LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2002

# EFEKTIFITAS PEMISAHAN SEL MANI SAPI BERKROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP DAN ASIDE MIGRATION

Peneliti:

Drh. SRI MULYATI, M.Kes.
Drh. IMAM MUSTOFA

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia
DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 53

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**September, 2002**

LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2002

# EFEKTIFITAS PEMISAHAN SEL MANI SAPI BERKROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP DAN ASIDE MIGRATION

Peneliti:

Drh. SRI MULYATI, M.Kes.
Drh. IMAM MUSTOFA



## LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia
DIP Nomor : 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002
Kontrak Nomor : 023/LIT/BPPK-SDM/IV/2002
Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 53

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**September, 2002**

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN**
**LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**
**DOSEN MUDA**

| | | |
|---|---|---|
| 1. | a. Judul Penelitian | : EFEKTIFITAS PEMISAHAN SEL MANI SAPI BERKROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK *SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP* DAN *ASIDE MIGRATION* |
| | b. Macam Penelitian | : Mengembangkan IPTEK |
| 2. | Kepala Proyek Penelitian | |
| | a. Nama lengkap dan Gelar | : Sri Mulyati, M.Kes.,Drh. |
| | b. Jenis Kelamin | : Perempuan |
| | c. Pangkat/Gol. dan NIP | : Penata/ III-C dan 131 760 379 |
| | d. Jabatan Sekarang | : Lektor Muda |
| | 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 | : Lab. Kebidanan – FKH Unair |
| 5. | Kerjasama dengan Instansi lain | |
| | a. Nama Instansi | : --- |
| | b. Alamat | : --- |
| 6. | Jangka waktu penelitian | : 6 (enam) bulan |
| 7. | Biaya yang diperlukan | : Rp. 6.000.000,- (Enam Juta Rupiah) |

Surabaya, Desember 2002

Mengetahui :
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga,

Dr. Sindhono, M.S., Drh.
NIP. 130 387 297

Ketua Peneliti,

Sri Mulyati, M.Kes.,Drh.
NIP. 131 760 379

Disetujui oleh :
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.,Drh.
NIP. 130 701 125

# RINGKASAN

## EFEKTIFITAS PEMISAHAN SEL MANI SAPI BERKROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK *SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP* DAN *ASIDE MIGRATION*

(Sri Mulyati, Imam Mustofa, Suzanita Utama. 2002. 40 Halaman)

Usaha pemeliharaan sapi akan lebih menguntungkan apabila dapat ditentukan jenis kelamin anak sebelum kebuntingan ternak terjadi. Dengan demikian dapat dihindari hilangnya biaya dan waktu pemeliharaan anak sapi dengan jenis kelamin yang tidak dikehendaki. Hal ini dapat dicapai secara maksimal apabila dapat dilakukan pemisahan sel mani berdasarkan jenis kromosom kelaminnya sebelum dipakai dalam program Inseminasi Buatan, Embrio Transfer maupun Fertilisasi *In Vitro*.

Penentuan jenis kelamin anak sebelum kebuntingan umumnya menggunakan teknik analisis karyotipe (Windsor,et al., 1993). Dengan teknik ini sensitivitasnya sangat tinggi dengan efisiensi sebesar 95% dan akurasi 98% (Thiebier dan Nibart, 1995). Permasalahannya adalah bahwa pemakaian teknik tersebut membutuhkan biaya yang sangat mahal dan peralatan canggih. Oleh karena itu dibutuhkan suatu terobosan berupa teknik non invasif yang murah dengan menggunakan peralatan yang telah ada. Hal ini dapat dilakukan dengan terlebih dahulu membuat analisis perbedaan morfologis/biometri sel mani sapi berkromosom X dan Y yang dipisahkan berdasarkan perbedaan sifat masing-masing (karakteristik motilitas, kecepatan berenang, densitas sel dan laju pengendapan).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan teknik non invasif yang paling efektif dapat memisahkan sel mani sapi dengan kromosom kelamin X dan Y dengan biaya yang relatif lebih murah dan menggunakan peralatan yang telah ada.

Penelitian ini menggunakan sampel semen beku sapi Madura yang diambil dari BIB Singosari. Sampel semen diperiksa motilitas dengan pemeriksaan natif, sedangkan persentase hidup dan ukuran kepala (p x l) dibuat dengan cara membuat preparat ulas dan diwarnai dengan Eosin-negrosin, kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan

pembesaran 10 x 40. Perlakuan terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 4 Perlakuan yaitu pemisahan sel mani sapi berkromosom X dan Y dengan teknik *Sephadex, Percoll, Swim up*, dan *Aside Migration*. Dari keempat perlakuan tersebut dibandingkan efektifitasnya dalam memisahkan sel mani berkromosom X dan Y dalam persentase dan diuji dengan Chi-Square untuk melihat adanya perbedaan yang nyata.

Hasil penelitian yang diperoleh kelompok kontrol dengan sel mani hidup 77,5 ± 11,05%. Motilitasnya 43,5 ± 6,7%. Sedangkan pada perlakuan dengan sephadex G-200 sel mani hidup 73,4 ± 11,5%, dengan motilitas 62,5 ± 14,7%. Dengan Percoll sel mani hidup 76,9 ± 13,3%, motilitas 36,5 ± 7,5%. Dengan Swim up sel mani hidup 53,2 ± 10,1%, dan motilitas 40,0 ± 5,85. Aside migration sel mani hidup 54,7 ± 8,9%, motilitas 33,9 ± 8,6%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa motilitas dan daya hidup sel mani pada kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan berbeda nyata.

Hasil penelitian terhadap ukuran kepala untuk pemisahan sel mani berkromosom X dan Y diperoleh, Sephadex dapat memisahkan antara sel mani berkromosom X 74,4%, kromosom Y 25,6%. Percoll kromosom X 82,0 % dan kromosom Y 18,0%. Swim up kromosom X 10,1%, kromosom Y 89,9%. Sedangkan Aside migration dapat memisahkan sel mani berkromosom X sebesar 1,0%, kromosom Y sebesar 99,0%. Dari semua perlakuan ini berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok kontrol yang mempunyai perbandingan kromosom X 44,8%, kromosom Y 55,2%.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa teknik separasi paling efektif untuk mendapatkan sel mani berkromosom X adalah Percoll 2 gradien yaitu 82% dan teknik paling efektif untuk mendpatkan sel mani berkromosom Y adalah campuran teknik swim up dengan aside migration yaitu 99 %.

## SUMMARY

# THE EFFECTIVITY OF SEPARATION OF X AND Y BEARING CHROMOSOME CATTLE SPERM USING *SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP* AND *ASIDE MIGRATION* TECHNIQUE



Mulyati, S. , I. Mustofa, dan S. Utama

Department of Obstetric Veterinary
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University



Sex determination before pregnancy is very important for lowery cost of cattle farm. Bearing sex chromosome will be important for increasing product Artificial Insemination, Embryo Transfer, and In Vitro Fertilisation, so we can decreasing cost.

Karyotyping methode is methode to determination of sex chromosome (Windsor, et al., 1993). This techniq is very sensitive, high efisiency (95%), and very acuration (98%). But, we need high cost and high apparatus if we used this techniq. So we tried to decreasing cost using modified technique by bearing sex chromosome (X and Y) based on its characters .The aim of this research is to design non invasif techniq that can separate cattle sperm sex chromosome (X and Y) by low cost and used simple apparatus.

This research use frozen semen (Madura Cattle) from BIB Singosari. After thawed, this sperm were observed its percent motility and life sperm and observation by Eosin-negrosin staining, than observed by microscope.

