

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

SELESAI

PAMERAN

01 JAN 2000

EKTIVITAS PEMISAHAN SEL SPERMATOZOA PEMBAWA KROMOSOM X DAN Y
DENGAN TEKNIK PERCOLL, SEPHADEX, SWIM-UP DAN ASIDE MIGRATION
BERDASARKAN ANALISIS SITOGENETIK

Ketua Peneliti :

Suzanita Utama, MPhil., Drh.

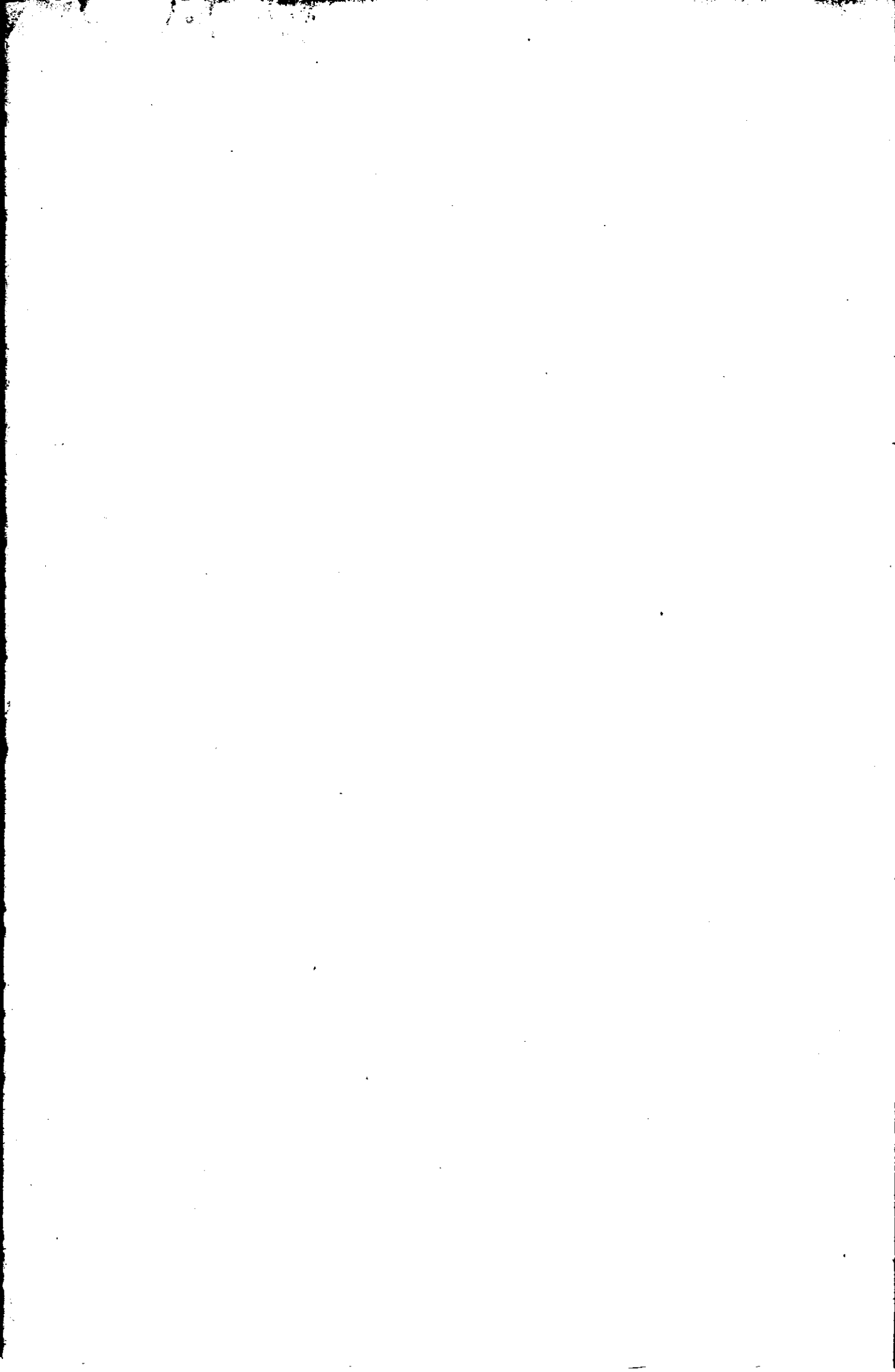


LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIK Suplemen Unair 1998/1999

SK.Rektor Nomor : 5415/J03/PL/1998

Nomor : 16



FERTILIZASI

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

571.864
1/1/99
c

AKTIVITAS PEMISAHAN SEL SPERMATOZOA PEMBAWA KROMOSOM X DAN Y
DENGAN TEKNIK PERCOLL, SEPHADEX, SWIM-UP DAN ASIDE MIGRATION
BERDASARKAN ANALISIS SITOGENETIK

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SELESAI

Ketua Peneliti :

Suzanita Utama, MPhil., Drh.



3000 059993141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DIK Suplemen Unair 1998/1999

SK.Rektor Nomor : 5415/J03/PL/1998

Nomor : 16

3000 07999 3121



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | Pembangunan (5995719) |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit / Kesehatan Repro- |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | duksi |

Kampus C, Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

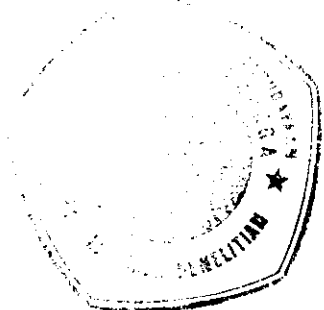
IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Efektivitas Pemisahan Sel Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y Dengan Teknik Percoll, Sephadex, Swim-up dan Aside Migration Berdasarkan Analisis Sitogenetik
- b. Macam Penelitian : Fundamental, Terapan, Pengembangan
 Institusional
- c. Katogori Penelitian : I II III IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap Dengan Gelar : drh. Suzanita Utama, M.Phil
- b. Jenis Kelamin : W a n i t a
- c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata Muda Tk.I/IIIb/131 877 883
- d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
- e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
- f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) 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 3.500.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 10 Februari 1999
- b. Hasil Penilaian : Baik Sekali B a i k
 S e d a n g K u r a n g

Surabaya, 10 Februari 1999

Mengetahui/Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

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





DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

EFEKTIVITAS PEMISAHAN SEL SPERMATOOZOA PEKBAWA KROMOSOM X DAN Y
DENGAN TEKNIK PERCOLL, SEPHADEX, *SWIM-UP* DAN *ASIDE MIGRATION*
BERDASARKAN ANALISIS SITOGENETIK

Peneliti:

Suzanita Utama, MPhil., Drh.

Fakultas Kedokteran Hewan



Lembaga Penelitian Universitas Airlangga

Dibiayai : DIK Suplemen Universitas Airlangga

SK. Rektor Nomor : 5415/JO3/PL/1998

Tanggal : 27 Juli 1998



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

EFEKTIVITAS PEMISAHAN SEL SPERMATOZOA PEMBAWA KROMOSOM X DAN Y
DENGAN TEKNIK PERCOLL, SEPHADEX, *SWIM-UP* DAN *ASIDE MIGRATION*
BERDASARKAN ANALISIS SITOGENETIK

Peneliti:

Suzanita Utama, MPhil., drh.
Dr. Jaba Mahaputra, MSc., drh.
Iman Mustofa, MKes., drh.

Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
Dibiayai : DIK Suplemen Universitas Airlangga
SK. Rektor Nomor : 5415/JO3/PL/1998
Tanggal : 27 Juli 1998



Ringkasan Penelitian

Judul Penelitian : EFEKTIVITAS PEMISAHAN SEL SPERMATOZOA PEMBAWA KROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK PERCOLL, SEPHADEX, *SWIM-UP*, DAN *ASIDE MIGRATION* BERDASARKAN ANALISIS SITOGENETIK.

Ketua Peneliti : Suzanita Utama

Anggota Peneliti : Laba Mahaputra
Imam Mustofa

Fakultas/Puslit : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Sumber Biaya : SPP/DPP Universitas Airlangga
SK. Rektor Nomor : 5415/J03/PL/1998
Tanggal : 27 Juli 1998

Jenis kelamin embrio mutlak ditentukan oleh sel spermatozoa sehingga dengan teknik manipulasi spermatozoa pembawa kromosom kelamin akan didapatkan embrio dengan jenis kelamin sesuai kebutuhan. Karena disuatu bidang peternakan, jenis kelamin ternak yang satu lebih bermanfaat dibandingkan jenis kelamin yang lain, maka dengan menekan produksi ternak dari jenis kelamin yang kurang bermanfaat dan meningkatkan produksi ternak dari jenis kelamin yang bermanfaat, akan dapat meningkatkan efisiensi reproduksi secara efektif.

Telah banyak penelitian yang mengusahakan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y berdasarkan perbedaan fisik, biokimia maupun immunologis diantara spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, namun pemisahan spermatozoa sapi Madura belum pernah diusahakan.

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas berbagai perlakuan dalam usaha pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y sapi Madura dengan kolom Percoll, kolom Sephadex.

teknik *swim-up* dan teknik *aside migration*.

Penelitian dilakukan di laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Unair, mulai bulan Juli 1998 sampai bulan Januari 1999.

Dalam penelitian ini sampel berupa semen beku sapi Madura unggul produksi Balai Inseminasi Buatan Singosari. Setelah masing-masing perlakuan yaitu pasase melalui kolom Percoll dan kolom Sephadex untuk mendapatkan spermatozoa pembawa kromosom X serta dengan teknik *swim-up* dan *aside migration* untuk mendapatkan spermatozoa pembawa kromosom Y, spermatozoa difertilisasikan dengan oosit sapi Madura yang telah masak. Setelah terjadi fertilisasi, *cleavage* dihentikan pada stadium metaphase, embrio dibuat preparat sitogenetik dan analisa dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat untuk penentuan jenis kelamin embrio sehingga diketahui kromosom kelamin spermatozoa yang membuahi oosit tersebut.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan adanya kecenderungan perubahan rasio spermatozoa pembawa kromosom X/Y setelah perlakuan dengan kolom Percoll, kolom Sephadex dan teknik *aside migration* yaitu dari 50 : 50 ke 54,9 : 45,1 dan 52,3 : 47,7 serta 48,2 : 51,8 berturut-turut. Sedang setelah perlakuan dengan teknik *swim-up* tidak tampak adanya pergeseran dari rasio normal.

Dengan terkuasnya teknik preparasi ulasan kromosom untuk analisis sitogenetik, menggunakan embrio satu sel, perlu dikembangkan lebih lanjut teknik untuk embrio 8 sel keatas yang akan lebih efisien untuk mengukur efektivitas berbagai modifikasi teknik separasi spermatozoa pembawa kromosom X dan Y.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat serta karuniaNya kepada kami para peneliti, sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan laporannya yang berjudul: "Efektivitas pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dengan teknik Percoll, Sephadex, *swim-up* dan *aside migration* berdasarkan analisis sitogenetik".

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya,
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga,
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
4. Kepala Laboratorium Kebidanan Veteriner,
5. Serta semua pihak baik yang secara langsung maupun tak langsung ikut membantu dalam penelitian ini.

Kami menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu peneliti mengharapkan saran dan kritik dari sejawat. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pihak yang berkepentingan.

