

Pola Gerakan Spermatozoa Sapi setelah Diinkubasi dalam Media Fertilisasi dengan Imbuhan Heparin dan/atau Kafein

*(MOVEMENT PATTERN OF BULL SPERM FOLLOWING
INCUBATION IN FERTILIZATION MEDIA SUPPLEMENTED
WITH HEPARIN AND/OR CAFFEINE)*

**Achmad Setiyono¹, Mohamad Agus Setiadi^{1,2},
Ekayanti Mulyawati Kaiin³, Ni Wayan Kurniani Karja^{1,2*}**

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana;

²Divisi Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 Indonesia,

Telp: (0251) 8626460, Fax: (0251) 8623940

³Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,

Jl. Raya Bogor km. 46, 16911 Indonesia.

Email: karjanwk13@gmail.com

ABSTRACT

Motility and movement patterns of spermatozoa are important factors to support the occurrence of the process of *in vitro* fertilization. Therefore, this research was conducted to determine the effect of the addition of heparin and caffeine singly or combination on the status of spermatozoa movement patterns during the *in vitro* capacitation. Thawed frozen semen was incubated in fertilization media only or added with 2 mM caffeine, 10 µg/mL heparin, and a combination of 2 mM caffeine and 10 µg/mL heparin for 60 minutes. Total motility, progressive motility and spermatozoa movement patterns (curvilinear velocity, VCL; linearity, LIN and amplitude of lateral displacement, ALH) were evaluated using computer-assisted sperm analysis (CASA). The evaluation was carried out before incubation or 0 minutes and consecutively at 15 minutes, 30 minutes and 60 minutes after incubation at 38.5 °C and 5% CO₂. The results showed that spermatozoa VCL did not differ in each treatment with different time periods (P>0.05), except for MF-Caf-2. The LIN percentage in MF-Caf-5 was found to be lower than other treatments until the 30 minute (P<0.05), then at the 30 minutes the value was the same as MF-Caf-2 (P>0.05). Immediately before incubation, sperm ALH in MF-Caf-5 was higher than MF (P<0.05), but did not differ from MF-Caf-2 and MF-Hep-10 (P>0.05). Spermatozoa experience hyperactive motility on caffeine-containing media during the incubation period. Total spermatozoa motility begins to decrease in the 30 minutes in MF and MF-Hep-10 and in the 60 minutes in MF-Caf-2 (P<0.05). Total spermatozoa motility between treatments in the same time period was also found to be no different (P>0.05), but progressive motility at the 60 minutes was higher in MF-Caf-5-Hep-10 when compared to MF-Caf-2-Hep-10 (P<0.05). These findings showed that the addition of caffeine singly or combination with heparin can induce hyperactivation and there is no significant decrease in motility for 60 minutes during the incubation period.

keywords: heparin, caffeine, motility, spermatozoa

ABSTRAK

Motilitas dan pola gerakan spermatozoa merupakan faktor yang penting untuk mendukung terjadinya proses fertilisasi secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penambahan heparin dan kafein secara tunggal maupun kombinasi terhadap status pola gerakan spermatozoa selama proses kapasitasasi *in vitro*. Semen beku yang sudah di-*thawing* diinkubasi di dalam media fertilisasi saja atau ditambahkan dengan kafein 2 mM, heparin 10 µg/mL, dan kombinasi kafein 2 mM dan heparin 10

$\mu\text{g/mL}$ selama 60 menit. Motilitas total, motilitas progresif dan pola gerakan spermatozoa (*curvilinear velocity*, VCL; *linearity*, LIN dan *amplitude of lateral displacement*, ALH) dievaluasi menggunakan *computer assisted sperm analysis* (CASA). Evaluasi dilakukan sebelum inkubasi atau menit ke-0 dan berturut-turut pada menit ke-15, ke-30 dan menit ke-60 menit setelah inkubasi di suhu $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $5\% \text{ CO}_2$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa VCL spermatozoa tidak berbeda pada setiap perlakuan dengan periode waktu yang berbeda ($P>0.05$), kecuali pada MF-Caf-2. Persentase LIN pada MF-Caf-5 ditemukan lebih rendah dibandingkan perlakuan lainnya sampai pada menit ke-30 ($P<0.05$), kemudian pada menit ke-30 nilainya sama dengan MF-Caf-2 ($P>0.05$). Segera sebelum inkubasi, ALH spermatozoa pada MF-Caf-5 lebih tinggi daripada MF ($P<0.05$), tetapi tidak berbeda dengan MF-Caf-2 dan MF-Hep-10 ($P>0.05$). Spermatozoa mengalami hiperaktif motilitas pada media yang mengandung kafein selama periode inkubasi. Motilitas total spermatozoa mulai menurun pada menit ke-30 pada MF dan MF-Hep-10 serta pada menit ke-60 pada MF-Caf-2 ($P<0.05$). Motilitas total spermatozoa antar perlakuan pada periode waktu yang sama juga ditemukan tidak berbeda ($P>0.05$), tetapi motilitas progresif pada menit ke-60 lebih tinggi pada MF-Caf-5-Hep-10 jika dibandingkan dengan MF-Caf-2-Hep-10 ($P<0.05$). Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan kafein secara tunggal atau dikombinasikan dengan heparin dapat menginduksi terjadinya hiperaktivasi dan tidak terjadi penurunan motilitas secara signifikan selama 60 menit selama periode inkubasi.

Kata-kata kunci: spermatozoa; motilitas; heparin; kafein

PENDAHULUAN

Preparasi spermatozoa merupakan salah satu tahapan dalam proses fertilisasi *in vitro*. Preparasi spermatozoa diperlukan untuk menginduksi terjadinya kapasitasi pada spermatozoa, sehingga memiliki kompetensi untuk membuahi oosit. Secara *in vivo*, spermatozoa akan mengalami perubahan gerakan menjadi lebih hiperaktif dan diikuti dengan reaksi akrosom setelah menempel pada oosit (Sagare-patil *et al.* 2013). Perubahan gerakan spermatozoa menjadi lebih aktif merupakan salah satu bagian dari kapasitasi. Selama kapasitasi, beberapa protein pada spermatozoa akan mengalami fosforilasi termasuk protein yang terdapat pada ekor sehingga menyebabkan spermatozoa mengalami hiperaktivasi (Marquez dan Suarez 2004). Perubahan gerakan spermatozoa tersebut menyebabkan spermatozoa dapat bergerak lebih cepat dan mempunyai kekuatan yang cukup untuk membantu menembus sel kumulus dan zona pelusida (Suarez 2008; Kato *et al.* 2010).

