

BIOLOGICAL PRODUCTS

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

KKC
KK II
577.15
Pem
1

**PEMERIKSAAN MEMBRAN SPERMATOZOA
PADA SEMEN BEKU DOMBA
SETELAH DICAIRKAN**

300002198 3141

Ketua Peneliti :

Drh. Maslichah Mafruchati

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai Oleh : DIP OPF Unair 1996/1997
SK.Rektor Nomor : 6229/J03/PL/1996
Nomor : 42**

Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan
Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi
Universitas Airlangga

PEMERIKSAAN MEMBRAN SPERMATOZOA
PADA SEMEN BEKU DOMBA
SETELAH DICAIRKAN

Peneliti

Drh. Maslichah Mafruchati

Drh. Epy Muhammad Luqman

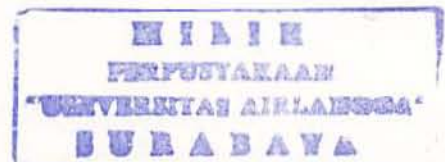
Drh. W i d j i a t i, M.Si

Dr. Bambang Poernomo S.,MS.,Drh

Drh. Nenny Harijani, M.Si

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

300002198 3141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIP/OPF Unair 1996/1997

SK. Rektor Nomor : 6229/J03/PL/1996

Nomor Urut : 42



UNIVERSITAS AIRLANGGA LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. Puslit dan Pembangunan Regional | 4. Puslit Lingkungan Hidup | 8. Puslit Kependudukan dan Pembangunan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 5. Puslit dan Pengembangan Gizi | 9. Puslit Bioenergi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 6. Puslit/Studi Wanita | 10. Puslit/Studi Kesehatan Reproduksi |
| | 7. Puslit Olahraga | |

Jl. Darmawangsa Dalam No. 2 Telp. (031) 5342322 Fax. (031) 5342322 Surabaya 60286

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Pemeriksaan Membran Spermatozoa Pada Semen Beku Domba Setelah Dicairkan
- b. Macam Penelitian : () Fundamental, (V) Terapan, () Pengembangan
2. Kepala Proyek Penelitian
 - a. Nama Lengkap Dengan Gelar : drh. Maslichah Mafruchati
 - b. Jenis Kelamin : W a n i t a
 - c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata Muda/IIIa/131 760 376
 - d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
 - e. Fakultas/Jurusan/Puslit : Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
 - f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : 5 (lima) orang
4. Lokasi Penelitian : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
 - a. Nama Instansi : -
 - b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 3.000.000,00
8. Hasil Seminar Penelitian :
 - a. Dilaksanakan Tanggal : 25 Maret 1997
 - b. Hasil Penilaian : () Baik Sekali (V) B a i k
() S e d a n g () K u r a n g



Mengetahui/ Mengesahkan :
n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Surabaya, 25 Maret 1997

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini f
NIP. 130 355 372

RINGKASAN PENELITIAN

J u d u l : PEMERIKSAAN MEMBRAN SPERMATOZOA PADA SEMEN BEKU DOMBA SETELAH DICAIRKAN

Peneliti : Maslichah Mafruchati
Epy Muhammad Luqman
W i d j i a t i
Bambang Poernomo S.
Nenny Harijani

Sumber Biaya : DIP/OPF Unair 1996-1997
SK. Rektor Nomor : 6229/J03/PL/1996

Pada proses pembekuan semen banyak faktor yang dapat menurunkan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur sehingga conception rate akan menurun dan akibatnya angka kebuntingan juga menurun. Pada proses pembekuan semen, tidak selalu memungkinkan untuk mempertahankan temperatur yang sesuai dengan prosedur. Terdapat bukti-bukti yang menunjukkan kerusakan membran spermatozoa karena shock temperatur. Motilitas spermatozoa dapat digunakan sebagai indikator spermatozoa yang sehat untuk dapat membuahi sel telur.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan antara keutuhan membran dengan motilitas spermatozoa. Dengan mengetahui keutuhan membran spermatozoa maka motilitas spermatozoa akan baik, sehingga angka fertilitasi dapat ditingkatkan. Peningkatan angka fertilitasi salah satu faktor penting untuk digunakan sebagai acuan dalam keberhasilan peningkatan metode kultur embrio.

