ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

PENGARUH FREKUENSI PENCUCIAN SPERMATOZOA DOMBA PADA MEDIUM BO DITAMBAH BSA DAN KAFEIN TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA HIDUP

Oleh :

NURUL HIDAYAH
SIDOARJO – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2005

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

PENGARUH FREKUENSI PENCUCIAN SPERMATOZOA DOMBA PADA MEDIUM BO DITAMBAH BSA DAN KAFEIN TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA HIDUP

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh :

Nurul Hidayah
NIM.060112919

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

(Trilas Sardjito,M.Si.,Drh)
Pembimbing Pertama

(Herman Setyono,M.S.,Drh)
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.**

Menyetujui,
Panitia penguji,

Rochmah kurnijasanti, M.Si.,Drh

Abdul Samik,M.S.,Drh
Sekretaris

Rimayanti,M.Kes.,Drh
Anggota

Trilas Sardjito,M.Si.,Drh
Anggota

Herman Setyono,M.S.,Drh
Anggota

Surabaya, 20 Juni 2005
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan

Prof. Dr. Ismudiono, M.S.,Drh
NIP. 130 687 297

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

PENGARUH FREKUENSI PENCUCIAN SPERMATOZOA DOMBA PADA MEDIUM BO DITAMBAH BSA DAN KAFEIN TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS DAN JUMLAH SPERMATOZOA HIDUP

NURUL HIDAYAH

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium *Brackett and Oliphant* (BO) yang ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan kafein terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup.

Penelitian ini menggunakan semen domba ekor gemuk. Semen dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok I adalah kontrol (P0), sampel tidak disentrifus. Kelompok II (P1), sampel dicuci dengan disentrifus sebanyak satu kali. Kelompok III (P2), sampel dicuci dengan disentrifus sebanyak dua kali. Medium pencucian spermatozoa dalam penelitian ini adalah BO yang ditambah BSA dan kafein sebanyak 3 ml pada kelompok kontrol dan perlakuan. Pemeriksaan persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup dilakukan pada menit ke-75 setelah perlakuan. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan Anava, jika ada perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan Uji BNT 5%.

Hasil penelitian terhadap persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup menunjukkan perbedaan sangat nyata ($p<0,01$) diantara perlakuan. Uji BNT 5% menunjukkan persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup pada pencucian dua kali (P2) lebih tinggi dan berbeda nyata dengan kelompok pencucian satu kali (P1) dan kontrol (P0), kelompok pencucian satu kali (P1) berbeda nyata dengan kontrol (P0). Pada penelitian ini dapat disimpulkan pencucian spermatozoa dua kali dapat meningkatkan persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, bahwa atas rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Frekuensi Pencucian Spermatozoa Domba Pada Medium BO ditambah BSA dan Kafein Terhadap Persentase Motilitas dan Jumlah Spermatozoa Hidup".

Sembah bakti, terima kasih tak terhingga penulis persembahkan skripsi ini kepada Ayahanda Sugandono, Ibunda Sutik Eli atas segala dukungan, motivasi, doa restu yang telah diberikan.

Pada kesempatan ini dengan penuh rasa hormat dan tulus ikhlas penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
- Drh. Trilas Sardjito, M.Si selaku pembimbing pertama dan Drh. Herman Setyono, M.S selaku pembimbing kedua yang telah bersedia memberikan kritik, saran, nasihat dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
- Drh. Suherni Susilowati, M.Kes yang telah sabar membimbing, memberikan segala fasilitas di Laboratorium Inseminasi Buatan (IB) untuk melaksanakan penelitian dan memberikan nasihat, bimbingan selama penelitian sampai terselesainya skripsi ini.
- Drh. Koesnoto, M.Si yang telah memberikan saran dan nasihat dalam pengolahan data penelitian.

- Kakakku Alifa Sugiarti, Kakak iparku Heri Susanto, Keponakanku Sendi Abiseka, Adikku Putri Ayu atas dorongan semangat selama ini.
- Keluarga Bapak Sampan Soewiryo atas semua dukungan mental, material yang telah diberikan.
- Masku Deas Tri Brawi Kurniawan beserta keluarga besar Bapak Soleh di Kertosono yang telah memberikan doa dan dukungan moril selama ini.
- Keluarga besar Bapak Suhariyanto dan Mas Okky di Jember yang telah memberikan doa dan dukungan moril selama ini. Untuk itu penulis secara khusus menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya.
- Mbak Surti dan Bapak Slamet atas bantuan selama penelitian.
- Para sahabat : Anik, Dyah Mei, Ulva, Dwi, Yosa, Diah, Yulia, Mbak Wiwit, Darusman dan seluruh angkatan 2001 atas kebersamaan selama ini.

Sebagai hasil karya manusia, disadari sepenuhnya penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan bagi kesempurnaan skripsi ini di masa yang akan datang.

Akhirnya penulis berharap semoga hasil yang telah dicapai bermanfaat bagi masyarakat dan pengembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Mei 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Perumusan Masalah	1
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Landasan Teori	4
1.6 Hipotesis Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Domba	6
2.2 Dewasa Kelamin Domba	7
2.3 Alat Reproduksi Hewan Jantan	7
2.4 Semen Domba	11
2.5 Sel Spermatozoa	13

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

2.6 Pembentukan Sel Spermatozoa 14

2.7 Metabolisme Spermatozoa 16

2.8 Pencucian Spermatozoa dengan Sentrifugasi 17

2.9 Kualitas Spermatozoa 18

2.10 Bahan Pencuci Spermatozoa 20

BAB III. MATERI DAN METODE PENELITIAN 22

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian 22

3.2 Materi Penelitian 22

3.2.1 Hewan Penelitian 22

3.2.2 Bahan Penelitian 22

3.2.3 Peralatan Penelitian 23

3.3 Metode Penelitian 23

3.3.1 Penampungan Semen 23

3.3.2 Pemeriksaan Semen Setelah Ejakulasi 24

3.3.3 Perlakuan Terhadap Semen 25

3.4 Peubah yang Diamati 27

3.5 Analisis Data 27

BAB IV. HASIL PENELITIAN 28

BAB V. PEMBAHASAN 31

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN 37

6.1 Kesimpulan 37

6.2 Saran 37

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

RINGKASAN 38

DAFTAR PUSTAKA 41

LAMPIRAN 45

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Komposisi Plasma Semen Domba 12
2. Pemeriksaaan Awal Semen Domba 28
3. Rata-rata Persentase Motilitas Spermatozoa Domba 29
4. Rata-rata Persentase Spermatozoa Hidup 29
5. Persentase Motilitas Spermatozoa Domba 45
6. Persentase Jumlah Spermatozoa Hidup Domba 45

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Analisis Statistik Persentase Motilitas dan Jumlah Hidup Spermatozoa Bentuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Uji BNT 5%.....45
2. Prosedur Pemeriksaan Motilitas (gerak progresif) Spermatozoa.....48
3. Prosedur Pemeriksaan Jumlah Hidup Spermatozoa.....49
4. Prosedur Pembuatan Larutan *Eosin Negrosin*.....50
5. Prosedur Pembuatan Medium Pencuci Spermatozoa.....51

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Skema Jalannya Penelitian 26
2. Gambaran Mikroskopis Spermatozoa 36
3. Bagian-bagian Spermatozoa..... 53

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Kesadaran masyarakat akan pentingnya protein hewani menyebabkan permintaan protein hewani semakin meningkat dari tahun ke tahun. Penghasil sumber energi salah satunya adalah domba. Domba dapat dimanfaatkan sebagai usaha ternak karena pemeliharaannya sangat mudah dan makanannya didapat tanpa perlu bersaing dengan manusia.

Berbagai usaha dilakukan dalam memenuhi permintaan masyarakat akan protein hewani, diantaranya dengan meningkatkan jumlah populasi ternak. Usaha peningkatan populasi ternak dengan meningkatkan efisiensi reproduksi ternak, misalnya dengan Inseminasi Buatan (IB) dan Fertilisasi *In Vitro* (FIV) untuk kepentingan tranfer embrio (Harrison *and* White,1972).

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* tergantung kualitas dari spermatozoa yang digunakan dalam membuahi sel telur. Spermatozoa bermutu tinggi, bebas kontaminasi mikroorganisme, serta daya fertilisasi optimum diperlukan dalam fertilisasi *in vitro.* Spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro* terlebih dahulu harus dipisahkan dari plasma semen karena komponen yang terdapat dalam plasma semen tidak seluruhnya dapat melindungi dan mempertahankan motilitas spermatozoa, melainkan dapat berpengaruh negatif terhadap kemampuan fertilisasi spermatozoa. Hal ini tidak berpengaruh pada fertilisasi *in vivo* karena saluran reproduksi betina dapat menyeleksi spermatozoa dengan kemampuan

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

fertilisasi yang tinggi. Plasma semen dapat dipisahkan dan dihilangkan dengan pencucian dalam medium isotonis (Hinting,1989).

Pencucian merupakan suatu cara untuk memisahkan spermatozoa dari komponen plasma semen. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan bahan-bahan dalam plasma semen yang dapat menurunkan kemampuan spermatozoa membuahi sel telur dan mempengaruhi pergerakan spermatozoa (Hinting,1989). Menurut Hunter (1995), plasma semen memiliki peranan penting pada awal pengangkutan spermatozoa tetapi tidak berperan penting dalam proses fertilisasi. Di dalam saluran reproduksi hewan betina, plasma semen berkurang dan hilang sama sekali mendekati tempat terjadinya fertilisasi. Adanya pengaruh negatif komponen plasma semen terhadap kemampuan fertilisasi spermatozoa mendorong dilakukannya penelitian yang diarahkan pada usaha untuk menghilangkan plasma semen serta mendapatkan spermatozoa dengan persentase motilitas dan jumlah hidup yang tinggi yaitu dengan pencucian. Kualitas fungsional spermatozoa yang lebih baik diperoleh dengan pengulangan pencucian untuk membuang plasma semen lebih banyak sehingga bahan dalam plasma semen yang dapat menurunkan kemampuan fertilisasi spermatozoa dapat dihilangkan (Hinting, 1989).