Induksi hiperaktif motilitas spermatozoa secara *in vitro* dapat dilakukan dengan menginkubasi spermatozoa di dalam media kapasitasi (Arai *et al.* 2019) yang diberi imbuhan zat kimia seperti *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), kafein dan *methylxanthine* (Mbizvo *et al.* 1993). Beberapa peneliti melaporkan bahwa penambahan kafein di dalam media fertilisasi dapat menginisiasi terjadinya hiperaktif motilitas (Colás *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2011). Kafein merupakan turunan dari *methylxanthine* yang dapat menghambat aktivitas enzim fosfodiesterase (Yamaguchi *et al.* 2013).

Penghambatan enzim fosfodiesterase dapat mengurangi kerusakan cAMP (Mbizvo *et al.* 1993) dan meningkatkan konsentrasi cAMP intraseluler (El-Gaafary *et al.* 1990). Menurut Barakat *et al.* (2015), kafein dapat memiliki efek secara langsung pada metabolisme seluler. Lebih lanjut kafein juga dilaporkan dapat mencegah terjadinya kerusakan pada membran plasma spermatozoa dan mempertahankan motilitas dalam jangka waktu yang panjang (Ho dan Suarez 2001; El-Bahrawy 2017), serta menginduksi kapasitasi (Rota *et al.* 2019). Bahan lain yang dapat menginduksi terjadinya kapasitasi adalah heparin (Kim *et al.* 2013). Penambahan heparin dilaporkan dapat meningkatkan kapasitasi dan motilitas pada spermatozoa sapi (Mor *et al.* 2007). Marquez dan Suarez (2004) melaporkan bahwa heparin dapat menginduksi terjadinya kapasitasi pada spermatozoa, namun tidak dapat menginisiasi terjadinya hiperaktif motilitas. Oleh karena itu, heparin dan kafein sering ditambahkan secara bersamaan sehingga dapat bekerja sinergis dalam menginduksi kapasitasi (Park *et al.* 1989), meningkatkan hiperaktivasi dan jumlah spermatozoa yang berpenetrasi ke dalam oosit (Kim *et al.* 2002).

Pola gerakan spermatozoa dapat dievaluasi dengan menggunakan *computer assisted sperm analysis* (CASA) berdasarkan nilai *curvilinear velocity* (VCL), *linearity* (LIN), *amplitude of lateral displacement* (ALH) (Hinrich dan Loux 2012), motilitas total dan motilitas progresif (Verstegen *et al.* 2002). Dibandingkan dengan penilaian kualitas spermatozoa secara objektif, penilaian spermatozoa dengan menggunakan CASA dapat menilai dengan terperinci dan

tingkat akurasi yang tinggi (Verstegen *et al.* 2002; Shojaei *et al.* 2012). Nilai VCL, ALH yang tinggi serta persentase LIN yang rendah dapat menggambarkan spermatozoa mengalami hiperaktif (Bernecic *et al.* 2019). Sedangkan nilai VCL, ALH dan motilitas total merupakan parameter yang mempengaruhi kemampuan spermatozoa untuk berpenetrasi melewati mukus serviks dan zona pelusida (Verstegen *et al.* 2002; Taberner *et al.* 2010). Heparin dan kafein dapat memengaruhi motilitas spermatozoa (Chamberland *et al.* 2001 dan Barakat *et al.* 2015), namun dilaporkan kafein dengan konsentrasi yang tinggi dapat menjaga motilitas lebih lama tetapi dapat menginduksi reaksi akrosom spontan (Yamaguchi *et al.* 2013 El-Bahrawy 2017). Sebagai akibatnya spermatozoa tidak dapat mempenetrasi oosit (Demyda-Peyras *et al.* 2012). Sejalan dengan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penambahan heparin dan kafein secara tunggal maupun kombinasi dalam media fertilisasi terhadap pola gerakan spermatozoa setelah diinkubasi secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

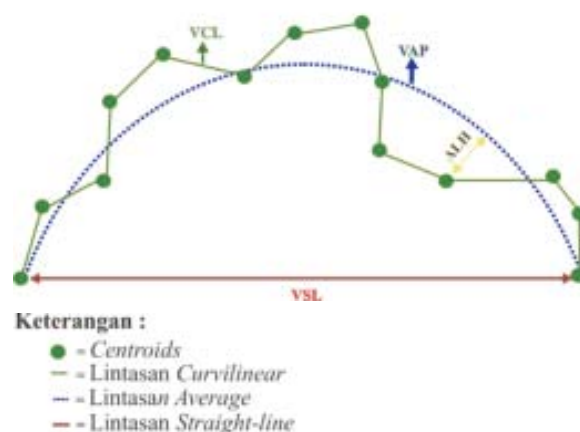
Preparasi Spermatozoa

Spermatozoa yang digunakan yaitu semen beku sapi Brahman yang diperoleh dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. Preparasi sperma menurut Setiadi dan Karja (2013) menggunakan teknik *washing* dengan modifikasi media fertilisasi Suzuki *et al.* (2000). Semen beku di-*thawing* dan dimasukkan ke dalam media fertilisasi, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang dan pelet disisakan sekitar 200 μ L. Pelet spermatozoa ditambahkan dengan media fertilisasi sampai konsentrasi 5×10^6 spermatozoa/mL. Rancangan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) dengan enam perlakuan dan tiga ulangan. Media fertilisasi yang digunakan yaitu: (1) media fertilisasi dasar tanpa ditambahkan kafein (Sigma Cat. #C4144) dan heparin (Sigma Cat. #H3393) (perlakuan MF), (2) media ditambah dengan kafein 2 mM (perlakuan MF-Caf-2), (3) media ditambah kafein 5 mM (perlakuan MF-Caf-5), (4) media ditambah heparin 10 mg/mL (perlakuan MF-Hep-10), serta (5) media kombinasi kafein 2 mM dan heparin 10 mg/mL (perlakuan MF-Caf-2-Hep-10), atau (6) media kombinasi kafein 5 mM dan heparin 10 mg/mL

(perlakuan MF-Caf-5-Hep-10). Setiap perlakuan spermatozoa diinkubasi dalam inkubator (Thermo Scientific) dengan kadar CO₂ 5 % dan temperatur 38.5 °C selama 0, 15, 30 dan 60 menit.

