

# SKRIPSI

## PEMISAHAN SPERMATOZOA BERKROMOSOM SEKS X DAN Y PADA SAPI MADURA DENGAN SEPHADEX G-200 DAN MIGRASI KEATAS



OLEH :

*EKO HARYANTO PASKALIS*

BANYUWANGI - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
1999**

**PEMISAHAN SPERMATOZOA BERKROMOSOM SEKS X DAN Y  
PADA SAPI MADURA DENGAN SEPHADEX G-200  
DAN MIGRASI KEATAS**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

Eko Haryanto Paskalis

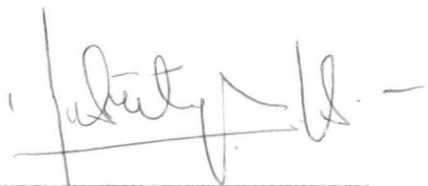
NIM 069311980

Menyetujui,

Komisi Pembimbing,



Dr. Laba Mahaputra, M.Sc., drh  
Pembimbing Pertama



Prof. Dr. Ir. Hj. Kusningrum, M.S  
Pembimbing Kedua

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

Menyetujui,

Panitia Penguji,



Imam Mustofa, M.Kes., drh  
Ketua



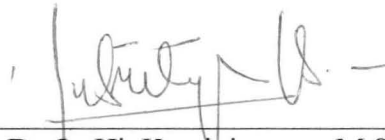
Prof. Dr. Soehartojo H., M.Sc  
Sekretaris



Widjiati, M.Si., drh  
Anggota

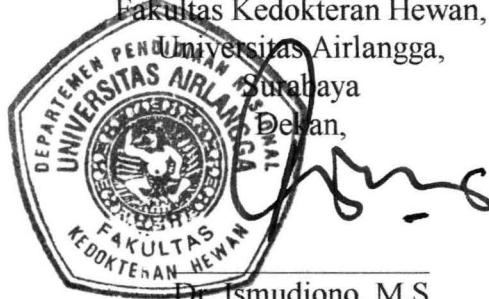


Dr. Laba Mahaputra, M.Sc., drh  
Anggota



Prof. Dr. Ir. Hj. Kusningrum, M.S  
Anggota

Surabaya, 5 Maret 1999  
Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Airlangga,  
Surabaya  
Dekan,



Dr. Ismudiono, M.S  
NIP. 130687297

**PEMISAHAN SPERMATOZOA BERKROMOSOM SEKS X DAN Y  
PADA SAPI MADURA DENGAN SEPHADEX G-200  
DAN MIGRASI KEATAS**

Eko Haryanto Paskalis

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan persentase spermatozoa motil dan hidup serta persentase spermatozoa berkromosom seks X dan Y setelah perlakuan kontrol, filtrasi dengan sephadex G-200 dan perlakuan migrasi keatas (*swim-up*).

Bahan utama penelitian berupa 18 straw mani beku sapi Madura yang diperoleh dari Laboratorium Kebidanan Veteriner Universitas Airlangga Surabaya, yang diproduksi oleh BIB (Balai Inseminasi Buatan) Singosari Malang. Bahan pemisah spermatozoa yaitu sephadex G-200 dan media Earle's. Pengamatan spermatozoa motil dilakukan dengan penetesan sperma setelah thawing diatas obyek glass dan diperiksa di bawah mikroskop. Penghitungan persentase spermatozoa hidup dilakukan dengan membuat preparat ulas memakai zat warna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna (jernih). Untuk identifikasi spermatozoa berkromosom seks X dan Y didasarkan atas dasar kepala (panjang x lebar) spermatozoa, jika dari keseluruhan pengukuran didapatkan besar kepala lebih besar atau sama dengan rata-rata diklasifikasikan spermatozoa berkromosom seks X dan yang lebih kecil dari rata-rata adalah spermatozoa berkromosom Y. Rancangan penelitian menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Data dianalisis dengan uji-F. Apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf sigifikasi 5% untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan persentase spermatozoa motil dan hidup diantara perlakuan (kontrol, filtrasi dengan sephadex G-200 dan migrasi keatas). Persentase spermatozoa motil dan hidup pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbanyak (65% untuk motilitas spermatozoa dan spermatozoa hidup sebesar 69,67%). Persentase jumlah terkumpulnya spermatozoa berkromosom seks X pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbanyak 79,83% dan persentase jumlah terkumpulnya spermatozoa berkromosom seks Y didapatkan terbanyak pada perlakuan migrasi keatas (*swim-up*) 62,17%.