Berdasarkan hal-hal tersebut, dengan mengingat pula bahwa komponen plasma semen tidak berperan penting pada proses fertilisasi serta berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang pernah dilakukan yaitu pencucian dapat meningkatkan motilitas dan jumlah hidup spermatozoa (Hinting,1989), maka dilakukan suatu uji coba untuk mengetahui pengaruh frekuensi pencucian dengan menggunakan media *Brackett and Oliphant* (BO) yang ditambahkan *Bovine*

Serum Albumin (BSA) dan kafein terhadap motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.

1.2 Perumusan Masalah

Bertitik tolak dari latar belakang permasalahan di atas maka perumusan masalah yang diajukan adalah :

1. Apakah frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein berpengaruh terhadap persentase motilitas (gerak progresif) spermatozoa?
2. Apakah frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein berpengaruh terhadap persentase jumlah spermatozoa hidup?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi, peranan frekuensi pencucian spermatozoa pada medium BO ditambah BSA dan kafein terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

1.5 Landasan Teori

Semen berupa cairan yang mengandung sel gamet jantan (spermatozoa) dan sekresi dari kelenjar pelengkap yang dinamakan plasma semen (Hafez,2003). Plasma semen selain mengandung bahan nutrisi yang dibutuhkan spermatozoa di saluran reproduksi betina juga mengandung mikroorganisme dan sel limfosit yang dapat menghambat kemampuan spermatozoa dalam fertilisasi (Hinting,1989).

Pelaksanaan program fertilisasi *in vitro* terlebih dahulu spermatozoa harus dipisahkan dari plasma semen dan bahan toksik dengan metode sentrifugasi. Pencucian merupakan salah satu cara memisahkan spermatozoa dari komponen plasma semen yang dapat menurunkan kemampuan fertilisasi spermatozoa. Salah satu pencucian yang sering dimanfaatkan dalam fertilisasi *in vitro* adalah melalui sentrifugasi dalam medium isotonis. Penambahan medium BO ditambah BSA dan kafein dalam pencucian spermatozoa dapat meningkatkan perolehan jumlah hidup dan motilitas (gerak progresif) menjadi 70-90% dari 50% dalam waktu 2-4 jam (Yanagimachi,1986).

Penelitian yang pernah dilakukan Sardjito (2003), melakukan pencucian sebanyak tiga kali menggunakan medium BO ditambah kafein dengan kecepatan 1000 rpm menghasilkan motilitas sebesar 45-65% dan jumlah spermatozoa hidup 86-92%. Mahaputra dkk.(1996), melakukan sentrifus spermatozoa dengan kecepatan 1800 rpm dalam medium yang mengandung BSA menghasilkan jumlah spermatozoa motil sebesar 85-90%.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan landasan teori dan rumusan masalah di atas dapat dikemukakan hipotesis sebagai berikut :

1. Frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO yang ditambahkan BSA dan kafein dapat meningkatkan persentase motilitas (gerak progresif) spermatozoa.
2. Frekuensi pencucian spermatozoa domba pada media BO yang ditambah BSA dan kafein dapat meningkatkan persentase jumlah spermatozoa hidup.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Domba

Domba digolongkan sebagai ternak ruminansia kecil yang sudah memasyarakat. Peranannya tidak dipungkiri lagi sebagai ternak yang mampu memanfaatkan berbagai macam limbah pertanian yang kandungan gizinya relatif rendah. Keistimewaan lain yaitu ukuran badan kecil, kebutuhan protein rendah, daya pilih yang rendah terhadap lingkungan (Trianasari, 2001).

Domba termasuk genus *ovis*. Klasifikasi bangsa domba yang paling umum berdasarkan jenis wool, daging, ada tidaknya tanduk serta karakteristik kemampuan adaptasinya. Klasifikasi yang luas adalah wool halus, medium, panjang, persilangan, permadani. Domba asli dalam negeri yaitu domba lokal, domba priangan, domba ekor gemuk. Domba lokal mempunyai ukuran badan kecil dengan berat badan berkisar antara 30-40 kg, pejantan mempunyai tanduk, berekor pendek. Domba priangan memiliki ekor pendek agak gemuk, berat badan antara 60-80 kg, pejantan mempunyai tanduk yang cukup besar, melengkung ke belakang. Domba ekor gemuk mempunyai berat badan berkisar antara 50-70 kg, bulu agak tebal, bagian pangkal ekor besar dan berlemak. Selain itu ada pula beberapa jenis domba import seperti *toxel, suffolk, dorset, merino* (Blakely *and* Bade, 1991).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

2.2 Dewasa Kelamin Domba.

Dewasa kelamin domba adalah suatu periode dalam kehidupan hewan jantan dan betina, proses reproduksi mulai terjadi yang di tandai oleh kemampuan untuk menghasilkan sel benih (spermatozoa) dan berkopulasi disertai perubahan karakteristik kelamin sekunder (Toelihere,1981). Menurut Trianasari (2001), kematangan seksual merupakan periode hewan sampai pada puncak kemampuan memproduksi semen terjadi pada umur 18 bulan.

Menurut Tomaszweska dkk.(1991), domba betina akan mencapai dewasa kelamin pada umur 6 sampai 7 bulan dan perkawinan dilakukan antara umur 12 sampai 18 bulan. masa pubertas domba jantan ditandai dengan domba menghasilkan sel mani dan diejakulasikan untuk pertama kali. Ejakulasi pertama umur 4 sampai 6 bulan, sedangkan kematangan seksual adalah periode hewan pada puncak kemampuan memproduksi air mani.

2. 3 Alat Reproduksi Domba Jantan.

Menurut Frandson (1993), sistem reproduksi domba jantan terbagi menjadi dua yaitu alat kelamin primer berupa gonad jantan atau testis; alat kelamin sekunder yang terdiri dari saluran alat kelamin, kelenjar pelengkap dan alat kopulasi. Sistem reproduksi pada hewan jantan secara anatomik berhubungan dengan saluran pengeluaran urine sehingga seluruh sistem ini disebut *tractus urogenital* .

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

2.3.1 Testis

Testis domba berbentuk lonjong dengan skrotum lebih pendek. Testis domba jantan yang sehat mempunyai berat masing-masing mencapai 200 – 300 gram. Testis merupakan alat reproduksi primer jantan mempunyai fungsi yaitu menghasilkan sel kelamin jantan (spermatozoa) dan hormon jantan atau testoteron (Evans *and* Maxwell, 1987).

Testis dibungkus oleh lapisan viseral dan *tunika vaginalis* yang melekat pada *tunika albuginea.* Kedua testis dipisahkan oleh sekat jaringan fibrosa. Di dalam testis terdapat *tubulus seminiferus* yang merupakan tempat terjadinya *spermatogenesis,* dipisahkan oleh jaringan interstitial. *Tubulus seminiferus* bersatu menjadi tubulus lurus yang memasuki bagian testis yang disebut *rete testis,* dari *rete testis* menuju bagian kepala epididimis melalui *ductus efferens* (Tomaszweska dkk.,1991)

2.3.2 Skrotum

Skrotum sebagai pembungkus testis melindungi terhadap gangguan luar. Fungsi dari skrotum adalah mengatur perubahan temperatur sehingga proses spermatogenesis dapat berlangsung secara normal. Suhu di dalam skrotum 4 sampai 7° C lebih rendah daripada suhu di rongga perut. Skrotum melindungi testis terhadap temperatur luar dengan jalan mengendurkan dan mengkontraksikan muskulus kremaster testis. Dinding skrotum mengkeriput pada temperatur dingin, muskulus kremaster berkontraksi dan testis tertarik mendekat ke arah sumber panas yaitu tubuh. Hal ini perlu agar tidak banyak panas yang terbuang. Apabila

terbuang. Apabila udara disekitar panas, skrotum relaksasi dan menggantung menjauhi tubuh. Proses ini merupakan keadaan termoregulasi skrotum (Tomaszweska dkk.,1991)

2.3.3 Saluran Kelamin Jantan dan Kelenjar-kelenjar Asesoris.

Saluran kelamin jantan terdiri dari epididimis, vas deferens dan uretra. Saluran kelamin ini secara otomatis bersatu dengan saluran air kencing dengan nama saluran urogenitalia hewan jantan. Epididimis terletak di belakang testis melekat pada *tunika albugenea*, merupakan saluran berkelok-kelok yang berfungsi sebagai tempat penampungan dan penyaluran spermatozoa. Kaput epididimis terletak di bagian atas dari testis, korpus mengarah ke bawah dan kauda epididimis terletak di bagian bawah testis. Penyimpanan spermatozoa berada di kauda epididimis. Vas deferens merupakan saluran yang menghubungkan kauda epididimis dengan uretra, yang berfungsi untuk menyalurkan spermatozoa. Dari kauda epididimis, vas deferens berjalan sejajar dengan badan epididimis. Di dekat kaput, epididimis menjadi lurus, bersama-sama dengan pembuluh darah dan syaraf di dalam satu pembungkus yang disebut *funiculus spermaticus* (Poernomo,2002).

Kelenjar pelengkap berfungsi menyediakan cairan untuk media spermatozoa yang berasal dari ekor epididimis. Kelenjar–kelenjar asesoris terdiri dari kelenjar *vesikula seminalis*, *prostata* dan *cowper*. Kelenjar *vesikula seminalis* sekresinya berupa cairan lengket dan berwarna keruh. Sekresi tersebut mengandung protein, asam sitrat, fruktosa dan beberapa enzim dalam konsentrasi

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

yang tinggi. Sekresi kelenjar-kelenjar *vesikula seminalis* membentuk 50 % dari volume ejakulat normal. Kelenjar *cowper* mensekresikan lendir dan merupakan cairan semen yang ditumpahkan menjelang ejakulasi. Kelenjar prostat bentuknya berbungkul-bungkul, sekresinya berupa cairan putih dan berbau khas (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

2.3.4 Alat Kopulasi

Organ kopulatoris pada hewan jantan disebut penis. Pada domba, tipe penisnya adalah fibroelastis. Pada penis fibroelastis, bagian korpus yang melengkung disebut *flexura sigmoidea*. Penis domba mempunyai ukuran sigmoid di belakang atas skrotum. Bagian penis yang dekat dengan tubuh disebut pangkal, bagian terbesar disebut badan dan bagian ujung yang bebas disebut gland penis. Pada domba bentuk gland penis berbentuk khas yang disebut *galea glandis*, yang tidak lain adalah bagian ujung dari uretra (Laing *et al.*,1998).