Penilaian Pola Gerakan Spermatozoa

Pada setiap akhir periode inkubasi, motilitas total, motilitas progresif dan pola gerakan spermatozoa (VCL, LIN, dan ALH) dievaluasi dengan menggunakan *computer assisted sperm analysis* (CASA Sperm Vision™ 3.7 Minitube, Germany), yang dihubungkan dengan mikroskop Zeiss Axio Scope A1. Evaluasi dilakukan dengan cara meneteskan sedikit semen di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup. Sampel diletakkan pada mikroskop (Zeiss Axio Scope A1) dan analisis dilakukan dari 5 lapang pandang. Menurut Amann dan Weberski (2014), rata-rata waktu kecepatan pergerakan kepala spermatozoa sepanjang lintasan *curvilinear* atau VCL (μ m/s); dan ALH (μ m) merupakan rata-rata jarak penyimpangan setiap *centroids* dari lintasan *average*. *Linearity* (LIN; %) merupakan kelurusan lintasan *curvilinear*, yang didapatkan dari VSL/VAP x 100 (Verstegen *et al.* 2002) (Gambar 1). Lebih lanjut, menurut Susilawati (2011), motilitas total merupakan semua sel spermatozoa yang motil dan tidak termasuk sel yang tidak motil, sedangkan motilitas progresif adalah semua sel yang bergerak maju ke depan dan tidak termasuk yang bergerak lokal atau sel sperma yang hidup tetapi bergerak maju sangat sedikit.



Gambar 1. Terminologi pola gerak spermatozoa dengan CASA (Amann dan Weberski 2014).

Analisis Statistik

Data disajikan dalam bentuk persentase ± *standart error mean* (SEM), selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan *one-way-anova* (6x4) dengan program SAS 9.4. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap variabel yang dievaluasi, maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola Gerakan

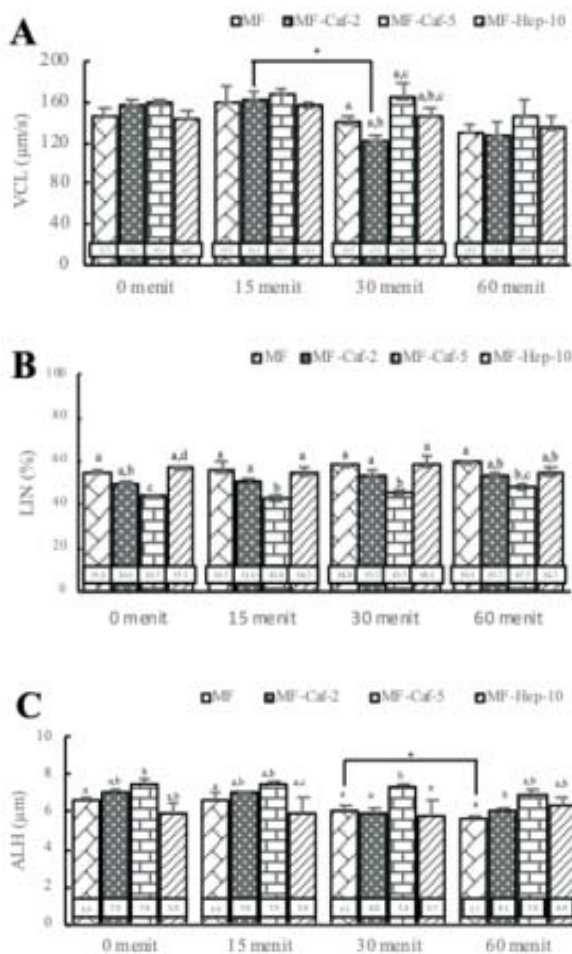
Pola gerakan spermatozoa setelah diinkubasi dalam media fertilisasi yang diberi imbuhan heparin dan kafein pada penelitian ini terdapat pada Gambar 2. Pola gerakan spermatozoa yang dievaluasi yaitu VCL (Gambar 2A), LIN (Gambar 2B), dan ALH (Gambar 2C).

Curvilinear Velocity

Berdasarkan Gambar 2A, nilai VCL tidak berbeda antar perlakuan MF, MF-Caf-2, MF-Caf-5 dan MF-Hep-10 pada menit ke-0 (147.2, 158.3 161.0 dan 144.7 µm/s, berturut-turut) (segera sebelum inkubasi), menit ke-15 (160.2, 163.4, 168.1 dan 156.1 µm/s, berturut-turut) dan ke-60 (130.8, 128.0, 147.0 dan 134.5 µm/s, berturut-turut) (P>0.05), sedangkan pada menit ke-30 nilai VCL pada perlakuan MF-Caf-2 nyata lebih rendah dibandingkan perlakuan MF-Caf-5 (123.0 vs 164.4 µm/s) (P<0.05). Nilai VCL spermatozoa tidak berbeda pada perlakuan yang sama dengan periode waktu yang berbeda (P>0.05), kecuali pada perlakuan MF-Caf-2. Nilai VCL spermatozoa pada perlakuan MF-Caf-2 mengalami penurunan pada menit ke-30 setelah inkubasi dibandingkan dengan menit ke-15 (P<0.05). Pada Gambar 3, ketika kafein dengan konsentrasi 2 dan 5 mM dikombinasikan dengan heparin 10 µg/mL, terdapat perbedaan nilai VCL antar perlakuan pada periode waktu yang sama (P<0.05) kecuali pada periode inkubasi 15 menit (P>0.05). Nilai VCL pada perlakuan MF-Caf-2-Hep-10 dengan periode inkubasi 15 dan 30 menit nyata lebih tinggi (P<0.05) dibandingkan dengan periode inkubasi 60 menit tetapi lebih rendah dari 0 menit (P<0.05) (Gambar 4A).

Data tersebut mengindikasikan bahwa bahwa pemberian kafein 5 mM secara tunggal atau dikombinasikan dengan heparin 10 mg/mL tidak berpengaruh nyata terhadap nilai VCL pada semua periode inkubasi. Sedangkan hasil penelitian Yeste *et al.* (2008) menunjukkan

bahwa penambahan kafein dari konsentrasi 0.5 sampai 2 mM pada media kriopreservasi dapat menyebabkan penurunan nilai VCL. Nilai VCL dapat dibedakan menjadi: cepat (>90 µm/s), sedang (45-90 µm/s), lambat (10-45 µm/s) dan statis atau imotil (<10 µm/s) (Křížková *et al.* 2017). Secara umum, selama inkubasi fertilisasi *in vitro* spermatozoa menunjukkan berenang cepat. Spermatozoa yang diinkubasi dengan kafein 5 mM yang dikombinasikan dengan heparin maupun ditambahkan secara tunggal memperlihatkan kecepatan berenang lebih cepat dibandingkan dengan kelompok lain dan tidak mengalami penurunan selama inkubasi.