Surabaya, Januari 1999

Peneliti

DAFTAR ISI

halaman

RINGKASAN PENELITIAN	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Permasalahan	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Spermatozoa	4
2.2. Konfirmasi pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y	6
2.2.1. Melihat jenis kelamin keturunan	7
2.2.2. Pewarnaan dengan Quinacrine	7
2.2.3. Analisis <i>karyotype</i> spermatozoa	8
2.2.4. Probe DNA	10
2.3. Usaha-usaha pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y	10
2.3.1. Kolom Percoll	11
2.3.2. Kolom Sephadex	11
2.3.3. Teknik <i>swim up</i>	12
2.3.4. Teknik <i>aside migration</i>	12
2.3.5. <i>Flow cytometry</i>	12
2.3.6. Teknik arus permukaan spermatozoa	13
2.3.7. Teknik H-Y antigen	13
2.4. Transformasi spermatozoa dalam ooplasma	14

BAB 3. METODA PENELITIAN	18
3.1. Maturasi oosit	19
3.2. Perlakuan I. Pemanenan spermatozoa pembawa kromosom X dengan kolom Percoll	20
3.3. Perlakuan II. Pemanenan spermatozoa pembawa kromosom X dengan kolom Sephadex	21
3.4. Perlakuan III. Pemanenan spermatozoa pembawa kromosom Y dengan teknik <i>swim-up</i>	21
3.5. Perlakuan IV. Pemanenan spermatozoa pembawa kromosom Y dengan teknik <i>aside migration</i>	22
3.6. Fertilisasi	22
3.7. Penghentian <i>cleavage</i>	23
3.8. Preparasi ulasan kromosom	23
 BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	 26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	35
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	42



DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 4.1. Persentase hasil pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dengan kolom Percoll, kolom Sephadex, teknik <i>swim-up</i> dan teknik <i>aside</i> migration serta kontrol.	27
Tabel 4.2. Persentase <i>plate</i> metaphase dari jumlah embrio, persentase preparat terdiagnosa dan tak terdiagnosa	33

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Transformasi Spermatozoa dalam Oplasma	16
Gambar 3.2. Ulasan Kromosom Embrio Sapi	24

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Komposisi larutan pencuci oosit, stok TL-Hepes dan buffer Phosphat	42
Lampiran 2. Hasil pembuatan preparat sitogenetik untuk konfirmasi pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dengan kolom Percoll, kolom Sephadex, teknik <i>swim-up</i> dan teknik <i>aside migration</i>	43

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Proses pembentukan spermatozoa pada mamalia menghasilkan 2 tipe spermatozoa berdasarkan kromatin seks yang dibawa. Dari kedua tipe gamet ini spermatozoa yang membawa kromosom X akan menghasilkan embrio betina sedangkan spermatozoa yang membawa kromosom Y akan menghasilkan embrio jantan setelah fertilisasi oosit.

Dengan demikian jelaslah bahwa jenis kelamin embrio mutlak ditentukan oleh sel spermatozoa sehingga dengan teknik manipulasi spermatozoa pembawa kromosom seks akan kita dapatkan embrio dengan jenis kelamin sesuai kebutuhan.

Bila semen sapi yang sudah dipisahkan berdasarkan jenis kelaminnya dipakai untuk inseminasi, baik dalam inseminasi buatan maupun fertilisasi *in vitro*, maka efisiensi reproduksi akan dapat ditingkatkan dengan sangat efektif. Dari suatu peternakan sapi perah, hanya sapi berkualitas tinggi yang diinseminasi dengan semen pembawa kromosom X sehingga akan didapatkan pedet betina penerus keturunan dengan kualitas sapi perah yang baik. Sedangkan sapi perah yang kualitasnya

kurang baik bisa diinseminasi dengan spermatozoa pembawa kromosom Y sehingga didapatkan pedet jantan yang lebih menguntungkan untuk produksi daging, karena sapi jantan tumbuh lebih cepat dan memproduksi daging lebih banyak. Jadi, mengapa perlu pengaturan jenis kelamin ternak? Alasan utamanya adalah, di suatu bidang satu jenis kelamin lebih bermanfaat daripada jenis kelamin lainnya sehingga dengan mengatur jenis kelamin peternak dapat meningkatkan perolehan ternak dari jenis kelamin yang lebih dibutuhkan serta menekan perolehan ternak dari jenis kelamin yang kurang dibutuhkan. Selain itu dengan teknik manipulasi ini juga dapat dicegah resiko terjadinya *freemartin* pada kebuntingan kembar, dimana kasus *freemartin* ini sangat merugikan peternak sapi.

1.2. Permasalahan

Walaupun banyak peneliti telah membuktikan adanya berbagai perbedaan fisik, biokimia maupun imunologis yang dimiliki spermatozoa pembawa kromosom X dan spermatozoa pembawa kromosom Y dan perbedaan-perbedaan ini telah dipakai sebagai dasar berbagai teknik pemisahan spermatozoa.

Sampai saat ini manipulasi pemisahan sel spermatozoa sapi Madura belum pernah dilakukan. Untuk memastikan efektivitas berbagai teknik untuk memisahkan spermatozoa pembawa kromosom X dan spermatozoa pembawa kromosom Y ini, maka perlu

sekali konfirmasi dengan analisis sitogenetik sehingga sekaligus dapat diketahui metode pemisah yang paling efektif.

1.3. Tujuan Penelitian

Mengetahui efektivitas pemisahan spermatozoa sapi Madura pembawa kromosom X dan Y dengan teknik Percoll, Sephadex, *swim up* dan *aside migration* (%) berdasarkan konfirmasi dengan analisis sitogenetik.

1.4. Manfaat Penelitian

Dengan diketahuinya efektivitas masing-masing teknik ini dapat dipilih teknik yang paling cocok untuk mendapatkan spermatozoa pembawa kromosom X maupun Y dari semen sapi Madura.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spermatozoa

Kepala spermatozoa berbentuk oval dan pipih, mempunyai nukleus yang sangat kompak. Jumlah kromosom dan isi DNA nukleus spermatozoa adalah haploid atau setengah dari sel-sel somatis dari spesies yang bersangkutan, yang baik berisi kromosom X atau Y. Kromosom kelamin bertanggung jawab atas berbagai perbedaan isi DNA (Anderson, 1991) yang menimbulkan banyak perbedaan potensial antara spermatozoa pembawa kromosom X atau Y. Hampir sepertiga berat kering sel spermatozoa berasal dari nukleus. Kromatin nukleus kurang lebih tersusun atas setengah bagian DNA dan setengah bagian protein (Garner dan Hafez, 1993).

Kromatin nukleus spermatozoa mamalia mempunyai kekakuan yang khas dan sangat padat. Kondensasi yang sangat tinggi ini terjadi selama spermatogenesis ketika protein nukleus digantikan oleh protamin, yaitu protein nukleus kaya arginin yang spesifik pada spermatozoa. Dalam spermatozoa masak protamin membentuk jaringan molekul yang dihubungkan satu dengan lainnya oleh ikatan disulfid intra- dan inter-protamin. Agens pembuka ikatan disulfid dibutuhkan untuk mengurai ikatan untuk dekontensasi kromatin spermatozoa (Wyrobek *et al.*, 1990), namun nukleus spermatozoa akan membengkak



dan kromatin segera mengalami dekondensasi secara cepat begitu spermatozoa berhubungan dengan ooplasma (Laurincik *et al.*, 1994a).

Dalam testis sapi, spermatozoa yang membawa kromosom X dan spermatozoa yang membawa kromosom Y diproduksi dalam jumlah yang sama (rasio kelamin primer 1:1) (Gordon, 1994). Demikian pula hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa rasio embrio sapi jantan : betina hasil fertilisasi *in vitro*, baik yang dikultur *in vitro* maupun *in vivo* tak jauh dari 1:1 (King *et al.*, 1991).

Pada umumnya pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y didasarkan pada berat, densitas atau ukuran kromosom X dan Y sebagai akibat perbedaan ukuran komponen-komponen spermatozoa yang berbeda, selain itu dipakai juga perbedaan dalam ekspresi haploid kromosom X dan Y sebagai akibat perbedaan sifat komponen-komponen spermatozoa (Hafez, 1993), dimana teknik sitogenetik ini merupakan satu-satunya pembeda yang sangat pasti (Gledhill, 1988).

Walaupun perbedaan isi DNA antara spermatozoa pembawa kromosom X dan Y hanya kira-kira 4 % (Cotincot *et al.*, 1993) untuk ternak domestik, beberapa peneliti telah sukses memanfaatkan dengan pewarnaan fluoresen dan *flow cytometry* (Garner *et al.*, 1983; Cran *et al.*, 1993).



Kenyataan bahwa pada mamalia, fertilisasi oleh spermatozoa pembawa kromosom X menghasilkan keturunan betina dan spermatozoa pembawa kromosom Y menghasilkan keturunan jantan menimbulkan berbagai usaha untuk melakukan seleksi jenis kelamin sebelum konsepsi sehingga mengubah rasio X : Y dalam populasi spermatozoa, baik *in vitro* sebelum Inseminasi Buatan maupun dalam saluran betina serta dalam fertilisasi *in vitro*.

Pada mulanya usaha pemisahan spermatozoa manusia disebabkan oleh adanya keinginan untuk mengurangi kejadian gangguan genetik yang terkait dengan jenis kelamin (*sex-linked genetic disorders*) yaitu gangguan resesif terkait-X yang lebih sering berpengaruh pada keturunan laki-laki. Sedang pada hewan domestik dikembangkan untuk mendapatkan produksi ternak yang maksimal dari jenis kelamin yang dibutuhkan (Windsor *et al.*, 1993).

2.2. Konfirmasi Pemisahan Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y

Masalah yang ada dalam penelitian yang mengusahakan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y adalah sulitnya mengukur efektivitas pemisahan spermatozoa berupa rasio spermatozoa pembawa kromosom X : Y dari populasi spermatozoa sudah dipisahkan/dimurnikan (Hafez, 1993; Windsor *et al.*,



1993). Berbagai cara yang digunakan untuk mengukur efektivitas hasil pemisahan adalah:

2.2.1. Melihat jenis kelamin keturunan

Metode ini sangat tidak efektif karena hasil sangat lambat diperoleh serta membutuhkan banyak sekali induk resipien untuk penarikan kesimpulan yang valid, sedangkan penggunaan hewan model tidak menjamin relevansi pada spesies yang diinginkan.

2.2.2. Pewarnaan dengan Quinacrine

Pewarnaan dengan quinacrine mustard menyebabkan pewarnaan fluoresen lengan panjang kromosom Y pada stadium metaphase dari spermatozoa manusia selain juga menimbulkan titik fluoresen (*F-body* atau *Y-body*) pada nukleus stadium interphase dari sel somatik maupun spermatozoa. Namun fluoresensi ini hanya terdeteksi sekitar 40 % dalam sampel semen normal. Problem lain yang ada yaitu bahwa fluoresensi kromosom Y ini adalah khas untuk setiap spesies dimana *F-body* hanya terdeteksi pada spermatozoa manusia dan gorila (Ericsson dan Glass, 1982). Walaupun Bhattacharya *et al.* (1977) melaporkan keberhasilannya mewarnai *F-body* spermatozoa sapi (disebut sebagai *B-body*) setelah perlakuan dengan protease, namun hal ini tetap tak terkonfirmasi secara jelas.

2.2.3. Analisis *karyotype* spermatozoa

Merupakan perkembangan yang lebih mutakhir berupa pemeriksaan langsung kromatin spermatozoa dalam keadaan terkondensasi, yang diadaptasi dari tes penetrasi oosit hamster tanpa zona (*pseudo-fertilization*) sebagai *assay* viabilitas spermatozoa dengan observasi kromosom spermatozoa stadium metaphase dalam pronukleus yang terbentuk (Yanagimachi, 1984). Karena terbukti oosit hamster tanpa zona dapat dipenetrasi oleh spermatozoa heterolog, maka tes ini dapat digunakan untuk spesies yang lain. Dan kemungkinan lainnya adalah aktivasi spermatozoa dengan ekstrak oosit tanpa sel (Brown et al., 1987; Ohsumi et al., 1988).

Pada metaphase, jumlah, ukuran dan morfologi kromosom dapat dilihat dengan mikroskop cahaya setelah berbagai perlakuan terhadap sel. Pada saat ini membran nukleus menghilang, kromosom tertata pada bidang ekuatorial. Kromosom telah mengalami kondensasi sehingga kromatid tampak memendek serta menebal, menyerupai huruf X karena sentromernya tidak membelah dan baru akan membelah pada tahap berikutnya, anaphase. Penampakan kromosom pada *plate* metaphase adalah khas untuk setiap spesies, namun secara normal *karyotype* adalah relatif konstan dimana masing-masing lengan terdiri dari 2 kromatid yang berdamp-

pingan kecuali perbedaan pada panjang total, letak sentromer serta pola pemitannya. Pada mamalia kromosom seks mempunyai gambaran sebagai berikut, pada yang betina mempunyai sepasang kromosom X homolog yang besar dan pada yang jantan mempunyai sebuah kromosom X yang besar dan sebuah kromosom Y yang kecil.