Penelitian ini menggunakan alat dan bahan : Vagina buatan, tabung penampung spermatozoa, penghitung Thoma, slide objective, semen domba, dry ice, nitrogen cair, laktosa, penicillin, streptomycin, natrium sitrat, medium Jayendran. Semen beku yang telah cair kemudian dihitung motilitasnya. Penghitungan motilitas diamati dengan menghitung persentase jumlah spermatozoa yang bergerak progresif ke depan dibagi jumlah total spermatozoa dalam satu lapangan pandang. Pemeriksaan keutuhan membran dilakukan dengan mencampurkan 4,5 ml medium (*Hypoosmotic Swelling (HOS)*) ditambah 0,5 ml semen cair. Mengamati keutuhan membran spermatozoa jika membran spermatozoa intact maka air akan masuk dan terjadi penggembungan di bagian ekor dan kepala. Jika terjadi kerusakan membran spermatozoa, maka tidak ada penggembungan pada bagian ekor atau kepala. Penghitungan keutuhan membran dengan menghitung jumlah spermatozoa yang menggembung dibagi jumlah total spermatozoa dalam satu lapangan pandang. Variabel yang diamati adalah persentase spermatozoa yang motil dan mengalami penggembungan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis korelasi regresi.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan ada hubungan antara ketuhan membran dengan motilitas spermataozoa ($R^2=0,8$). Uji pemeriksaan membran spermatozoa metode Jayendran dan Zanelved ini dapat digunakan secara luas mengingat penggunaannya sangat mudah dan murah sebagai uji kualitatif spermatozoa.

KATA PENGANTAR

Syukur kami ucapkan atas rahmat dan hidayahNya sehingga penulisan laporan penelitian ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini tak lupa kami sampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan dana dalam penelitian ini.
2. Ketua Lembaga Penelitian atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bimbingan dan bantuanya dalam penelitian ini.
4. Kepala Laboratorium Fisiologi Reproduksi FKH Unair atas arahan, bimbingan selama penelitian berlangsung.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu koreksi yang bertujuan untuk memperbaiki laporan ini sangat kami harapkan.

Surabaya, April 1997

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

Kata Pengantar	iii
Daftar Tabel	iv
Daftar Lampiran	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Fisiologi Semen Beku	5
2.2. Faktor Mempengaruhi Daya Hidup Sperma- tozoa Secara In Vitro	6
2.3. Membran Spermatozoa	8
III. MATERI DAN METODE	10
3.1. Tempat Penelitian	10
3.2. Materi Penelitian	10
3.3. Metode Penelitian	11
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
V. KESIMPULAN DAN SARAN	20
5.1. Kesimpulan	20
5.2. Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Perhitungan Keutuhan Membran dan Motilitas Spermatozoa	14
2. Persamaan Garis Regresi dan Korelasi Keutuhan Membran dengan Motilitas Spermatozoa Domba...	15

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Perhitungan Motilitas Spermatozoa dari Semen Beku Domba Setelah Dicairkan	24
2. Perhitungan Keutuhan Membran Spermatozoa dari Semen Beku Domba Setelah Dicairkan	24
3. Hasil Perhitungan Statistik Hubungan antara Keutuhan Membran dengan Motilitas Spermatozoa Domba	25
4. Diagram Perhitungan Statistik Hubungan antara Keutuhan Membran dengan Motilitas Spermatozoa Domba	26

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Perbaikan dalam metode kultur embrio telah maju dengan cepat dan sekarang telah menjadi acuan untuk keberhasilan perbaikan tersebut yaitu : maturasi oosit, fertilisasi, dan perkembangan embrio sampai periode blastosit (Overström, 1996).

Fertilisasi adalah suatu proses bersatunya kedua jenis sel kelamin (spermatozoa dan oosit) sehingga menghasilkan sebuah sel baru yang disebut sigot. Fertilisasi adalah suatu proses ganda yang meliputi aspek embriologis yaitu pengaktifan sel telur oleh spermatozoa dan aspek genetis berupa penurunan unsur kebakaan (DNA) dari pejan-tan ke sel telur (Hafez, 1987).

Salah satu unsur yang berperan dalam proses ferti-lisasi adalah spermatozoa yang telah dewasa dalam arti spermatozoa yang telah mengalami proses kapasitasi di saluran kelamin betina sebelum bertemu dengan oosit ditempat fertilisasi. Spermatozoa yang telah mengalami proses kapasitasi, maka spermatozoa ini akan mempunyai kemampuan untuk membuahi sel telur (Gilbert, 1988).