Gambar 2. Pola gerakan spermatozoa yang ditambahkan heparin atau kafein secara tunggal pada media fertilisasi. (A. *curvilinear velocity* atau VCL; B. *linearity* atau LIN; C. *amplitude of lateral displacement* atau ALH. Huruf ^{a,b,c} pada waktu inkubasi yang sama dan tanda * pada perlakuan yang sama dengan waktu inkubasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan (P<0.05).

Linearity

Pada periode waktu yang sama (0, 15, 30 dan 60 menit), tidak ditemukan adanya perbedaan ($P>0.05$) persentase LIN antara perlakuan MF (55.0, 55.7, 58.0 dan 59.3 %) dengan MF-Caf-2 (50.0, 51.0, 53.7 dan 53.7 %) dan MF-Hep-10 (57.3, 54.3, 58.3 dan 54.7 %) (Gambar 2B). Sedangkan, persentase LIN pada perlakuan MF-Caf-5 (43.0 %) ditemukan lebih rendah dibandingkan perlakuan lainnya sampai pada menit ke-30 periode inkubasi ($P<0.05$), kemudian pada menit ke-60 nilainya sama dengan perlakuan MF-Caf-2 (53.7 %) dan MF-Hep-10 (54.7 %) ($P>0.05$). Persentase LIN spermatozoa antar perlakuan yang sama pada periode waktu yang berbeda tidak berbeda. Persentase LIN berbeda antar perlakuan pada setiap periode waktu yang sama ($P<0.05$), tetapi tidak berbeda pada semua perlakuan pada periode waktu yang berbeda ($P>0.05$). Perlakuan MF-Caf-5-Hep-10 menunjukkan persentase LIN lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan MF-Caf-2-Hep-10 sepanjang periode inkubasi (43.0 % vs 49.3 %; 44.3 % vs 49.0 %; 44.7 % vs 53.0 % dan 45.7 % vs 51.7 %).

Selama inkubasi semua perlakuan menunjukkan berenang linier dengan kisaran nilai LIN 43-59%. Spermatozoa berenang *linier* apabila nilai LIN $> 35\%$ dan berenang *non linear* ketika nilai LIN $< 35\%$ (González-Abreu *et al.* 2017; Susilawati 2011). Nilai LIN pada spermatozoa dapat menandakan karakteristik arah gerakan atau kelurusan berenang spermatozoa (El-Bahrawy *et al.* 2017). Namun, spermatozoa yang diinkubasi dengan kafein 5 mM menunjukkan nilai *linearity* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya. Colás *et al.* (2009) menjelaskan bahwa kafein dapat menurunkan persentase LIN sejak awal inkubasi. Penurunan persentase LIN selama inkubasi menunjukkan perubahan spermatozoa dari kondisi tidak terkapasitasi menjadi kapasitasi (Herreros *et al.* 2005). Penurunan LIN pada spermatozoa dapat mengindikasikan bahwa terjadi pembengkokan bagian tengah ekor yang berlebihan dan menunjukkan bahwa spermatozoa mengalami hiperaktivasi (El-Bahrawy 2017).

Amplitude of lateral displacement

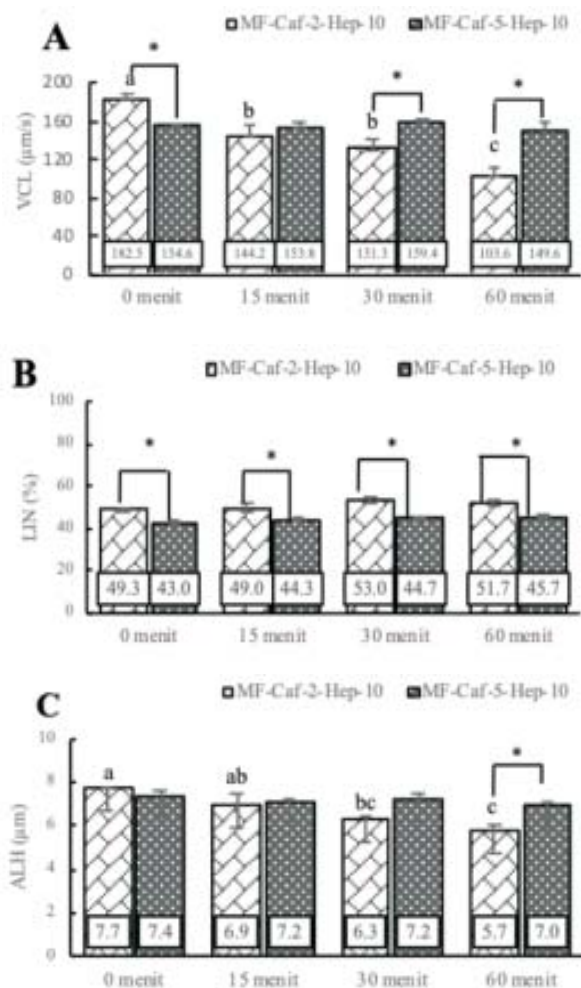
Nilai ALH disajikan pada Gambar 2C. Segera sebelum inkubasi, nilai ALH spermatozoa pada perlakuan MF-Caf-5 nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan MF (7.6 μm vs 6.6 μm) ($P<0.05$), akan tetapi tidak

berbeda dengan perlakuan MF-Caf-2 (7.0 μm) dan MF-Hep-10 (5.9 μm) ($P>0.05$). Lima belas menit setelah inkubasi, nilai ALH perlakuan MF-Hep-10 (5.9 μm) nyata lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan MF-Caf-2 (7.0 μm) dan MF-Caf-5 (7.5 μm) ($P<0.05$). Pada menit ke-60, nilai ALH (5.7-7.0 μm) tidak berbeda antara perlakuan MF-Caf-2 (6.1 μm), MF-Caf-5 (7.0 μm) dan MF-Hep-10 (6.4 μm) ($P>0.05$). Demikian halnya dengan nilai ALH pada perlakuan yang sama dalam waktu yang berbeda tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0.05$), kecuali pada perlakuan MF dengan periode inkubasi 60 menit mempunyai nilai ALH yang nyata lebih rendah ($P<0.05$) dibandingkan dengan nilai ALH pada periode inkubasi 30 menit. Sedangkan nilai ALH terendah terdapat pada perlakuan MF-Caf-2-Hep-10 dengan periode inkubasi 30 dan 60 menit. Nilai tersebut nyata ($P<0.05$) lebih rendah dibandingkan dengan nilai ALH pada periode inkubasi 0 menit dan 15 menit.