In this research we have a controle and four treatment (Sephdex, Percoll, Swim-up, and Aside Migration). We use for statistical analysis is Chi-Squre for proportional comparative sex X and Y chromosome, while for motility and life sperm used descriptife statistic (percent).

The results showed that mean of Madura cattle sperm size was 40.6 μm, and proportionally sex X: Y–bearing chromosome found 45.2 : 55%. The highest effectiveness of the technique on separating the sperm Y-bearing chromosome was 99% based on sperm head size using S-Mig technique (mixing beetwen Swim-up and Aside migration technique). Whereas the highest effectiveness in separating of sperm X-bearing chromosome was 82% accured by using Percoll two gradients collumn technique.

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis sampaikan ke Hadirat Allah SWT, karena berkat rahmadnya dan dengan kerja keras, selesai sudah laporan penelitian ini dengan judul EFEKTIFITAS PEMISAHAN SEL MANI SAPI BERKROMOSOM X DAN Y DENGAN TEKNIK *SEPHADEX, PERCOLL, SWIM UP* DAN *ASIDE MIGRATION.*

Penelitian ini dapat terlaksana dengan baik atas pembiayaan dari Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia DIP Nomor: 003/XXIII/1/--/2002 Tanggal 1 Januari 2002. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tak terhingga kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini
2. Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S., Drh. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Dekan dan Segenap Pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
4. Semua Pihak yang ikut membantu pelaksanaan penelitian sampai tersusunnya laporan penelitian ini.

Akhirnya penulis menyadari mungkin laporan penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu demi kesempurnaan laporan penelitian ini penulis harapkan kritik, saran serta masukan berharga dari sejawat lain yang membaca. Demikian kiranya laporan penelitian ini semoga bermanfaat bagi dunia Kedokteran, Kedokteran Hewan dan Masyarakat, Amiin.

Surabaya, Desember 2002

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

Halaman

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

# BAB I

# PENDAHULUAN

Usaha pemeliharaan sapi akan lebih menguntungkan apabila dapat ditentukan jenis kelamin anak sebelum kebuntingan ternak terjadi. Dengan demikian dapat dihindari hilangnya biaya dan waktu untuk pemeliharaan anak sapi dengan jenis kelamin yang tidak dikehendaki. Hal ini dapat dicapai secara maksimal apabila dapat dilakukan pemisahan sel mani berdasarkan jenis kromosom kelaminnya sebelum dipakai dalam program inseminasi buatan, transfer embrio maupun fertilisasi *in vitro*.

## 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Terbentuknya individu baru yang berkelamin betina ataupun jantan dipengaruhi oleh banyak faktor. Proporsi kelahiran akibat hasil perkawinan alam secara teoritis menghasilkan anak jantan atau betina dengan perbandingan sama. Dengan berkembangnya Inseminasi Buatan (IB) banyak keluhan yang timbul dari peternak bahwa anak sapinya kebanyakan jantan. Kelahiran anak sapi jantan dari hasil IB tersebut tidak lepas dari teori keasaman/kebasaan dari vagina/serviks waktu melakukan IB. Kebanyakan IB berpedoman pada 10-12 jam setelah mulai timbul birahi sebagai saat yang tepat untuk pembuahan. Namun demikian kenyataannya inseminator datangnya terlambat, setelah mengerjakan IB ditempat lain atau karena medan yang mungkin menyulitkan untuk datang sebelum 8 jam setelah permulaan birahi sehingga suasana serviks/vagina lebih basa, sehingga harapan peternak untuk mendapatkan pedet dengan jenis kelamin betina tidak terpenuhi (Mahaputra, *et al.*, 1989).

Sampai saat ini belum ada pusat penelitian yang secara tepat dapat menentukan jenis kelamin keturunan ternak sesuai dengan yang dikehendaki sebelum kebuntingan terjadi. Secara normal tanpa manipulasi tertentu, dengan teknik inseminasi buatan, transfer embrio maupun fertilisasi *in vitro*, kesempatan untuk memperoleh jenis kelamin anak jantan atau betina adalah sama, atau dengan seks rasio (jumlah anak jantan/jumlah anak betina) satu. Hal ini terjadi karena dalam populasi sel mani seks rasio juga sebesar satu. Pada fertilisasi *in vitro* dengan penundaan waktu fertilisasi (Dominko dan First, 1996), mengubah pH medium (Soeminto, *et al.*, 1997), maupun waktu pre inkubasi yang berbeda (Nomura, *et al.*, 1997) menghasilkan seks rasio yang belum memuaskan.

Penentuan jenis kelamin anak sebelum kebuntingan umumnya menggunakan teknik analisis karyotype (Windsor, *et al.*, 1993). Dengan teknik ini sensitivitasnya sangat tinggi dengan efisiensi sebesar 95% dan akurasi 98% (Thiebier dan Nibart, 1995). Permasalahannya adalah bahwa pemakaian teknik tersebut membutuhkan biaya yang sangat mahal dan peralatan canggih. Oleh karena itu dibutuhkan suatu terobosan berupa teknik non infasif yang murah dan dengan menggunakan peralatan yang telah ada. Hal ini dapat dilakukan dengan terlebih dahulu membuat analisis perbedaan morfologis/biometri sel mani sapi berkromosom X dan Y yang dipisahkan berdasarkan perbedaan sifat masing-masing (karakteristik motilitas, kecepatan berenang, densitas sel dan laju pengendapan). Selanjutnya hasil tersebut dikonfirmasikan dengan hasil analisis kromosomnya. Dengan demikian diharapkan dapat diperoleh sel mani dengan jenis kromosom kelamin tertentu yang dikehendaki dengan teknik laboratorium sederhana berupa pemisahan dengan *sephadex, percoll, swim up dan aside migration.*

Pemanfaatan sel mani yang telah diketahui jenis kromosom kelaminnya tersebut pada teknik fertilisasi *in vitro* akan membuka peluang tersedianya bank embrio yang telah terseleksi jenis kelaminnya yang siap diaplikasikan pada peternakan rakyat maupun komersial.

**1.2. Rumusan Masalah**

Identifikasi sel mani berkromosom kelamin X dan Y paling akurat dilakukan dengan analisis karyotipenya. Disamping itu masing-masing sel mani X dan Y tersebut mempunyai perbedaan mikrobiometri dan perbedaan sifat-sifat karakteristik motilitas, kecepatan berenang, densitas sel dan laju pengendapannya.

Pada penelitian ini akan dicoba memisahkan sel mani berkromosom kelamin X dan Y berdasarkan sifat-sifat tersebut di atas dengan teknik *Sephadex, Percoll, Swim up,* dan *Aside migration.* Adapun kriteria yang digunakan adalah mikrobiometri sel mani pada masing-masing hasil pemisahan. Kepastian kromosom kelamin masing-masing bagian hasil pemisahan dilakukan dengan mengkonfirmasikan data yang diperoleh terhadap data penelitian lain tentang hubungan mikrobiometri sel mani dengan kromosom kelaminnya.

**Rumusan masalah yang diajukan dari penelitian ini adalah :**

1. Apakah pemisahan sel mani sapi dengan teknik Sephadex, Percoll, Swim Up dan Aside Migration berpengaruh terhadap motilitas dan daya hidup sel mani ?
2. Apakah pemisahan sel mani sapi dengan teknik Sephadex, Percoll, Swim Up, dan Aside Migration berpengaruh terhadap perbandingan proporsional sel mani sapi yang diduga berkromosom kelamin X dan Y ?

3. Teknik mana yang paling efektif untuk memisahkan sel mani sapi yang berkromosom kelamin X atau sel mani yang berkromosom kelaminY ?