Pada proses pembekuan semen banyak faktor yang dapat menurunkan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur



sehingga *conception rate* akan menurun dan akibatnya angka kebuntingan juga menurun. Pada proses pembekuan semen, tidak selalu memungkinkan untuk mempertahankan temperatur yang sesuai dengan prosedur. Terdapat bukti-bukti yang menunjukkan kerusakan membran spermatozoa karena *cold shock* (Shamsuddin and Rodriguez-Martinez, 1994). Fenomena *cold shock* pada spermatozoa yang dibekukan dan perubahan-perubahan intra sel akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal-kristal es. Kristal-kristal es ini dapat merusak spermatozoa secara mekanik.

Untuk mengantisipasi persoalan tersebut perlu dilakukan pemeriksaan integritas fisiologis dari spermatozoa. Hal ini dimaksudkan untuk menentukan keutuhan membran spermatozoa karena bila terjadi kerusakan membran akrosom maka enzim-enzim fertilisasi akan keluar dan spermatozoa tidak akan mampu lagi menembus sel-sel kumulus yang membungkus sel telur akibatnya akan terjadi kegagalan fertilisasi.

Motilitas adalah sangat penting untuk fertilitas, karena motilitas dapat menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat. Motilitas dapat membantu transport spermatozoa dari luar untuk mencapai tempat terjadinya fertilisasi.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Proses kapasitasi dan reaksi akrosom membutuhkan membran spermatozoa yang utuh dan berfungsi baik. Adanya antibodi, enzim-enzim dan zat-zat lain yang merupakan suatu sistem komplemen yang terdapat di dalam semen dapat mempengaruhi fungsi membran spermatozoa ataupun dapat merusak membran spermatozoa. Motilitas spermatozoa yang progresif dapat menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat. Apakah terdapat korelasi antara keutuhan membran dengan motilitas spermatozoa ?.

Untuk menilai apakah spermatozoa mempunyai membran yang utuh dilakukan dengan *hypoosmotic swelling test* (HOS) atau uji pembengkakan hipoosmotik berdasarkan penelitian yang dilakukan Jayendran and Zanelved (1986).

1.3. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan di atas, maka perlu diajukan hipotesis penelitian yang dijadikan landasan dalam pelaksanaan penelitian selanjutnya. Hipotesis yang diuji adalah sebagai berikut :

Terdapat korelasi antara keutuhan membran dengan motilitas spermatozoa.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. Keutuhan membran spermatozoa menunjukkan motilitas spermatozoa yang baik.
2. Kemampuan motilitas spermatozoa dalam menentukan keberhasilan inseminasi buatan.

1.5. Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui kondisi keutuhan membran spermatozoa maka akan dapat menentukan motilitas spermatozoa sehingga dapat meningkatkan angka fertilisasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fisiologi Semen Beku

Semen merupakan sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran reproduksi betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Untuk dapat digunakan dalam waktu lama dan dengan daya buah yang baik, maka semen dapat dibekukan sebelum diinseminasikan. Keuntungan dari semen beku tersebut : peternak dapat memilih bibit yang dikehendaki, dapat didistribusikan secara luas sehingga mempunyai nilai ekonomis yang tinggi serta dapat mencegah beberapa invasi jasad renik.

Semen beku adalah mani yang telah diencerkan menurut prosedur biasa lalu dibekukan jauh di bawah titik nol beku air. Karena dibekukan, umur dan daya guna spermatozoa juga dibekukan (Partodihardjo, 1982). Pembekuan adalah fenomena fisik yang mengakibatkan suatu larutan terutama air (pelarut) akan membeku menjadi kristal-kristal es dan bahan terlarut tidak bersatu dengan kristal-kristal tersebut, tetapi berakumulasi dan makin pekat. Semen yang dibekukan diberi substrat krioprotektan dan sumber nutrisi. Pembekuan dilakukan bertahap untuk menghindari shock temperatur yang dapat mengakibatkan

pecahnya membran spermatozoa. Namun demikian persentase kematian spermatozoa dari semen beku mencapai 20-80 % (atau rata-rata 40 %) dan beberapa semen pejantan sekitar 10-20 % tidak tahan terhadap pembekuan (Hardjopranjoto, 1981).

Menurut Smith dan Polge (1950) yang dikutip oleh Hardjopranjoto (1991) penyimpanan semen sapi, kambing dan domba pada suhu rendah dalam pengencer kuning telur sitrat dengan penambahan 10 % dan 15 % gliserol kemudian didinginkan secara perlahan dari 2 °C sampai -79 °C dan dicairkan kembali menunjukkan 50-90 % semen masih hidup.