Pada waktu ereksi, penis keluar melalui lubang preputium. Ereksi penis disebabkan oleh membesarnya ruang kavernosus. Hal ini dikarenakan meningkatnya aliran darah ke dalam penis. Tegangnya penis menjadikan lurusnya lekukan sigmoid (Tomaszweska dkk.,1991).

2.3.5 Preputium

Preputium merupakan suatu lipatan kulit yang menyelubungi bagian ujung depan penis. Selaput lendir dari preputium ini berkelenjar dan sekresinya bersifat

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

lemak. Sekresi kelenjar ini bercampur dengan epitel yang rusak sehingga berbau merangsang yang disebut *smegma preputium* (Poernomo,2002).

2.4 Semen Domba

Semen atau air mani adalah sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke saluran kelamin betina melalui uretra penis sewaktu kopulasi. Cairan ini mengandung spermatozoa dan cairan beraneka ragam sekresi dari dinding saluran reproduksi hewan jantan dan sekresi kelenjar saluran yang dilewatinya (Hafez, 2000). Menurut Frandson (1993), spermatozoa di hasilkan oleh *tubulus seminiferus*, sedangkan plasma semen merupakan campuran sekresi dari beberapa kelenjar yaitu ampula, ductus deferens, vesicularis, bulbouretralis, dan prostat.

Ciri-ciri makroskopis semen domba yang baik adalah warna putih susu atau krem, volume antara 0,7 – 2 ml, konsistensi pekat dan pH antara 6,9 – 7,3. Adapun ciri-ciri mikroskopis semen domba yang baik adalah konsentrasi 2 – 6 x 10^{9} spermatozoa per ml, abnormalitas tidak lebih dari 20 %, presentase kematian tidak melebihi 50 % (Evans *and* Maxwell,1987). Kondisi semen domba dapat dipengaruhi antara lain oleh umur, kondisi ternak, frekuensi pengambilan dan pelaksana (Nalbandov, 1990).

Menurut Hunter (1995), plasma semen mengandung nutrisi dan sebagai *buffer* untuk kapasitasi. Plasma semen berfungsi untuk motilitas, metabolisme dan pelindung spermatozoa untuk melawan keadaan asam dalam vagina. Plasma semen mengandung bahan persenyawaan organik termasuk fruktosa, asam sitrat,

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

sorbitol, *Gliseril phosporil choline (GPC)*, ergotionin, sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Plasmalogen terdapat di dalam spermatozoa itu sendiri. Fruktosa merupakan makanan utama bagi spermatozoa. GPC merupakan sumber energi bagi spermatozoa di dalam alat kelamin betina. Asam sitrat dan inositol tidak dimetabolisir oleh spermatozoa (Ismudiono,1999). Zat-zat organik yang terkandung dalam plasma semen adalah K, Ca dan bikarbonat yang tinggi dibanding di tempat lain dalam tubuh (Partodiharjo,1992).

Menurut Hafez (2000), mikroorganisme dalam plasma semen berasal dari saluran reproduksi dan peralatan yang digunakan dalam pengambilan semen. Bakteri dalam plasma semen misalnya *Aspergillis ochraceus, Brucella mellitensis.* Kontaminasi bakteri dalam plasma semen dapat menyebabkan kegagalan fertilisasi. Kontaminasi mikroorganisme ditandai dengan banyaknya sel leukosit pada plasma semen berkisar $10^5 - 10^8$ per 100 ml.

Tabel 1. Komposisi Plasma Semen Domba

Bahan	**Konsentrasi (mg/100ml)**
Air, gram/100 ml	85
Sorbitol	72
GPC	72
Inositol	12
Asam sitrat	140
Ergotionin	0
Plasmalogen	380
Natrium	190
Kalium	90
Klorida	86
Kalsium	11

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

2. 5 Sel Spermatozoa

Spermatozoa merupakan hasil akhir dari sel jantan setelah mengalami proses pendewasaan. Spermatozoa adalah sel yang sudah sangat terspesialisasi dan padat yang tidak lagi mengalami pertumbuhan (Hafez,2000).

Spermatozoa yang berkualitas baik adalah spermatozoa yang bergerak *progresif* (maju), lurus dan cepat (Satmoko dan Soeradi,1992). Kecepatan bergerak dari spermatozoa dipengaruhi faktor lingkungan dan suhu. Kecepatan gerak spermatozoa pada suhu 37° C sekitar 100 mikron/detik. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa gerak sperma dapat distimulasi dengan pemberian zat kimia (Hinting dan Marlinata, 1981).

Spermatozoa terdiri dari kepala, bagian tengah dan ekor. Bentuk kepala spermatozoa domba bulat telur dan pipih, panjang dan lebar kira-kira 8 – 10 x 4 – 4,5 mikron. Pada bagian kepala terdapat nukleus yang mengandung kromatin yang terdiri dari *Deoxyribonuclei Acid* (DNA), juga akrosom yang mengandung enzim *Hyaluronidase, corona penetrazing enzim* (CPE), akrosin yang berperan dalam fertilisasi. Seluruh permukaan spermatozoa bersama-sama bagian lain di bungkus oleh selaput sel berupa lipoprotein. Apabila spermatozoa mati, permeabilitas selaput selnya meningkat sehingga zat warna dapat masuk menembus selaput sel (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

Bagian tengah spermatozoa mempunyai panjang 1,5 -2 kali panjang kepalanya. Pada bagian tengah spermatoa terdapat mitokondria sebagai tempat

berlangsungnya proses metabolisme spermatozoa untuk menghasilkan energi. Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus kreb dan transport elektron yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphospat* (ATP) (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

Bagian ekor spermatozoa mempunyai panjang 35 – 45 mikron dengan panjang diameter 4-6 mikron menyerupai flagel. Ujung anterior pangkal ekor (*middle piece*) berhubungan dengan bagian kepala, tempat ini merupakan tempat untuk implantasi. Pangkal ekor merupakan bagian yang kaya plasmalogen, yaitu suatu bahan yang mengandung asam lemak. Asam lemak ini dapat dioksidir sehingga menghasilkan energi. Bagian tengah ekor bertindak sebagai mesin pendorong (Poernomo,2002).

2.6 Pembentukan Sel Spermatozoa

Spermatozoa merupakan hasil akhir dari sel jantan setelah mengalami proses pendewasaan. Proses pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis. Proses spermatogenesis baru dimulai setelah hewan mencapai masa pubertas (remaja). Proses spermatogenesis terdiri dari 4 tahap, yaitu : proliferasi, tumbuh, masak, transformasi (Tomaszweska dkk.,1991).

Tahap proliferasi terjadi sejak pra lahir sampai beberapa waktu sesudah fetus dilahirkan. Bakal sel kelamin mengalami pembelahan secara mitosis menghasilkan sejumlah spermatogonium. Pada tahap tumbuh spermatogonium membelah secara mitosis sebanyak 4 kali sehingga dari sebuah spermatogonium menghasilkan 16 buah dan tumbuh menjadi spermatosit primer (Poernomo,2002)

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Tahap masak di mulai dengan pembelahan meiosis, sehingga spermatosit primer berubah menjadi spermatosit sekunder. Spermatosit sekunder membagi diri secara meiosis menjadi spermatid. Proses dari spermatogonium sampai menjadi spermatid disebut *spermacytogenesis*. Tahap metamorfosa, spermatid menjadi spermatozoa. Proses perubahan dari spermatid menjadi spermatozoa disebut *spermiogenesis*. Ciri-ciri proses *spermiogenesis* : aparat golgi menjadi tudung anterior atau akrosom, inti spermatid menjadi kepala sperma, dari sentriol keluar ekor, plasma membran menjadi selubung tubuh spermatozoa, mitokondria mengumpul di bagian ekor (Poernomo,2002)

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma. Ketika terjadi reaksi akrosom, membran plasma lepas dan hilang dari permukaan anterior akrosom. Kejadian ini diikuti dengan pelepasan enzim akrosom sedikit demi sedikt (Hafez,2000). Enzim-enzim tersebut antara lain :

- Enzim Hyaluronidase.

  Enzim ini berfungsi untuk menguraikan *kumulus oophorus* dan dengan enzim tersebut memungkinkan spermatozoa menembus lapisan terluar dari sel telur.

- Enzim Penetrasi korona (CPE).

  Enzim ini berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada korona radiata. Dengan adanya enzim tersebut, korona radiata hancur.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

- Enzim Akrosin

  Enzim ini berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa melalui *Zona Pellucida.* Spermatozoa yang tidak mengandung akrosin adalah infertil sekalipun motil dan mempunyai membran plasma yang utuh.

- Enzim ATP - ase

  Enzim ini mempengaruhi akrosin untuk mengadakan kapasitasi.

- Enzim Glukonidase.

  Enzim ini berfungsi untuk memecah tetrasakarida yang dihasilkan oleh enzim hyaluronidase dari asam hyaluronat.

2. 7 Metabolisme Spermatozoa

Metabolisme di dalam spermatozoa bertujuan untuk pembentukan *Adenosin Triphospat* (ATP). ATP ini digunakan utuk menyokong mekanisme pergerakan spermatozoa dan mempertahankan keseimbangan osmose. Oleh karena itu besarnya gaya metabolisme spermatozoa berhubungan secara langsung dengan motilitas (gerak progresif). Tempat terjadi metabolisme ialah di sitoplasma dan mitokondria leher spermatozoa. Pada spermatozoa manusia, glikolisis merupakan cara terbesar membentuk energi untuk motilitas (gerak progresif), dan mempertahankan kehidupan sel dengan memanfaatkan energi yang didapat dari metabolisme pernapasan (Hafez,1993).

ATP yang dibentuk dengan cara glikolisis atau fruktolisis tersebut dapat dengan cara *anaerob* dan *aerob* yaitu melalui siklus kreb. Metabolisme *aerob* melibatkan pengambilan oksigen yaitu dengan mitokondria (Tournaye,1994).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Substrat atau bahan bakar pada umumnya berasal dari bahan-bahan yang terdapat pada plasma semen (eksogen) antara lain : glukosa, fruktosa, manosa, galaktosa, piruvat, sorbitol, asam oksalat, asam suksinat dan asam lemak jenuh. Dan dapat juga substrat berasal dari dalam spermatozoa sendiri (Endogen), antara lain : fosfolipid terutama pada keadaan mendesak. Bahan bakar eksogen berupa glukosa dan piruvat lebih siap dimetabolisme dibanding eksogen lain. Besarnya kecepatan metabolisme sangat tergantung pada tingginya jumlah nukleotida (ATP, ADP, AMP) dan akan lebih tinggi bila didukung oleh faktor-faktor sepertinya : mudahnya substrat digunakan, konsentrasi enzim dan transpor ion-ion pada membran (Ismudiono,1999).