Berbagai teknik pemitaan, Q-, G-, R- dan C menghasilkan pola pewarnaan yang berbeda untuk masing-masing pasangan kromosom yaitu:

1. Metode Q (fluoresensi Quinacrine): Memperlihatkan pita-pita/band kromosom tertentu sebagai daerah fluoresen di bawah mikroskop fluoresen.
2. Metode G (Giemsa): memperlihatkan pita-pita sebagai daerah tercat ungu gelap.
3. Metode R (*reverse-banding*): merupakan metode pemitaan kebalikan dimana kromosom diperlakukan dengan larutan alkali sebelum diwarnai.
4. Metode C (*centromere*): teknik khusus untuk pengecatan daerah sentromer.



2.2.4. Probe DNA

Merupakan teknik terbaru dengan penggunaan *probe* untuk kromosom X, Y maupun X dan Y sekaligus (*double-FISH*) yang selanjutnya dilakukan hibridisasi (*Fluorescence in situ hybridization/FISH*). Untuk teknik ini tidak mutlak diperlukan stadium metaphase karena dapat dilakukan pada sel-sel stadium interphase dan keberhasilannya mencapai 95-100 % (Plachot dan Popescu, 1993). Usaha seksing menggunakan urutan berulang yang spesifik untuk kromosom Y spermatozoa sapi telah dapat dilakukan karena keberhasilan kloning fragmen DNA ini (Schwerin *et al.*, 1991).

2.3. Usaha-usaha Pemisahan Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y

Keberhasilan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y tergantung dari adanya beberapa perbedaan dasar antara kedua tipe sel tersebut antara lain (Windsor *et al.*, 1993)

1. Arus permukaan membran plasma
2. Perbedaan densitas
3. Perbedaan morfologi nukleus dan kepala
4. Karakter pergerakan/motilitas
5. Kandungan DNA
6. Sensitivitas pH
7. H-Y antigen pada spermatozoa pembawa kromosom Y

Sampai sekarang berbagai teknik telah dikembangkan dengan tujuan mengeksploitasi beberapa dari perbedaan-perbedaan diatas untuk memisahkan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y antara lain

2.3.1. Kolom Percoll

Teknik ini berupa sedimentasi ekuilibrium pada gradien densitas. Percoll merupakan medium gradien densitas yang dapat digunakan untuk pemurnian sel, virus maupun organel dengan sedimentasi ke tingkat dimana gravitasi obyek dan medium adalah sama. Percoll terdiri dari partikel-partikel koloid silika dengan diameter 15 - 30 nm yang dilapisi dengan polyvinyl pyrrolidone (PVP). Dinyatakan tidak toksik terhadap sel dan di bidang fertilisasi *in vitro* manusia maupun hewan telah digunakan untuk mendapatkan spermatozoa motil dengan angka rekoverti sekitar 50 % (*discontinuous Percoll gradient* 55 dan 90 % ; densitas 1,082 - 1,117 g/ml) yang 5 - 10 kali lebih tinggi dibanding dengan prosedur *swim-up* (Avery dan Greve, 1995).

2.3.2. Kolom Sephadex

Merupakan teknik sedimentasi non-ekuilibrium (yang didasarkan pada laju endap) berupa filtrasi spermatozoa

melalui suatu kolom Sephadex yang berisi butiran/biji jel Sephadex berdiameter 40-120 μm . Spermatozoa diambil dari fraksi tertentu dari filtrat. Pada manusia keberhasilan dari teknik ini mencapai 70-80 % (Zarutskie *et al.*, 1989).

2.3.3. Teknik *swim-up*

Parrish *et al.* (1986) melakukan modifikasi teknik ini dari ilmu kedokteran manusia untuk digunakan dalam fertilisasi *in vitro* pada sapi. Untuk pemisahan jenis kelamin spermatozoa, digunakan perbedaan karakter pergerakan spermatozoa dimana spermatozoa pembawa kromosom Y bergerak lebih cepat ke permukaan media segar dibanding spermatozoa pembawa kromosom X karena lebih kecil secara morfologis.

2.3.4. Teknik *aside migration*

Juga menggunakan perbedaan karakter pergerakan spermatozoa dimana spermatozoa pembawa kromosom Y bergerak lebih cepat dalam media dari pusat ke tepi roset (*rosette*) (Mahaputra *et al.*, 1987).

2.3.5. *Flow cytometry*

Teknik ini membedakan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y berdasarkan DNA total relatif dimana spermatozoa pembawa kromosom X mengandung 2,8 - 7,5 % lebih banyak DNA



(Johnson, 1996). Pengukuran intensitas fluoresensi dilakukan dengan *flow cytometer* setelah pewarnaan dengan fluorokrom khusus DNA, seperti Hoechst 33342. Pada ternak, hasil konfirmasi dengan jenis kelamin keturunan mencapai 90 % (Johnson, 1997).

2.3.6. Teknik arus permukaan spermatozoa

Masih ada 2 pendapat, yang pertama adalah bahwa spermatozoa pembawa kromosom X berarus positif dan spermatozoa pembawa kromosom Y berarus negatif (Bhattacharya *et al.*, 1979) sedangkan pendapat kedua adalah bahwa semua spermatozoa secara keseluruhan berarus negatif, dengan spermatozoa pembawa kromosom X mempunyai arus negatif yang lebih kuat (Ishijimau *et al.*, 1992).

2.3.7. Teknik antigen H-Y

Merupakan usaha pemisahan spermatozoa berdasarkan adanya antigen spesifik jantan yaitu antigen H-Y. Untuk identifikasi spermatozoa Y yang mengandung antigen ini, digunakan antibodi H-Y yang dikompertisikan dengan antibodi berlabel fluoresen. Akurasi dari teknik ini tidak melebihi 80 - 90 % (VanVliet *et al.*, 1989). Cara lain yaitu menghambat perkembangan morula ke blastosis pada embrio jantan dengan menambahkan antibodi ini (Utsumi *et al.*, 1993).

2.4. Transformasi Spermatozoa dalam Ooplasma

Segera setelah penetrasi melalui zona pelusida kepala spermatozoa mulai membengkak. Ekor dan elemen kepala spermatozoa terpisah dari nukleus dan segera mengalami degenerasi (Anderson, 1977). Membran nukleus menghilang, mengakibatkan kontak langsung kromatin paternal ke ooplasma. Nukleus spermatozoa terus membengkak dan mengalami serangkaian transformasi dalam ooplasma (Abeydeera dan Niwa, 1992).

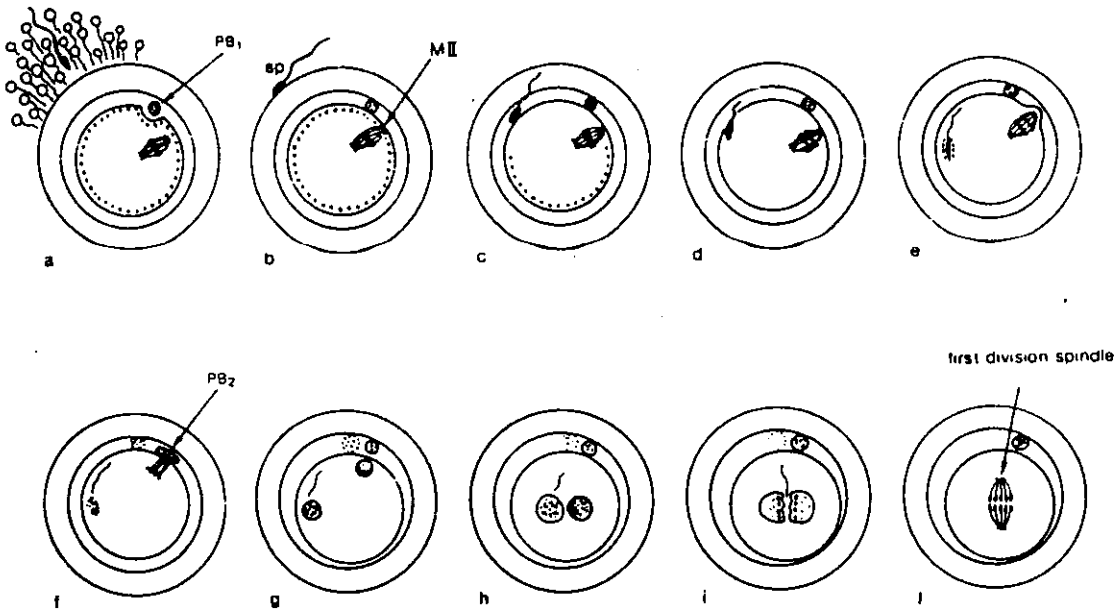
Faktor-faktor ooplasma menginduksi berbagai perubahan molekuler dalam spermatozoa, termasuk berkurangnya ikatan-ikatan disulfid serta degradasi ensimatik protein nukleus. Pelepasan protamin spesifik spermatozoa yang digantikan oleh histon yang berasal dari oosit menyebabkan terjadinya dekon-densasi nukleus sperma diikuti pembentukan sejumlah nukleoli serta membran nukleus dari retikulum endoplasmik halus. Selanjutnya struktur ini disebut dengan pronukleus jantan yang selanjutnya membengkak. Secara simultan, akibat aktivasi oleh spermatozoa, miosis berlanjut pada oosit menghasilkan oosit masak serta pelepasan badan kutub II, kemudian terjadi pembentukan nukleoli dan membran nukleus disekitar kromatin betina yang mengalami dekon-densasi (Laurincik *et al.*, 1994a), diikuti pula dengan pembengkakan struktur ini yang sekarang selanjutnya disebut dengan pronukleus betina.

Ooplasma menjadi kompeten untuk dekon-densasi nukleus



spermatozoa bila bercampur dengan materi vesikel germinal yang dilepas selama maturasi. Sedang oosit yang belum masak, dengan vesikel germinal yang utuh tak dapat menimbulkan dekontdensasi kromatin spermatozoa. Pengatur perkembangan pronukleus jantan adalah faktor sitoplasmik dalam oosit yang disebut MPGF (*Male Pronucleus Growth Factor*).MPGF ini terdapat pada oosit yang betul-betul masak dan seringkali sangat sedikit ditemukan pada oosit hasil pemasakan *in vitro* (Laurincik *et al.*, 1994b) dalam kondisi yang tidak optimal. Ooplasma akan kehilangan aktivitas MPGF dalam beberapa jam setelah aktivasi (Crozet, 1993).

Segera setelah penyelesaian meiosis oosit, oosit yang sudah terfertilisasi (sigot) mengandung 2 nukleus haploid (pronukleus), berkembang, meningkat volumenya secara sinkron dengan pronukleus jantan sedikit lebih besar. Pada sapi bentukan pronukleus ini tak dapat dilihat secara langsung tanpa pewarnaan karena tekstur sitoplasmanya. Apalagi pada keadaan *in vitro* dimana berbagai granula dalam sitoplasma yang terbentuk dengan ukuran lebih besar (McLaren, 1990). Replikasi DNA terjadi dalam kedua pronukleus yang membesar dalam migrasinya kearah satu sama lainnya menuju pusat oosit.



Gambar 2.1. Transformasi Spermatozoa dalam Ooplasma.

- a). spermatozoa siap memasuki oosit masak dengan badan kutub I dan *plate* metaphase
- b-f). aktivasi spermatozoa menginduksi penyelesaian meiosis II dengan pelepasan badan kutub II.
- g-i). pronukleus jantan dan betina terbentuk, menuju ke pusat oosit.
- j). stadium metaphase dari siklus sel pertama

(dimodifikasi dari Crozet, 1993).

