

**Efektivitas Penambahan berbagai Konsentrasi Glutathion
terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Sapi Bali
*Post Thawing***

ANNISYA SYARIFUDDIN¹,
DESAK NYOMAN DEWI INDIRA LAKSMI², WAYAN BEBAS¹

^{1,2}Lab Reproduksi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jl. PB Sudirman Denpasar, Fax (0361) 701808.
Email: annisya_vetro@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui “Efektivitas Penambahan Berbagai Konsentrasi Glutathion terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Sapi Bali *Post Thawing*”.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kelompok perlakuan : Kontrol semen yang diencerkan dengan andromed tanpa penambahan glutathion, G1 semen yang diencerkan dengan andromed ditambahkan konsentrasi 0,5 mM glutathion, G2 konsentrasi 1,0 mM glutathion, dan G3 konsentrasi 1,5 mM glutathion. Masing-masing perlakuan diulang 6 kali, sehingga sampel yang digunakan sebanyak 24 sampel.

Hasil penelitian untuk rata-rata daya hidup secara berturut-turut adalah : 55,00 ± 6,33, 57,50 ± 4,18, 65,00 ± 4,47 dan 55,83 ± 5,85. Untuk motilitas progresif secara berturut-turut adalah : 53,33 ± 4,08, 56,67 ± 4,08, 63,33 ± 4,08 dan 54,17 ± 3,76.

Dengan analisis uji sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan glutathion menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas. Uji lanjutan kemudian dilakukan dengan uji wilayah Duncan dan diperoleh rata-rata persentase daya hidup spermatozoa pada perlakuan Kontrol nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G1, G2, dan G3. Rata-rata persentase daya hidup spermatozoa pada perlakuan G1 nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G2. Rata-rata persentase daya hidup spermatozoa pada perlakuan G2 nyata lebih banyak ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan Kontrol, G1, dan G3. Rata-rata persentase daya hidup spermatozoa pada perlakuan G3 nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G1 dan G2.

Pada motilitas spermatozoa perlakuan Kontrol nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G1, G2, dan G3. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan G1 nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G2. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan G2 nyata lebih banyak ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan Kontrol, G1, dan G3. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan G3 nyata lebih sedikit ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan G2 dan G3.

Kata Kunci : motilitas, daya hidup, spermatozoa, *post thawing*.

PENDAHULUAN

Pertambahan jumlah penduduk Indonesia, peningkatan taraf hidup kesejahteraan masyarakat dan peningkatan kesadaran akan pentingnya kesehatan dan nilai gizi menyebabkan keperluan akan bahan asal hewan sebagai sumber protein juga semakin meningkat. Sehubungan dengan hal tersebut pemerintah telah berusaha mengembangkan berbagai usaha di bidang peternakan antara lain ternak sapi, unggas, babi, kambing dan domba.

Ternak ruminansia besar (sapi dan kerbau) mempunyai peranan penting dalam memenuhi kebutuhan daging sebagai sumber protein hewani, walaupun perannya masih merupakan nomor dua setelah unggas. Sapi bali (*Bos javanicus*) sebagai

plasma nutfah yang ada di Indonesia termasuk salah satu ternak yang dikembangkan keberadaannya untuk mendukung pemenuhan gizi dari protein hewani. Sangat banyak keunggulan yang dimiliki sapi bali antara lain : pertumbuhan yang cepat, sebagai sapi pekerja yang baik dan efisien, daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan dan persentase beranak mencapai 80% (Hardjosubroto, 1994).

Dalam pembibitan sapi bali, keterbatasan jumlah pejantan unggul dapat diatasi dengan menerapkan program teknologi reproduksi yaitu inseminasi buatan (IB) sehingga potensi pejantan unggul sapi bali dapat dimanfaatkan secara optimal, keuntungan lain yang dapat diperoleh adalah mengatasi kendala jarak dan waktu, mencegah penularan penyakit dan menghemat dana pemeliharaan pejantan. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan dalam pelaksanaan inseminasi buatan adalah kualitas semen beku yang digunakan.