Mekanisme metabolisme spermatozoa adalah sebagai berikut, glukosa secara difusi masuk melalui membran leher kemudian di dalam sitoplasma leher mengalami glikolisis dan sebagai hasilnya adalah asam piruvat, asam laktat, dan ATP. Selanjutnya asam piruvat dengan bantuan *piruvat dehidrogenase* diubah menjadi asetil ko-A, selanjutnya masuk dalam siklus kreb dengan bantuan oksigen, rantai respirasi dan sistem sitokrom akan terbentuk ATP, yang selanjutnya di serahkan pada serabut luar dan serabut dalam untuk menimbulkan pergerakan kontraktil (Hafez,2000).

2.8 Pencucian Spermatozoa dengan Sentrifugasi

Usaha untuk meningkatkan kualitas spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan dengan pencucian spermatozoa dari bahan dalam plasma semen yang menurunkan kemampuan fertilisasi spermatozoa. (Hinting,1989).

Menurut Sear Weaston (1986) dikutip Sardjito (2003), sentrifugasi merupakan suatu teknik yang digunakan dalam pencucian untuk memisahkan seminal plasma dan bahan krioprotektan yang terdapat pada sel spermatozoa.pada proses ini digunakan alat pemusing (sentrifus). Kerja alat ini berdasarkan pemutaran sampel pada suatu poros sehingga bekerja gaya sentrifugal yang mempunyai arti harfiah " lari dari pusat ". Gaya ini merupakan lawan dari gaya sentripetal yang arti harfiahnya " mencari pusat ". Bila dalam suatu partikel yang kerapatannya berbeda dikenakan gaya sentrifugal, maka partikel akan bergerak sepanjang tabung dengan partikel yang lebih rapat akan menuju ke jari-jari yang lebih besar.

2.9 Kualitas Spermatozoa

2.9.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas (gerak progresif) merupakan parameter penting untuk menilai kemampuan fertilitas. Spermatozoa immotil adalah steril. Spermatozoa immotil, apakah hidup atau mati, tidak dapat menembus *cervical mucus* (Amelar *et al.*.1980). Faktor utama yang mengontrol motilitas (gerak progresif) spermatozoa adalah ATP yang dihasilkan oleh mitokondria (Tournaye, 1994).

Setelah kapasitasi spermatozoa mengubah gerakannya menjadi gerak pecutan sperma atau hiperaktif atau gerak cemeti. Gerakan atau motilitas progresif ini dianggap efisien menghadapi cairan tuba yang kental (Suarez,1998). Motilitas spermatozoa yang hiperaktif ini penting untuk menghantarkan penetrasi

spermatozoa ke *cumulus oophorus* dan mempersiapkan spermatozoa menjalani reaksi akrosom (Tagart *et al.,* 1995).

Temperatur juga mempengaruhi motilitas (gerak progresif) spermatozoa. Spermatozoa yang disimpan pada suhu dingin yaitu –15 ° C menunjukkan penurunan motilitas yang sangat nyata dibandingkan spermatozoa yang disimpan pada suhu 4° C. Penurunan motilitas ini disebabkan terjadinya kerusakan pada membran spermatozoa. Penambahan gliserol tidak berpengaruh pada motilitas spermatozoa (Nakatsukosa *et al.*,2001).

Jika menggunakan pembesaran 400 kali, maka akan menampakkan gerakan individu spermatozoa yang berupa gerak maju (*progressif*), mundur (*reverse)*, bergetar (*vibrator*), dan berputar (*oscilatoris*) (Salisbury *and* Van Dermark,1985). Semen harus mempunyai gerakan massa minimal positif dua dan sebagian besar spermatozoa bergerak *progresif*, untuk dapat digunakan dalam kawin suntik (Partodiharjo, 1992).

2.9.2 Pemeriksaan Hidup Mati Spermatozoa

Penilaian persentase hidup mati spermatozoa berdasarkan kemampuan zat warna menembus membran spermatozoa. Jika spermatozoa hidup, maka kondisi membran masih utuh, sehingga zat warna sulit menembus membran, akibatnya spermatozoa tidak berwarna. Sebaliknya jika sel sperma mati, maka membrannya telah rusak atau hilangnya lapisan lipoid sehingga zat warna dapat masuk menembus membran (Hardijanto dkk.,2003).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

2.10 Bahan Pencuci Spermatozoa

Pelaksanaan proses fertilisasi *in vitro* diperlukan pencucian spermatozoa dengan menggunakan medium isotonis untuk memisahkan spermatozoa dengan komponen plasma semen. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa gerak spermatozoa dapat dirangsang dengan pemberian zat kimia (Hinting dan Marlinata,1981; Rees *et al.,*1990). Mahaputra dkk.(1996) melakukan pencucian spermatozoa sapi Madura dengan melakukan sentrifugasi 1800 rpm, selama 10 menit dalam medium yang mengandung BSA menghasilkan spermatozoa motil 85-90 %.

Penggunaan medium isotonis pada pencucian spermatozoa berorientasi pada motilitas dan jumlah hidup spermatozoa. Syarat-syarat bahan pencuci spermatozoa yang baik adalah mengandung zat makanan sebagai pengganti hilangnya seminal plasma, mampu mempertahankan pH, menyediakan lingkungan yang isotonis. Selain itu, bahan pencuci spermatozoa tidak mengandung zat yang bersifat racun terhadap sel sperma, sehingga tidak merusak daya fertilisasi spermatozoa (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

Salah satu bahan pencuci spermatozoa yang bersifat isotonis adalah medium *Bracket and Oliphant* (BO). Penambahan medium BO ke dalam semen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba menjadi 70-90% dari 50% dalam waktu 2-4 jam. Selain meningkatkan motilitas , medium BO juga diketahui dapat meningkatkan kematangan hidup spermatozoa domba (Yanagimachi ,1986)

Medium BO banyak mengandung natrium, kalsium, magnesium dan sodium khlorida juga mengandung glukosa, piruvat sebagai bahan nutrisi

spermatozoa serta asam amino yang sangat dibutuhkan bagi kelangsungan hidup spermatozoa, sedangkan sodium pyruvat dan glukosa dalam medium BO sebagai sumber energi. Glukosa berfungsi sebagai sumber energi melalui proses glikolisis yang mengubah glukosa menjadi *glukosa 6 phospat*. Selanjutnya *glukosa 6 phospat* diubah menjadi *fruktosa 6 phospat*. Kemudian melalui bantuan enzim *difospopyridin nukleotida* (DPN), *fruktosa 6 phospat* diubah menjadi *asam monophospat gliserin* menghasilkan sumber energi yang digunakan untuk motilitas serta metabolisme biosintesa sel (Rimayanti dkk., 1998).

Penambahan kafein pada medium BO dapat meningkatkan motilitas spermatozoa (Boatman,1990). Kafein merupakan zat yang berfungsi untuk menghambat kerja enzim *fosfodiesterase* yang berfungsi menguraikan CAMP menjadi 5'AMP juga terhambat. Penghambatan ini menyebabkan konsentrasi CAMP di dalam sel juga meningkat, peningkatan CAMP dapat memacu motilitas sel sperma (Ganiswara,1995).

Bovine Serum Albumin (BSA) merupakan bagian dari protein darah. Istilah albumin menjelaskan suatu protein atau gugusan protein yang larut air. Albumin merupakan protein berlimpah dalam sistem sirkulasi dan mempunyai kontribusi sebanyak 80% terhadap tekanan osmotik darah. Albumin juga bertanggung jawab terhadap pH darah. BSA dapat bekerja dengan baik pada pH kurang dari 5 dan lebih dari 10. BSA dapat pula bekerja dengan baik pada pH normal dengan penyimpanan pada suhu dingin yaitu 4^0 C tetapi pada saat digunakan harus disesuaikan dengan suhu ruangan atau suhu tubuh (Anonimus,2000)

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Inseminasi Buatan (IB), Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Mulai tanggal 26 Juni sampai 26 Agustus 2004.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel semen domba ekor gemuk. Domba jantan yang digunakan berjumlah dua ekor, berumur ± 3 tahun, berat badan ± 50 kg dan secara klinik dinyatakan sehat, alat kelamin normal dan libido baik. Sebagai pemancing digunakan satu ekor domba betina. Pengambilan semen dilakukan sekali dalam seminggu, selama enam minggu (6 kali ulangan).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain : semen sebanyak ± 2 ml yang ditampung dari seekor domba ekor gemuk dari Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, zat warna *eosin negrosin* (lampiran 4) yang digunakan untuk pewarnaan hidup mati spermatozoa, medium BO ditambah BSA dan kafein (Sigma Biochemical, lampiran 5) untuk pencucian spermatozoa, vaselin sebagai pelicin pada vagina buatan, NaCl fisiologis.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

3.2.3 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari seperangkat vagina buatan dengan tabung penampung semen berskala, tali, termos, pemanas air, termometer celcius, mesin sentrifus, mikroskop cahaya , lemari es , pembakar bunsen, tabung reaksi , tabung sentrifus, rak tabung, gelas objek, gelas objek cekung, gelas penutup, pipet berskala, pipet Pasteur, spuit 3 ml , alat penghitung , kertas pH, gelas beker , kapas, kertas aluminium.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Penampungan Semen

Penelitian ini diawali dengan pengamatan awal keadaan fisik domba jantan yang digunakan untuk penelitian. Selanjutnya mempersiapkan seperangkat vagina buatan. Vagina buatan bersuhu ± 41-43 ° C dan pada bagian dalam vagina buatan diolesi vaselin sebagai pelicin sejauh kurang lebih setengah sampai sepertiga bagian dari ujung belakang. Ujung depan vagina buatan dipasang corong karet dan tabung berskala yang ditutup kertas aluminium agar semen yang tertampung terlindung dari sinar matahari langsung.