ALH merupakan lebar osilasi kepala saat spermatozoa bergerak (Verstegen *et al.* 2002) dan indikator pergerakan perputaran flagelum spermatozoa (Suarez 2008). Spermatozoa mengalami perubahan gerakan menjadi hiperaktif salah satunya dengan pengamatan ALH (green dan fishel 1999). Sedangkan menurut Chatiza *et al.* (2012), perubahan pola gerakan merupakan aktivitas dari flagelum dapat terjadi karena spermatozoa mengalami kapasitasi. Spermatozoa mengalami perubahan hiperaktif motilitas dengan nilai ALH $e^{\text{''}} 7 \mu\text{m}$ (green dan fishel 1999; Verstegen *et al.* 2002) dan dapat melewati lendir serviks ketika nilai ALH $e^{\text{''}} 4.5 \mu\text{m}$ (Mortimer 1997). Peningkatan perputaran pada flagelum diperlukan spermatozoa untuk meningkatkan daya dorong ketika spermatozoa melakukan penetrasi melawati *cumulus oophorus* dan lapisan glikoprotein zona pelusida (Kato *et al.* 2010; Ishimoto dan Gaffney 2016; Harayama 2018). pada perlakuan media fertilisasi tanpa kafein dan heparin mengalami penurunan ALH. Penurunan ALH dapat disebabkan karena spermatozoa telah kehilangan energi dalam jumlah besar akibat dari peristiwa hiperaktif motilitas (Tesarik *et al.* 1990).

Hiperaktif Motilitas

Selama periode inkubasi, spermatozoa akan mengalami perubahan pola gerakan menjadi hiperaktif motilitas. Menurut Shojaei *et al.* (2012) terdapat tiga kriteria dalam perubahan



Gambar 3. Pola gerakan spermatozoa yang ditambahkan kombinasi heparin dan kafein pada media fertilisasi. (A. *curvilinear velocity* atau VCL; B. *linearity* atau LIN; C. *amplitude of lateral displacement* atau ALH). Huruf ^{a,b,c} pada perlakuan sama dengan waktu inkubasi yang berbeda dan tanda * pada perlakuan berbeda dengan waktu inkubasi yang sama menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0.05$).

pada pola motilitas yaitu; mendorong terjadinya motilitas progresif, fase transisi ke hiperaktif motilitas dan hiperaktif motilitas. Perubahan terhadap motilitas dapat membantu spermatozoa berenang lebih cepat dan menghasilkan hentakan pada flagelum untuk berenang melalui epitel isthmus, berpindah ke ampula, serta melakukan penetrasi ke sel kumulus dan zona pelusida selama fertilisasi *in vivo* (Kato *et al.* 2010; Harayama 2018). Penelitian Shojaei *et al.* (2012) menjelaskan bahwa penentuan spermatozoa mengalami perubahan gerakan menjadi hiperaktif motilitas ketika nilai ALH >

7 µm, LIN < 65% dan VCL > 80 µm. Berdasarkan nilai tersebut, spermatozoa mengalami hiperaktif motilitas dapat terjadi ketika hanya ditambahkan dengan kafein. Pemberian kafein dengan konsentrasi 5 mM dapat menginisiasi terjadinya hiperaktivasi tetapi juga dapat mempertahankan hiperaktivasi. Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya bahwa penambahan kafein dengan konsentrasi 5-10 mM berpotensi sebagai stimulator hiperaktif motilitas pada spermatozoa manusia, sapi, badak dan gajah (Horst *et al.* 2018). Sedangkan penambahan kafein 2 mM belum dapat mempertahankan hiperaktivasi sepanjang periode inkubasi.

Jika ditelaah lebih lanjut kafein dapat mengubah motilitas spermatozoa menjadi hiperaktif motilitas dengan cepat (Marquez dan Suarez 2004) karena kafein memungkinkan masuknya Ca^{2+} yang berasal dari ekstraseluler ke dalam sel spermatozoa (Ho dan Suarez 2001; Colás *et al.* 2009). Hal tersebut dapat terjadi karena kafein mampu memengaruhi permeabilitas (Marquez dan Suarez 2004) dan mengaktifkan kanal Ca^{2+} pada membran plasma (Colás *et al.* 2009) yang hanya terdapat pada aksonema flagelum (Ho dan Suarez 2001). Sedangkan peningkatan Ca^{2+} dapat mempercepat ATP-ase pada *dynein* (Moraes dan Meyers 2018), sehingga *dynein* mengubah energi kimia ATP dan menjadi motor penggerak spermatozoa (Thompson *et al.* 2018). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler akan didistribusikan ke satu sisi aksonem yang dapat mengakibatkan perubahan gerakan flagelum menjadi asimetris (Ho dan Suarez 2001) dan memutar (Herrerros *et al.* 2015). Hal tersebut dapat terjadi karena penyimpanan Ca^{2+} yang terdapat pada daerah leher spermatozoa didistribusikan secara asimetris (Ho dan Suarez, 2001). Oleh karenanya, pada saat hiperaktif motilitas spermatozoa yang diinkubasi dengan kafein menunjukkan pergerakan asimetris dengan terjadinya penurunan persentase LIN.

Penurunan hiperaktif motilitas dapat terjadi karena responsif terhadap akrosom karena peningkatan *protein tyrosine phosphorylation* (Marquez dan Suarez, 2004). Selain itu, dengan terdapatnya heparin pada perlakuan kombinasi antara kafein 2 mM dan heparin 10 mg/mL dapat mempercepat berakhirnya hiperaktivasi motilitas. Berbeda mekanisme dengan kafein, heparin selama periode inkubasi berikatan dengan protein membran plasma yang menyebabkan hilangnya

kolesterol dan fosfolipid, hal tersebut menyebabkan peningkatan Ca^{2+} pertama kali terjadi pada akrosom (Parrish, 2014) dan peningkatan cAMP (Marquez dan Suarez, 2004) serta *protein tyrosine phosphorylation* (Kumaresan *et al.*, 2019). Sedangkan *protein tyrosine phosphorylation* dapat menyebabkan spermatozoa menjalani reaksi akrosom serta terjadinya hiperaktif motilitas prematur (Suarez, 2008). Hal tersebut sejalan dengan pendapat Benercic *et al.* (2019) bahwa spermatozoa sapi yang diinkubasi dengan heparin tidak menginisiasi terjadinya hiperaktivasi motilitas.