Semen beku memiliki keuntungan, dapat menyediakan bibit pejantan yang memiliki kualitas genetik tinggi dalam sifat-sifat produksi tertentu, mempunyai fertilitas yang tinggi dan dapat bertahan hidup hingga bertahun-tahun. Spermatozoa yang dibekukan dan disimpan pada suhu -79°C di dalam CO_2 padat tahan hidup 3 – 4 tahun atau lebih, dan pada -196°C di dalam nitrogen cair spermatozoa dapat bertahan hidup hingga waktu 10 – 25 tahun (Tolihere, 1993).

Dalam proses pembekuan antara 20 – 80% spermatozoa dapat mengalami kematian (Tolihere, 1993). Proses *cooling*, *freezing*, dan *thawing* dapat menimbulkan stress fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan fertilitasnya (Chatterjee *et al*, 2001). Gadea *et al*, 2000 melaporkan ada proses penting selama proses pembekuan yaitu produksi *reactive oxygen species (ROS)* dimana dapat mengubah fungsi dan struktur membran spermatozoa. Demikian pula menurut Rizal (2005) mengatakan bahwa kejutan dingin (*cold shock*) dan serangan radikal bebas diakibatkan karena adanya kontak antara spermatozoa dengan oksigen pada saat koleksi dan pengolahan spermatozoa. Pembekuan spermatozoa juga dapat menurunkan viabilitas spermatozoa dan group sulfidril yang terkandung dalam membran protein spermatozoa (Chatterjee *et al*, 2001).

Untuk memperbaiki kualitas semen beku dengan menambahkan senyawa antioksidan di dalam pengencer semen telah banyak dilaporkan. Glutathion dan beta karoten dapat meningkatkan fertilitas spermatozoa domba garut hasil kriopreservasi (Rizal, 2005). Penggunaan antioksidan glutathion pada pengencer babi dapat mempertahankan motilitas spermatozoa yang dibekukan (Gadea *et al*, 2000).

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan yang digunakan adalah seekor pejantan sapi bali dewasa kelamin dengan kondisi penampilan dan kesehatan yang baik. Nama pejantan Banuarsa, berat badan 560 kilogram dan berumur 8 tahun.

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah semen segar sapi bali, bahan pengencer andromed®, glutathion, pewarna eosin, nitrogen cair, aquabidesilata.

Peralatan yang digunakan adalah vagina buatan, tabung reaksi, gelas erlenmeyer, pipet tetes, gelas ukur, mikroskop cahaya, gelas objek, gelas penutup, bunsen, timbangan mikro, pH, meter kontainer N₂ cair, straw mini (0,25 ml), rak straw, *waterbath*, lemari es, styrofoam, mesin *filling* dan *sealing*.

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari empat kelompok. Kelompok kontrol : semen + pengencer andromed, Kelompok perlakuan I : semen + pengencer andromed + 0,5 mM glutathione, Kelompok perlakuan II : semen + pengencer andromed + 1 mM glutathione, Kelompok perlakuan III : semen + pengencer andromed + 1,5 mM glutathione, Setiap kelompok terdiri dari 6 ulangan.

Variabel dalam penelitian ini adalah Variabel bebas : daya hidup dan motilitas spermatozoa sapi bali dari semen yang baru ditampung dari pejantan. Variabel kendali : konsentrasi spermatozoa dalam bahan pengencer andromed dan konsentrasi glutathion yang ditambahkan kedalam bahan pengencer andromed. Variabel tergantung : daya hidup dan motilitas spermatozoa yang telah diencerkan dengan bahan pengencer andromed dengan penambahan berbagai konsentrasi glutathion.

Untuk pengumpulan data dilakukan dengan cara mengambil semen yang telah di *thawing* selanjutnya diteteskan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop. Data daya hidup spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung di bawah mikroskop jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna (transparan) saat dilakukan pewarnaan spermatozoa dengan menggunakan pewarnaan eosin negrosin sedangkan data motilitas spermatozoa diperoleh dengan cara menghitung di bawah mikroskop jumlah spermatozoa yang mempunyai gerakan progresif. Daya hidup dan motilitas spermatozoa dinyatakan dalam persen (%).