2.2 Faktor Mempengaruhi Daya Hidup Spermatozoa Secara

In Vitro.

Sifat-sifat fisik dan kimiawi bahan pengencer, kadar pengenceran dan faktor seperti suhu dan cahaya adalah penting dalam perlakuan dan penyimpanan semen untuk inseminasi buatan. Selain itu pH, tekanan osmotik, ion-ion elektrolit dan ion-ion non elektrolit mempengaruhi daya tahan hidup spermatozoa secara *in vitro* (Toelihere, 1981).

Spermatozoa sangat aktif dan tahan hidup lama pada sekitar pH 7. Spermatozoa domba dan sapi menghasilkan asam laktat dalam jumlah yang tinggi dari metabolisme fruktosa sehingga penting untuk menambahkan unsur-unsur

penyanggah atau buffer ke dalam medium untuk mempertahankan pH. Spermatozoa tetap motil untuk waktu lama di dalam media yang isotonik. Pada kondisi hipertonic ataupun hipotonik spermatozoa akan cepat rusak (Toelihere, 1981).

Ion-ion elektrolit dalam kadar rendah diperlukan spermatozoa, tapi dalam konsentrasi yang tinggi seperti fosfor, kalsium, kalium akan menghambat motilitas spermatozoa. Demikian juga ion-ion elektrolit seperti fruktosa, glukosa dan lain sebagainya dalam jumlah tertentu dibutuhkan spermatozoa sebagai sumber energi, namun dalam jumlah yang berlebih justru akan mempengaruhi daya tahan spermatozoa.

Kadar metabolisme dan motilitas spermatozoa berbeda-beda menurut suhu. Peninggian 10 °C di atas suhu lingkungan akan meningkatkan kadar metabolisme hingga dua kali lipat atau lebih. Di atas suhu 50 °C spermatozoa akan kehilangan daya geraknya dalam waktu 5 menit. Penyimpanan *in vitro* suhu 37 °C spermatozoa hanya tahan hidup beberapa jam karena kehabisan substrat, penurunan pH karena penimbunan asam laktat serta adanya pertumbuhan kuman.

Pendinginan akan mengurangi aktifitas spermatozoa dan memperpanjang umur spermatozoa, tetapi harus dijaga agar tidak rusak. Spermatozoa akan rusak apabila didinginkan jauh di bawah 0 °C, kecuali kalau ditambahkan

bahan-bahan krioprotektan seperti gliserol. Apabila spermatozoa didinginkan sampai mencapai titik beku tanpa diberi zat-zat krioprotektan, maka spermatozoa akan mengalami shok temperatur, spermatozoa akan kehilangan daya hidupnya. Kerusakan pada bagian membran plasma lebih besar daripada bagian intraseluler. Untuk menghindari shok temperatur, maka penurunan suhu secara perlahan pada suhu kritis 15 °C sampai 0 °C (Toelihere, 1979).

Temperatur mempengaruhi tingkat metabolisme relatif spermatozoa. Pada temperatur 37 °C tingkat metabolisme relatif mencapai 100 % (Salisbury, 1978).

2.3 MEMBRAN SPERMATOZOA

Spermatozoa ditutupi oleh membran sel dari kepala sampai ekor yang mempunyai susunan sangat kompleks baik komposisi molekulernya maupun secara fungsional. Membran spermatozoa sama seperti membran sel pada umumnya terdiri dari dua lapis lipoprotein (Pedersen and Fawcett, 1976), yang komposisinya terdiri dari 52 % protein, 40 % lipid, dan 8 % karbohidrat yang biasanya tergabung dalam glikolipid dan glikoprotein (De Robertis and De Robertis, 1980).

Susunan kerangka dari membran spermatozoa adalah kepala lapisan lipoprotein hidrofilik membentuk permukaan bagian luar dan kepala lapisan lipoprotein hidrofobik

membentuk permukaan membran bagian dalam, dan ekor-ekornya bertemu ditengah-tengah membran. Diantaranya terdapat protein globular dan protein fibrous dan protein-protein ini dapat bergerak (Capaldi, 1974).