## KATA PENGANTAR

Pujian dan syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala kasih dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dalam waktu yang diharapkan.

Rasa terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak Dr. Laha Mahaputra, M.Sc., drh selaku pembimbing pertama dan Ibu Prof. Dr. Ir. Hj. Kusriningrum, M.S selaku pembimbing kedua atas segala bantuan yang diberikan baik berupa sarana pendukung penelitian maupun atas bimbingan penulisan sejak awal penelitian sampai disusunnya hasil penelitian ini.

Demikian pula penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada Dekan dan Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bekal ilmu yang diberikan.

Ungkapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Staf Laboratorium Kebidanan Veteriner Universitas Airlangga Surabaya atas segala saran dan bantuannya selama penelitian berlangsung. Untuk Ayah-Ibu serta saudara-saudara penulis di rumah, dik Sri terima kasih atas dukungan, segenap cinta dan doanya selama ini serta kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa memberikan kedamaian di dalam hati kita. Akhirnya penulis sadar bahwa penelitian ini jauh dari sempurna untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Surabaya , 5 Maret 1999

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	ix
<b>BAB.I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	4
1.3. Hipotesis Penelitian.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Sapi Madura.....	6
2.2. Mani Beku.....	7
2.3. Tinjauan tentang Spermatozoa.....	8
2.3.1. Air Mani Sapi.....	8
2.3.2. Proses Spermatogenesis.....	9
2.3.3. Kromosom Seks.....	10
2.3.4. Perbedaan Kromosom Seks X dan Y Spermatozoa dan Usaha Pemisahannya.....	12
2.4. Tinjauan tentang Sephadex.....	14

<b>BAB III. MATERI DAN METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2. Materi Penelitian.....	17
3.3. Metoda Penelitian.....	18
3.4. Pelaksanaan Penelitian.....	18
3.5. Pengamatan Penelitian.....	21
3.6. Analisis Data.....	21
<b>BAB IV. HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>22</b>
4.1. Motilitas Spermatozoa.....	22
4.2. Sel Spermatozoa yang Hidup.....	23
4.3. Spermatozoa Berkromosom Seks X dan Y.....	24
<b>BAB V. PEMBAHASAN.....</b>	<b>27</b>
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>33</b>
6.1. Kesimpulan.....	33
6.2. Saran.....	33
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>34</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>40</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Perbedaan kromosom seks spermatozoa.....	14
2. Rata-rata jumlah sel spermatozoa motil.....	22
3. Rata-rata jumlah sel spermatozoa hidup.....	23
4. Rata - rata jumlah sel spermatozoa berkromosom seks X dan Y.....	25

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia parsial sephadex.....	15
2. Skema yang menunjukkan bagaimana partikel terpisah pada saat dilewatkan sephadex.....	16
3. Grafik persentase sel spermatozoa motil.....	22
4. Grafik persentase sel spermatozoa hidup.....	24
5. Grafik persentase sel spermatozoa berkromosom seks X dan Y.	25

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pengamatan rata-rata jumlah sel spermatozoa motil pada berbagai perlakuan.....	40
2. Hasil pengamatan rata-rata jumlah sel spermatozoa hidup pada berbagai perlakuan.....	42
3. Hasil pengamatan rata-rata jumlah sel spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200, migrasi keatas ( <i>swim-up</i> ) dan perlakuan kontrol.....	44
4. <i>Thawing</i> (pencairan) semen beku sapi madura.....	48
5. Sentrifugasi semen untuk perlakuan Migrasi keatas.....	48
6. Penampungan spermatozoa pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200.....	49
7. Pemeriksaan motilitas spermatozoa.....	49
8. Penghitungan jumlah spermatozoa hidup dan mati serta pengukuran (panjang dan lebar) kepala spermatozoa.....	50

**BAB I****PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang Permasalahan**

Pembangunan peternakan adalah merupakan bagian yang tak terpisahkan dari pembangunan pertanian dan pembangunan nasional pada umumnya dalam mewujudkan masyarakat yang adil dan makmur.

Salah satu tujuan pembangunan peternakan adalah peningkatan produksi peternakan untuk memenuhi konsumsi dan gizi masyarakat melalui pembinaan produksi ternak.