Prosedur Penelitian

- Penyiapan pejantan yang akan diambil semennya : ternak jantan yang akan ditampung semennya harus memenuhi persyaratan yaitu umur, silsilah keturunan, kondisi badan dan nafsu seksual.
- Perakitan vagina buatan : vagina buatan merupakan alat yang menyerupai vagina yang sebenarnya sehingga mendapatkan hasil yang maksimal karena merupakan modifikasi dari perkawinan alam.
- Penampungan semen : penampungan semen dilakukan oleh minimal dua orang dan sapi pemancing. Satu orang operator memegang vagina tiruan untuk menampung semen dan satu atau dua orang lagi bertugas mengendalikan pejantan yang akan ditampung semennya. Semen yang keluar di tampung pada cawan petri.
- Pembuatan pengencer andromed : bahan pengencer dibuat dengan melarutkan andromed kedalam aquabidesilata dengan perbandingan 1 : 4 sambil diaduk agar homogen.
- Penambahan berbagai konsentrasi glutathion dalam pengencer andromed : konsentrasi glutathion 0,5 mM dibuat dengan melarutkan 15,3665 mg glutathion ke dalam 1 ml andromed kemudian diaduk hingga homogen. Untuk larutan 1 mM dibuat dengan melarutkan 30,733 mg glutathion ke dalam 1 ml

andromed kemudian diaduk hingga homogen sedangkan untuk larutan glutathion 1,5 mM dibuat dengan melarutkan 40,0995 mg glutathion ke dalam 1 ml andromed kemudian diaduk hingga homogen.

- Evaluasi semen : pemeriksaan semen dibagi menjadi dua kelompok, yaitu pemeriksaan secara makroskopik dan pemeriksaan mikroskopik (Tolihere, 1993).
- Pengenceran semen : Semen diambil sebanyak 0,5 ml kemudian dilarutkan ke dalam pengencer andromed 5 ml.
- Printing straw : straw yang telah di pilih kemudian diberikan tanda.
- *Filling* dan *sealing* : setelah straw diberi tanda dilakukan pengemasan semen ke dalam straw dengan volume tiap straw sebesar 0,25 ml.
- Ekuilibrasi : setelah dilakukan pengemasan kemudian dilakukan proses penyesuaian sperma dengan kondisi lingkungan yang merupakan tahap persiapan sperma untuk menjalani penurunan suhu agar kerusakan/kematian sperma akibat penurunan suhu dapat diminimalkan (Tolihere, 1993).
- Pembekuan semen : pembekuan semen dilakukan diawali dengan meletakkan straw yang telah diekuilibrasi 10 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 15 menit di dalam *styrofoam*.
- Penyimpanan semen beku : semen beku di simpan di dalam kontainer nitrogen cair.
- *Thawing* : pencairan kembali dilakukan di dalam *waterbath* bersuhu 37° C selama 30 detik.
- Pengamatan : Pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin dengan cara semen diambil dengan batang gelas dan diletakkan pada *object glass* kemudian ditetaskan pewarna eosin negrosin pada semen dan aduk perlahan sampai homogen selanjutnya dibuat preparat hapusan dan dianginkan sampai kering, selanjutnya preparat diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah spermatozoa yang

tidak menyerap warna (transparan) sebagai tanda spermatozoa masih hidup sedangkan pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan mengambil semen dari tempat penyimpanan dan ditetaskan diatas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif.

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan nyata, dilanjutkan dengan uji wilayah Duncan. Semua proses pengolahan data dilakukan dengan program SPSS 15.0 *for windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kualitas semen sapi bali yang digunakan dalam penelitian ini berada pada kisaran normal dan layak untuk diproses lebih lanjut (Tabel 4.2).

Tabel 4.1. Kualitas Semen Sapi Bali

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	8
Warna	Putih susu
Derajat keasaman (pH)	$\pm 6,8$
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi ($\times 10^6$ / ml)	1310
Motilitas (%)	75%
Daya hidup (%)	85%

Hasil penelitian efektivitas penambahan berbagai konsentrasi glutathion terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa *post thawing* pada perlakuan kontrol, G1, G2, dan G3 untuk rata-rata daya hidup secara berturut-turut adalah : $55,00 \pm 6,33$,

57,50 ± 4,18, 65,00 ± 4,47 dan 55,83 ± 5,85. Untuk motilitas progresif secara berturut-turut adalah : 53,33 ± 4,08, 56,67 ± 4,08, 63,33 ± 4,08 dan 54,17 ± 3,76. (Tabel 4.3).