Sebelum pengambilan semen, dilakukan pencucian pada preputium menggunakan sabun dan air hangat, selanjutnya preputium dikeringkan dengan handuk. Libido pejantan dirangsang dengan cara membiarkan pejantan menaiki betina. Rangsangan dilakukan sebanyak dua sampai tiga kali. Saat pejantan menaiki betina dan melakukan gerakan ejakulasi, preputium dipegang dengan

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

tangan kiri. Penis yang terjulur karena ereksi diarahkan ke vagina buatan. Semen yang diejakulasikan tertampung dalam tabung berskala.

3.3.2 Pemeriksaan Semen setelah Ejakulasi

Semen yang diperoleh sebelum diberi perlakuan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis untuk menentukan kualitas semen yang diperoleh. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, kekentalan, dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi gerak massa, gerak individu, motilitas, persentase hidup mati spermatozoa.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Pemeriksaan motilitas dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen dan satu tetes NaCl fisiologis di atas gelas obyek kemudian diaduk sampai homogen, kemudian gelas obyek ditutup dengan gelas penutup. Penilaian gerak motilitas adalah gerak motil progresif berdasarkan persentase spermatozoa aktif dibanding dengan spermatozoa yang nampak pada lapangan pandang (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dilakukan dengan cara meneteskan setetes kecil semen di gelas obyek, selanjutnya ditambahkan larutan *eosin negrosin* kemudian dibuat preparat ulas dan difiksasi di atas api bunsen. Penghitungan atas 100 spermatozoa dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Sel sperma hidup akan tampak berwarna terang dan yang mati berwarna merah muda (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

3.3.3 Perlakuan Terhadap Semen

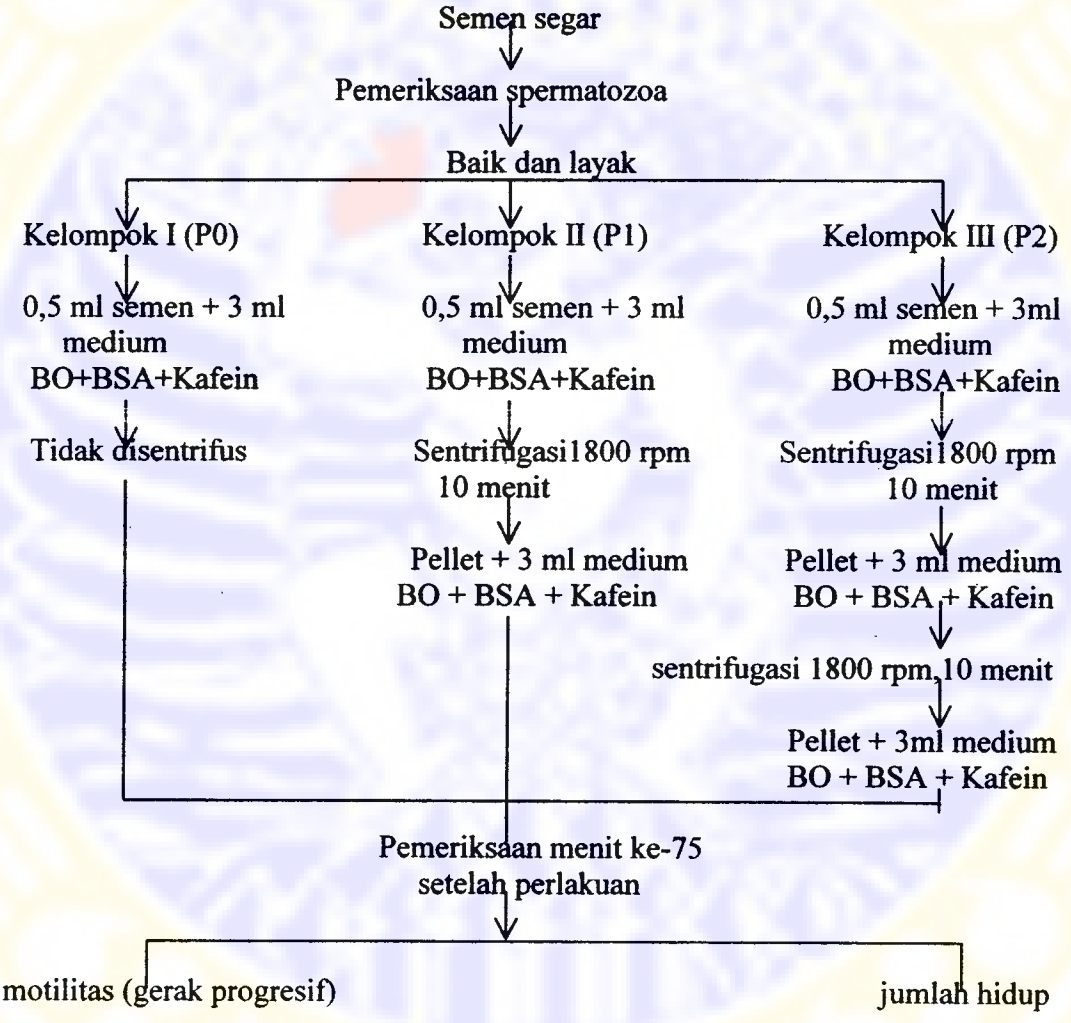
Semen yang memenuhi syarat pemeriksaan awal dibagi menjadi tiga kelompok. Semen dimasukkan melalui dinding tabung dengan menggunakan pipet pastur. Masing-masing kelompok berisi ± 0,5 ml semen. Selanjutnya dengan spuit 3 ml, sebanyak 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein) ditambahkan ke dalam masing-masing kelompok. Pada masing-masing tabung sentrifus diberi label P0, P1, P2 dengan perincian sebagai berikut :

P0 : 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein), diletakkan pada gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit, selanjutnya diperiksa terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup. P0 sebagai kontrol.

P1 : 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein), dicuci sebanyak satu kali dengan cara diputar dalam sentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, cairan bagian atas (supernatan) dibuang sehingga yang tersisa dalam tabung hanya pellet. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml medium pencuci, diletakkan pada gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit, selanjutnya diperiksa terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup.

P2 : 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485gram kafein), dicuci sebanyak dua kali dengan cara diputar dalam sentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, cairan bagian atas dibuang sehingga yang tersisa hanya pellet. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml medium pencuci kemudian disentrifus kembali dengan

kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang sehingga meninggalkan pellet dalam tabung. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml medium pencuci, diletakkan pada gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit, selanjutnya diperiksa terhadap persentase motilitas (gerak progresif) dan jumlah spermatozoa hidup.



Gambar 1. Skema Jalannya Penelitian

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

3.4 Peubah yang Diamati

Kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan pemeriksaan terhadap peubah yang diamati pada menit ke-75 setelah perlakuan. Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Motilitas adalah jumlah spermatozoa yang bergerak maju. Perkiraan motilitas adalah prosedur visual dan dinyatakan secara perbandingan, tidak mutlak. Motilitas dapat diketahui dengan menganalisis sampel semen yang diteteskan pada obyek gelas, ditutup dengan gelas penutup berukuran 20 x 20 mm. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Nilai yang diperoleh dinyatakan dalam persentase (Salisbury *and* Van Dermark,1985).
2. Spermatozoa hidup adalah jumlah sel sperma yang tampak berwarna terang sedangkan yang mati berwarna merah pada preparat ulas dengan pewarnaan *eosin negrosin.* Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali per 100 sel sperma. Nilai yang diperoleh dinyatakan dalam persentase (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Varian (Anava). Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan Uji BNT 5% (Kusriningrum,1990).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Pemeriksaan Awal Semen

Sebelum dilakukan uji untuk pengamatan, terlebih dahulu dilakukan seleksi kelayakan sampel yang ditunjukkan dalam tabel berikut ini :

Tabel 2. Pemeriksaan Awal Semen Domba

Sampel	Vol (ml)	Bau	Warna	Konsistensi	pH	Gerakan massa	Gerakan individu	Hidup (%)
1	2	Khas	Putih	Sedang	7	+++	P	95
2	1,1	Khas	Putih	Kental	7	+++	P	90
3	2	Khas	Putih	Sedang	7	+++	P	90
4	1,2	Khas	Putih	Kental	7	+++	P	95
5	1,2	Khas	Putih	Kental	7	+++	P	95
6	1,3	Khas	Putih	Kental	7	+++	P	95

Keterangan : P = Gerakan individu maju (progresif)

+++ = Gerakan massa berbentuk gelombang tebal dan gelap

Standar normal semen domba adalah warna putih susu atau krem, volume antara 0,7-2 ml, pH antara 6,9-7,3 (Evans dan Maxwell,1987). Semen harus mempunyai gerakan massa minimal positif dua dan bergerak progresif, dengan persentase kematian tidak melebihi dari 50% (Partodiharjo,1997). Data di atas menunjukkan bahwa sampel yang digunakan telah memenuhi kelayakan untuk dipakai mengamati setiap peubah dalam penelitian ini.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

4.2 Motilitas (gerak progresif) Spermatozoa

Data yang diperoleh dari penelitian tentang pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein terhadap persentase motilitas spermatozoa ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 3. Rata-rata Persentase Motilitas Spermatozoa Domba

Perlakuan	Motilitas (%)
P0	60,83 ± 2,04 [c]
P1	70,83 ± 2,04 [b]
P2	75,00 ± 0,00 [a]

Keterangan : Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p<0,05$)

Berdasarkan hasil analisis varian (Anava) terhadap persentase motilitas (gerak progresif) spermatozoa menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) diantara perlakuan. Uji BNT 5% menunjukkan bahwa kelompok pencucian dua kali (P2) memberikan motilitas tertinggi berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok pencucian satu kali (P1) dan kontrol (P0), kelompok pencucian satu kali (P1) berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kontrol (P0).

4.3 Spermatozoa Hidup

Data yang diperoleh dari penelitian tentang pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein terhadap persentase spermatozoa hidup ditunjukkan dalam tabel berikut :

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Tabel 4. Rata-rata Persentase Spermatozoa Hidup

Perlakuan	Spermatozoa hidup (%)
P0	71,50 ± 1,22 [c]
P1	76,00 ± 1,10 [b]
P2	79,67 ± 0,82 [a]

Keterangan : superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p<0,05$)

Berdasarkan hasil analisis varian (Anava) terhadap persentase spermatozoa domba yang hidup menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) diantara perlakuan. Uji BNT 5% menunjukkan bahwa kelompok pencucian dua kali (P2) berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok pencucian satu kali (P1) dan kontrol (P0), kelompok pencucian satu kali (P1) berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kontrol (P0).