Pada membran spermatozoa terdapat reseptor untuk lektin dan mempunyai sifat berpindah-pindah. Terjadinya perubahan ikatan lektin ini adalah : pada waktu proses maturasi spermatozoa di epididimys, selama kapasitasi, sesudah reaksi akrosom dan pada beberapa keadaan yang mendesak (Kochler, 1981). Membran spermatozoa mempunyai muatan yang negatip (Cooper and Bedford, 1971). Permukaan membran spermatozoa yang sebagian besar berasal dari plasma semen seperti laktoferin, proteinase, dan faktor dekapasitasi, sedang sebagian kecil berasal dari spermatozoa sendiri. Komponen membran spermatozoa yang berfungsi sebagai stabilisator adalah lipid (Hafez, 1980). Komposisi lipid pada membran spermatozoa terdiri dari : kolesterol, fosfolipid, spingiomyelin dan fosfatidil etanolamine (Halt and Nort, 1985).

Enzym yang terdapat dalam membran spermatozoa adalah : alkaline fosfatase, ATP-ase dan AMP-ase (Ivonov and Provirov, 1981), konsentrasi enzim-enzim tersebut berfungsi dalam proses metabolisme spermatozoa. Semakin besar jumlahnya maka kecepatan metabolisme semakin cepat (Zaneveld, 1985).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga selama 3 (tiga) bulan terhitung tanggal 9 Oktober hingga 4 Desember 1996.

3.2. Materi Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga ekor domba jantan yang berumur 2,5-3 tahun. Kondisi kesehatan secara klinis sehat dan mempunyai libido yang baik. Dipelihara di dalam kandang secara terpisah. Pakan yang diberikan rumput segar, daun-daunan, konsentrat dan minum secara *ad libitum*. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : vagina buatan, tabung penampung spermatozoa, penghitung Thoma, *slide objective*, peralatan kandang. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : semen domba, es kering, gliserol, fruktosa, susu skim, glukosa, nitrogen cair, laktosa, penicillin, streptomycin, natrium sitrat, medium Jayendran.

3.3. Metode Penelitian

Persiapan semen beku domba :

Pengambilan semen domba menggunakan vagina buatan. Semen yang tertampung diperiksa secara makroskopis meliputi : volume, konsentrasi, bau, warna dan derajat keasaman. Pemeriksaan rutin secara mikroskopis meliputi : penentuan konsentrasi, gerakan massa, gerakan individu dan penentuan persentase sperma hidup. Semen dalam standar normal kemudian diencerkan menggunakan pengencer sitrat kuning telur dengan cara sebagai berikut :

Laktosa 10,5 g ditambah akuades hingga 100 ml dipanaskan dengan suhu 80 °C, kemudian didinginkan hingga suhu kamar. Tambahkan kuning telur dengan perbandingan 100 : 27 kocok hingga homogen. Tambahkan pula penicillin 1000 IU/ml diluter dan streptomisin 1 mg/ml diluter juga gliserol 3,5 %. Masukkan semen dalam campuran tersebut pada suhu 5 °C selama 1 - 2 jam (waktu equilibrasi). Teteskan dalam lubang-lubang balok es kering (beberapa menit sampai padat), kemudian pindahkan ke kontainer berisi nitrogen cair hingga siap diperiksa dengan metode *hypoosmotic swelling*.

Persiapan medium :

Pada penelitian ini menggunakan medium *hypoosmotic swelling test* (HOS medium) menurut Jayendran dan Zanelved

(1986). yaitu campuran fruktosa 2,7 gram dalam 100 ml aqudest steril dengan natrium sitrat 1,47 gram dalam 100 ml aqudest steril. Total campuran 200 ml merupakan HOS medium yang diharapkan mempunyai nilai osmolaritas sebesar 150 osmol.

Cara kerja :

Semen beku di cairkan (thawing) dengan air kran pada suhu kamar dalam waktu kurang dari 5 menit, semen yang telah cair kemudian dihitung motilitasnya. Pemeriksaan keutuhan membran dilakukan dengan mencampurkan 4,5 ml medium HOS ditambah 0,5 ml semen cair (setelah dicairkan dari semen beku domba). Simpan dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37 °C (diusahakan tekanan osmotik tidak berubah). Dua jam kemudian diperiksa di bawah mikroskop kemudian dihitung spermatozoa yang mengembung dibagi dengan total spermatozoa yang dihitung dalam satu lapangan pandang.