**Hipotesis Penelitian yang diajukan adalah :**

Terdapat perbedaan yang nyata persentase sel mani sapi berkromosom kelamin X dan Y setelah pemisahan dengan teknik *Sephadex, Percoll, Swim up,* dan *Aside migration.*

# BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA

Secara fisiologis kesempatan untuk memperoleh jenis kelamin anak jantan atau betina sama atau dengan seks rasio (jantan/betina) sebesar satu. Hal ini terjadi karena dalam populasi sel spermatozoa proporsi sel berkromosom X maupun Y masing-masing juga sebesar 50 % (Hafez, 1993). Pada fertilisasi *in vitro* (*FIV*) dengan penundaan waktu fertilisasi menghasilkan proporsi embrio dengan jenis kelamin jantan lebih besar secara nyata (Dominko dan First, 1996). Usaha lain dengan mengubah pH medium menjadi lebih alkalis, ternyata menghasilkan proporsi embrio jantan lebih besar sampai 75 % dari keseluruhan populasi embrio (Soeminto, *et al.*, 1997). Perlakuan berupa pemberian waktu pre inkubasi yang berbeda sebelum *FIV* ternyata tidak berpengaruh terhadap proporsi jantan-betina populasi embrio (Nomura, *et al.*, 1997).

Penentuan jenis kelamin anak sebelum kebuntingan paling akurat dilakukan dengan menggunakan teknik analisis karyotipe (Windsor, *et al.*, 1993). Teknik ini merupakan teknik invasif, dimana embrio yang akan diperiksa diambil salah satu sel tropoblasnya untuk dipakai sebagai bahan pemeriksaan secara sitogenetis. Dengan teknik ini sensitivitasnya sangat tinggi dengan efisiensi sebesar 95 % dan akurasi 98 % (Thiebier dan Nibart, 1995), namun memerlukan bahan-bahan kimia yang sangat mahal dan peralatan yang canggih.

Menurut Windsor, *et al.* (1993) sel spermatozoa berkromosom X dan Y mempunyai perbedaan sifat motilitas, kecepatan berenang, densitas sel dan laju pengendapan. Perbedaan-perbedaan tersebut dapat dipakai sebagai dasar pemisahan sel spermatozoa

menurut kromosom kelaminnya dengan teknik *Sephadex*, *Percoll*, *Swim up*, dan *Aside migration*.

## 2.1. Spermatozoa

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).

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 segingga mengubah rasio X : Y dalam populasi spermatozoa, baik *in vivo* 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**

Secara proporsional alami jumlah kromosom spermatozoa X dan Y pada hewan dan manusia umumnya sama. Pada domba proporsi tersebut berdasarkan panjang kepala kali lebar (pxl) adalah 49% menunjukkan spermatozoa berukuran lebih kecil dari rata-rata yang dicurigai sebagai spermatozoa berkromosom Y dan sisanya 51% mempunyai besar kepala sama dan lebih besar dari rata-rata yang dicurigai sebagai spermatozoa berkromosom X (Mahaputra, *et al.*, 1989). Besar kepala spermatozoa sapi adalah 32 - 45μm, struktur kromatin yang terdapat dalam inti untuk membentuk DNA lebih banyak 3-4 % terdapat pada spermatozoa X sehingga ukuran kepala diklasifikasikan lebih besar dari spermatozoa Y (Hafez, 1993). Dengan demikian secara proporsional spermatozoa berkromosom X dan Y sebenarnya dapat menghasilkan anak jantan dan betina sama banyak, tetapi karena struktur morfologi yang berbeda, suasana lingkungan yang sama tidak dapat diakomodasi sama baik oleh kedua jenis spermatozoa yang berbeda kromosom, sehingga individu baru yang lahir jumlah populasinya juga berbeda. Selain itu ada beberapa perbedaan lagi yang bisa dipakai untuk identifikasi spermatozoa berkromosom X dan Y, yaitu hanya spermatozoa Y yang berfluorescent, spermatozoa berkromosom X umumnya bergerak menuju katoda dan spermatozoa berkromosom Y mempunyai H-Y antigen lebih banyak (Erricson dan Glass, 1982).

Masalah yang ada dalam penelitian yang mengusahakan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y adalah sulitnya mengukur efektifitas pemisahan spermatozoa berupa kromosom X : Y dari populasi spermatozoa yang sudah dipisahkan/ dimurnikan (Hafez, 1993; Windsor, *et al.*, 1993). Berbagai cara yang digunakan untuk mengukur efektifitas hasil pemisahan adalah :

**2.2.1. Melihat Jenis Kelamin Keturunan**

Metode ini sangat tidak efektif karena hasilnya 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 fluorensen lengan panjang kromosom Y pada stadium metaphase dari spermatozoa manusia, selain itu 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 spermatozoa normal. Problem lain yang ada yaitu bahwa fluoresensi kromosom Y adalah khas untuk setiap spesies dimana F-*body* hanya terdeteksi pada spermatozoa manusia dan gorila (Erricson 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

Cara ini merupakan perkembangan 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); Oshumi *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 *karyotipe* adalah relatif konstan dimana masing-masing lengan terdiri dari 2 kromatid yang berdampingan kecuali perbedaan pada panjang total, letak sentromer serta pola pemetaannya. 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.

### 2.2.4. *Probe* DNA

Teknik ini 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. Sensivitas pH
7. H-Y antigen pada spermatozoa pembawa kromosom Y

Sampai sekarang berbagai teknik telah dikembangkan dengan tujuan mengeksploitasi beberapa dari perbedaan–perbedaan di atas 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 *invitro* manusia maupun hewan telah digunakan untuk mendapatkan spermatozoa motil dengan angka rekoveri 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 um. 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 morphologis.

**2.3.4. Teknik** *Aside Migration*

Teknik ini 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.* , 1997 ).

**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 intensifitas 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 dikompetisikan 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).

# BAB 3

# TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

## 1. Tujuan Penelitian

Untuk menemukan teknik non invasif yang paling efektif dapat memisahkan sel mani sapi dengan kromosom kelamin X dan Y dengan biaya yang relatif lebih murah dan menggunakan peralatan yang telah ada.

## 2. Manfaat Penelitian

Dengan ditemukannya teknik pemisahan sel mani sapi dengan kromosom kelamin X dan Y dengan yang relatif lebih murah diharapkan selanjutnya dapat digunakan untuk memproduksi embrio dengan jenis kelamin tertentu yang dikehendaki untuk mendukung pengadaan bank embrio dengan jenis kelamin yang telah diketahui.

# BAB 4

# METODE PENELITIAN

Masing-masing sebanyak 10 straw semen sapi Madura beku (BIB Singosari ) dilakukan pengenceran kembali (*thawing*) dengan air hangat 35 – 37 ° C selama 1 menit. Setelah sel mani dalam semen dari masing-masing straw dilihat persentase motilitas dan persentase hidupnya lebih dari 50 % di bawah mikroskop, selanjutnya dicuci dengan 3 ml media *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS, Sigma), lalu disentrifuge dengan kecepatan 1800 rpm. Media EBSS yang berupa filtrat bagian atas dibuang, lalu pellet yang tersisa sekitar 100 µl dipindahkan ke masing-masing perlakuan. Ulangan terhadap masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 10 kali.

## Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

### 1. Identifikasi Variabel

a. Variabel Bebas (Independent Variable)

Pemisahan sel mani sapi dengan teknik *Sephadex*, *Percoll*, *Swim Up*, dan *Aside Migration.*

b. Variabel Tergantung (Dependent Variable)

- Motilitas sel mani
- Daya Hidup sel mani
- Perbandingan proporsional sel mani berkromosom kelamin X dan Y

**2. Definisi Operasional Variabel**

Pemisahan sel mani adalah memisahkan kromosom kelamin X dan Y sel mani sapi dengan teknik *Sephadex, Percoll, Swim Up*, dan *Aside Migration.*

Motilitas adalah gerakan maju sel mani sapi dalam satu lapang pandang di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali sebelum dilakukan pemisahan (Kontrol) dibandingkan dengan sesudah dilakukan pemisahan (Perlakuan).