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa yang baik dinilai dengan melihat gerak progresif dari spermatozoa tersebut. Kemampuan spermatozoa mendorong dirinya sendiri maju ke depan dikarenakan adanya substansi kontraktil pada bagian tengah spermatozoa diteruskan keseluruh bagian ekor. Motilitas spermatozoa normal memperlihatkan gerakan-gerakan spermatozoa maju ke depan secara serempak disebabkan oleh gerakan ekor yang mengarah ke kiri dan ke kanan. Gerakan ekor yang cepat dan kuat mampu mendorong spermatozoa masuk ke dalam *ovum* (Salisbury *and* Van Dermark,1985).

Temperatur lingkungan sangat berpengaruh pada pergerakan spermatozoa. Pada penelitian ini spermatozoa didiamkan pada suhu ruangan (32 °C) sesuai saran Salisbury *and* Van Dermark (1985) bahwa kecepatan gerak maju spermatozoa optimal pada temperatur mendekati suhu tubuh dikarenakan pada temperatur tubuh aktifitas metabolisme dan gerakan spermatozoa normal. Menurut Cahyono (1988), temperatur tubuh domba berkisar antara 39-40° C. Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa spermatozoa yang dibiarkan terlalu lama pada suhu ruangan akan mengalami kematian karena pengaruh panas lingkungan. Untuk mengurangi panas berlebihan, pada penelitian ini tabung yang berisi spermatozoa ditutup dengan kertas aluminium dan dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi air.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa pada penelitian ini dilakukan menit ke-75 setelah perlakuan dengan tujuan memberikan kesempatan spermatozoa melakukan kapasitasi karena waktu kapasitasi spermatozoa domba berlangsung 1-1,5 jam setelah ejakulasi sehingga didapatkan pergerakan spermatozoa yang optimal (Hunter,1995).

Faktor yang dapat menghambat dan menurunkan motilitas spermatozoa adalah plasma semen. Suatu cara untuk menghilangkan plasma semen adalah dengan pencucian dalam medium isotonis (Hinting,1989). Pencucian spermatozoa dengan teknik sentrifugasi dapat menghilangkan elemen plasma semen pada permukaan spermatozoa sehingga dapat membentuk *vesikula* untuk mengeluarkan enzim yang diperlukan pada saat fertilisasi (Hunter,1995) Menurut Sardjito (2003), pencucian dengan teknik sentrifugasi merupakan cara yang paling mudah dan relatif sederhana dari proses kapasitasi spermatozoa secara *in vitro*. Oleh karena itu perlu cara yang tepat untuk melakukan pencucian spermatozoa dengan metode sentrifugasi dengan tingkat kerusakan spermatozoa yang tidak terlalu parah. Penelitian yang pernah dilakukan Sardjito (2003) membuktikan bahwa kecepatan sentrifugasi 1000-2000 rpm tidak menyebabkan kerusakan membran spermatozoa yang parah. Penggunaan kecepatan sentrifugasi sebesar 1800 rpm pada penelitian ini masih dalam batas kecepatan yang tidak menyebabkan kerusakan membran spermatozoa yang parah.

Pencucian spermatozoa menggunakan medium pencuci yang mengandung zat makanan sebagai pengganti hilangnya plasma semen, mampu mempertahankan pH, tidak bersifat racun terhadap spermatozoa (Salisbury *and*

Temperatur lingkungan sangat berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa. Partodiharjo (1982) menyatakan bahwa spermatozoa yang dibiarkan terlalu lama pada suhu ruangan akan mengalami kematian karena panas berlebihan. Untuk mengurangi panas berlebihan, pada penelitian ini tabung yang berisi spermatozoa ditutup dengan kertas aluminium dan diletakkan ke dalam gelas beker yang berisi air.

Faktor yang dapat menurunkan daya hidup spermatozoa adalah amoniak dan hidrogen peroksida hasil metabolit spermatozoa yang bersifat racun dalam plasma semen (Salisbury *and* Van Dermark, 1985). Menurut Hinting (1989), hasil metabolit yang bersifat racun pada plasma semen dapat dihilangkan melalui pencucian. Penelitian yang pernah dilakukan Sardjito (2003) membuktikan bahwa pencucian dengan kecepatan sentrifugasi 1000-2000 rpm tidak menyebabkan kerusakan membran spermatozoa yang parah. Kerusakan membran spermatozoa yang parah menyebabkan pembentukan energi tidak optimal dan kematian spermatozoa. Penggunaan kecepatan sentrifugasi sebesar 1800 rpm dalam penelitian ini masih dalam batas yang tidak menyebabkan kerusakan membran yang parah.

Data hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) diantara perlakuan. Pencucian dua kali (P2) dengan rata-rata persentase sebesar 79,67 % memberikan jumlah spermatozoa hidup tertinggi yang berbeda nyata ($p<0,05$) terhadap kelompok pencucian satu kali (P1) dengan rata-rata persentase jumlah spermatozoa hidup sebesar 76,00% dan kontrol (P0) dengan rata-rata persentase sebesar 71,50 %(tabel 4). Hal ini disebabkan pada pencucian

Van Dermark,1985). Penggunaan medium *Brackett and Oliphant* (BO) yang ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan kafein pada penelitian ini memenuhi persyaratan sebagai bahan pencuci spermatozoa. Medium BO mengandung glukosa, piruvat, asam amino sebagai bahan nutrisi spermatozoa. Glukosa pada medium BO berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa, natrium karbonat pada medium BO berfungsi sebagai *buffer* untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. Menurut Hinting (1989), pencucian spermatozoa dalam medium yang mengandung BSA dapat merangsang proses kapasitasi. BSA merupakan bagian dari protein darah sehingga mempunyai tekanan osmotik sama dengan darah yang berfungsi melindungi permeabilitas membran spermatozoa. Menurut Utomo (2001) menyatakan bahwa penambahan kafein ke dalam medium pencuci spermatozoa dapat menghilangkan *calmodulin binding protein* dan menghambat penguraian CAMP menjadi 5'AMP, peningkatan CAMP dapat memacu motilitas spermatozoa.

Data hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) diantara perlakuan. Kelompok pencucian dua kali (P2) dengan rata-rata persentase motilitas (gerak progresif) spermatozoa domba sebesar 75,00 % memberikan motilitas (gerak progresif) tertinggi yang berbeda nyata ($p<0,05$) terhadap kelompok pencucian satu kali (P1) dengan rata-rata persentase motilitas sebesar 70,83 % dan kontrol (P0) dengan rata-rata persentase motilitas sebesar 60,83 % (tabel 3). Hal ini disebabkan pada kelompok pencucian dua kali (P2) plasma semen lebih banyak yang terbuang. Menurut Hinting (1989), plasma semen mengandung bahan-bahan penghambat kapasitasi dan pergerakan spermatozoa

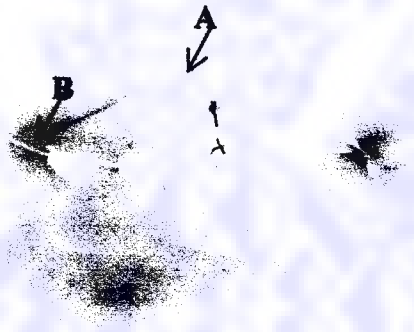
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

seperti *calmodulin binding protein*, leukosit dan hidrogen peroksida. Menurut Utomo (2001), hilangnya *calmodulin binding protein* pada permukaan spermatozoa memudahkan masuknya ion kalsium ke dalam sel sperma sehingga motilitas meningkat. Menurut Sardjito (2003), hidrogen peroksida yang merupakan hasil metabolit spermatozoa dalam plasma semen yang tidak dibuang akan menyebabkan konsentrasi H^+ meningkat sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa. Semakin banyak plasma semen yang terbuang, bahan-bahan penghambat kapasitasi dan pergerakan spermatozoa dapat dihilangkan. Menurut Sardjito (2003), selama kapasitasi terjadi peningkatan metabolisme. Perombakan ATP selama metabolisme akan menghasilkan energi yang diperlukan untuk kontraksi fibril-fibril spermatozoa. Semakin besar energi yang dihasilkan spermatozoa menyebabkan pergerakannya semakin cepat. Akibatnya persentase motilitas (gerak progresif) dan gerakan progresif spermatoza pada kelompok pencucian dua kali (P2) lebih tinggi.

5.2 Spermatozoa Hidup

Penilaian jumlah spermatozoa yang hidup berdasarkan adanya zat warna yang menembus spermatozoa. Pada spermatozoa hidup dengan kondisi membran yang masih utuh sehingga zat warna sulit menembus membran. Akibatnya sediaan spermatozoa dengan pewarnaan *eosin negrosin* tetap berwarna putih. Sedangkan spermatozoa yang sudah mati karena terjadi kerusakan membran, maka zat warna mudah masuk menembus sel sperma sehingga berwarna merah (Hardijanto dkk.,1993).

spermatozoa dua kali, plasma semen lebih banyak yang terbuang. Menurut Hinting (1989), plasma semen mengandung bahan-bahan yang dapat menurunkan daya hidup spermatozoa seperti mikroorganisme, gas-gas beracun hasil metabolisme spermatozoa. Adanya mikroorganisme dalam plasma semen mengakibatkan daya hidup spermatozoa menurun karena persaingan penggunaan zat penting antara mikroorganisme dan spermatozoa. Selain mikroorganisme, dalam plasma semen terdapat gas beracun hasil metabolisme spermatozoa berupa asam laktat, amoniak, hidrogen peroksida yang jika tidak dihilangkan dalam waktu yang lama akan mengakibatkan kematian spermatozoa. Menurut Aurich (1987) dikutip dari Sardjito (2003), dalam suasana asam konsentrasi H^+ semakin tinggi sehingga membuka peluang terbentuknya hidrogen peroksida yang akhirnya menyebabkan gangguan terhadap metabolisme sel sehingga energi yang dihasilkan tidak optimal dan menurunkan kemampuan hidup.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis spermatozoa dengan pewarnaan *eosin negrosin* pembesaran 400 kali. A) Sel sperma hidup, B) Sel sperma mati.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pencucian spermatozoa domba sebanyak dua kali pada medium BO yang ditambahkan BSA dan kafein dapat meningkatkan persentase motilitas (gerak progresif) spermatozoa.
2. Pencucian spermatozoa domba sebanyak dua kali pada medium BO yang ditambahkan BSA dan kafein dapat meningkatkan persentase jumlah spermatozoa hidup.