Produksi dan populasi ternak di Indonesia terus meningkat sejalan dengan usaha yang telah diterapkan oleh pemerintah bukan saja untuk memperbaiki tarap hidup petani dan masyarakat pada umumnya tetapi ini juga dalam rangka mengantisipasi era globalisasi ekonomi pada tahun 2003 agar seluruh aspek ekonomi terutama sub sektor peternakan mampu bersaing dengan negara-negara lain (Putu dkk., 1997).

Salah satu usaha nyata yang dilakukan pemerintah dewasa ini adalah program inseminasi buatan yang penggalakannya sudah dikenal luas oleh masyarakat terutama di pedesaan. Program ini telah terbukti manfaatnya untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak lokal dimana keturunannya menjadi unggul karena hasil persilangan dengan bibit unggul dari luar negeri. Namun program inseminasi buatan ini belum mampu memenuhi keinginan dari peternak yang menginginkan jenis kelamin tertentu dari ternaknya, dimana peternak sapi

potong menginginkan jenis kelamin jantan dari persilangan ternaknya begitu sebaliknya peternak sapi perah menginginkan anak sapi betina.

Bioteknologi reproduksi telah berhasil memenuhi keinginan dari peternak yaitu dengan ditemukannya cara-cara pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y, sehingga bila yang diambil spermatozoa berkromosom seks X dan diinseminasikan pada betina yang sedang ovulasi dapat diharapkan keturunan yang diperoleh akan betina.

Pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y adalah salah satu bioteknologi molekuler yang dikembangkan di dunia selama lebih dari 60 tahun pada manusia. Teknik-teknik pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y yang dikembangkan antara lain teknik elektroforesis, sedimentasi maupun filtrasi dengan sephadex. Dalam perkembangannya teknik pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada hewan banyak mengacu teori atau teknik pada manusia.

Teknik filtrasi spermatozoa berkromosom seks X dan Y dengan sephadex merupakan salah satu teknik yang banyak dilakukan baik pada manusia maupun pada hewan. Pada manusia teknik filtrasi dengan sephadex terhadap spermatozoa berkromosom seks X dan Y telah menghasilkan bayi perempuan (Adimoelya, 1974-1975). Pada domba filtrasi dengan sephadex colum G-200 menunjukkan hasil 87% spermatozoa berkromosom seks X didapatkan pada filtrat (Mahaputra dkk., 1989).

Pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y dengan sephadex dilandasi oleh suatu teori bahwa sephadex mempunyai kemampuan untuk

melepaskan molekul yang lebih besar dulu dan menahan molekul yang lebih kecil, sehingga teori inilah yang dijadikan landasan dalam pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y mengingat adanya perbedaan besarnya ukuran pada spermatozoa berkromosom seks X dan Y.

Metode lain yang juga dilandasi teori adanya perbedaan ukuran spermatozoa berkromosom seks X dan Y adalah metode migrasi keatas. Metode ini didasarkan atas kemampuan dari spermatozoa yang mempunyai ukuran lebih kecil untuk bergerak lebih cepat dibanding spermatozoa yang mempunyai ukuran lebih besar. Telah diketahui oleh para ilmuwan bahwa adanya chromatin pada sel spermatozoa berkromosom seks X yang lebih banyak dari sel spermatozoa seks kromosom Y mengakibatkan kepala sel spermatozoa berkromosom seks X cenderung lebih besar dari sel spermatozoa berkromosom seks Y. Pada sapi tidak banyak dilaporkan mengenai kedua teknik ini, sehingga sampai saat ini dunia peternakan sapi perah yang mengharapkan anak sapi betina masih merupakan hambatan yang belum terpecahkan (Mahaputra dkk., 1989).

## 1.2. Perumusan Masalah

Beberapa masalah yang diungkapkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah penggunaan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas (*swim-up*) dapat digunakan untuk memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada sapi Madura ?
2. Apakah ada perbedaan persentase jumlah terkumpulnya spermatozoa sapi Madura berkromosom seks X dan Y antara teknik penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas ?
3. Apakah ada perbedaan persentase jumlah terkumpulnya spermatozoa sapi Madura hidup dan motil antara teknik penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas ?