Motilitas Total

Motilitas adalah satu dari karakteristik spermatozoa yang sangat penting yang dihubungkan dengan kemampuan spermatozoa untuk membuahi oosit. Persentase total motilitas pada penelitian ini dinilai dengan menggunakan CASA (Tabel 1). Total motilitas spermatozoa ditemukan tidak berbeda antar perlakuan pada periode waktu yang sama. Total motilitas mulai menurun pada menit ke-30 pada perlakuan MF (68.8%) dan MF-Hep-10 (66.5%) serta perlakuan MF-Caf-2 (63.7%) terjadi penurunan pada menit ke-60 ($P < 0.05$). Total motilitas spermatozoa pada perlakuan MF-Caf-5 tidak berbeda mulai dari sejak diinkubasi sampai menit ke-60. Motilitas total spermatozoa yang diinkubasi pada media fertilisasi dengan imbuhan kafein dan heparin disajikan pada Tabel 2. Motilitas total spermatozoa antar perlakuan pada periode waktu yang sama juga ditemukan tidak berbeda ($P > 0.05$). Penurunan motilitas total pada perlakuan MF-Caf-2-Hep-10 terjadi pada menit ke-60 (42.7%).

Pada penelitian ini, spermatozoa pada media yang ditambahkan kafein 5 mM memperlihatkan nilai motilitas total yang tidak berbeda pada semua periode inkubasi yang dicobakan. Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Colás *et al.* (2009) dan Hamza *et al.* (2018) bahwa penambahan kafein dapat memperpanjang waktu motilitas selama periode inkubasi sebelum fertilisasi. Hal ini diakibatkan karena kafein diketahui dapat menghambat aktivitas enzim fosfodiesterase (Yamaguchi *et al.* 2013). Penghambatan enzim fosfodiesterase dapat meningkatkan konsentrasi cAMP intraseluler (El-Gaafary *et al.*, 1990) dan mengurangi kerusakan cAMP (Mbizvo *et al.*, 1993). Selain itu, kafein juga dilaporkan meningkatkan pemanfaatan fruktosa (Milani *et*

al., 2010) dengan menginduksi penguraian glikogen menjadi gula sederhana, yang dapat digunakan spermatozoa dalam waktu yang lama sehingga dapat menjaga motilitas dan gerakan kinetik spermatozoa (El-Bahrawy 2017). Heparin dapat mengakibatkan penurunan motilitas total lebih cepat. Penggunaan heparin dengan dosis yang tidak tepat dapat menyebabkan tidak efektifnya pengaruh heparin. Menurut Lu dan Siedel (2004), spermatozoa sapi memperlihatkan perbedaan kebutuhan konsentrasi heparin untuk menginduksi kapasitas. Hal ini dapat terjadi karena heparin dapat meningkatkan aktivitas mitokondria spermatozoa (Córdoba *et al.*, 2006), oksidasi mitokondria (Fernández dan Córdoba, 2017) dan memicu penurunan metabolisme asam amino (Fernández dan Córdoba, 2016). Peningkatan aktivitas mitokondria dapat menyebabkan terjadinya kerusakan dan penuaan yang dapat berdampak pada penurunan motilitas (Ahmad *et al.*, 2015). Hal tersebut disebabkan karena spermatozoa mungkin tidak menghasilkan ATP yang memadai untuk melakukan pergerakan motilitas (Farahi *et al.*, 2018). Heparin diketahui dapat menyebabkan pengurangan cadangan energi yang dapat berdampak terhadap penurunan motilitas karena terjadi percepatan metabolisme (Chamberland *et al.*, 2001). Sedangkan, energi yang dihasilkan digunakan spermatozoa untuk menjaga motilitas, terutama untuk menjalani proses hiperaktivasi dan *protein phosphorylation* (Fernández dan Córdoba, 2018). Selain itu, penelitian Fernández dan Córdoba (2017) menunjukkan bahwa tanpa adanya cAMP, spermatozoa yang diinduksi dengan heparin akan memetabolisme laktat dalam jumlah yang besar. Lebih lanjut, penurunan ketersediaan laktat dan piruvat dapat terjadi selama inkubasi kapasitas (El-Shahat *et al.*, 2016). Ketersediaan piruvat dan laktat diperlukan spermatozoa untuk menghasilkan ATP yang dapat digunakan untuk menjaga motilitas (Colás *et al.*, 2009) dan mempertahankan motilitas (Peña *et al.*, 2012). Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian kafein dengan konsentrasi 5 mM dapat mencegah terjadinya penurunan motilitas total.

Motilitas Progresif

Motilitas progresif spermatozoa ditemukan tidak berbeda antar perlakuan pada periode waktu yang sama (Tabel 1). Sedangkan perlakuan MF, MF-Caf-2, dan MF-Hep-10 mulai

Tabel 1, Motilitas spermatozoa setelah diinkubasi di media fertilisasi dengan heparin atau kafein secara tunggal.

Perlakuan	Waktu Inkubasi (menit)	Motilitas (% ± SEM)	Progresif Motilitas (% ± SEM)
MF	0	75,4±0,7 ^a	65,0±0,8 ^a
	15	73,2±0,9 ^{ab}	65,4±1,0 ^a
	30	68,8±1,2 ^{bc}	55,5±1,6 ^b
	60	62,0±3,2 ^c	49,8±3,7 ^b
MF-Caf-2	0	76,8±1,2 ^m	66,1±1,7 ^m
	15	75,3±1,1 ^m	64,1±1,8 ^m
	30	70,6±2,4 ^{mn}	55,1±2,4 ⁿ
	60	63,7±0,3 ⁿ	47,6±2,7 ⁿ
MF-Caf-5	0	76,5±1,3	67,6±1,0 ^t
	15	75,1±2,3	65,2±1,6 ^t
	30	72,8±2,5	62,7±1,2 ^t
	60	69,5±1,4	54,2±3,5 ^u
MF-Hep-10	0	72,6±2,9 ^x	63,9±3,6 ^x
	15	69,5±4,3 ^x	58,4±4,8 ^x
	30	66,5±3,9 ^y	55,7±3,0 ^y
	60	64,6±1,5 ^y	52,3±2,7 ^y

Keterangan: Huruf ^(a,b,c; m,n; t,u; x,y) pada perlakuan yang sama dengan waktu inkubasi berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P<0.05).

Tabel 2. Motilitas spermatozoa setelah diinkubasi di media fertilisasi dengan kombinasi heparin dan kafein.

