186-188.
- Neild, D., G. Chaves, M. Flores, M. H. Miragaya, A. Gonzalez, and A. Aguero. 2000. The hypo-osmotic swelling test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia.** 32(6):351-355.
- Neild, D., G. Chaves, M. Flores, N. Mora, M. Beconi, and A. Aguero. 1999. The hypo-osmotic swelling test in equine spermatozoa. **Theriogenology.** 51(4):721-727.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. **Hum. Reprod. Update** 12(4):417-435.
- Partodihardjo, S. 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan.** Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya, Jakarta.
- Perez-Llano, B., J.L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo, and P. Garcia-Casado. 2001. A short hypo-osmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology.** 56(3):387-398.
- Peri, A. and M. Serio. 2000. The CREM system in human spermatogenesis. **J. Endocrinol. Investigation.** 23:578-583.
- Ridwan. (2009). Pengaruh pengencer semen terhadap abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa kambing lokal pada penyimpanan suhu 5°C. **J. Agroland.** 16(2):187-192.
- Rodriguez-Gil, J.E., A. Monserrat, and T. Rigau. 1994. Effects of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure of canine spermatozoa. **Theriogenology.** 42(5):815-829.
- Rota, A., N. Penzo, L. Vincenti, and R. Mantovani. 2000. Hypo-osmotic swelling as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology.** 53(7):1415-1420.
- Simmons, L.W. and J.L. Fitzpatrick. 2012. Sperm wars and the evolution of male fertility. **Reprod.** 144:519-534.
- Subekti, S. 2003. Kualitas Telur dan Karkas Ayam Lokal yang Diberi Tepung Daun Katuk dalam Ransum. **Tesis.** Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Suprayogi, A. 2005. Blood serum volatile fatty acids (VFAs) in lactating sheep and VFAs production under *in-vitro* conditions using *Sauropus androgynus* (L.) Merr. Leaves. **Gakuryoku.** XI(3):57-60.
- Susilawati, T. 2011. **Spermatologi.** Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Walker, W.H. L. Fucci, and J.F. Habener. 1995. Expression of gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5', monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB); regulation by follicle stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat sertoli cells. **Endocrinol.** 136:3534-3545.
- Yaakub, H., A.R. Alimon, and I. Ismail. 2011. Effect of copper in palm kernel meal diet in reproductive system of farm animals. **The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries.** 26-29 July 2011. Thailand:116-120.