## 1.3. Hipotesis Penelitian

Dalam penelitian ini diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Sephadex G-200 dan metode migrasi keatas dapat digunakan untuk memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada sapi Madura.
2. Terdapat perbedaan persentase jumlah spermatozoa berkromosom seks X dan Y antara pemisahan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas.
3. Terdapat perbedaan persentase jumlah sel spermatozoa hidup dan motil antara penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y sapi Madura antara teknik penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas.
2. Mengetahui persentase jumlah terkumpulnya spermatozoa sapi Madura yang berkromosom seks X dan Y setelah penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas.
3. Mengetahui perbandingan jumlah terkumpulnya spermatozoa sapi Madura yang hidup dan motil antara penyaringan dengan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang bisa diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai teknik pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y menggunakan sephadex G-200 dan metode migrasi keatas pada spermatozoa sapi Madura.
2. Pengembangan inseminasi buatan yang menguntungkan secara ekonomis pada sapi.
3. Salah satu cara pemecahan masalah tentang pemilihan jenis kelamin anak.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Sapi Madura

Bangsa sapi ini merupakan sapi potong Indonesia yang diduga sebagai hasil persilangan antara Banteng yang waktu itu masih liar dengan Zebu dan sapi-sapi lokal yang sering disebut type Shorthorn karena bulunya yang berwarna merah. Persilangan tersebut sudah berlangsung berabad-abad yang diikuti dengan isolasi yang relatif lama dan disertai dengan seleksi yang ketat menghasilkan sapi yang sudah agak homogen (Huitema, 1986).

Sapi Madura berbentuk sedang, bertulang bagus dan berotot terutama pada sapi-sapi jantan kerapan, kaki dan teracaknya cukup kuat sebagai sapi tarik, bahkan dijalanan aspal sekalipun. Pengaruh Banteng masih terlihat pada warna bulunya yang merah terang dengan bagian-bagian putih yang tidak begitu jelas peralihannya, atau warna yang terang pada bagian-bagian tubuh seperti kaki bawah, bawah perut dan disekitar pantatnya.

Pengaruh Zebu masih jelas tampak pada bentuk tanduk, punuk dan gelambir yang tidak terlalu besar pada sapi jantannya dan warna gelap disekitar bahu dan leher.

Sapi betina biasanya digunakan sebagai tenaga tarik disawah dan sebagai penghasil anak, sedang jantannya selain diseleksi untuk pacuan (kerapan) dan hewan potong, juga dalam jumlah kecil dikerjakan sebagai hewan tarik dijalan

raya. Sapi Madura tidak begitu besar, jantan dewasa beratnya 300kg-350kg, sedang betinanya 200kg - 250kg(Surjoatmodjo, 1992).

## 2.2 Mani Beku

Mani beku memiliki pengertian sebagai mani yang disimpan pada suhu dibawah titik beku antara (-79 °C sampai -196 °C) yang sebelumnya telah diencerkan menurut prosedur biasa (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994). Menurut Hardijanto dan Hardjopranto (1994) mani beku mempunyai beberapa keuntungan dan kerugian. Keuntungan mani beku adalah: memungkinkan semen dapat disimpan lama dan dengan daya membuahi yang tetap baik, dengan demikian mani beku masih dapat dipakai untuk inseminasi setelah disimpan bertahun-tahun, walaupun kadang-kadang pejantan yang mempunyai semen itu sudah mati; mani beku dapat dikirim kenegara-negara diseluruh dunia dengan jarak pengiriman yang jauh dan waktu pengiriman yang lama dengan biaya relatif rendah; mani beku dapat mencegah penyakit kelamin menular pada hewan betina karena pendinginan yang rendah menghambat pertumbuhan kuman; memungkinkan penggunaan yang efisien sepanjang tahun dari semen pejantan unggul yang terluka kakinya atau lumpuh. Adapun kerugiannya adalah: pemakaian semen beku secara besar-besaran akan membatasi jumlah pejantan yang dipakai dan mungkin mempersempit dasar genetik suatu bangsa tertentu; pada proses pembekuan semen sebagian dari sel spermatozoa akan mengalami kematian (20 - 80% dengan rata-rata 40%) sehingga sel-sel kelamin jantan tersebut perlu dipertinggi untuk setiap dosis Inseminasi Buatan ; semen dari

beberapa pejantan (10 - 20%) tidak tahan terhadap pembekuan; dan jika pemeliharaan dan pemeriksaan pejantan yang tidak baik pada pusat IB, dapat mengakibatkan mani beku mempunyai potensi besar dalam menyebarkan penyakit viral dan bakterial.