Posisi pronukleus jantan dan betina yang berhadapan di pusat oosit merupakan prasyarat bagi pembentukan kromosom paternal dan maternal pada spindel pembelahan *cleavage* pertama. Perpindahan kedua pronukleus tergantung pada aktivitas sitoskeleton. Duplikasi kromatin terjadi dalam kedua pronukleus secara bersamaan dan menjelang prophase pembelahan *cleavage* pertama komplemen kromatin paternal dan



maternal mengalami kondensasi. Pada akhir siklus sel pertama, komplemen kromatin paternal dan maternal mengalami kondensasi dalam kedua pronukleus yang tetap dalam posisi berhadapan. Walaupun kedua pronukleus sangat berdekatan, tetapi fusi tidak terjadi pada mamalia (Crozet, 1993). Setelah hilangnya membran kedua pronukleus, terjadi kombinasi kromosom paternal dan maternal membentuk sebuah nukleus yang diploid. Selanjutnya kromosom tertata pada bidang ekuatorial (*plate metaphase*) dari kutub spindel yang diorganisasi oleh sentromer dan mikrotubulus di daerah sitoplasma sekitarnya. Selanjutnya pada anaphase, pasangan-pasangan kromosom di bidang ekuatorial terpisah, masing-masing bergerak ke arah kutub spindel yang berlawanan sepanjang mikrotubulus kinetokor yang memendek.



BAB 3 METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di sub-laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga mulai bulan Juli 1998 sampai dengan bulan Januari 1999.

Dalam penelitian ini sampel semen beku sapi Madura unggul, diperoleh dari sapi yang sama (Komara), dalam kemasan mini straw yang diproduksi Balai Inseminasi Buatan Singosari.

Setelah masing-masing perlakuan yaitu pasase melalui kolom Percoll dan Sephadex untuk mendapatkan spermatozoa pembawa kromosom X serta dengan teknik *swim-up* dan *aside migration* untuk mendapatkan spermatozoa pembawa kromosom Y, spermatozoa difertilisasikan dengan oosit sapi Madura yang telah masak. Setelah terjadi fertilisasi, *cleavage* dihentikan pada stadium metaphase, embrio dibuat preparat sitogenetik dan dianalisa di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat untuk menentukan jenis kelamin embrio, sehingga diketahui kromosom kelamin spermatozoa yang membuahi oosit tersebut.

Sebelum masing-masing perlakuan, semen beku *dithawing* dengan cara dibiarkan selama 5 detik di temperatur kamar,



kemudian direndam dalam air hangat 38 °C selama 30 detik.

Semua prosedur dalam penelitian ini sedapat mungkin dilakukan dalam kabinet *laminair air flow* (Speg Air Tech, PRC). Diluar kabinet, sterilitas dijaga secermat mungkin. Pemakaian semua bahan untuk kultur diusahakan yang telah diuji pada embrio. Semua media dipersiapkan dengan penyaringan melalui filter dengan lubang berdiameter 0,2 µm (Acrodisc, Gelman Sciences) dan diekuilibrasikan minimal selama 2 jam sebelum dipakai dalam inkubator untuk optimalisasi pH, temperatur serta fase gas dalam media. Penguapan media dalam inkubator dicegah dengan adanya kelembaban maksimal serta penutupan dengan minyak mineral sehingga pH dan osmolalitas media terjaga. Selain itu minyak mineral juga berfungsi mencegah kontaminasi dan mengurangi fluktuasi suhu yang ekstrim.

Data disajikan dalam bentuk deskriptif berupa persentase spermatozoa pembawa kromosom X setelah perlakuan dengan kolom Percoll dan Sephadex serta persentase spermatozoa pembawa kromosom Y setelah perlakuan dengan teknik *swim-up* dan *aside migration*.

3.1. Maturasi Oosit

Oosit dikumpulkan dengan melakukan aspirasi folikel yang berdiameter 2-7 mm pada ovarium sapi yang didapat dari Rumah Potong Hewan Pegirian, Kotamadya Surabaya. Oosit



dimaturasi secara *in vitro* dalam media maturasi *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199, Medium 199, Hepes *modification*, Sigma M-2520) yang mengandung 10 % serum sapi dan bufer NaHCO₃. Sebelum pemasakan, oosit dicuci dengan media pencuci oosit (Lampiran 1.) dan dibilas dengan media maturasi. Setiap 20 oosit dimasukkan dalam tetes maturasi (100 µl) dan ditutup dengan minyak mineral (Sigma, M-8410). Pemasakan dilakukan selama 24 jam dalam inkubator (Compact CO₂ series 5000, Thermolyne, USA) dengan fase gas CO₂ 5 % dalam udara, temperatur 38,5 °C dan kelembaban maksimal.

3.2. Perlakuan I. Pemanenan Spermatozoa Pembawa Kromosom X dengan Kolon Percoll

Semen beku yang sudah *dithawing* dituang ke dalam tabung berdiameter 120 mm dengan dasar berbentuk kerucut berisi 2 lapis larutan Percoll (Sigma, P-1644) yang telah disiapkan sebelumnya, dalam inkubator (38,5 °C). Lapisan yang berada di dasar tabung adalah larutan Percoll dengan konsentrasi 90 % sebanyak 3 ml, sedang lapisan di atasnya adalah larutan Percoll dengan konsentrasi 45 % sebanyak 3 ml. Selanjutnya tabung dipusingkan dengan kecepatan 750 x g selama 20 menit. Pelet spermatozoa di dasar tabung dicuci dalam Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Sigma E-6132) yang mengandung 1,5 % *Bovine Serum Albumin* (BSA, FAF free, Sigma A-60003).



3.3. Perlakuan II. Pemanenan Spermatozoa Pembawa Kromosom X dengan Kolom Sephadex

Kolom Sephadex 2,5 % (Sephadex G-200, Sigma G-200-120) dalam buret dengan diameter 150 mm dan tinggi 5 cm dipersiapkan 24 jam sebelum dipakai. Satu straw semen beku yang telah dihangatkan dituang di permukaan kolom dan katup yang berada di bagian bawah dari kolom dibuka sehingga media menetes ke bawah dan sambil menambahkan EBSS ke bagian atas kolom lewat dinding tabung untuk menjaga kesinambungan terjadinya arus aliran kearah bawah disela-sela butiran jel Sephadex, tetes ke 21 sampai dengan tetes ke 30 ditampung dalam vial. Tetes pertama sampai dengan tetes ke 20 dibuang karena belum terdapat spermatozoa di dalamnya. Selanjutnya spermatozoa yang ditampung dibersihkan dari sisa-sisa Sephadex dengan EBSS.

3.4. Perlakuan III. Pemanenan Spermatozoa Pembawa Kromosom Y dengan Teknik *Swim-up*

Setelah *dithawing*, satu straw semen dicuci dalam EBSS dengan pemusingan 700 x g selama 5 menit. Setelah supernatan di bagian atas tabung dibuang dan hanya disisakan peletnya, ke dalam tabung dimasukkan 3 ml EBSS secara perlahan-lahan melalui dindingnya. Tabung dibiarkan pada posisi miring 45 derajat dalam inkubator. Setelah 30 menit, spermatozoa dalam EBSS di permukaan atas tabung diambil.



3.5. Perlakuan IV. Pemanenan Spermatozoa Pembawa Kromosom Y dengan Teknik *Aside migration*

Tetes media EBSS berbentuk roset dipersiapkan dalam cawan petri berdiameter 35 mm dengan membuat 6 tetes kecil (25 μ l) di bagian tepi dari cawan petri mengelilingi sebuah tetes besar (200 μ l) di pusat cawan petri. Setelah itu keenam tetes kecil dihubungkan ke tetes pusat dengan menarik media tipis-tipis membentuk huruf 's' dan segera ditutup dengan lapisan minyak mineral. Roset fertilisasi ini diekuilibrasikan dalam inkubator minimal selama 2 jam.

Setelah *dithawing*, semen dicuci dalam EBSS dengan pemusingan 700 x g selama 5 menit. Setelah itu supernatan di bagian atas tabung dibuang, dan 20 μ l campuran pelet dan sisa supernatan dimasukkan ke dalam tetes di pusat roset. Kemudian spermatozoa dibiarkan berenang dari pusat roset ke tetes-tetes di bagian tepi roset dengan meletakkan cawan petri dalam inkubator (CO_2 5 %, O_2 20 %, N_2 75 %, temperatur 38,5 $^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban maksimal) selama 30 menit.

3.6. Fertilisasi

Setelah perlakuan dengan kolom Percoll, kolom Sephadex dan teknik *swim up*, dibuat tetes-tetes fertilisasi dengan volume 45 μ l dibawah lapisan minyak mineral, kemudian disimpan dalam inkubator sampai oosit siap difertilisasikan.



Demikian pula untuk kontrol yang tidak menerima perlakuan apapun selain pencucian dalam EBSS dengan pemusingan 700 x g selama 5 menit. Sedangkan untuk perlakuan dengan teknik *aside migration*, tetes fertilisasi (EBSS) berbentuk roset yang telah dipersiapkan terlebih dahulu sebelum pelepasan spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa yang dipakai dalam penelitian ini adalah $1,5 \times 10^6$ spermatozoa ml^{-1} .

Sebelum dimasukkan dalam tetes fertilisasi oosit yang telah masak dicuci dahulu dalam larutan pencuci oosit dan dibilas dengan EBSS.

3.7. Penghentian *Cleavage*

Tiga puluh satu jam setelah fertilisasi, kedalam tetes fertilisasi dimasukkan colchicine (Demecolcin, Sigma, Hybri-max D-6279) dengan konsentrasi akhir 0,1 $\mu\text{l/ml}$ EBSS. Sigot diinkubasi (CC_2 5 %, 38,5 °C, kelembaban maksimal) selama 12 jam.

3.8. Preparasi Ulasan Kronosom

Setelah 12 jam inkubasi dengan colchicine, embrio dicuci 2 kali dalam media pencuci oosit dan kemudian dice-
lupkan ke dalam campuran Trypsin 0,25 % dan EDTA 0,02 % (b/v) selama 60 detik untuk melunakkan zona pelusida dan



melepaskan sel-sel kumulus dari zona pelusida, yang dibantu secara mekanis dengan berkali-kali melewati lubang ujung pipet mikro. Embrio yang telah benar-benar bersih dari sel kumulus kemudian direndam dalam larutan garam hipotonik Natrium sitrat 0,9 % (b/v) (tri-Sodium citrate dehydrate, Merck) yang berfungsi membengkakkan sel dan menebarkan kromosom. Dua belas menit kemudian, embrio yang telah menggembung dipindahkan ke atas gelas obyek yang telah dibersihkan dan kemudian difiksasi dengan meneteskan larutan fiksatif berupa campuran methanol : asam asetat glasial dengan perbandingan 1:1 (v/v) selama 5 menit, kemudian fiksasi dilanjutkan dengan campuran methanol : asam asetat glasial dengan perbandingan 3:1 (v/v) selama minimal 24 jam pada temperatur -20°C . Preparat kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan diudara lalu disimpan pada temperatur kamar selama 1 minggu sebelum diwarnai.



Gambar 3.2. Ulasan Kromosom Embrio Sapi
(panah panjang: X, panah pendek: Y)
(Sumber: Iwasaki dan Nakahara, 1990).



Pewarnaan dilakukan dengan meneteskan larutan Giemsa 4 % (v/v) dalam bufer fosfat (pH 6,8; Lampiran 1.) selama 3,5 menit kemudian dicuci dengan aquades dan dikeringkan di udara. Preparat yang telah kering kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran rendah untuk menghitung jumlah embrio dengan *plate* metaphase. Kromosom diperiksa pada pembesaran 1000 x (CK-2, Olympus, Japan) dibawah minyak emersi dan kromosom jenis kelamin ditentukan dengan identifikasi sebuah kromosom Y atau 2 kromosom X, setelah pemeriksaan kelengkapan seluruh kromosom. Embrio yang hanya mempunyai sebuah kromosom X tetapi tanpa kromosom Y tidak dipakai.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pelaksanaan preparasi untuk analisis sitogenetik dengan *karyotyping*, diperlukan stadium metaphase dari suatu sel, karena pada saat ini kromosom paling jelas dapat diidentifikasi, untuk itu hanya bisa dipakai sel yang sedang aktif membelah (Hafez, 1993). Karena dalam nukleus spermatozoa sudah tidak terjadi pembelahan lagi, maka perlu dilakukan fertilisasi (*in vitro*) untuk mendapatkan tatanan kromosom paternal pada *plate* metaphase.