6.2. Saran

1. Perlakuan pencucian spermatozoa domba sebanyak dua kali pada medium BO yang ditambah BSA dan kafein dapat digunakan untuk meningkatkan persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai daya fertilisasi secara *in vitro* spermatozoa hasil pencucian.

RINGKASAN

NURUL HIDAYAH. Penelitian mengenai pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa domba pada medium BO ditambah BSA dan kafein terhadap persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup di bawah bimbingan Trilas Sardjito, M.Si.,Drh sebagai pembimbing pertama dan Herman Setyono, M.S.,Drh sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh frekuensi pencucian spermatozoa pada medium *Brackett and Oliphant* (BO) yang ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dan kafein terhadap persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.

Penelitian ini terdiri dari tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok pencucian satu kali (P1), pencucian dua kali (P2) dan kontrol (P0) dengan masing-masing enam ulangan. Pada masing-masing kelompok ditambahkan medium BO ditambah BSA dan kafein sebanyak 3 ml.

Spermatozoa diperoleh dari hasil penampungan semen domba ekor gemuk, dengan menggunakan seperangkat vagina buatan. Semen yang diperoleh sebelum diberi perlakuan, dilakukan pemeriksaan makroskopis maupun mikroskopis untuk mengetahui kualitasnya. Semen yang memenuhi persyaratan dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok I (P1) berisi 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein) dicuci sebanyak satu kali dengan cara diputar dalam sentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian cairan

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

bagian atas dibuang sehingga yang tersisa hanya pellet. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml medium pencuci kemudian diletakkan pada gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit. Kelompok II (P2) berisi 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml BO + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein) dicuci sebanyak dua kali dengan cara diputar dalam sentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, cairan bagian atas dibuang sehingga yang tersisa dalam tabung hanya pellet. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml media pencuci kemudian disentrifus lagi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. cairan bagian atas dibuang sehingga yang tersisa hanya pellet. Tabung yang berisi pellet ditambahkan 3 ml medium pencuci kemudian diletakkan ke dalam gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit. Kelompok III adalah kontrol (P0) berisi 0,5 ml semen + 3 ml medium pencuci (50 ml Bo + 1,0 gram BSA + 0,0485 gram kafein), tidak disentrifugasi. Tabung yang berisi semen diletakkan pada gelas beker berisi air dan didiamkan pada suhu ruangan selama 75 menit. Pellet dan semen pada masing-masing kelompok diperiksa persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.

. Hasil penelitian menunjukkan persentase motilitas spermatozoa pada kelompok kelompok pencucian satu kali (P1) adalah sebesar 70,83%, pencucian dua kali (P2) sebesar 75,00%, dan kontrol (P0) adalah sebesar 60,83%. Berdasarkan hasil analisis varian (Anava) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) antara perlakuan. Kelompok pencucian dua kali (P2) memberikan motilitas (gerak progresif)

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

tertinggi yang berbeda nyata ($p<0,05$) dengan pencucian satu kali (P1) dan kontrol (P0), kelompok pencucian satu kali (P1) berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kontrol (P0).

Hasil penelitian terhadap jumlah spermatozoa hidup menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p<0,01$) antara perlakuan. Pada kelompok pencucian dua kali (P2) dengan rata-rata persentase jumlah spermatozoa hidup sebesar 79,67% berbeda nyata ($p<0,05$) terhadap kelompok satu kali pencucian (P1) dan kontrol (P0). Kelompok kontrol dengan rata-rata persentase sebesar 71,50% memberikan jumlah spermatozoa hidup terendah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pencucian spermatozoa domba sebanyak dua kali pada medium BO ditambah BSA dan kafein dapat meningkatkan persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup.

DAFTAR PUSTAKA

Anonimus. 2000. *Interaction of SWP With Bovine Serum Albumin (BSA).* http://www.friedli.com/research/phd.htm

Amelar. J. Fertility, R.D, L. Dubin and C.Y. Schoenteld. 1980. *Sperm Motility* and sterility. 3 Dev. P: 197-215

Boatman, D.E, B.D. Bovister and E. Cruz. 1990. *Addition Of Caffein Can Reactivate Immotily Golden Hamster Spermatozoa.* J. Androl. P: 66-72

Blakely, J. and D.H. Bade. 1991. *Ilmu Peternakan.* Penerjemah B. Srigandono. Edisi 4. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal : 333-349

Cahyono, B. 1988. *Beternak Domba dan Kambing.* Kanisius. Yogyakarta. Hal : 15-20

Evans, G and W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats.* Botter Worth. Hal : 25-32

Frandson, R.D. 1993. *Anatomi dan Fisiologi ternak.* Penerjemah B. Srigandono dan K. Praseno. Edisi 4. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal : 754-757

Ganiswara, S.G. 1995. *Farmakologi dan Terapi.* Edisi 4. Fakultas Kedokteran Indonesia. Jakarta. Hal : 166

Gardner, D.L. and E.S.E. Hafez. 1987. *Spermatozoa and Seminal Plasma Reproduction in Farm Animal.* 5th Ed. Lea and Febiger. Philadelpia. Hal : 165-188

Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal.* 7th Ed. Lea and Febiger. Philadelpia. Hal :272-336

Hardijanto dan Hardjopranjoto. 1999. *Ilmu Inseminasi Buatan.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 34-36

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, T. Susilowati, S. Suprayogi. 1999. *Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 7-16

Harrison, R.A.P. and I.G. White. 1972. *Some Metode for Washing Spermatozoa from Bull, Ram and Boar ; A Comparison Using Biochemical and Other Criteria.* Journal Reproduction Feertilization. Vol. 29.

Hinting, A. 1989. *Assement Of Human Spermatozoa Ability.* Tesis. Rijks Universiteit. Belgium. Hal : 1-16

Hinting, A. dan Marlinata, A. 1981. *Beberapa Obat yang Meningkatkan energi Spermatozoa. Editor Arsyad, K.M. Prosiding Seminar Spermatogenesis.* Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi Indonesia. Surabaya. Hal : 27-29

Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknik Reproduksi Hewan Betina.* Penerbit ITB. Bandung. Hal : 124-130

Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 27-29

Kusriningrum, R. 1990. *Rancangan Percobaan ; Rancangan Acak Lengkap. Diktat Kuliah. Universitas Airlangga.* Surabaya. Hal : 65

Laing, J.A, W.J.B. Morgan, W.C. Wagner. 1998. *Fertility and Infertility Veteriner Practise.* 5th Ed. Bailerre Tindal. London. P : 8-11

Mahaputra, L., I. Mustofa, S. Utama dan P. Srianto. 1996. *Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi Madura.* Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3. dirjen dikti. Jakarta. Hal : 45-57

Nalbandov, AV.1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas.* Edisi 3. Penerbit Universitas Indonesia.

Nakatsukosa, E., T. Inomata, T. Ikeda, M. Shino and N. Kashiwazaki. 2001. Generation *of Live Rat Offspring by Introuterine Insemination With Epididymal Spermatozoa Cryopreservased at-96° C.* J. Reproduction. P : 463-467

Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan.* PT. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal : 519-556

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Poernomo, B. 2002. *Pengantar Ilmu Mudigah*. Diktat kuliah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 23-44

Rees, J.M., W.J. Ford and Hull.1990. *Effect of Caffein and Pentoxifylline on The Motility and Metabolism of Human Spermatozoa*. J. Reprod. Fertil. Vol 90. P : 147-156

Rimayanti., T. Hernawati, S. Suherni, H. Agoes dan B. Utomo. 1998. *Pengaruh pengenceran Media EBBS dan BO Pada Semen Beku Kambing Etawa Terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 12-15

Sardjito, T. 2003. *Pengaruh Sentrifugasi Spermatozoa Sapi Terhadap Intregritas Membran, Resistensi dan Kelayakan Kondisi pada Proses Fertilisasi In Vitro*. Tesis. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 40-53

Salisbury, G.W and N.L. Van Dermark. 1985. *Fisiologi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta*. Hal : 530-550

Satmoko dan Soeradi. 1992. *Studi Kafein Terhadap Kualitas Spermatozoa Manusia In Vitro*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta

Suarez, S.S. 1998. *The Oviductal Sperm Reservoir in Mamals ; Mechanism of Formation*. J. Biol. Reprod. P : 1105-1107

Taggart, D.A., C.M. Leigh, U.R. Steele and J. Phelan. 1996. *Effect Of Cooling and Cryopreservation on Sperm Motility and Morphology of Several Species of Marsupial*. J. Reprod. Fertile. Dev. 8. P : 672-679

Toelihere, M.R. 1981. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal : 102- 379

Tomaszweska, M.W., I.K. Sutama, I.G. Putu dan T.D. Chaniago.1991. *Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi ternak di Indonesia*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal : 25-32

Tournaye, H. 1994. *The Effect of Pentoxity on Sperm Function and Embryionic Development of Male Factor Infertility*. Tesis. Vrije Unversiteit. Brussel. P : 22

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Trianasari, R. 2001. *Pengaruh Berbagai Bahan Pengencer Dalam Proses Pembekuan Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Domba.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 1-8

Utomo, B. 2001. *Pengaruh Kafein pada Medium Pencucian dan Kapasitasi Spermatozoa Kambing Terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal.* Media Kedokteran Hewan. Vol 18. Hal : 123-126

Yanagimachi, R. 1986. *The Movement Of Goat Spermatozoa Before and After Capacitation.* J. Reprod. Fert. Vol 23. P : 193-196

Lampiran 1. Analisis Statistik Persentase Motilitas dan Jumlah Spermatozoa Hidup dengan Menggunakan Analisis Varian (Anava) dilanjutkan Uji BNT 5%