Daya Hidup adalah Jumlah (persentase) sel mani hidup sebelum dilakukan pemisahan (Kontrol) dibandingkan dengan sedudah dilakukan pemisahan (Perlakuan), berdasarkan hasil pewarnaan pada preparat ulas sel mani dengan menggunakan zat warna Eosin-negrosin, dengan pembesaran 400 kali, dimana kepala sel mani yang hidup tidak terwarnai/tidak menyerap warna Eosin-negrosin, sedangkan sel mani yang mati berwarna merah keunguan karena menyerap warna Eosin-negrosin.

Perbandingan proporsional sel mani berkromosom kelamin X dan Y adalah Jumlah (persentase) sel mani berkromosom kelamin X dan Y sebelum dilakukan pemisahan (Kontrol) dibandingkan dengan sesudah dilakukan pemisahan (Perlakuan) berdasarkan ukuran mikrobiometri (μm) kepala sel mani (pxl).

**Prosedur Penelitian :**

Penelitian ini dilakukan dengan membagi sampel semen sapi Madura beku bentuk Straw (BIB Singosari), menjadi 1 kelompok Kontrol dan 4 kelompok Perlakuan, yaitu :

**Kelompok I : Kelompok Kontrol**

Satu tetes semen diperiksa secara natif untuk dilihat motilitasnya, sedangkan untuk menghitung persentase hidup dan ukuran kepala sel mani, dibuat dengan cara satu

tetes semen ditambah dengan satu tetes zat warna Eosin-negrosin dibuat preparat ulas di atas gelas obyek. Setelah difiksasi dengan nyala api selanjutnya diperiksa dengan mikroskop pada pembesaran 10 x 40 (400x).

**Kelompok II :** ***Untuk mendapatkan sel mani berkromosom X***

Campuran sephadex G-200 12,5 % dalam EBSS dibiarkan selama 24 jam dalam tabung Buret dengan katup berpenampang 150 mm, dengan tinggi 50 mm. Selanjutnya sebanyak 250 µl campuran semen dalam EBSS tersebut diteteskan di atas campuran sephadex G-200 dalam tabung Buret. Permukaan cairan yang berisi semen diturunkan dengan membuka katup Buret sehingga semen akan tertarik turun. Sambil menurunkan permukaan cairan sephadex, dari mulut Buret bagian atas dituangkan larutan EBSS secara bertahap agar volume cairan dalam Buret tetap. Empat kali hasil saringan tersebut ditampung dalam vial 150 µl setiap lima tetes hingga tetes ke-50. Vial 4 hingga vial 10 (7 vial) masing-masing dilakukan perhitungan konsentrasi sel mani hidup berikut ukuran panjang dan lebar kepala.

**Kelompok III :** ***Untuk mendapatkan sel mani berkromosom X***

Sebanyak 250 µl semen dalam EBSS tersebut diletakkan dengan hati-hati di atas kolom Percoll yang berada dalam tabung plastik berbentuk kerucut (3 ml Percoll 90 % di bagian bawah dan 3 ml Percoll 45 % di atasnya). Setelah disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 2800 rpm, maka semen yang berada di dasar tabung diambil dengan pipet untung diwarnai dengan Eosin-negrosin dan dibuat preparat ulas. Selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 40 untuk perhitungan persentase hidup dan pengukuran panjang dan lebar kepala sel mani.

**Kelompok IV : *Untuk mendapatkan sel mani berkromosom Y***

Sebanyak 250 µl campuran semen dalam EBSS tersebut dimasukkan dengan mikro pipet ke dalam 3 ml larutan EBSS yang berada dalam tabung plastik berbentuk kerucut. Selanjutnya disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Cairan bagian atas dibuang, kemudian endapan (pellet) yang tertinggal diisi kembali dengan 3 ml EBSS secara perlahan dari dinding tabung. Setelah dibiarkan selama 30 menit sel mani yang berada dipermukaan cairan diambil dan dibuat pewarnaan dengan Eosin-negrosin untuk menghitung persentase sel mani hidup serta pengukuran panjang dan lebar kepala sel mani.

**Kelompok V : *Untuk mendapatkan sel mani berkromosom Y***

Dibuat sediaan "roset" yaitu masing-masing 25 µl EBSS sebanyak 10 buah yang berada sentripetal dalam cawan petri 56 mm, dengan bagian tengah cawan berisi 200 µl EBSS yang dihubungkan satu per satu dengan menarik ujung mikro pipet dari pusat ke tepi sentripetal dengan sangat tipis. Sediaan tersebut selanjutnya ditutup dengan minyak parafin dan dibiarkan dalam inkubator 5 % $CO_2$ pada suhu 38,5 ° C selama 2 jam. Sebanyak 250 µl campuran semen-EBSS diletakkan dengan mikro pipet ke dalam EBSS yang berada di bagian pusat roset. Setelah dibiarkan selama 30 menit dalam inkubator, sel mani diambil dari semua tetes 25 µl bagian sentripetal cawan petri untuk dibuat pewarnaan dengan Eosin-negrosin. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan persentase hidup dan pengukuran panjang dan lebar kepala sel mani.

**Evaluasi dan Analisis Data**

Motilitas dan Daya hidup sel mani sapi Madura dihitung dalam persentase dan disajikan dalam bentuk Deskriptif. Hasil pemisahan sel mani berdasarkan kromosom kelamin X dan Y dengan melihat ukuran mikrobiometri kepala (pxl) dinyatakan dalam persentase, dan untuk melihat adanya perbedaan yang nyata ($P<0,05$) dari masing-masing kelompok diuji dengan Uji Chi-Kuadrat/Chi-Square (Steel and Torrie, 1989).

# BAB 5

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian dengan menggunakan 10 kali ulangan semen beku sapi Madura yang berasal dari Balai Inseminasi Buatan Singosari dari kelompok kontrol dan masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel I di bawah ini.

Tabel I. Rataan (± Sd) Motilitas dan Hidup Sel Mani Sapi Madura dari Beberapa Perlakuan.

| | Hidup (%) | Motil (%) |
|---|---|---|
| Kontrol | 77,5 ± 11,05 [a] | 43,5 ± 6,69 [b] |
| Sephadex G – 200 (Sdx) | 73,4 ± 11,5 [a] | 62,5 ± 14,7 [a] |
| Percoll (45% & 90%) (Pcl) | 76,9 ± 13,3 [a] | 36,5 ± 7,5 [b] |
| Swim up (Sup) | 50,2 ± 10,1 [b] | 40,0 ± 5,8 [b] |
| Sup + Mig (S-Mig) | 54,7 ± 8,9 [b] | 33,9 ± 8,6 [b] |

Keterangan :Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

Setelah *thawing* rataan (± Sd ) sel mani hidup dengan pewarnaan Eosin negrosin pada kelompok kontrol adalah 77,5 ± 11,05% tetapi yang motil jauh lebih rendah yaitu hanya 43,5 ± 6,7%. Tampaknya sel mani yang non motil masih banyak yang hidup tercermin dari zat warna Eosin-negrosin tidak dapat mewarnai kepala sel mani tersebut. Dengan kata lain bisa dikatakan bahwa tidak semua sel mani hidup dapat motil.