Dalam penelitian ini, embrio sapi Madura satu sel hasil fertilisasi *in vitro* telah dibuat preparat sitogenetik untuk keperluan *seksing*, sehingga selanjutnya dapat diketahui, perubahan rasio spermatozoa pembawa kromosom X : Y setelah berbagai perlakuan dalam usaha untuk pemisahannya.

Seperti dapat dilihat pada Tabel 4.1., dalam usaha untuk memanen spermatozoa pembawa kromosom X dengan melewati spermatozoa melalui kolom Percoll didapatkan 54,9 % dan melalui kolom Sephadex didapatkan 52,3 %. Sedangkan usaha pemurnian spermatozoa pembawa kromosom Y dengan teknik *swim-up* didapatkan hasil 50 % dan dengan teknik *aside migration* didapatkan hasil 51,8 %. Pada kelompok kontrol, dimana semen



hanya dicuci dalam media EBSS dengan sentrifugasi didapatkan persentase spermatozoa pembawa kromosom X dan Y masing-masing 50,5 % dan 49,5 %.

Tabel 4.1. Persentase hasil pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dengan kolom Percoll, kolom Sephadex, teknik *swim-up* dan teknik *aside migration* serta kontrol.

	persentase hasil pemisahan	
	X	Y
Percoll	54,9	45,1
Sephadex	52,3	47,7
<i>Swim-up</i>	50,0	50,0
<i>Aside migration</i>	48,2	51,8
Kontrol	50,5	49,5

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan perubahan rasio spermatozoa pembawa kromosom X/Y setelah perlakuan dengan kolom Percoll, kolom Sephadex dan teknik *aside migration* yaitu dari 50 : 50 ke 54,9 : 45,1 dan 52,3 : 47,7 serta 48,2 : 51,8. Sedang setelah perlakuan dengan teknik *swim-up* tidak tampak adanya pergeseran dari rasio normal (Tabel 4.1.). Bila dibandingkan antara kelompok Percoll dengan kelompok Sephadex, terlihat pula adanya kecenderungan bahwa kelompok Percoll lebih efektif dalam memanen



spermatozoa pembawa kromosom X. Walaupun dengan jumlah ulangan kecil, namun hasil penelitian ini menunjukkan adanya kemungkinan memperkaya proporsi spermatozoa pembawa kromosom X dengan kolom Percoll.

Untuk meningkatkan efektivitas pemanenan spermatozoa pembawa kromosom X dengan kolom Percoll kemungkinan dapat dipakai jumlah gradien yang berbeda dengan densitas yang berbeda. Dalam penelitian ini, dengan gradien Percoll 45 % dan 90 % masing-masing sebanyak 3 ml dengan sentrifugasi 750 x g selama 20 menit, masih banyak spermatozoa pembawa kromosom Y yang menembus ke dasar gradien Percoll 90 %. Schwerin *et al.* (1991) melakukan pemisahan spermatozoa sapi dengan 2 kali fraksinasi melalui 10 gradien Percoll dengan densitas berkisar antara 1,034 - 1,068 g/ml. Tentu saja dengan perubahan gradien ini harus diantisipasi perlunya perubahan kecepatan dan lama sentrifugasi. Pada manusia, usaha separasi spermatozoa menggunakan teknik ini memberi hasil yang berkisar antara tidak adanya perubahan rasio (Gawecka-Szczygiel dan Kurpisz, 1995) sampai adanya perubahan rasio yang tidak signifikan secara klinis (Flaherty dan Matthews, 1996). Terlepas dari adanya perbedaan interspesies untuk perbedaan kandungan DNA antara spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, sudah semestinya prosedur yang berbeda memberikan hasil yang berbeda.



Mengenai penggunaan kolom Sephadex untuk usaha separasi, perlu diperhatikan kecepatan arus yang ditimbulkan diantara biji-biji jel Sephadex. Untuk itu perlu dicari, kecepatan yang tepat untuk dapat menggelontor spermatozoa pembawa kromosom X saja, yang juga harus dipadukan dengan ukuran biji-biji jel Sephadex yang secara langsung menentukan besar rongga antara, tempat lewatnya spermatozoa. Kebanyakan usaha pemisahan dengan kolom Sephadex pada manusia mengalami kegagalan (Lobel *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1993; Gawecka-Szczygiel dan Kurpisz, 1995) namun Zarutskie *et al.* (1989) merekomendasikan penggunaannya sebagai satu-satunya teknik yang dapat merubah rasio seks.

Usaha *seksing* spermatozoa dengan teknik *swim-up* belum banyak diteliti pada hewan, tetapi pada manusia percobaan-percobaan menunjukkan kegagalan (Lobel *et al.*, 1993; Samura *et al.*, 1997). Tampaknya, perbedaan kecil pada kandungan DNA diantara spermatozoa pembawa kromosom X dan Y menimbulkan perbedaan yang lebih kecil pula pada massa dan kecepatan gerak spermatozoa, sehingga dengan perbedaan kecepatan gerak spermatozoa yang sangat kecil ini, dibutuhkan jarak tempuh yang lebih panjang, untuk keberhasilan usaha fraksinasi. Flaherty dan Matthews (1996), yang juga mengalami kegagalan bahkan telah mencoba teknik ini dengan memakai variabel waktu (15, 30, 45 dan 60 menit).



Teknik *aside migration* menggunakan dasar yang sama, yaitu perbedaan kecepatan pergerakan spermatozoa. Hanya dalam teknik ini, pergerakan spermatozoa lebih terarahkan, yaitu ke tepi roset sehingga pergerakan spermatozoa yang timbul lebih linear dibanding dalam teknik *swim-up*. Bisa saja dalam teknik *swim-up*, spermatozoa pembawa kromosom Y yang motil, bergerak secara progresif hanya di setengah bagian bawah tabung karena mengingat ukuran spermatozoa yang sangat kecil bila dibanding dengan ukuran diameter tabung. Dengan modifikasi ke bentuk lain, yang tetap dalam bentuk garis, yang menyediakan jarak tempuh lebih jauh sangat diyakini fraksinasi berhasil dengan baik.

Untuk mendapatkan embrio satu sel (sigot) pada stadium metaphase, pada kultur diberikan *arresting agent* berupa colchicine yang menghambat aktivitas mikrotubulus sehingga tidak terjadi pemisahan pasangan-pasangan kromosom pada *plate* metaphase. Untuk pemberian colchicine ini harus memperhatikan lama tercapainya fertilisasi yaitu total waktu dari inseminasi sampai terjadinya *cleavage* pertama. Colchicine harus diberikan tepat sebelum metaphase dan kesulitannya adalah, harus diberikan pada suatu populasi oosit-embrio yang tidak sama kecepatannya (stadium). Bila diberikan terlalu dini, sebagian oosit yang sudah terfertilisasi akan terhambat pada metaphase, sedangkan yang lambat atau belum terfertilisasi akan terhambat pada metaphase II dari miosis



sehingga tidak terjadi fertilisasi. Bila colchicine diberikan terlalu lambat, lebih banyak embrio yang tak terpakai karena telah mengalami pembelahan. Demikian pula, bila inkubasi dalam colchicine terlalu lama, sigot akan mengalami kerusakan, yang terutama akan sangat mempengaruhi kualitas preparasi kromosom.

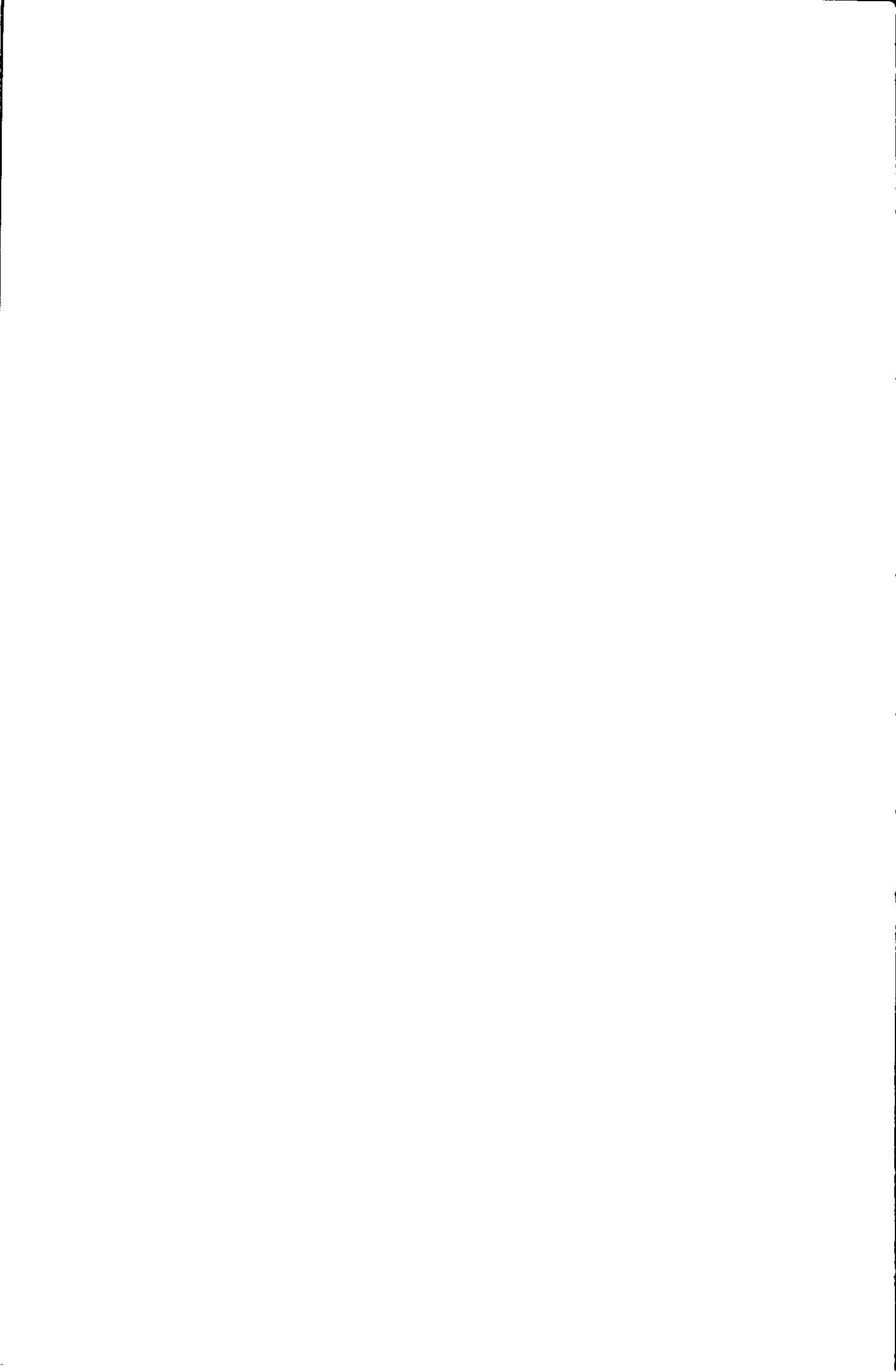
Dari hasil penelitian pendahuluan, untuk kondisi penelitian ini colchicine paling baik diberikan 31 jam setelah fertilisasi. Ternyata ini sesuai dengan hasil berbagai penelitian yang menyatakan bahwa secara *in vivo* maupun *in vitro*, pada sapi, sigot mencapai *cleavage* pertama dalam 23 - 31 jam setelah fertilisasi (Laurincik *et al.*, 1994a). Inkubasi dengan colchicine dilakukan selama 12 jam karena paling tidak 12 jam yang sama dengan satu siklus sel sudah cukup untuk menjaring keseluruhan populasi sigot namun tidak terlalu lama untuk menimbulkan kerusakan pada kromosom dalam nukleus.