Tabel 4.2. Rata-rata ± SD Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Sapi Bali *Post Thawing*

Perlakuan	Rata-rata Daya Hidup (%)	Rata-rata Motilitas (%)
Kontrol	55,00 ± 6,33	53,33 ± 4,08
G1	57,50 ± 4,18	56,67 ± 4,08
G2	65,00 ± 4,47	63,33 ± 4,08
G3	55,83 ± 5,85	54,17 ± 3,76

Setelah di analisis dengan pengujian statistik, hasil pengujian menunjukkan bahwa penambahan glutathion pada perlakuan memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing*.

Dengan uji wilayah Duncan diperoleh rata-rata persentase daya hidup spermatozoa menunjukkan bahwa penambahan glutathion dengan konsentrasi 1 mM memberikan hasil yang terbaik untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa sapi bali *post thawing* (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Uji Duncan Perlakuan terhadap Daya Hidup Spermatozoa Sapi Bali
Post Thawing

Perlakuan	Subset for alpha = ,05	
	1	2
Duncan ^a		
Kontrol	55,00	
0,5 mM	55,83	
1,5 mM	57,50	
1 mM		65,00
Sig.	,448	1,000

Setelah di analisis dengan pengujian statistik, hasil pengujian menunjukkan bahwa penambahan glutathion pada perlakuan memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing*.

Dengan uji Duncan diperoleh rata-rata persentase motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa penambahan glutathion dengan konsentrasi 1 mM memberikan hasil yang terbaik untuk mempertahankan motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing* (Tabel 4.4).

Tabel 4.4. Uji Duncan Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Bali Post Thawing

Perlakuan	Subset for alpha = ,05	
	1	2
Duncan ^a		
Kontrol		
0,5 mM	53,33	
1,5 mM	54,17	
1 mM	56,67	
Sig.		63,33
	,187	1,000

Pembahasan

Inseminasi buatan adalah salah satu bentuk bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak. Salah satu proses yang menjadi penyebab terbentuknya radikal bebas adalah proses penampungan, pengenceran dan penyimpanan. Dimana pada proses ini terjadi kontak antara semen dan udara yang menyebabkan radikal bebas terbentuk. Radikal bebas yang terbentuk dapat memicu terjadinya peroksidasi lemak membran sehingga akan menurunkan daya hidup dan motilitas spermatozoa (Sikka, 1996).

Dalam penelitian ini dilakukan penambahan berbagai konsentrasi glutathion (tanpa glutathion, 0,5 mM, 1 mM dan 1,5 mM) kedalam pengencer andromed untuk penyimpanan spermatozoa sapi bali *post thawing*. Dengan analisis uji sidik ragam perlakuan penambahan glutathion menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa. Uji lanjutan dengan uji wilayah Duncan menunjukkan bahwa penambahan glutathion dengan konsentrasi 1 mM memberikan hasil terbaik terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa sapi bali *post thawing*. Rizal (2005), melaporkan bahwa penambahan glutathion pada bahan pengencer Tris sitrat untuk pengencer semen domba yang disimpan beku memberikan perbedaan yang nyata terhadap kualitas semen setelah dilakukan *thawing*. Menurut Triwulanningsih *et al.* (2003), penambahan glutathion pada bahan pengencer Tris sitrat untuk pengencer semen sapi yang disimpan pada suhu 5° C memberikan perbedaan yang nyata terhadap kualitas semen.

Reaksi yang ditimbulkan oleh radikal bebas pada membran plasma sel (terutama pada asam lemak tak jenuh) akan membentuk radikal baru, yang jika bertemu dengan molekul lain akan terjadi lagi reaksi dan membentuk radikal baru juga. Demikian seterusnya sehingga terjadi reaksi berantai (*chain reaction*), dan apabila ini terjadi pada membran plasma sel, reaksi itu akan berhenti jika seluruh membran plasma sel telah mengalami kerusakan atau dihentikan dengan cara menambahkan senyawa antioksidan.