Demikian pula pada preparasi sel mani dengan sephadex G-200 (Sdx) yang dikoleksi dari tetes ke 20-30 jumlah rataan (± Sd) sel mani hidup yang didapat adalah 73,4 ± 11,5% dengan motilitas 62,5 ± 14,7%. Kalau rataan motilitas ini dibandingkan dengan yang didapat pada kontrol, menunjukkan jauh lebih baik secara nyata. Hal ini disebabkan karena sebagian besar waktu pelepasan katup bawah column Sdx sel mani yang mempunyai kepala lebih besar dengan asumsi lebih berat dan motil akan menembus terlebih dahulu ikut arus hidrolik dari EBSS, sehingga karakter sel mani yang didapat

sesuai dengan hukum gravitasi dan kemampuan motilitasnya. Tetapi bila urutan tetes pengumpul diubah dan jumlahnya ditambah sel mani yang didapat ukuran dan motilitasnya lebih beragam. Ini berarti karena bentuk molekulnya Sdx yang bulat-bulat besar dan kecil bersifat hanya menahan sementara sel yang lebih kecil dan melepas duluan sel yang lebih berat.

Preparasi semen dengan Percoll (Pcl), sering dipakai dalam rangka persiapan *FIV*, karena bentuk selnya dapat memisahkan sel mani dengan kotoran-kotoran yang tidak diperlukan untuk *FIV*. Dengan memakai dua jenis gradian 45 dan 90% Pcl dan setelah diputar 700 x g, sel mani banyak didapatkan pada dasar tabung. Rataan (± Sd) sel mani hidup adalah 76,9 ± 13,3% dan sel mani motil 36,5 ± 7,5%. Kalau dibandingkan jumlah sel mani motil yang didapat lebih sedikit baik dengan kontrol, lebih-lebih dengan perlakuan Sdx .Observasi dibawah mikroskop menunjukkan bentuk molekul Pcl jauh lebih kecil sehingga antar molekulnya akan tersusun secara lebih rapat, sehingga celah/lubang untuk sel mani lewat akan jauh lebih kecil dari pada Sdx. Dengan demikian tampaknya sel mani yang bisa menuju ke dasar tabung hanya yang memiliki berat yang betul-betul lebih dari rataan berat sel mani keseluruhan. Kedua perlakuan di atas (Sdx dan Pcl) didasari oleh teori bahwa sel mani mamalia berkromosom X mempunyai kromatin DNA 2,8 –7,5% lebih banyak dari pada sel mani berkromosom Y (Johnson, 1996), pada manusia sel mani berkromosom X kromatin DNA lebih banyak 3-4% dari pada sel mani berkromosom Y (Hafez, 1993).

Pada preparasi semen dengan renang ke atas (Sup) untuk *FIV* dilakukan mula-mula untuk memisahkan sel mani non motil dengan motil dan kotoran-kotoran yang mengkontaminasi semen sehingga didapatkan sel mani motil tanpa terkontaminasi. Masih

dilandasi dengan teori struktur sel mani yang lebih kecil yang dimiliki oleh sel mani berkromosom Y akan bermigrasi ke atas lebih cepat dan duluan dibandingkan dengan sel mani berkromosom X yang relatif lebih lambat karena lebih berat. Pada perlakuan kelompok renang keatas ini diperoleh rataan (± Sd) sel mani hidup setelah 30 menit dengan ulangan 10 kali adalah 53,2 ± 10,1% dan motilitas sebanyak 40,0 ± 5,8%. Temuan motilitas ini tidak jauh berbeda dengan laporan sebelumnya dengan teknik preparasi yang sama yaitu 48,2% (Mahaputra dkk., 1997).

Untuk preparasi sel mani agar lebih selektif, teknik gabungan antara Sup dengan Aside migration (Smig) diperoleh rataan sel mani hidup 54,7 ± 8,9% dan motilitas 33,9 ± 8,6%. Angka ini lebih rendah secara nyata dari kontrol. Hal ini besar kemungkinannya setelah bergerak selama 1 jam persediaan energi yang ada pada sel mani jumlahnya sudah menurun sehingga lebih banyak sel mani non motil. Tetapi tampaknya sistem seleksi sel mani ini lebih tepat karena akan didapat sel mani yang betul-betul motil. Artinya setelah bertemu dengan oosit masak masih punya kemampuan bergerak dan menembus zona. Sedangkan pada kelompok kontrol walaupun angka motilitasnya lebih banyak tetapi tampaknya banyak yang setelah bertemu dengan oosit masak menjadi non motil.

Hasil penelitian dari pemisahan sel mani sapi Madura berdasarkan kromosom kelamin X dan Y dari kelompok kontrol dan masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel II berikut ini.

Tabel II. Rataan (± Sd) Ukuran Kepala Sel Mani Sapi Madura dan Persentase Klasifikasi Kelompok yang Memiliki Kromosom X dan Y dari Kelompok Kontrol dan Masing-masing Perlakuan.

| | Ukuran Kepala | | |
|---|---|---|---|
| | μm | < X (%) | ≤ X (%) |
| Kontrol | 40,6 ± 4,6 | 55,2 [a] | 44,8 [a] |
| Sephadex G-200 (Sdx) | 42,7 ± 3,8 | 25,6 [b] | 74,4 [b] |
| Percoll 45% & 90% (Pcl) | 44,9 ± 3,6 | 18,0 [b] | 82,0 [b] |
| Swim Up (Sup) | 37,5 ± 3,2 | 89,9 [c] | 10,1 [c] |
| Sup + Mig (S-Mig) | 36,4 ± 2,0 | 99,0 [c] | 1,0 [c] |

Keterangan : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sgt. nyata.

Analisis kuantitatif rataan (± Sd) ukuran kepala (p x l) sel mani sapi Madura dengan total dari 4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan masing-masing 10 kali ulangan, diperoleh rataan (± Sd) ukuran kepala (p x l) adalah 40,6 ± 4,6 μm pada kelompok kontrol. Ukuran kepala minimal diperoleh 35,3 sebanyak 32 %, dan ukuran kepala maksimum adalah 49,6μm sebanyak 9,5 %. Sedangkan sisanya adalah sel mani berkepala ukuran sedang antara 38,3 – 44,1μm sebanyak 58,5 % (Lampiran 9 dan Tabel II). Jadi ukuran kepala sel mani sapi Madura, masih termasuk rentangan ukuran kepala umumnya bangsa sapi yaitu 32 – 45μm (Hafez, 1993).

Dari sampel semen sapi Madura yang dihitung secara kuantitatif ukuran kepalanya yang terbagi dalam 5 kelompok termasuk 1 kelompok kontrol dengan masing-masing ulangan 10 kali. Pada kelompok kontrol didapatkan proporsi ukuran kepala sel mani yang lebih kecil dari ukuran kepala dari rataan populasi yang dicurigai memiliki kromosom Y adalah 55 % dan ukuran kepala yang lebih besar sama dengan rataan dan dicurigai memiliki kromosom X adalah sebanyak 45 %. Proporsi ini tidak berbeda secara nyata. Berarti kesempatan terbentuknya anak jantan dan anak betina pada sapi dengan

menggunakan semen beku terjadi secara berimbang. Secara alamiah proporsi jenis kelamin penentu dari sel mani memiliki kromosom berbanding 50:50 (Hafez,1993).