Problema fertilisasi dengan semen beku pada pusat Inseminasi buatan yang terurus baik terletak pada perlakuan semen yang tidak wajar. Permukaan nitrogen cair dalam *container depot* tidak boleh dibiarkan terlalu menurun, harus selalu berisi. Sewaktu mengambil ampul atau *straw*, *canister* ditarik keatas tetapi tidak boleh keluar melewati mulut *container*, pengambilan dilakukan segera dan *canister* segera pula dimasukkan kedalam nitrogen cair. Jumlah dan lama pengeluaran harus semaksimal mungkin. Setiap kali hanya satu ampul atau *staw* yang dicairkan kembali. Ampul atau *straw* yang telah dikeluarkan dari cairan *thawing* dikeringkan dengan handuk bersih. Pada waktu tertentu perlu diperiksa kualitas semen sesudah *thawing* dengan mengevaluasi motilitasnya pada suhu tubuh (Toelihere, 1979)

## **2.3. Tinjauan tentang Spermatozoa**

### **2.3.1. Air Mani Sapi**

Sel-sel spermatozoa dihasilkan oleh tubulus seminiferus di dalam testis. Sel tersebut berkembang dari sel epitel germinatif yang tersusun di permukaan dalam dinding tubulus seminiferus yang berkembang dengan jalan pembelahan (Hardijanto dan Harjopranto, 1990). Sel spermatozoa akan disimpan untuk sementara dalam epididimis, di sini sel spermatozoa akan mengalami

pendewasaan lebih lanjut. Pada waktu ejakulasi sel spermatozoa akan bergerak ke depan sebagai akibat adanya kontraksi ritmis dari semua saluran alat kelamin jantan, bersamaan dengan itu kelenjar aksesoris mengeluarkan cairan-cairannya sehingga sel spermatozoa bersama-sama aksesoris membentuk air mani (semen).

Air mani dari suatu spesies hewan mempunyai perbedaan dalam sifat-sifatnya dengan spesies lain. Pada ternak babi dan kuda, air mani dalam satu kali ejakulasi mempunyai volume yang besar, sehingga air maninya sangat encer. Sedangkan pada sapi dan domba, volume air maninya sedikit karena kelenjar aksesoris mengeluarkan cairan dalam jumlah yang rendah (Hardjopranto, 1995).

### **2.3.2. Proses Spermatogenesis**

Spermatogenesis adalah proses pembentukan sel spermatozoa, yang terdiri dari dua fase. Fase pertama adalah fase pertumbuhan jaringan spermatogenik dengan pembelahan mitosis, kemudian diikuti oleh pembelahan reduksi (meiosis), pada pembelahan reduksi ini jumlah kromosom dibagi dua sama banyak yaitu dari diploid ( $2n$ ) menjadi haploid ( $1n$ ). Pada sapi pembelahan reduksi akan membagi jumlah kromosom dari 60 menjadi 30, kemudian diikuti oleh pembagian sel secara mitosis yang lain. Fase ini dikenal dengan nama spermatositogenesis yang diakhiri dengan terbentuknya spermatid. Sedangkan fase kedua adalah lanjutan dari proses spermatogenesis, dimana spermatid mengalami metamorfosa sehingga menyebabkan terbentuknya sel mani secara sempurna, fase ini disebut spermiogenesis (Hardjopranto, 1995).

### 2.3.3. Kromosom Seks

Jenis kelamin pada mamalia ditentukan oleh susunan genetik pada individu tersebut yang terbentuk pada waktu fertilisasi. Pada waktu pembelahan meiosis pada proses spermatogenesis, gen-gen yang menentukan sifat-sifat genetik yang terdapat di dalam kromosom terbagi secara acak di antara spermatozoa. Pada waktu pembuahan, ovum dan spermatozoa yang masing-masing dengan bentuk haploid (setengah jumlah kromosom) saling melebur dan terjadilah zigot (ovum yang telah mengalami fertilisasi) dengan jumlah kromosom yang lengkap (Hardijanto, 1994). Embrio dengan kromosom XX akan menjadi betina dan embrio dengan kromosom XY menjadi jantan (Frandsen, 1992). Berarti pada sapi yang memiliki 30 pasang kromosom, sepasang kromosom yang menentukan jenis kelamin disebut kromosom seks, sisanya 29 pasang disebut autosom (Salisbury and Vandemark, 1985).