Dalam proses pembuatan preparat ulas dan fiksasi, sejumlah embrio hilang dan rusak. Sisanya sejumlah 1067 embrio satu sel (Lampiran 2.), terbagi dalam 3 ulangan untuk masing-masing 4 kelompok perlakuan dan kontrol, berhasil mencapai tahap pewarnaan hingga evaluasi. Embrio yang telah melewati siklus sel pertamanya (lebih dari satu sel) tidak dipakai dalam penelitian ini karena membutuhkan protokol berbeda untuk persiapan kromosomnya yang kelihatannya disebabkan oleh adanya perbedaan rasio nukleus dan sitoplasma yang cukup besar.



Tanpa membedakan kelompok perlakuan maupun kontrol, *plate* metaphase yang didapatkan adalah 23,7 % (Tabel 4.2.). Seperti telah diuraikan sebelumnya, oosit yang terinkubasi dengan colchicine sebelum berhasilnya aktivasi oleh spermatozoa, akan terhenti pada metaphase II sehingga tak dapat dipakai dalam penelitian ini. Alasan lain dari rendahnya perolehan *plate* metaphase ini adalah bahwa *plate* metaphase hanya terbentuk tepat sebelum *cleavage*, sedang tanpa pemberian colchicine angka *cleavage* yang pada kebanyakan penelitian dihitung pada 48 jam setelah fertilisasi maksimal mencapai 80 %. Apalagi fiksasi dilakukan 43 jam setelah fertilisasi sehingga sejumlah oosit yang sudah terfertilisasi, karena perkembangannya yang lambat belum mencapai stadium metaphase dari siklus sel pertamanya pada saat fiksasi.

Iwasaki dan Nakahara (1990) melaporkan hasil penelitiannya melakukan preparasi sitogenetik menggunakan blastosis, bahwa embrio hasil *in vivo* menghasilkan *plate* metaphase yang jauh lebih banyak dibandingkan embrio produksi *in vitro*. Dalam penelitian lain, Kawarsky *et al.* (1996) melakukan preparasi sitogenetik embrio sapi dari berbagai stadium, dan menyatakan bahwa semakin lanjut stadium, semakin besar keberhasilan *karyotyping*.



Tabel 4.2. Persentase *plate* metaphase dari jumlah embrio, persentase preparat terdiagnosa dan tak terdiagnosa.

	jumlah embrio	<i>plate</i> metaphase	terdiagnosa *	tak terdiagnosa
Percoll	215	26,4	55,6	44,4
Sephadex	214	24,1	50,5	49,5
<i>Swim-up</i>	240	23,7	50,6	49,4
<i>Aside migration</i>	183	23,0	55,6	44,4
Kontrol	215	21,3	56,9	43,1
Rata-rata		23,7	53,8	46,2

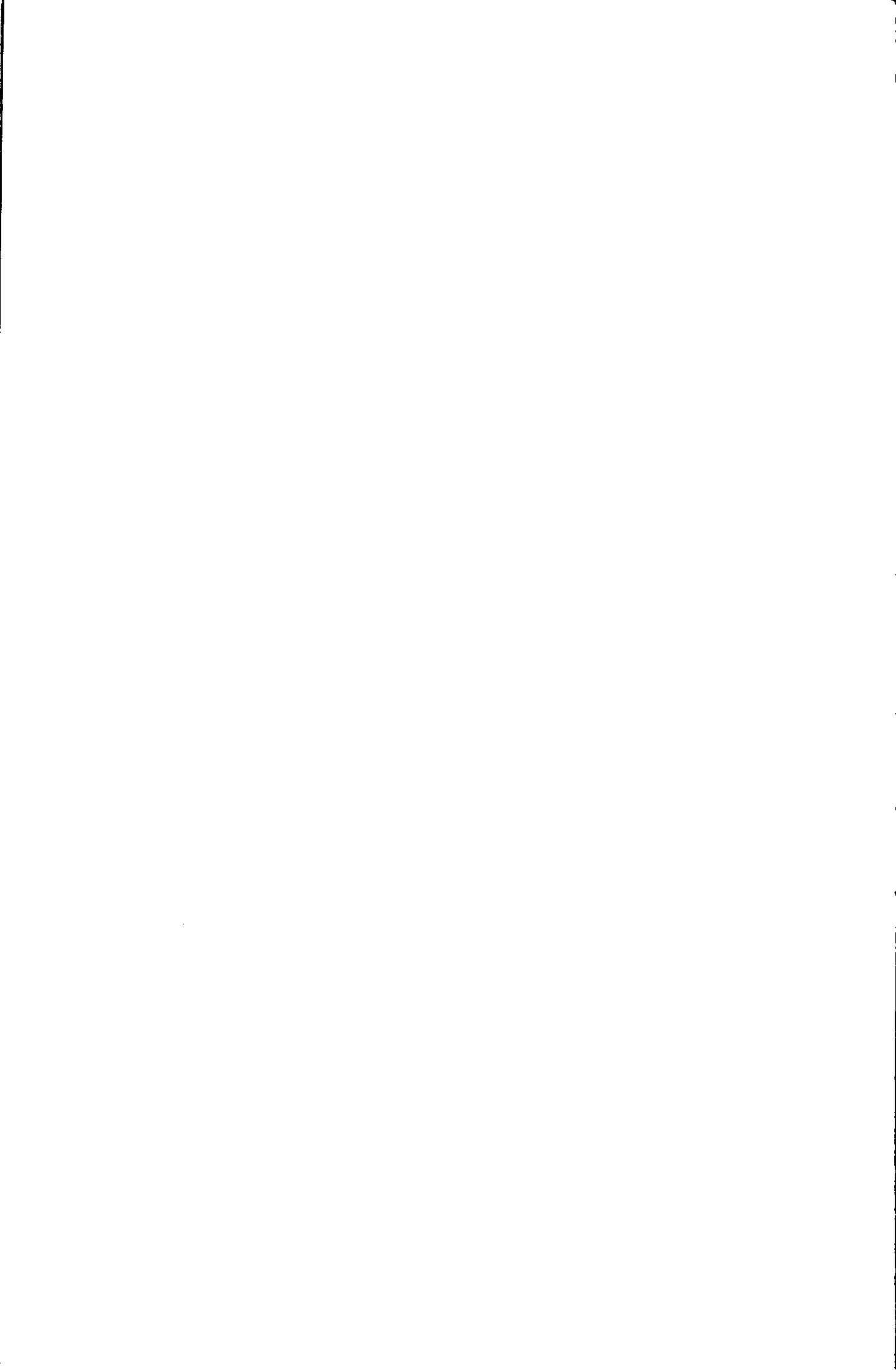
* Persentase preparat terdiagnosa dari jumlah *plate* metaphase

Perbedaan perolehan *plate* metaphase diantara kelompok-kelompok perlakuan dan kontrol (Tabel 4.2.) dapat dipastikan dipengaruhi oleh perbedaan keberhasilan fertilisasi akibat perbedaan dalam preparasi spermatozoa yang merupakan faktor tunggal dalam hal ini. Sejumlah *plate* metaphase dari embrio yang dianalisa (rata-rata dari seluruh kelompok 46,2 %, Tabel 4.2.), tak dapat didiagnosa oleh karena hilangnya kromosom, atau kurang baiknya ulasan kromosom sehingga menyulitkan identifikasi kromosom. Dalam hal ini bisa terjadi, kromosom-kromosom terletak dalam posisi yang terlalu berdekatan karena perlakuan hipotonik yang kurang efektif akibat terlalu lama menunggu dalam inkubasi dengan colchicine, atau terlalu singkat dalam larutan hipotonik. Demikian pula bila terlalu lama berada dalam larutan hipotonik, kromosom akan terlalu menye-



Kondisi lainnya adalah hasil pewarnaan yang kurang tajam yang kemungkinan disebabkan rendahnya kualitas kromosom sehingga menyulitkan diagnosa. Dalam hal ini batas antara kromosom dan nukleoplasma tidak jelas, apalagi pemitannya, tampak sangat kabur. Lechniak *et al.* (1996) melaporkan adanya pengaruh kurang optimal dan konstannya temperatur media selama prosedur *in vitro* terhadap terjadinya kerusakan *plate* metaphase dan *multipolar spindle*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Moor dan Crosby (1985) bahwa *germinal vesicle break down* (GVBD) dan akhir metaphase I adalah stadium yang sangat sensitif terhadap perubahan temperatur. Dari penelitian pendahuluan didapatkan bahwa dalam kondisi penelitian ini perlakuan hipotonik paling baik dilakukan selama 12 menit.

Melihat hasil-hasil dari penelitian pendahuluan untuk mendapatkan prosedur yang tepat dalam preparasi kromosom ini dapat disimpulkan bahwa bila digunakan sigot, persentase *plate* metaphase yang didapat sangat rendah, yang terutama disebabkan pada saat ini sebetulnya oosit tersebut hanya terduga (*presumptive*) sigot. Bila digunakan embrio 2, 4 ataupun 8 sel, akan sangat sulit mendapatkan dalam jumlah banyak sekaligus. Jadi yang paling menjanjikan adalah morula, dimana pada stadium ini walaupun terdapat perbedaan jumlah blastomer, ukuran sel ataupun rasio nukleus/sitoplasma masih relatif sama.