Penelitian sebelumnya dengan menggunakan sel mani domba didapatkan proporsr yang dicurigai sel mani berkromosom Y dan X adalah 49:51 (Mahaputra, *et al.*, 1989). Dilihat dari proporsi sel mani yang dicurigai mempunyai kromosom X dan Y yang berimbang, tampaknya keluhan yang pernah dilontarkan di suatu kelompok IB di Bangkalan Jawa Timur bahwa anak sapi Madura yang lahir dengan menggunakan semen beku, secara proporsional lebih banyak anak jantan yang lahir. Hal ini cenderung diakibatkan oleh waktu IB yang berkait dengan puncak birahi sehingga akan mempengaruhi pH uterus. Pada manusia telah diketahui lebih cermat bahwa senggama pada saat ovulasi atau sesaat setelah ovulasi akan didapat jumlah anak laki-laki yang lebih dominan dari anak perempuan (Phillips and Hilton,1992).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan perubahan rasio proporsi sel mani pembawa kromosom X dan Y setelah perlakuan dengan kolom Sephadex, kolom Percoll, Swim up, dan teknik Aside migration yaitu : dari 55,2 : 44,8, menjadi 25,6 : 74,4,; 18,0 : 82,0; 89,9 : 10,1; dan 99,0 : 1,0. Hal ini dapat dilihat bahwa proporsi perbandingan sel mani pembawa kromosom kelamin X dan Y dari kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan sangat berbeda nyata.

Sephadex G-200 dan Percoll, mula-mula dipakai untuk tujuan preparasi semen manusia sebelum dilakukan *FIV*. Karena kemampuannya dapat memisahkan sel yang lebih kecil dengan yang lebih besar, maka kedua zat ini lebih populer sebagai zat separasi sel mani berkromosom X. Dengan memanfaatkan konsentrasi 2,5 % Sdx dalam EBSS, sel mani yang dicurigai berkromosom X dapat dipisahkan hingga 74,4% berada pada

tetes ke 20-30. Hasil pemisahan ini berbeda secara nyata dengan proporsi sel mani yang diduga berkromosom X ($p < 0,05$). Hal ini diperkuat oleh hasil pengukuran rataan (±Sd) besar kepala yang makin membesar yaitu 42,7 ± 3,8 μm adalah juga berbeda secara nyata dari besar kepala pada kelompok kontrol ($p < 0,05$ ) (Lampiran 10).

Sedangkan Percoll (Pcl) dapat memisahkan sel mani yang berukuran sama lebih besar dari rataan kepala yang diduga berkromosom X lebih tinggi yaitu 82%. Angka ini juga berbeda secara nyata dengan hasil kelompok kontrol ($p < 0,05$). Demikian pula proporsi ini diperkuat oleh ukuran rataan (± Sd) kepala dari kelompok perlakuan Pcl yang meningkat menjadi 44,9 ± 3,6μm dan berbeda secara nyata dengan rataan ukuran kepala dari kelompok kontrol sebesar 40,6 ± 4,6 μm ($p <0,05$) (Lampiran 11).

Bila dibandingkan antara kelompok Sephadex dengan kelompok Percoll, terlihat pula adanya kecenderungan bahwa kelompok Percoll lebih efektif dalam memanen sel mani pembawa kromosom X. Sehingga hasil penelitian ini menunjukkan adanya kemungkinan memperkaya proporsi sel mani pembawa kromosom X dengan teknik kolom Percoll.

Untuk meningkatkan efektifitas pemanenan sel mani 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 700 x g selama 20 menit, masih ada sel mani pembawa kromosom Y yang menembus ke dasar gradien Percoll 90%. Schwerin, *et al.* (1991) melakukan pemisahan sel mani 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 sel mani menggunakan teknik ini memberi hasil yang berkisar antara tidak adanya perubahan rasio ( Gawecka-Szezygiel 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 sel mani pembawa kromosom X dan Y, sudah semestinya prosedur yang berbeda memberikan hasil yang berbeda.

Usaha pemisahan (*sexing*) sel mani 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 antara sel mani pembawa kromosom X dan Y menimbulkan perbedaan yang lebih kecil pula pada massa dan kecepatan gerak sel mani, sehingga dengan perbedaan kecepatan gerak sel mani 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 sel mani. Hanya saja dalam teknik ini pergerakan sel mani lebih terarahkan, yaitu ke tepi rosset sehingga pergerakan sel mani yang timbul lebih linear dibanding dalam teknik swim up. Bila dalam teknik swim up, sel mani pembawa kromosom Y yang motil, bergerak secara progresif hanya di setengah bagian bawah tabung karena mengingat ukuran sel mani 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 memisahkan sel mani yang berukuran kepala lebih kecil (diduga berkromosom Y) kedua teknik separasi ini seperti renang atas (Sup) dan gabungan Sup dan migrasi kesamping (S-mig) dilakukan pada penelitian ini. Rataan ukuran kepala sel mani yang diambil 30 menit setelah Sup pada kedalaman 2 mm dari permukaan atas media EBSS, diperoleh 37,5 ± 3,2 μm. Hasil analisis kuantitatif ini diperkuat oleh bukti data bahwa populasi sel mani yang lebih kecil yang diduga berkromosom Y sebanyak 90% dapat ditangkap dibagian atas media. Sedangkan dengan gabungan teknik S-mig diperoleh rataan (± Sd) besar kepala yang paling kecil yaitu 36,4 ± 2,0 μm tidak berbeda dengan Sup tetapi kedua angka ini berbeda secara nyata ($p<0,05$) dengan kontrol (Lampiran 12). Teknik gabungan ini (Smig) dapat memisahkan sel mani berukuran kecil yang diduga berkromosom Y hingga 99%. Hasil ini berbeda nyata dengan kontrol ($p<0,05$). Temuan yang pernah dilaporkan bahwa dengan teknik Swim up saja pada semen domba setelah IB diperoleh kelahiran anak jantan hingga 100% (Mirajuddin, 1998).

# BAB 6

## KESIMPULAN DAN SARAN

1. Motilitas sel mani sapi Madura tertinggi yang didapat setelah perlakuan sephadex G-200 dan dari semua perlakuan berbeda nyata dengan kontrol.
2. Rataan ukuran kepala sel mani sapi Madura adalah 40,6 μm, dengan perbandingan proporsional sel mani diduga berkromosom X 45% dan Y 55%.
3. Teknik separasi paling efektif untuk memisahkan sel mani diduga berkromosom X adalah percoll 2 gradient collum yaitu 82% dan teknik paling efektif untuk memisahkan sel mani berkromosom Y adalah campuran teknik swim-up dengan aside migration yaitu 99%

## DAFTAR PUSTAKA


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. 1979. Succesfull Separation of X and Y Spermatozoa in Human and Bull semen. International Journal of Fertility 22 : 30 – 35.

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.

Dominko, T and N.L. First, 1996. Relationship between The Maturational State of Oocytes at The Time of Inseminations and Sex Ratio of Subsequent Early Bovine Embryos. Theriogenology 47 : 1041-1050.

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.

Gawecka-Szezygiel, 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. 6 th. Ed. E.S.E. Hafez (Editor). Lea & Febiger. Philadelphia. p: 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.

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.

King, W.A., B.R. Yadav, K.P. Xu, L. Picard, M.A. Sirard, A. Verini-Supplizi, K.J. Betteridge. 1991. The Sex ration of Bovine embryos produced in vivo and in vitro. Theriogenology 36 : 779 – 788.

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. Wurlina, T.D. Sulistiyati and S. Mulyati. Pemisahan Spermatozoa Domba dengan Spehadex Collumn G-200. Media Kedokteran Hewan Vol. 5 No.1. 1989.

Mahaputra, L., Hinting, A., Hermadi, H..A., Mustofa, I., Utama, S. dan Pudjisrianto. 1997. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya, Dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi. Ditjen Dikti Depdikbud. PHB II/4.

Mirajuddin, 1998. Pengaruh Preparasi Sperma dengan Metode Sentrifugasi Gradient Densitas Kolom Percoll dan Swim Up Terhadap Kualitas Spermatozoa dan Angka Konsepsi pada Kambing Peranakan Ettawa (PE). Tesis Program Pasca Sarjana Unair. Surabaya.