Perlakuan	Waktu Inkubasi (menit)	Motilitas (% ± SEM)	Progresif Motilitas (% ± SEM)
MF-Caf-2-Hep-10	0	76,4±0,7 ^a	66,2±1,2 ^a
	15	72,0±4,6 ^a	60,9±4,3 ^{ab}
	30	66,7±3,5 ^{ab}	52,5±2,0 ^b
	60	61,8±4,9 ^b	42,7±5,6 ^{c,*}
MF-Caf-5-Hep-10	0	75,8±2,0	6,5±2,3
	15	72,7±0,9	58,8±1,8
	30	69,9±1,8	58,5±1,8
	60	68,4±1,2	54,4±1,0 [*]

Keterangan: Huruf ^(a,b,c) pada perlakuan yang sama dengan waktu berbeda dan tanda ^(*) pada perlakuan berbeda dengan waktu inkubasi yang sama menunjukkan adanya perbedaan (P<0.05).

terjadi penurunan motilitas progresif pada menit ke-30 (P<0.05). Motilitas progresif spermatozoa pada perlakuan MF-CAF-5 menurun setelah menit ke-60 masa inkubasi (P<0.05). Lebih lanjut, persentase motilitas progresif pada perlakuan MF-Caf-2-Hep-10 lebih rendah dibandingkan perlakuan MF-Caf-5-Hep-10. Motilitas progresif pada menit ke-60 lebih tinggi pada perlakuan MF-Caf-5-Hep-10 jika dibandingkan dengan perlakuan MF-Caf-2-Hep-

10 (54.4 % vs 42.7 %) (P<0.05). Motilitas progresif terjadi pada menit ke-30 masa inkubasi (58.8 %) (P<0.05). Motilitas progresif tidak ditemukan adanya penurunan pada kedua perlakuan inkubasi (P>0.05) pada perlakuan kombinasi heparin dan kafein sampai menit ke-60 masa inkubasi.

Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian kafein dengan konsentrasi 5 mM juga dapat mempertahankan motilitas progresif

walaupun dikombinasikan dengan heparin. Menurut Rota *et al.* (2019) penambahan kafein 5 mM dapat mempertahankan motilitas total, motilitas progresif dan *velocity* dari spermatozoa. Sedangkan spermatozoa yang diinkubasi dengan kafein 5 mM menunjukkan pola pergerakan hiperaktif. Hal tersebut dapat terjadi karena spermatozoa masih dalam tahap transisi hiperaktivasi. Menurut Verstegen *et al.* (2002) bahwa transisi dari gerakan progresif ke hiperaktif adalah hiperaktif progresif. Terdapat empat tipe pola pergerakan hiperaktif pada spermatozoa diantaranya dua hiperaktif progresif (*circling* dan *helical*) serta dua hiperaktif nonprogresif (*thrashing* dan *star-spin*) (Lannou *et al.*, 1992). Secara *in vivo*, spermatozoa yang dapat mempertahankan motilitas total yang lebih lama selama inkubasi dapat memungkinkan spermatozoa bertahan hidup di saluran reproduksi betina, menjalani kapasitasi dan melakukan fertilisasi ke dalam oosit (Joshi *et al.*, 2005). Menurut Morell (2019) motilitas progresif diperlukan spermatozoa untuk dapat memasuki kumulus *oophorus* dan bergerak di dalamnya untuk dapat mencapai oosit. Hal tersebut diindikasikan bahwa penurunan kadar cAMP mengakibatkan penurunan VCL dan ALH spermatozoa (Jing *et al.*, 2014). Sehingga, terjadinya penurunan VCL akan berpengaruh terhadap penurunan motilitas progresif.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: Penambahan kafein merupakan bahan terbaik untuk mempertahankan motilitas total dan motilitas progresif pada spermatozoa sapi. Konsentrasi 5 mM merupakan konsentrasi terbaik penambahan kafein pada media fertilisasi untuk menginduksi terjadinya hiperaktivasi motilitas. Penambahan kafein 5 mM secara tunggal atau dikombinasikan dengan heparin 10 mg/mL dapat menginduksi terjadinya hiperaktivasi dan tidak terjadinya penurunan motilitas yang signifikan selama periode inkubasi dilakukan.

SARAN

Perlu dilakukan pengamatan Ca^{2+} intraseluler dan *protein tyrosine phosphorylation*, untuk menggambarkan tingkat hiperaktivasi dan kapasitasi spermatozoa dalam beberapa

waktu inkubasi dan kombinasi antara heparin dan/atau kafein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Reproduksi, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dan Laboratorium Fertilisasi *in vitro* Divisi Reproduksi dan Kebidanan Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan fasilitas selama penelitian ini dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad M, Ahmad N, Riaz A, Anzar M. 2015. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reprod Fert Dev* 27: 784-793.
- Amann RO, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5-17.
- Arai Y, Sakase M, Fukushima M, Harayama H. 2019. Identification of isoforms of calyculin A-sensitive protein phosphatases which suppress full-type hyperactivation in bull ejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. 129: 46-53.
- Barakat IAH, Danfour MA, Galewan FAM, Dkhil MA. 2015. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *Biomed Res Int* 1-7.
- Bernećić NC, Gadella BM, Leahy T, de Graaf SP. 2019. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology* 137: 56-66.
- Bernećić NC, Gadella BM, Leahy T, de Graaf SP. 2019. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology* 137: 56-66.
- Chamberland A, Fournier V, Tardiv S, Sirard MA, Sulliva R, Bailey JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine

- sperm capacitation. *Theriogenology* 55: 823-835.
- Chatiza FP, Bartels P, Nedambale TL, Wagenaar GM. 2012. Computer assisted sperm analysis of motility patterns of postthawed epididymal spermatozoa of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*), and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*) incubated under conditions supporting domestic cattle *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 78: 402-414
- Colás C, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. 2009 Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *Int J Andro* 33: 187-197.
- Córdoba M, Mora N, Beconi MT. 2006. Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology* 65: 882-892
- Demyda-Peyras S, Dorado J, Hdalgo M, Luca LD, Muñoz-Serrano A, Moreno-Millan M. 2012. *In vitro* induction of the acrosome reaction in spermatozoa from endangered Spanish bulls: Effect of breed, culture media and incubation time. *Live Sci.* 149: 275-281.
- El-Bahrawy KA. 2017. The influence of caffeine supplementation and concerted utilization of enzymatic and mechanical semen liquefaction on freezability of dromedary camel spermatozoa. *Int J Vet Med* 5: 121-127.
- El-Gaafary MN, Daader AH, Ziedan A. 1990. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. *Anim Reprod Sci* 23: 13-19.
- El-Shahat KH, Taysser MI, Zaki KA. 2016. Effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction of fresh ram spermatozoa. *Asian Pacific J Reprod* 5: 148-155.
- Farahi M, Masoudi AA, Ehsani A. 2018. Does the change in sperm motility during the production period differ between high and low motility groups?. *Livestock Sci* 216: 1-5.
- Fernández S, Córdoba M. 2016. Progesterone causes metabolic changes involving aminotransferases and creatine kinase in cryopreserved bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 164: 90-96.
- Fernández S, Córdoba M. 2017. A membrane-associated adenylate cyclase modulates lactate dehydrogenase and creatine kinase activities required for bull sperm capacitation induced by hyaluronic acid. *Anim Reprod Sci* 179: 80-87.
- Fernández S, Córdoba M. 2018. Hyaluronic acid-induced capacitation involves protein kinase C and tyrosine kinase activity modulation with a lower oxidative metabolism in cryopreserved bull sperm. *Theriogenology* 122: 68-73.
- Hamza NA, Selman MO, Mossa HA. 2018. Comparison of best yield of *in vitro* sperm activation techniques with new technique of caffeine combined with density gradient centrifugation in iraqi patients. *Pharm Sci Res* 10: 36-39.
- Harayama H. 2018. Flagellar hyperactivation of bull and boar spermatozoa. *Reprod Med Biol* 17: 442-448.
- Herreros MG, Aparicio IM, Núñez I, García-Marín LJ, Gil MC, Vega FJP. 2005. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology* 63: 795-805.
- Hinrich K, Loux SC. 2012. Hyperactivated sperm motility: are equine sperm different?. *J Equine Vet Sci* 31: 441-444.
- Ho H-C, Suarez SS. 2001. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 65: 1606-1615.
- Horst GVD, Medger K, Steckler D, Luther I. 2018. Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) sperm revisited: Motility, morphology and ultrastructure of fresh sperm of consecutive ejaculates. *Anim Reprod Sci* 195: 309-320.
- Ishimoto K, Gaffney E. 2016. Mechanical tuning of mammalian sperm behaviour by hyperactivation, rheology and substrate adhesion: a numerical exploration. *J R Interface* 13: 1-11.

- Jing Y, Xiao-qiang J, Shuai Z, Gen-lin W. 2014. RNA Interference-Mediated Downregulation of sAC Gene Inhibits Sperm Hyperactivation in Male Rats (*Rattus norvegicus*). *J Integr Agric* 13: 394-401.
- Joshi A, Bag S, Naqvu SMK, Sharma RC, Mittal JP. 2005. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Rumin Res* 56: 231-238.
- Kato Y, Shoei S, Nagao Y. 2010. Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- α -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. *Zygote* 19:21-30.
- Kim BK, Lee SC, Lee KS, Lee BK, Han CH, Kim JH, Lee CS. 2002. Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 57: 2093-2104.
- Kim EY, Noha EH, EJ Noh EJ, Park MJ, Park HY, Lee DS, Riu1 KZ, Park SP. 2013. Effect of glycosaminoglycans on *in vitro* fertilizing ability and *in vitro* developmental potential of bovine embryos. *Asian-Aust Anim Sci* 26: 178-188.
- Krízková J, Èoudková V, Maršálek M. 2017. Computer-assisted sperm analysis of head morphometry and kinematic parameters in warmblood stallions spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 57: 8-17.
- Kumaresan A, Johannisson A, Humblot P, Bergqvist AS. 2019. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 124: 48-56.
- Lannou DL, Griveau JF, Pichon JPL, Quero JC. 1992. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reprod* 7: 1417-1421.
- Lu KH, Siedel JJE. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.
- Marquez M, Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod* 70: 1626-1633.
- Mbizvo MT, Johnston RC, Baker GH. 1993. The effect of the motility stimulants, caffeine, pentoxifylline, and 2-deoxyadenosine on hyperactivation of cryopreserved human sperm. *Fertil Steril* 59: 1112-1117.
- Milani C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Geirard O, Romagnoli S. 2010. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 20-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen thawed dog semen. *Theriogenology* 74: 153-64.
- Mor V, Das T, Bhattacharjee M, Chatterjee. 2007. Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 404-409.
- Moraes CR, Meyers S. 2018. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim Reoprod Sci* 194: 71-80.
- Morell JM. 2019. Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 137: 122-126.
- Oliveira VP, Marquws MG, Simoes R, Assumpcao MEOD, Visintin JA. 2011. Influence of caffeine and chondroitin sulfate on swine sperm capacitation and *in vitro* embryo production. *Acta Scie Vete* 39: 961-962.
- Park CK, Ohgoda O, Niwa K. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod. Fert* 86: 577-582.
- Parrish JJ. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 67-73.
- Peña AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela JJ, Herradón PG. 2012. Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Anim Reprod Sci* 133: 214-223.
- Rota A, Sabatini C, Przybyl A, Ciaramelli A, Panzani D, Camillo F. 2019. Post-thaw addition of caffeine and/or pentoxifylline affect differently motility of horse and donkey-cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 75: 41-47.

- Sagare-Patil V, Vemekar M, Galvankar M, Modi D. 2013. Progesterone utilizes the PI3K-AKT pathway in human spermatozoa to regulate motility and hyperactivation but not acrosome reaction. *Molr Cell Endocrin* 374: 82–91.
- Setiadi MA, Karja NWK. 2013. Tingkat perkembangan awal embrio sapi *in vitro* menggunakan media tunggal berbahan dasar tissue culture medium (TCM) 199. *JKH* 7: 150-154.
- Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil. 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology* 77: 940-951.
- Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14: 547-657.
- Susilawati T. 2011. Spermatology. Malang (ID): UB Pr.
- Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Inter J Androl* 23: 13-21.
- Taberner E, Morató R, Mogas T, Miró J. 2010. Ability of Catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 118: 354-361.
- Tesarik J, Oltras CM, Testert J. 1990. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J Reprod Fert* 88: 665-575.
- Thompson SK, Kutchy NA, Kwok S, Rosyada NA, Imunorin IG, Purwantara B, Memili E. 2018. Review: Sperm: Comparative morphology and function related to altered reproductive strategies and fertility in mammals. *Prof Anim Sci* 34: 558-565.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Yamaguchi S, Suzuki C, Noguchi M, Kasa S, Mori M, Isozaki Y, Ueda S, Funahashi H, Kikuchi K, Nagai T, Yoshioka K. 2013. Effects of caffeine on sperm characteristics after thawing and inflammatory response in the uterus after artificial insemination with frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 79: 87-93.
- Yeste M, Briz M, Pinnart E, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Prauneda A, Bussaleu E, Casas I, Bonet S. 2008. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 109: 236-250.