Tabel 5. Persentase Motilitas Spermatozoa Domba

Ulangan	Perlakuan (%)		
	P0	P1	P2
1	60	70	75
2	60	70	75
3	60	75	75
4	65	70	75
5	60	70	75
6	60	70	75
Total	365	425	450
Rata-rata	60,83	70,83	75,00
SD	2,04	2,04	0,00

Tabel 6. Persentase Jumlah Spermatozoa Hidup

Ulangan	Perlakuan (%)		
	P0	P1	P2
1	73	76	80
2	72	76	80
3	72	75	78
4	70	76	80
5	72	78	80
6	70	75	80
Total	429	456	478
Rata-rata	71,50	76,00	79,67
SD	1,22	1,10	0,82

Oneway

Descriptives

motilitas sperma 75 menit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
po	6	60,8333	2,0412	,8333	58,6912	62,9755	60,00	65,00
p1	6	70,8333	2,0412	,8333	68,6912	72,9755	70,00	75,00
p2	6	75,0000	,0000	,0000	75,0000	75,0000	75,00	75,00
Total	18	68,8889	6,3142	1,4883	65,7489	72,0289	60,00	75,00

ANOVA

motilitas sperma 75 menit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	636,111	2	318,056	114,500	,000
Within Groups	41,667	15	2,778		
Total	677,778	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: motilitas sperma 75 menit

LSD

(I) P	(J) P	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
po	p1	-10,0000*	,9623	,000	-12,0510	-7,9490
	p2	-14,1667*	,9623	,000	-16,2177	-12,1157
p1	po	10,0000*	,9623	,000	7,9490	12,0510
	p2	-4,1667*	,9623	,001	-6,2177	-2,1157
p2	po	14,1667*	,9623	,000	12,1157	16,2177
	p1	4,1667*	,9623	,001	2,1157	6,2177

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Oneway

Descriptives

jumlah hidup spema 75 menit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	71,50	1,22	,50	70,21	72,79	70	73
1	6	76,00	1,10	,45	74,85	77,15	75	78
2	6	79,67	,82	,33	78,81	80,52	78	80
Total	18	75,72	3,58	,84	73,94	77,50	70	80

ANOVA

jumlah hidup spema 75 menit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	200,778	2	100,389	89,455	,000
Within Groups	16,833	15	1,122		
Total	217,611	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah hidup spema 75 menit

LSD

(I) P	(J) P	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-4,50*	,61	,000	-5,80	-3,20
	2	-8,17*	,61	,000	-9,47	-6,86
1	0	4,50*	,61	,000	3,20	5,80
	2	-3,67*	,61	,000	-4,97	-2,36
2	0	8,17*	,61	,000	6,86	9,47
	1	3,67*	,61	,000	2,36	4,97

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan Motilitas (gerak progresif) Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas (gerak progresif) spermatozoa dilakukan dengan :

1. Mengambil semen atau pelet dari masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol.
2. Ambil satu tetes dari masing-masing kelompok. Teteskan pada objek gelas khusus berpemukaan cekung.
3. Tutup sediaan dengan objek gelas dan periksa di bawah mikroskop pembesaran 400 kali.
4. Menghitung persentase sel spermatozoa yang bergerak progresif dengan penilaian 0% (tidak ada yang bergerak) sampai 100% (seluruh sperma bergerak ke depan).
5. Pengamatan dilakukan pada 5 lapangan pandang

Sumber : Toelihere (1989)

Lampiran 3. Prosedur Pemeriksaan Jumlah Hidup Spermatozoa

Pemeriksaan dan penghitungan jumlah hidup spermatozoa dilakukan dengan cara :

1. Ambil setetes kecil semen atau pelet yang diperiksa, tempatkan pada salah satu ujung objek gelas.
2. Ambil setetes besar larutan *eosin negrosin*, tempatkan di sebelah tetesan semen.
3. Campur kedua tetesan tersebut dengan cepat sampai homogen.
4. Buat preparat ulas dari campuran tersebut di atas.
5. Panaskan di atas nyala api Bunsen.
6. Pencampuran sampai dengan pemanasan harus dilakukan dengan cepat ± 15 detik.
7. Preparat ulas diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.
8. Spermatozoa hidup akan berwarna putih sedangkan mati berwarna merah.
9. Dibuat persentase dari pengamatan 100 ekor spermatozoa dalam satu atau dua lapangan pandang, berapa yang hidup (putih) dan berapa yang mati (merah).

Sumber : Toelihere (1989)

Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Larutan *Eosin Negrosin*

1. Buat larutan A : 20 gram Negrosin *ad* 500 ml aqua. Aduk dan panaskan.
2. Buat larutan B : 200 ml larutan a (21,628 gram Na_2HPO_4-$2H_2O$ *ad* 500 ml aqua) ditambah larutan b (22,254 gram KH_2PO_4 *ad* 500 ml aqua).
3. Buat larutan C : 43,3 gram glukosa *ad* 500 ml aqua.
4. Campurkan bahan berikut dengan pemanasan :

A	100 ml
B	30 ml
C	20 ml
Eosin yellow	5 gram
Aqua *ad*	300 ml

Sumber : Hardijanto dkk,(2003)

Lampiran 5. Prosedur Pembuatan Medium Pencuci Spermatozoa

Medium A (500 ml)

1. NaCl	4,3092 gram
2. KCl	0,1974 gram
3. $CaCl_2.2H_2O$	0,2171 gram
4. $NaH_2PO_4.2H_2O$	0,0840 gram
5. $MgCl_2.6H_2O$	0,0697 gram
6. Phenol red 0,5%	0,1 ml
7. Distilled water	500 ml

Simpan dalam botol tertutup rapat

Medium B (200 ml)

1. $NaHCO_3$	2,5873 gram
2. Phenol red 0,5%	0,04 ml
3. Distilled water	200,0 ml

Gassing dengan mengalirkan CO_2 dalam medium B selama 30 menit, simpan dalam botol dengan tutup putar (rapat)

BO medium

1. Medium A 76,0 ml
2. Medium B 24,0 ml
3. Glukosa 0,15 gram
4. Sodium pyruvat 0,0137 gram

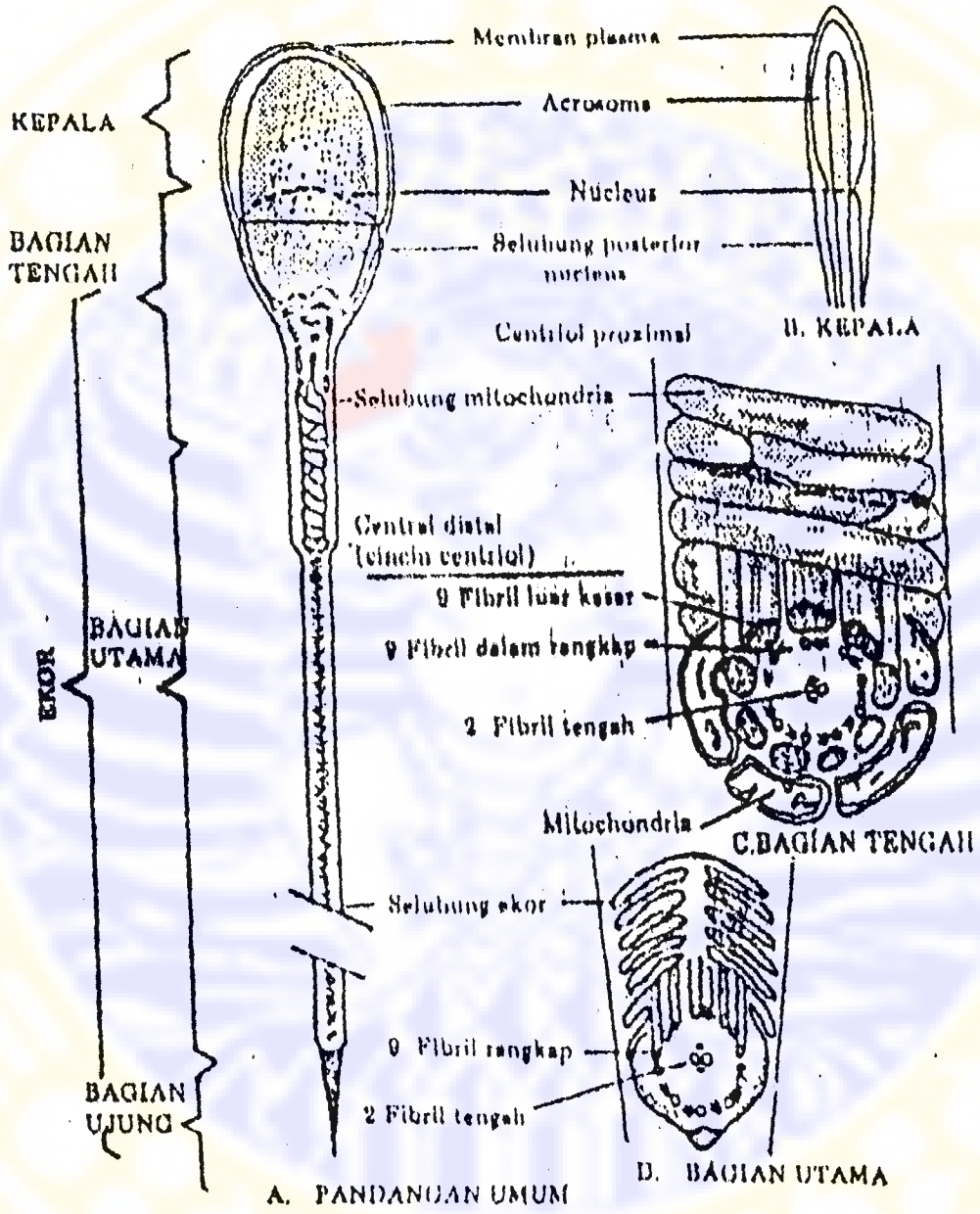
Filtrasi dengan mikrofilter 0,22 mikrometer, lalu simpan dalam water bath

Medium Pencuci Sperma

1. BO medium 50 ml
2. Kafein sod. Benzoat 0,0485 gram
3. BSA 1.0 gram

Campur BSA perlahan-lahan (jangan dikocok), campur sampai merata dan filtrasi dengan mikrofilter 0,22 mikrometer. Simpan dalam water bath 37 ° C

Sumber : Sigma,Lab. Bio Analitik (2004)



Gambar 3. Bagian-bagian Spermatozoa