Nomura, M, C. Sumantri and T. Suzuki, 1997. The Effect of Sperm Pre-incubation Times on The Develomental Rate and Sexing of Bovine Embryo. 4 th International Meeting on Biotechnology in Animal Reproduction, Bogor, Indonesia, August 6-9, 1997.

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.

Phillips,H., T. Hilton, 1992. Ingin anak laki-laki atau perempuan. Sari Kesehatan Populer. Arcan, Jakarta Copyright.

Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E. dan Ohama, K. 1997. Assesment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. Human Reproduction 12 : 2437 – 2442.

Schwerin, M., Blottner, S., Thomson, 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.

Soeminto, A. Kumiasih and S. Muniroh, 1997. Fertility Rate and Fry Sex in Cyprinidis in Different pH Fertilization Medium. 4 th International Meeting on Biotechnology in Animal Reproduction, Bogor, Indonesia, August 6-9, 1997.

Steel, G.D. dan J.H. Torrie, 1989. Prinsip dan prosedur statistika, suatu pendekatan biometrik. Alih bahasa Ir. Bambang Sumantri, Penerbit PT. Gramedia Jakarta. Hal 260-263.

Thibier, M. and M. Nibart., 1995. The Sexing of Embryos in The Field. Theriogenology 43 : 71-80.

Utsumi, K., Hayashi, M., Takakura, R., Utaka, K. dan Iritani, A. 1993. Embryo sez selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and development 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.

Windsor, D.P., G. Evans and I.G. White., 1993. Sex Predetermination by Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm : A Riview. Reprod. Fertil. Dev. 5:155-171.

Yanamigachi, 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

ampiran 1. Kontrol

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motilitas | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1. | 76 | 45 | 28 | - | 27 | 35 | 10 | 40,99 | 55 | 45 |
| 2. | 80 | 50 | 18 | 2 | 24 | 46 | 10 | 41,89 | 44 | 56 |
| 3. | 81 | 40 | 19 | 2 | 34 | 40 | 5 | 41,09 | 55 | 45 |
| 4. | 85 | 45 | 10 | - | 42 | 37 | 11 | 41,97 | 52 | 48 |
| 5. | 90 | 35 | 28 | - | 33 | 27 | 12 | 40,84 | 61 | 39 |
| 6. | 86 | 40 | 21 | 4 | 36 | 29 | 10 | 40,98 | 61 | 39 |
| 7. | 78 | 35 | 23 | 1 | 26 | 40 | 10 | 41,42 | 50 | 50 |
| 8. | 83 | 40 | 14 | 1 | 38 | 39 | 8 | 41,57 | 53 | 47 |
| 9. | 59 | 50 | 31 | 2 | 26 | 32 | 9 | 40,59 | 59 | 41 |
| 10. | 57 | 55 | 36 | 3 | 23 | 29 | 9 | 40,23 | 62 | 38 |
| x | 77,5 | 43,5 | | | | | | | 55,2 | 44,8 |
| Sd | 11,05 | 6,69 | | | | | | | 5,7 | 5,7 |

ampiran 2. Sephadex G-200 Tetes 20-30

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motil | 1,5x1,25 (33,08) | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1 | 57 | 40 | 2 | 8 | 5 | 9 | 73 | 5 | 43,65 | 22 | 78 |
| 2 | 59 | 40 | 2 | 10 | 5 | 9 | 68 | 8 | 43,30 | 24 | 76 |
| 3 | 73 | 65 | 1 | 12 | 2 | 12 | 67 | 7 | 43,11 | 26 | 74 |
| 4 | 80 | 75 | 2 | 15 | 5 | 10 | 58 | 12 | 43,37 | 30 | 70 |
| 5 | 89 | 80 | - | 10 | 3 | 10 | 58 | 19 | 43,65 | 23 | 77 |
| 6 | 83 | 75 | - | 9 | 2 | 9 | 70 | 10 | 43,35 | 20 | 80 |
| 7 | 87 | 70 | - | 19 | 4 | 9 | 57 | 11 | 42,40 | 32 | 68 |
| 8 | 69 | 60 | - | 9 | 1 | 21 | 58 | 11 | 42,93 | 31 | 69 |
| 9 | 75 | 70 | - | 7 | 1 | 8 | 65 | 19 | 42,12 | 16 | 84 |
| 10 | 62 | 50 | - | 8 | 2 | 22 | 58 | 10 | 42,86 | 32 | 68 |
| x | 73,4 | 62,5 | | | | | | | | 25,6 | 74,4 |
| Sd | 11,5 | 14,6 | | | | | | | | 5,5 | 5,5 |

ampiran 3. Sephadex G-200 Tetes 26-35

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motil | 1,5x1,25 (33,08) | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1 | 87 | 60 | 2 | 13 | 5 | 7 | 73 | - | 41,78 | 27 | 73 |
| 2 | 79 | 75 | 2 | 18 | 3 | 9 | 68 | - | 41,28 | 32 | 68 |
| 3 | 73 | 65 | 1 | 12 | 2 | 18 | 67 | - | 42,02 | 33 | 67 |
| 4 | 80 | 80 | 2 | 17 | 5 | 16 | 58 | - | 40,50 | 42 | 58 |
| 5 | 89 | 85 | - | 14 | 3 | 29 | 43 | 11 | 42,02 | 46 | 54 |
| 6 | 83 | 75 | - | 19 | 2 | 26 | 43 | 10 | 41,71 | 47 | 53 |
| 7 | 87 | 75 | - | 19 | 4 | 19 | 47 | 11 | 41,96 | 42 | 58 |
| 8 | 89 | 85 | - | 19 | 1 | 22 | 48 | 10 | 41,95 | 42 | 58 |
| 9 | 75 | 70 | - | 17 | 1 | 18 | 55 | 9 | 42,25 | 36 | 64 |
| 10 | 62 | 60 | - | 8 | 2 | 22 | 58 | 10 | 42,86 | 32 | 68 |
| x | 80,4 | 73,0 | | | | | | | | 37,9 | 62,1 |
| Sd | 8,6 | 9,2 | | | | | | | | | |

Lampiran 4. Percoll

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motilitas | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1. | 94 | 40 | 5 | 4 | 12 | 58 | 21 | 44,06 | 21 | 79 |
| 2. | 89 | 50 | 8 | 5 | 7 | 51 | 29 | 44,40 | 20 | 80 |
| 3. | 92 | 40 | 16 | - | 10 | 47 | 27 | 43,74 | 26 | 74 |
| 4. | 63 | 35 | 7 | - | 7 | 58 | 28 | 44,72 | 14 | 86 |
| 5. | 62 | 35 | 6 | 2 | 6 | 61 | 25 | 44,57 | 14 | 86 |
| 6. | 58 | 45 | 6 | - | 7 | 61 | 28 | 45,69 | 11 | 89 |
| 7. | 80 | 30 | 4 | - | 16 | 46 | 34 | 44,92 | 20 | 80 |
| 8. | 86 | 35 | - | - | 15 | 54 | 31 | 45,15 | 15 | 85 |
| 9. | 75 | 25 | 4 | 5 | 11 | 63 | 17 | 43,91 | 20 | 80 |
| 10. | 70 | 30 | 6 | 4 | 9 | 56 | 25 | 44,32 | 19 | 81 |
| x | 76,9 | 36,5 | | | | | | | 18,0 | 82,0 |
| Sd | 13,3 | 7,5 | | | | | | | 4,4 | 4,4 |