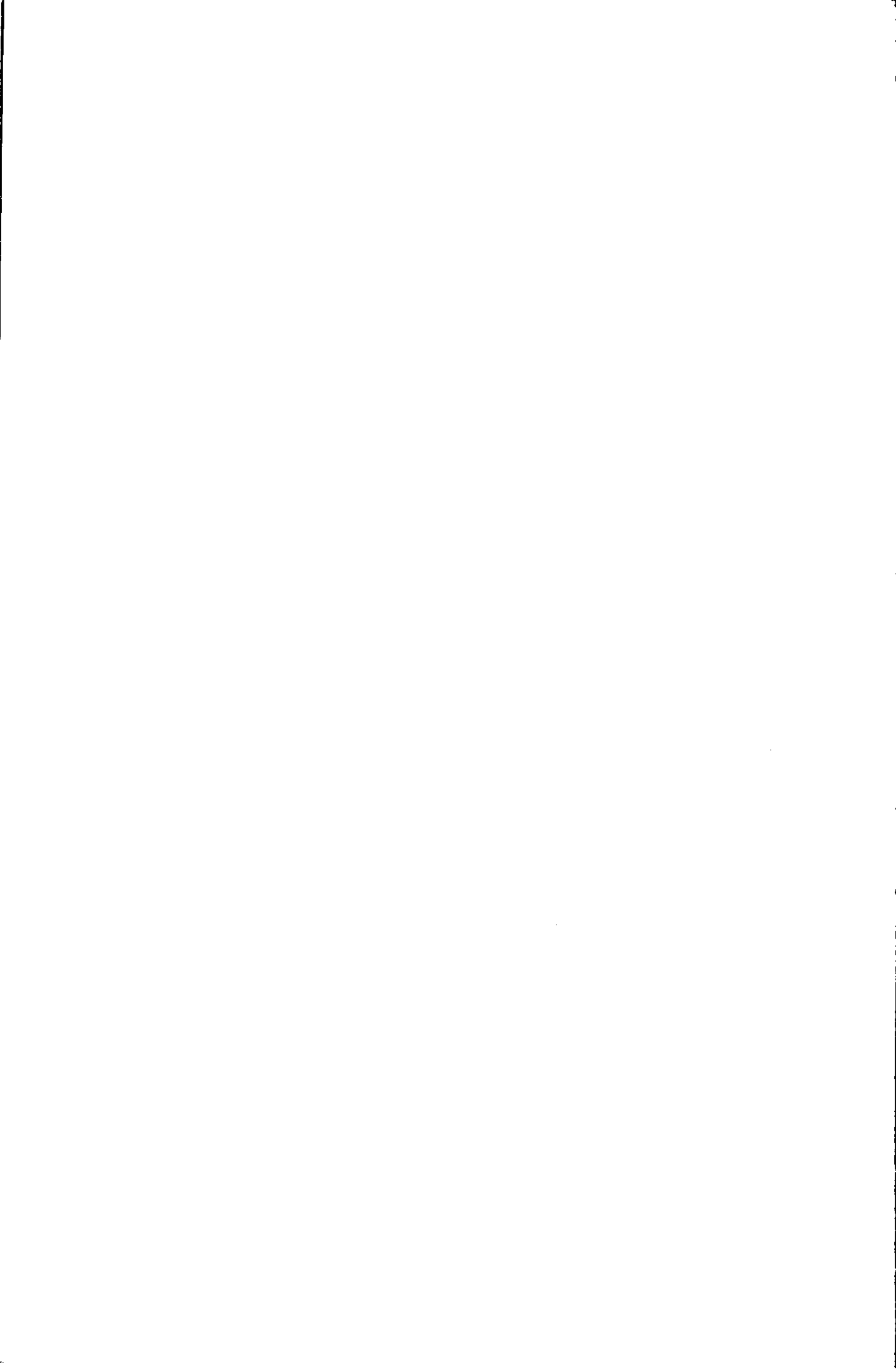


BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

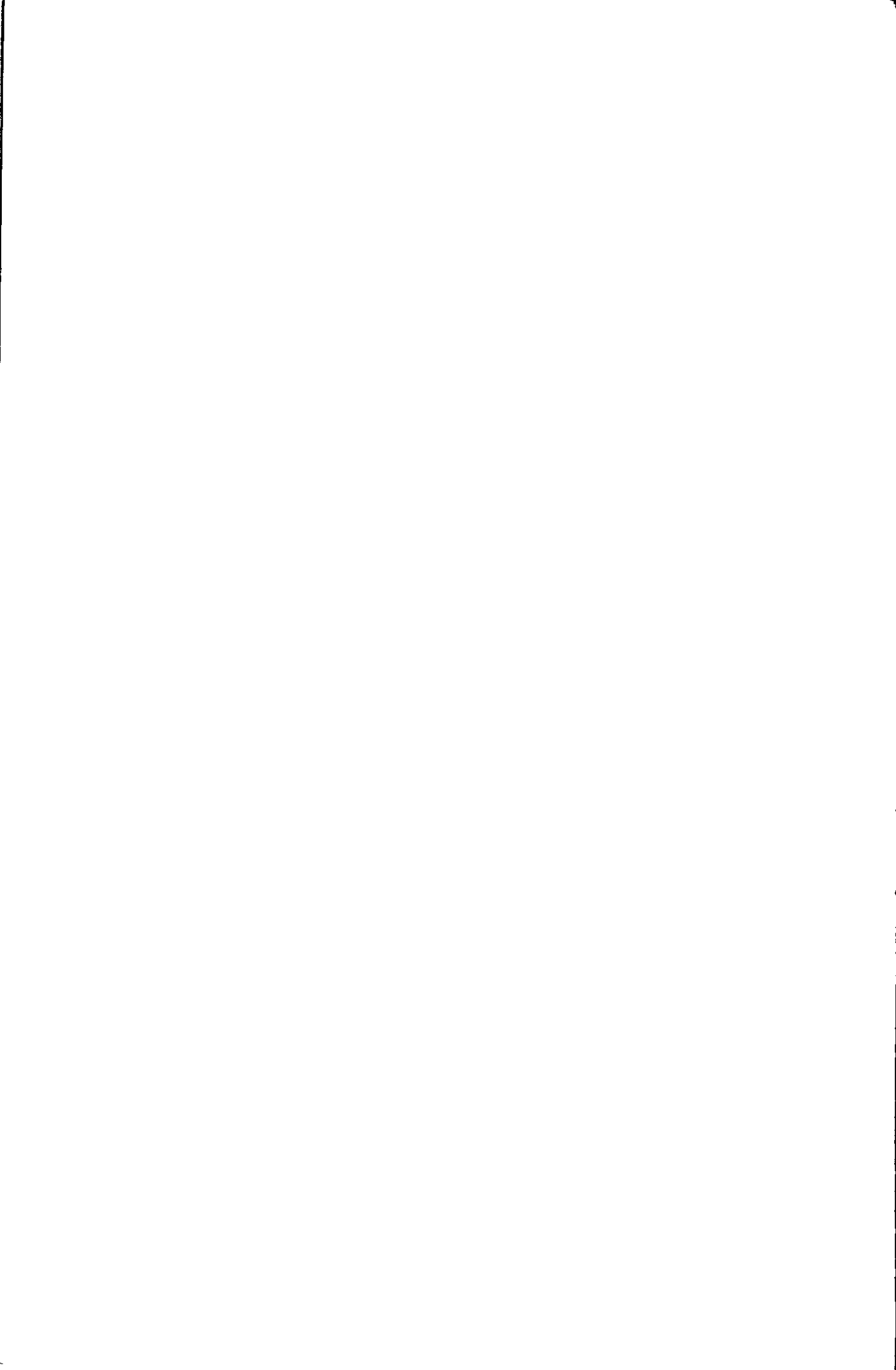
1. Filtrasi spermatozoa sapi Madura melewati kolom Percoll dan Sephadex cenderung meningkatkan proporsi spermatozoa pembawa kromosom X yaitu masing-masing sebesar 4,9 % dan 2,3 %.
2. Penerapan teknik *swim-up* pada semen sapi Madura tidak meningkatkan proporsi spermatozoa pembawa kromosom Y.
3. Penerapan teknik *aside migration* pada semen sapi Madura cenderung meningkatkan proporsi spermatozoa pembawa kromosom Y sebesar 1,8 %.
4. Diantara seluruh perlakuan, kolom Percoll paling banyak mengubah rasio spermatozoa pembawa kromosom X/Y dari normalnya.



Saran

Dengan terkuasainya teknik preparasi ulasan kromosom untuk analisis sitogenetik menggunakan embrio satu sel, perlu dikembangkan lebih lanjut teknik untuk embrio delapan sel keatas yang akan lebih efisien untuk mengukur efektivitas berbagai teknik pemisahan.

Perlu pula penelitian lebih lanjut tentang berbagai pengembangan teknik separasi spermatozoa dengan kolom Percoll, kolom Sephadex, teknik *swim-up* maupun teknik *aside migration* untuk meningkatkan perubahan rasio.



DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera, L.R. dan Niwa, K. 1992. Ability of in vitro maturing bovine oocytes to transform sperm nuclei to metaphase chromosomes. *Journal of Reproduction and Fertility* 96: 565-572.
- Anderson, G.B. 1991. Fertilization, early development, and embryo transfer. In : *Reproduction in Domestic Animals*. Fourth Edition. Academic Press, Inc.
- Avery, B. dan Greve, T. 1995. Impact of Percoll in bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44: 871-878.
- Bhattacharya, B.C., Shome, P. dan Gunther, A.H. 1977. Successful separation of X and Y spermatozoa in human and bull semen. *International Journal of Fertility* 22: 30-35.
- Bhattacharya, B.C., Evans, B.M. dan Shome, P. 1979. Semen separation technique monitored with greater accuracy by B-body test. *International Journal of Fertility* 24: 256-259.
- Brown, D.G., Blake, E.J., Wolgemuth, D.J., Gordon, K. dan Ruddle, F.H. 1987. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts. *Journal of Experimental Zoology* 242: 215-231.
- Cotincot, C., K. Mc Elreavey, M. Fellous. 1993. Sex determination : Genetic control. In : *Reproduction in Mammals and Man*. Ed. C. Thibault., M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses. Paris. 213-226.
- Cran, D.G., L.A. Johnson, N.G.A. Miller, D. Cochrane, C. Polge. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y- chromosome bearing sperm and *in vitro fertilization*. *The Veterinary Record* 132: 40-41.
- Crozet, N. 1993. Fertilization in vivo and in vitro in *Reproduction in Mammals and Man*. Ed. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses. Paris. 327-347.



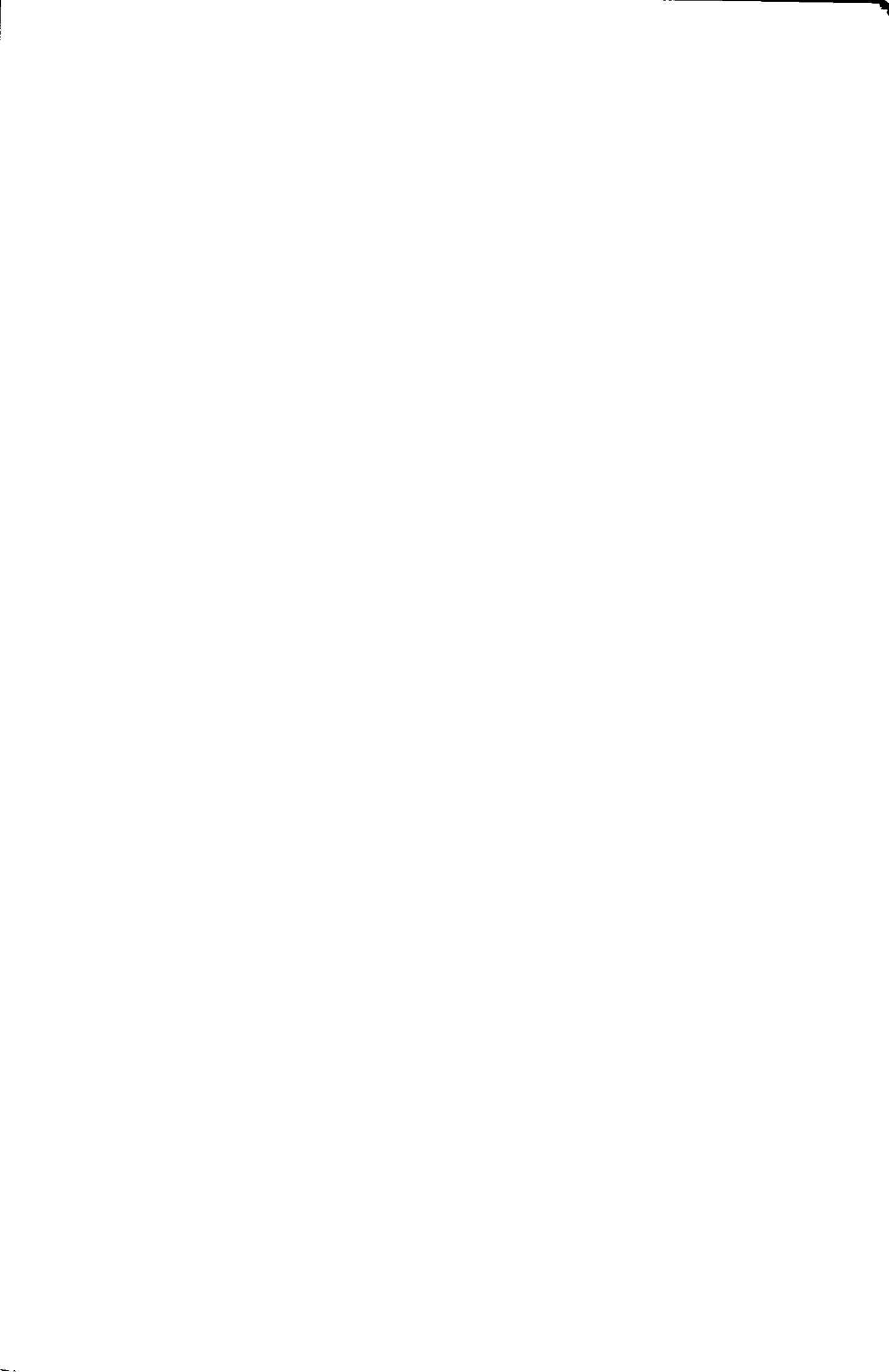
- Ericsson, R.J. dan Glass, R.H. 1982. Functional differences between sperm bearing the X- and Y-chromosome. In 'Prospects for Sexing Mammalian Sperm'. Editor R.P. Amann dan G.E. Seidel. Colorado Assoc. University Press: Boulder. 201-211.
- Flaherty, S.P. dan Matthews, C.D. 1996. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Molecular Human Reproduction* 2: 937-942.
- Garner, D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M.A. Vandilla, L.A. Johnson. 1983. Quatification of the X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28: 312-321.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 1993. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in farm animals*. 6th ed. E.S.E. Hafez (Editor). Lea and Febiger. Philadelphia. 165-187.
- Gledhill, B.L., 1988. Selection and separation of X and Y chromosome bearing mammalian sperm. *Gamete Research* 20: 377-395.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture*, 11. I. Gordon (Editor). CAB International. Wallingford.
- Gawecka-Szczygiel, M. dan Kurpisz, M. 1995. X- and Y-chromosome bearing sperm selection and detection methods. A review. *Folia Histochem Cytobiology* 33: 219-227.
- Hafez, E.S.E., 1993. X- and Y- chromosome-bearing spermatozoa. In: *Reproduction in farm animals*. 6th ed. E.S.E. Hafez (Editor). Lea and Febiger. Philadelphia. 440-445.
- Ishijima, S.E., Okuno, M., Nahori, Y., Seki, S., Nagafuchi, S., Kaneko, S. dan Mohri, H. 1992. Identification of X- and Y- chromosome bearing sperm separated by free-flow electrophoresis using Y-specific polymerase chain reaction. *Biomedical Research* 13: 221-224.
- Iwasaki, S. dan Nakahara, T. 1990. Influence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenology* 34: 683-690.