Peubah yang diamati :

Penghitungan motilitas diamati dengan menghitung persentase jumlah spermatozoa yang bergerak progresif ke depan dibagi total spermatozoa dalam satu lapangan pandang. Mengamati membran spermatozoa jika membran spermatozoa utuh maka air akan masuk dan terjadi pengembangan di bagian ekor dan kepala. Jika terjadi kerusakan membran spermatozoa, maka tidak ada pengembangan pada bagian



ekor atau kepala. Penghitungan keutuhan membran spermatozoa dengan menghitung persentase jumlah spermatozoa yang menggebung dibagi dengan total spermatozoa dalam satu lapangan pandang.

Rancangan percobaan dan analisis statistik :

Varibel yang diamati adalah persentase spermatozoa yang motil dan mengalami penggebugan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis korelasi matriks.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang telah diperoleh dari penghitungan keutuhan membran dan motilitas spermatozoa dari semen beku domba yang dicairkan dikemukakan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan Keutuhan Membran dan Motilitas Spermatozoa (%).

No.	Rata-rata	
	Membran	Motilitas
1	74,2	69,5
2	66,4	68,6
3	64,4	74,0
4	63,1	72,0
5	70,1	79,4
6	60,9	68,0
7	66,9	74,3
8	68,5	71,9
x	66,8	72,2
sd	4,2	3,7

Hasil analisis korelasi matriks menunjukkan terdapat korelasi yang bermakna ($p < 0,05$) antara keutuhan membran dengan motilitas spermatozoa dari semen beku domba yang telah dicairkan dengan koefisien korelasi ($R^2 = 0,8$).

Spermatozoa yang mempunyai selubung pada bagian luarnya berupa membran plasma mempunyai fungsi khusus pada proses interaksi dengan sel telur (ovum). Membran plasma spermatozoa yang sempurna secara biokimiawi sangat diperlukan sebelum proses fertilisasi seperti kapasitasi dan reaksi akrosom. Membran plasma spermatozoa juga mempertahankan integritas sel spermatozoa, sehingga sangat penting dalam proses metabolisme juga keberhasilan pertemuan gamet jantan dan betina (Jayendran and Zanelved, 1986).

Proses pembekuan akan berpengaruh pada keadaan spermatozoa, menurut Toelihere (1981), bahwa kira-kira sebanyak 50 - 70 % sel-sel spermatozoa akan mati atau imotil karena proses pembekuan. Hal ini apabila tidak diantisipasi dengan penambahan beberapa medium untuk menjaga kekuatan membran spermatozoa akibat pengaruh temperatur, maka tidak akan menghasilkan viabilitas spermatozoa yang baik, yang nantinya keberhasilan fertilisasi tidak dapat diprediksi secara akurat (Mafruchati dkk., 1996).

Viabilitas spermatozoa akan hilang dan tidak dapat dipulihkan kembali, apabila spermatozoa yang diejakulasikan kemudian dengan segera didinginkan sampai mencapai suhu pembekuan. Kejadian ini disebut *cold shock*. Tanda khas *cold shock* adalah setelah pencairan kembali

(*post thawing*) spermatozoa tidak terjadi pergerakan. Kerusakan ini akibat dari daya selubung lipoprotein spermatozoa lebih besar dari pada daya kontraksi isi sel. Spermatozoa pada ejakulat kedua lebih resisten terhadap *cold shock* dari pada spermatozoa yang pertama. Resistensi ini merupakan sifat-sifat spermatozoa dan bukan sifat plasma semen (Toelihere, 1981).

Untuk pencegah terjadi *cold shock* akibat proses pendinginan, maka dilakukan pendinginan secara perlahan-lahan pada suhu kritis 15 °C sampai *cold shock* dapat dihambat dengan penambahan bahan-bahan yang mengandung zat pelindung phospholipid dan lecithin yang terdapat dalam kuning telur maupun air susu sapi.

Sebaliknya, pada saat pencairan kembali (*post thawing*) semen beku dengan menggunakan air bersuhu 5 °C atau lebih menunjuk beberapa variasi terhadap viabilitas spermatozoa. Menurut Hafez dan Elliot (1954), Van Demark *et al.* (1957) yang dikutip oleh Toelihere (1981) saat pencairan kembali (*post thawing*) semen beku dengan menggunakan air bersuhu 5 °C atau lebih menunjukkan beberapa variasi terhadap viabilitas spermatozoa. *Thawing* yang dilakukan pada temperatur 38 °C - 40 °C menghasilkan viabilitas lebih baik dibanding dengan suhu rendah. Peneliti lain ada menyatakan bahwa *thawing* pada temperatur 5 °C menghasilkan motilitas yang lebih baik di-

bandingkan dengan *thawing* pada temperatur 38 °C. Di Amerika Serikat *thawing* dilakukan dengan memasukkan *straw* ke dalam air es pada suhu 5 °C selama 5-6 menit. Motilitas spermatozoa dan persentase akrosom yang utuh tertinggi pada waktu segera sesudah semen beku dicairkan kembali dengan air panas pada suhu rata-rata 75 °C. Untuk Indonesia metode *thawing* yang paling praktis adalah *thawing* dengan air kran, dengan catatan bahwa semen yang sudah dicairkan kembali (*post thawing*) tersebut harus diinseminasikan dalam waktu kurang dari 5 menit.