ampiran 5. Swim Up

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motilitas | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1. | 56 | 45 | 58 | 14 | 18 | 10 | - | 37,42 | 90 | 10 |
| 2. | 46 | 40 | 60 | 12 | 16 | 12 | - | 37,44 | 88 | 12 |
| 3. | 42 | 40 | 64 | 12 | 14 | 10 | - | 37,18 | 90 | 10 |
| 4. | 38 | 30 | 60 | 4 | 23 | 13 | - | 37,57 | 87 | 13 |
| 5. | 54 | 45 | 54 | 4 | 34 | 8 | - | 37,62 | 92 | 8 |
| 6. | 60 | 50 | 59 | 4 | 29 | 8 | - | 37,40 | 92 | 8 |
| 7. | 51 | 40 | 58 | 8 | 25 | 9 | - | 37,44 | 91 | 9 |
| 8. | 53 | 35 | 59 | 9 | 27 | 8 | - | 38,53 | 92 | 8 |
| 9. | 74 | 40 | 71 | 3 | 14 | 12 | - | 37,06 | 88 | 12 |
| 10. | 58 | 35 | 51 | 9 | 29 | 9 | 2 | 37,94 | 89 | 11 |
| x | 53,2 | 40,4 | | | | | | | 89,9 | 10,1 |
| Sd | 10,1 | 5,8 | | | | | | | 1,9 | 1,9 |

.ampiran 6. Aside Migration

Perbandingan Hidup, Motilitas dan Ukuran Kepala (p x l) Sel Mani Sapi Madura

| No. | Σ Sel Mani | | Ukuran Kepala | | | | | x µm | <x % | ≥x % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hidup | Motilitas | 2 x 1 (35,28) | 1,75x1,25 (38,33) | 2,25x1 (39,69) | 2x1,25 (44,1) | 2,25x1,25 (49,61) | | | |
| 1. | 35 | 25 | 9 | 32 | 8 | 16 | 35 | 39,12 | 65 | 35 |
| 2. | 37 | 35 | 3 | 36 | 3 | 10 | 48 | 39,98 | 52 | 48 |
| 3. | 44 | 40 | 5 | 41 | 5 | 18 | 31 | 38,85 | 69 | 31 |
| 4. | 46 | 40 | 4 | 38 | 6 | 15 | 36 | 38,86 | 64 | 36 |
| 5. | 34 | 30 | 4 | 32 | 3 | 14 | 47 | 40,05 | 53 | 47 |
| 6. | 55 | 45 | 3 | 39 | 5 | 21 | 32 | 39,12 | 68 | 32 |
| 7. | 64 | 45 | 1 | 43 | 7 | 12 | 37 | 39,26 | 63 | 37 |
| 8. | 52 | 40 | 5 | 38 | 10 | 18 | 29 | 38,83 | 71 | 29 |
| 9. | 53 | 45 | 4 | 35 | 12 | 17 | 32 | 39,13 | 68 | 32 |
| 10. | 50 | 40 | 3 | 39 | 10 | 15 | 33 | 39,09 | 67 | 33 |
| x | 76,9 | 36,5 | | | | | | | 18,0 | 82,0 |
| Sd | 13,3 | 7,5 | | | | | | | 4,4 | 4,4 |

Lampiran 7. Perbandingan Motilitas Sel Mani

---------- DESCRIPTIVE STATISTICS ----------

HEADER DATA FOR: B: SELMANI LABEL : Ktl,Spx,Pcl,Sup,S-Mig
NUMBER OF CASES: 200 NUMBER OF VARIABLES: 5

Perbandingan Motilitas Kontrol Vs Perlakuan

| NAME | N | MEAN | STD. DEV. |
|---|---|---|---|
| Ktl | 200 | 43.5 | 6.69 |
| Spx | 200 | 62.5 | 14.7 |
| Pcl | 200 | 36.5 | 7.5 |
| Sup | 200 | 40.0 | 5.8 |
| S-Mig | 200 | 33.9 | 8.6 |

Lampiran 8. Perbandingan Daya Hidup Sel Mani

---------- DESCRIPTIVE STATISTICS ----------

HEADER DATA FOR: B: SELMANI LABEL : Ktl,Spx,Pcl,Sup,S-Mig
NUMBER OF CESES: 200 NUMBER OF VARIABLES: 5

Perbandingan Daya Hidup Kontrol Vs Perlakuan

| NAME | N | MEAN | STD.DEV. |
|---|---|---|---|
| Ktl | 200 | 77.5 | 11.05 |
| Spx | 200 | 73.4 | 11.5 |
| Pcl | 200 | 76.9 | 13.3 |
| Sup | 200 | 50.2 | 10.1 |
| S-Mig | 200 | 54.7 | 8.9 |

Lampiran 9. Uji Chi - Square Proporsi Perbandingan Sel Mani Diduga Berkromosom X dan Y Kontrol dengan Sephadex

---------- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS ----------
Kontrol Vs Sephadex

OBSERVED FREQUENCIES

| | 1 | 2 | TOTAL |
|---|---|---|---|
| 1 | 55 | 45 | 100 |
| 2 | 26 | 74 | 100 |
| TOTAL | 81 | 119 | 200 |

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 16.267,

PROB.= 5.501E-05

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 17.450,

PROB.= 2.950E-05

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail =1.0000, Upper Tail = 2.413E-05

Lampiran 10. Uji Chi - Square Proporsi Perbandingan Sel Mani Diduga Berkromosom X dan Y Kontrol dengan Percoll

---------- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS ----------
Kontrol vs Percoll

OBSERVED FREQUENCIES

| | 1 | 2 | TOTAL |
|---|---|---|---|
| 1 | 55 | 45 | 100 |
| 2 | 18 | 82 | 100 |
| TOTAL | 73 | 127 | 200 |

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 27.958, PROB.= 1.240E-07

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 29.533,

PROB.= 5.505E-08

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail =1.0000, Upper Tail = 4.227E-06

Lampiran 11. Uji Chi - Square Proporsi Perbandingan Sel Mani Diduga Berkromosom X dan Y Kontrol dengan Swim up

---------- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS ----------
Kontrol vs Swim up

OBSERVED FREQUENCIES

| | 1 | 2 | TOTAL |
|---|---|---|---|
| 1 | 55 | 45 | 100 |
| 2 | 90 | 10 | 100 |
| TOTAL | 145 | 55 | 200 |

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 28.991,

PROB.= 7.281E-08

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 30.721,

PROB.= 2.987E-08

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail = 1.582E-08, Upper Tail =1.0000

Lampiran 12. Uji Chi - Square Proporsi Perbandingan Sel Mani Diduga Berkromosom X dan Y Kontrol dengan Swim up + Migration (S-Mig)

---------- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS ----------
Kontrol Vs S-Mig

OBSERVED FREQUENCIES

| | 1 | 2 | TOTAL |
|---|---|---|---|
| 1 | 55 | 45 | 100 |
| 2 | 99 | 1 | 100 |
| TOTAL | 154 | 46 | 200 |

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 52.202,

PROB.= 7.546E-11

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 54.658,

PROB.= 7.544E-11

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail = 1.341E-15, Upper Tail =1.0000

Lampiran 13. Uji Chi - Square Proporsi Perbandingan Sel Mani Diduga Berkromosom X dan Y Kontrol dengan Perlakuan

---------- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS ----------
Kontrol vs Perlakuan

OBSERVED FREQUENCIES

| | | 1 | 2 | TOTAL |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 55 | 45 | 100 |
| | 2 | 26 | 74 | 100 |
| | 3 | 18 | 82 | 100 |
| | 4 | 90 | 10 | 100 |
| | 5 | 99 | 1 | 100 |
| TOTAL | | 288 | 212 | 500 |

CHI-SQUARE =218.537, D.F.= 4, PROB. = 1.420E-12