- Johnson, L.A., Flook, J.P. dan Hawk, H.W. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41: 199-203.
- Johnson, L.A. 1996. Gender preselection in mammals: an overview. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103: 288-291.
- Johnson, L.A. 1997. Advances in gender preselection in swine. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* . 52: 255-266.
- Kawarsky, S.J., Basrur, P.K., Stubbings, R.B., Hansen, P.J. dan King, W.A. 1996. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of Reproduction* 54: 53-59.
- King, W.A., B.R. Yadav, K.P. Xu, L. Picard, M.A. Sirard, A. Verini-Supplizi, K.J. Betteridge. 1991. The Sex ratio of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 36: 779-788.
- Laurincik, J., Kopecny, V. dan Hyttel, P. 1994a. Pronucleus development and DNA synthesis in bovine zygotes in vivo. *Theriogenology* 42: 1285-1293.
- Laurincik, J., Rath, D. dan Niemann, H. 1994b. Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 102: 277-284.
- Lechniak, D., Switonski, M. dan Sosnowski, M. 1996. The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 46: 267-277.
- Lobel, S.M., Pomponio, R.J. dan Mutter, G.L. 1993. The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* 59: 387-392.
- Mahaputra, L., Hinting, A., Hermadi, H.A., Mustofa, I., Utama, S. dan Pudjisrianto. 1997. Teknik Pembuatan Embrio Be, Kembar Identik Dan Viabilitasnya, Dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi. Ditjen Dikti Depdikbud. PHB II/4.
- Marquant-LeGuienne, B., Nibart, M., Guyader, C. Cohen, G., Exposito, L., Thuard, J.M. dan Thibier, M. 1992. DNA probe sexing of young in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 37: 253.



- McLaren, A. 1990. Fertilization, cleavage and implantation. In: *Reproduction in Farm Animals*. Ed. E.S.E. Hafez. 3rd ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 143-163.
- Moor R.M. dan Crosby, I.M. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* 75: 467-473.
- Ohsumi, K., Katagiri, C. dan Yanagimachi, R. 1988. Human sperm nuclei can transform into condensed chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Gamete Research* 20: 1-9.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J/L., Liebfried-Rutledge, M.L., Critser, N.S., Eyestone, W.H. dan First, N.L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
- Plachot, M. dan Popescu, P. 1993. Chromosome and gene anomalies; Their consequences on reproduction and embryonic development. In: *Reproduction in Mammals and Man*. Ed. C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses. Paris.
- Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E. dan Ohama, K. 1997. Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Human Reproduction* 12: 2437-2442.
- Schwerin, M., Blottner, S., Thomsen, P.D., Roschlau, D. dan Brockmann, G. 1991. Quantification of Y Chromosome Bearing Spermatozoa of Cattle Using *In Situ* Hybridization. *Molecular Reproduction and Development* 30: 39-43.
- Soerjoatmodjo, M. 1992. Analisis sitogenetik dan morfometrik beberapa sapi di Indonesia. Desertasi Doktor. PPS Unair.
- Utsumi, K., Hayashi, M., Takakura, R., Utaka, K dan Iritani, A. 1993. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Molecular Reproduction and Development* 34: 25-32.
- VanVliet, R.A., Verrinder Gibbins, A.M. dan Walton, J.S. 1989. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology* 32: 421-438.



- Vidal, F., Moragas, M., Catala, V., Torello, M.J., Santalo, J., Calderon, G., Gimenez, C., Barri, P.N., Egozcue, J. dan Veiga, A. 1993. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Human Reproduction* 8: 1740-1743.
- Windsor, D.P., Evans, G. dan White, I.G. 1993. Sex Predetermination by Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm: A Review. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 155-171.
- Wyrobek, A.J., Alhorn, T., Balhorn, R., Stanker, L. dan Pinkel, D. 1990. Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Molecular Reproduction and Development* 27: 200-208.
- Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs, their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Research* 10: 187-232.
- Zarutskie, P.W., Muller, C.H., Magone, M. dan Soules, M.R. 1989. The clinical relevance of sex selection techniques. *Fertility and sterility* 52: 891-905.



Lampiran 1. Komposisi larutan pencuci oosit, stok TL Hepes dan buffer Phosphat.

Komposisi larutan pencuci oosit (100 ml):

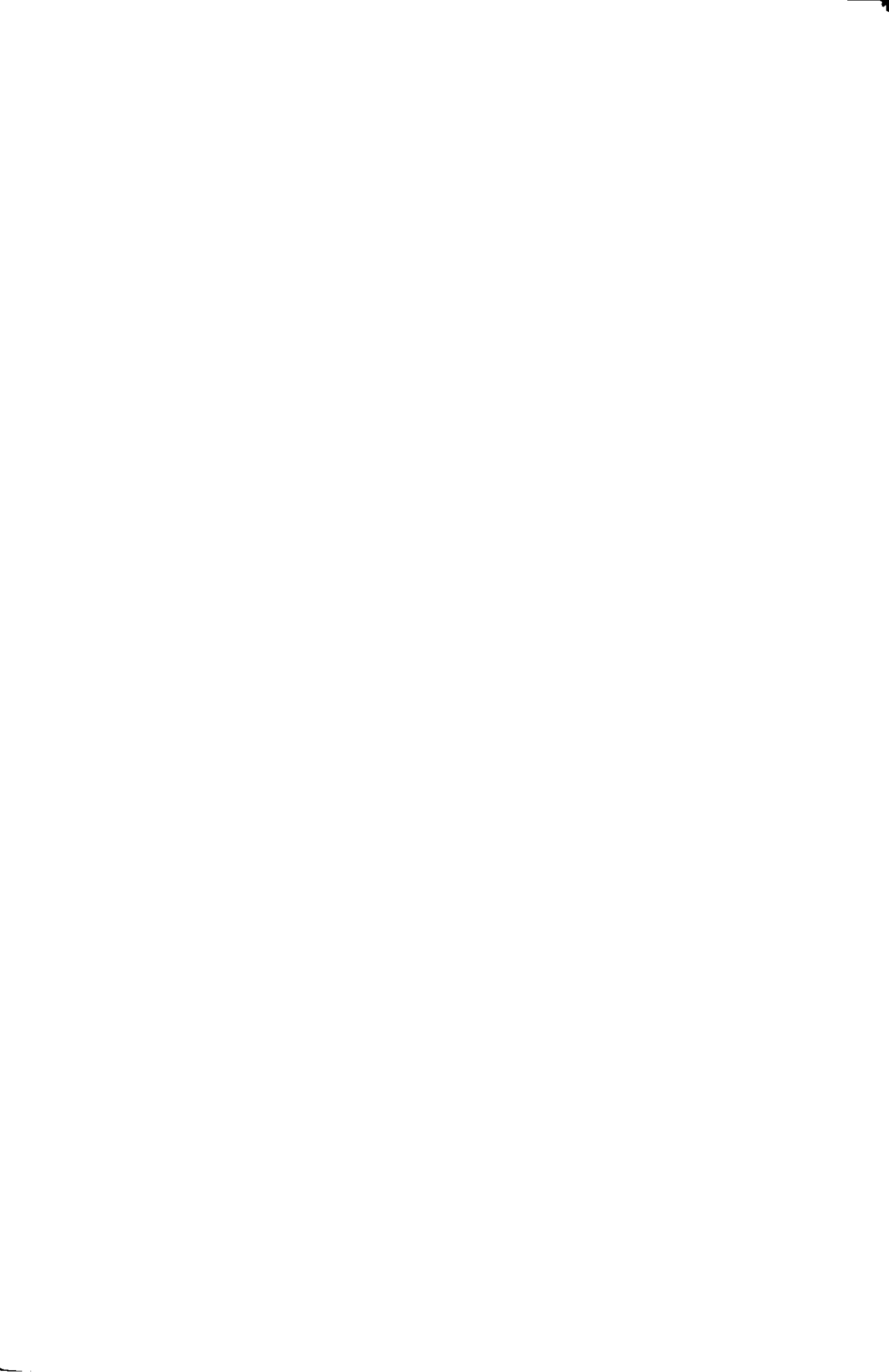
stok TL Hepes	99 ml
Piruvat	1 ml
Gentamisin	50 μ l
BSA fraksi V	300 mg

Komposisi stok TL Hepes (500 ml):

NaCl	3,330 g
KCl	0,120 g
NaHCO ₃	0,084 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,028 g
Na lactat	930 μ l
HEPES	1,200 g
Penicilin	0,0325 g
Phenol red	0,005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,150 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,050 g

Komposisi buffer Phosphat (100 ml):

KH ₂ PO ₄	0,07 M	9 ml
Na ₂ HPO ₄	0,07 M	11 ml



Lampiran 2. Hasil pembuatan preparat sitogenetik untuk konfirmasi pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dengan kolom Percoll, kolom Sephadex, teknik *swim-up* dan teknik *aside migration*.

	ulangan	jumlah embrio	plate metaphase	terdiagnosa		tak terdiagnosa
				X	Y	
Percoll	1	86	24 (27,9)	6 (54,5)	5 (45,5)	13 (54,2)
	2	60	16 (26,7)	5 (55,6)	4 (44,4)	7 (43,8)
	3	69	17 (24,6)	6 (54,5)	5 (45,5)	6 (35,3)
Sephadex	1	89	21 (23,6)	5 (62,5)	3 (37,5)	13 (61,9)
	2	55	15 (27,3)	4 (50,0)	4 (50,0)	7 (46,7)
	3	70	15 (21,4)	4 (44,4)	5 (55,6)	6 (40,0)
<i>Swim-up</i>	1	67	16 (23,9)	5 (55,6)	4 (44,4)	7 (43,8)
	2	103	22 (21,4)	5 (50,0)	5 (50,0)	12 (54,5)
	3	70	18 (25,7)	4 (44,4)	5 (55,6)	9 (50,0)
<i>Aside migration</i>	1	69	17 (24,6)	3 (37,5)	5 (62,5)	9 (52,9)
	2	50	12 (24,0)	4 (57,1)	3 (42,9)	5 (41,7)
	3	64	13 (20,3)	4 (50,0)	4 (50,0)	5 (38,5)
Kontrol	1	84	19 (22,6)	5 (50,0)	5 (50,0)	9 (47,4)
	2	59	13 (22,0)	4 (57,1)	3 (42,9)	6 (46,2)
	3	72	14 (19,4)	4 (44,4)	5 (55,6)	5 (35,7)

1067