Menurut (Marrow, 1980) di samping temperatur *thawing*, hal yang perlu diperhatikan adalah motilitas spermatozoa untuk dievaluasi, karena untuk mendukung ada tidaknya hubungan pengaruh temperatur terhadap persentase viabilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa merupakan prosentase dari spermatozoa yang mampu bergerak setelah semen beku dicairkan kembali (*post thawing*).

Menurut Shamsuddin and Rodriguez-Martinez (1994) Integritas membran spermatozoa dapat dipertahankan dengan baik apabila ditambahkan dengan glutaraldehid (5 % dalam 0,1 mol sodium cacodylate buffer, pH 7.2-7.4) pada medium saat *post thawing*.

Prinsip dasar uji *hypoosmotic swelling* yaitu membran plasma spermatozoa yang sempurna akan memberi kesempatan air untuk masuk ke dalam sel. Kondisi yang *hypoosmotic*

ini akan menyebabkan sel spermatozoa membengkak. Pada membran plasma spermatozoa yang mengelilingi bagian ekor nampak lebih fleksibel dan lebih longgar bila dibandingkan dengan membran plasma yang mengelilingi bagian kepala spermatozoa. Oleh sebab itu pembengkakan pada bagian ekor lebih jelas. Kemampuan sel spermatozoa untuk membengkak dalam kondisi *hyposmotic* menunjukkan kemampuan membran untuk memberikan mengalirnya air ke dalam sel sehingga terbentuk keseimbangan antara cairan dalam sel spermatozoa dengan cairan yang berada di sekitar sel spermatozoa.

Pembengkakan sel spermatozoa menunjukkan korelasi yang bermakna ($p < 0,05$) disebabkan motilitas sel spermatozoa juga tergantung pada transport zat-zat yang melewati membran spermatozoa dan sejumlah fungsi biokimia seperti metabolisme spermatozoa, aktifitas mikrotubuler pada ekor spermatozoa. Pembengkakan spermatozoa menunjukkan fungsi dan integritas membran spermatozoa baik (normal). Dengan demikian motilitas merupakan aspek fisiologis spermatozoa sedang morfologis normal merupakan aspek anatomis spermatozoa dan oleh karena kemampuan spermatozoa untuk menyesuaikan dengan kondisi *hyposmotic* merupakan aspek fisiologis, maka pembengkakan spermatozoa mempunyai hubungan kausal dengan motilitas (Subratha, 1986).

Uji pembengkakan *hypoosmotic* ini belum memberikan indikator fertilitas pejantan, namun uji ini sangat mudah dan murah untuk dilakukan.

BAB V**KESIMPULAN DAN SARAN****5.1. Kesimpulan**

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

Terdapat korelasi antara keutuhan membran dengan motilitas spermatozoa domba.

5.2. Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Meski uji pembengkakan *hypoosmotic* ini belum memberikan indikator fertilitas pejantan, namun uji ini sangat mudah dan murah untuk dilakukan.
2. Uji pembengkakan *hypoosmotic* disarankan dapat dilakukan pada uji rutin spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariguno. D., N. S. Lubis, A. Tjokronegoro dan S. Soebijanto. 1988. Pengaruh Antibodi Antisperma Pada Permukaan Spermatozoa Terhadap Keutuhan Fungsi Membran Spermatozoa. Kongres IV PANDI. Semarang.
- Becker. W. M. 1990. The World of The Cell. The Benyamin/Cumming Publishing Company, Inc. Menlo Park. California.
- Capaldi R.A. 1974. A Dynamic Model of Cell Membrane. J. American Science.
- De Robertis E.D.P and De Robertis E.M.F. 1980. Cell and Molecular Biology. 7th ed. Saunder College. Philadelphia.
- Gilbert, S.F. 1988. Developmental Biology. 2nd ed. Sinaver Assosites, Inc. Publisher. Sunderland. Massachusetts.
- Grippe, A. A. 1994. Cholesterol, Phospholipid and Phospholipase Activity of Ampulary and Istmic Fluid The Bovine Oviduct. J. Reprod. Fert.
- Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction in Farm Animals. 5th Ed. Lea and Febiger. Piladelphia.
- Halt, W. V. and North. R.D. 1985. Determination of lipid Composition and Thermal Phase Transition Temperature in Eriched Plasma Membran Fraction from Ram Spermatozoa. J. Reprod. Fert.
- Ivonov. N. and Provirov. Y. 1981. Isolation of Plasma Membranes fram Ram Spermatozoa by Two Phase Polymer System. J. Reprod. Fert.
- Jayendran, R. S. and Zaneveld. I.J.D. 1986. Instruction For Hypoosmotic Swelling (HOS) Test. Short Course : Reproduction / Andrology and Hormonal Contraception.
- Kochler. J.K. 1981. Lectins as probes of the sprmatozoon surface. Arch. Andrology.

- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mafruchati. M., B. P. Soenardirahardjo, E. M. Luqman, Widjiati, dan M. Sukmanadi. 1996. Kultur Embrio Dini dalam Medium Brinster. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Marrow. D.A. 1980. Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive disease in animals, W.B. Saunders Co., Philadelphia. London. Toronto.
- Overström. E. W. 1996. In Vitro Assesment of Embryo Viability. Theriogenology. 45:3-16.
- Park, C. K., O. Ohgoda and K. Niwa. 1989. Penetration of Bovine in The Present of Caffein and Heparin. J. Reprod.
- Partodihardjo, S. 1980. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Pedersen, H. and Fawcett D.W. 1976. Fuctional anatomy of human spermatozoa. In : Hafez E.S.E. Human semen and fertility regulation in men. The C.V. Mosby Comp. St. Louis.
- Salisbury, G.W, Van Demark, N.L, and Lodge, J.R. 1978. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, 2nd ed. Freeman and Co. San Francisco.
- Shamsuddin, M. and H. Rodriguez-Martinez. 1994. A Simple, Non Traumatic Swin-up Methode For The Selection of Spermatozoa for In Vitro Fertilization in The Bovine. Uppsala.
- Subratha, I. M., 1987. Nilai Uji Pembengkakan Hipoosmotik Untuk Menentukan Kualitas Spermatozoa. Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Toelihere. M. R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Toelihere, M. R. 1985. Ilmu Kebidanan pada Ternak Sapi dan Kerbau. Angkasa. Bandung.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization, In Physiology of Reproduction. New York.

Zaneveld L.J.D. 1985. The Biology of Human Spermatozoa.
Proceeding Congres PANDI. Jakarta.



Lampiran 1. Perhitungan Motilitas Spermatozoa dari Semen Beku Domba Setelah Dicairkan (%).

No.	Ulangan			Rata-rata
	I	II	III	
1	64,2	60,1	84,3	69,5
2	68,1	66,5	72,1	68,6
3	72,3	70,4	79,3	74,0
4	66,0	80,4	69,6	72,0
5	82,1	78,0	78,0	79,4
6	69,4	62,3	72,4	68,0
7	78,1	76,5	68,3	74,3
8	74,8	70,4	70,6	71,9

Lampiran 2. Perhitungan Keutuhan Membran Spermatozoa dari Semen Beku Domba Setelah Dicairkan (%).

No.	Ulangan			Rata-rata
	I	II	III	
1	70,1	72,4	80,1	74,2
2	66,4	64,1	68,8	66,4
3	70,1	70,8	52,3	64,4
4	62,1	72,6	54,6	63,1
5	70,2	76,6	83,6	70,1
6	66,2	60,3	56,1	60,9
7	70,1	68,3	62,4	66,9
8	70,2	67,3	60,0	68,5

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Statistik Hubungan antara Keutuhan Membran dengan Motilitas Spermatozoa Domba.

----- CORRELATION MATRIX -----

HEADER DATA FOR: A:IKA-1 LABEL: motilitas dan membran spermatozoa
 NUMBER OF CASES: 8 NUMBER OF VARIABLES: 2

	motilita	membran
motilita	1.00000	
membran	.23852	1.00000

PAMERAN

01 MAY 1998

CRITICAL VALUE (1-TAIL, .05) = + Or - .62658
 CRITICAL VALUE (2-tail, .05) = +/- .70477

N = 8