Kim *et al* (1999), melaporkan bahwa penambahan 1 mM glutathion dalam media fertilisasi pada proses pembuahan menghasilkan proses blastosis yang berbeda tergantung pada pejantan yang digunakan. Untuk pejantan yang memiliki tingkat kesuburan yang rendah secara proses *in vitro*, penambahan 1 mM glutathion menjadi efektif. Hal ini disebabkan oleh peningkatan ROS selama kultur *in vitro* yang dapat menyebabkan kerusakan sel spermatozoa. Sikka (1996), menyatakan bahwa ROS memiliki potensi implikasi pada proses reproduksi biologis, termasuk superoksida (O_2^-), anion hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal peroksida (ROO.), dan reaktif hidroksil (.OH). *Reaktive oxygen species (ROS)* menyebabkan peningkatan kerusakan DNA, protein dan lipid, meningkatkan stres oksida yang termasuk lipid peroksidase yang mampu menyebabkan penurunan motilitas, viabilitas (daya hidup), kapasitas, reaksi akrosom, dan fungsi spermatozoa pada umumnya akan menyebabkan penurunan kesuburan.

Konsentrasi glutathion yang memberikan hasil terbaik dalam penelitian ini adalah 1 mM, hal ini disebabkan karena konsentrasi ini merupakan konsentrasi yang tepat dan pada konsentrasi ini kemungkinan terjadi keseimbangan antara reaksi pengikatan radikal bebas oleh glutathion (GSH) dimana pada konsentrasi ini akan terbentuk GSSG oleh enzim GSH-peroksidase dengan GSSG menjadi GSH oleh enzim GSH-reduktase. Hal ini didukung oleh pendapat Kidd (1997) yang melaporkan bahwa keseimbangan penggunaan GSH oleh enzim GSH-peroksidase yang akan membentuk GSSG dan perubahan GSSG menjadi GSH oleh enzim GSH reduktase diatur secara homeostasis.

Pada konsentrasi 1,5 mM menunjukkan penurunan daya hidup dan motilitas spermatozoa yang paling rendah, hal ini kemungkinan terjadi karena pada konsentrasi glutathion yang berlebih dapat menimbulkan efek negatif yaitu terjadinya efek toksik dari glutathion yang menyebabkan kematian spermatozoa, hal ini sesuai dengan pernyataan Uysal and Bucak (2007).

Penambahan glutathion pada bahan pengencer semen untuk penyimpanan semen baik dalam bentuk semen cair dingin (*chilled semen*) maupun semen beku

(*frozen semen*) dapat mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa karena glutathion dapat mencegah terjadinya kerusakan membran plasma dan kematian spermatozoa akibat terjadinya peroksidasi lemak membran.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan glutathion dapat mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa *post thawing*. Penambahan glutathion dengan konsentrasi 1 mM menghasilkan daya hidup dan motilitas spermatozoa yang paling tinggi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap fertilitas sapi bali yang diinseminasikan dengan semen penambahan glutathion pada bahan pengencer andromed.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Dinas dan *staff* UPTD Peternakan Propinsi desa Baturiti, atas bantuannya selama penelitian, sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Chatterjee S., Smith ER., Hanada K., Stevens VL., Mayor S. 2001. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *EMBO J.* 20:1583–1592.
- Gadea J., Selles E., Ruiz S., Coy P., Romar R., Matas C., Campos I. 2000. Effect of the presence of glutathione in the thawing diluent on the penetrability capacity of porcine oocytes in vitro. Di dalam : *Proceedings 14 ICAR* : Stockholm, 2-6 Jul 2000. Abstract Vol 2, 17:11.
- Hardjosubroto W. 1994. Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan. PT. Gramedia Widiasarana Indonesia, Jakarta.

- Kidd PM. 1997. Glutathione : Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. *Alternative Medicine Review*. Volume 2, Number 3
- Kim IH., Van Langendonk A., Van Soom A., Vanroose G., Casi A.L., Hendriksen PJM., Bevers MM. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52:537-547.
- Rizal M. 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi β -karoten Terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. Skripsi Program Sarjana, Universitas Pattimura, Ambon.
- Sikka, Suresh C. 1996. Oxidative Stress and Role Of Antioxidants In Normal and Abnormal Sperm Function. Available from: www.bioscience.org.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angakasa, Bandung.
- Triwulanningsing, E., Situmorang P., Sugiarti, T., Sianturi, RG., Kusumaningrum DA. 2003. Pengaruh Penambahan Glutathione Pada Medium Pengencer Sperma Terhadap Kualitas Semen Cair. *JITV* 8 (2) 91-97
- Uysal O., Bucak MN. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *ACTA VET. BRNO* 2007, 76 : 383-390; doi:10.2754/avb200776030383