Menurut Salisbury *et al.* (1985), hewan jantan memiliki satu kromosom kelamin (kromosom seks) yang lebih besar dari yang lain. Kromosom yang lebih besar adalah spermatozoa berkromosom seks X, yang lebih kecil adalah spermatozoa berkromosom seks Y. Hal tersebut secara morfologi tampak pada bentuk dan ukuran kepala spermatozoa yang berbeda. Pada spermatozoa berkromosom seks X ukuran kepalanya lebih besar karena kandungan DNA (*Deokxyribonucleicacid*) lebih banyak. Sedangkan pada spermatozoa berkromosom seks Y kandungan DNA lebih sedikit sehingga ukuran kepalanya kecil (Hafez, 1987). Ukuran panjang kali lebar kepala spermatozoa berkisar antara 32-45 mikron (Toilihere, 1981). Pada sapi ukuran kepala spermatozoa

berkromosom seks X adalah  $>36,5$  mikrometer dan spermatozoa berkromosom seks Y  $\leq 36,5$  mikrometer (Trinil dkk., 1994). Sedangkan pada domba ukuran kepala spermatozoa berkromosom seks X adalah  $>50$  mikrometer dan spermatozoa berkromosom seks Y  $\leq 50$  mikrometer (Mahaputra dkk., 1989).

Pada saat fertilisasi spermatozoa yang mengandung kromosom seks X dan Y mempunyai peluang yang sama untuk membuahi kromosom dari ovum (rasio kromosom seks X dan Y spermatozoa adalah 1:1). Pada domba rasio kromosom seks X dan Y spermatozoa yaitu 49,3% untuk sel spermatozoa yang mempunyai ukuran kepala ( $p \times l$ )  $\leq 50$  mikrometer (spermatozoa berkromosom seks Y) dan 54,7% untuk spermatozoa berkromosom seks X dengan ukuran kepala  $>50$  mikrometer (Mahaputra dkk., 1989). Rasio spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada sapi Fries Holland adalah 52% sel spermatozoa berukuran kepala  $>36,5$  mikrometer (spermatozoa berkromosom seks X) dan 48% sel spermatozoa berukuran kepala  $<36,5$  mikrometer yang merupakan spermatozoa berkromosom seks Y (Nurul, 1994). Bila spermatozoa yang mempunyai kromosom seks X membuahi ovum, akan menghasilkan anak betina (kromosom seks XX). Bila spermatozoa yang mempunyai kromosom seks Y membuahi ovum, akan menghasilkan anak jantan dengan kromosom seks XY (Salisbury and Vandemark, 1985). Sebaliknya pada unggas kromosom seks X terdapat pada hewan jantan dan kromosom seks Y terdapat pada hewan betina (Toilihere, 1981).

### **2.3.4. Perbedaan Kromosom Seks X dan Y Spermatozoa dan Usaha Pemisahannya.**

Pejantan pada mamalia menentukan terjadinya generasi betina atau jantan anak yang dilahirkan. Hal ini sesuai dengan perbandingan jumlah sel spermatozoa berkromosom seks X dan sel spermatozoa berkromosom seks Y yang dimiliki oleh pejantan (Mahaputra dkk., 1989). Dalam penentuan jenis kelamin anak maka usaha pemisahan sel spermatozoa berkromosom seks X dan Y harus dilandasi dengan pengetahuan tentang perbedaan antara kromosom seks spermatozoa. Pada hewan jantan memiliki satu kromosom kelamin (kromosom seks) yang lebih besar dari yang lain. Kromosom yang lebih besar adalah kromosom X, yang lebih kecil adalah kromosom Y. Perbedaan tersebut secara morfologis tampak pada bentuk dan ukuran kepala spermatozoa (Salisbury and Vandemark, 1985). Pada kromosom X ukuran kepala spermatozoa lebih besar karena kandungan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) lebih banyak dibanding kromosom seks Y yang lebih kecil (Hafez, 1987). Menurut Bhattacharya (1966) spermatozoa kromosom seks X mengandung kromatin yang lebih banyak di kepalanya sehingga ukurannya lebih besar dibanding kromosom seks Y yang lebih kecil. Hal ini diperkuat oleh Frandson *et al.* (1992) yang mengatakan bahwa kromatin kelamin ditemukan pada 60-80% nuclei somatik betina dan tidak lebih dari 10% pada nuklei somatik jantan. Dalam perbedaan kromosom seks pada spermatozoa dapat ditinjau dari beberapa aspek antara lain seperti tabel 1.

Perkembangan spermatologi dewasa ini, telah berhasil memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dari spermatozoa berkromosom seks Y. Pada

manusia telah berhasil dipisahkan spermatozoa berkromosom seks X dari spermatozoa berkromosom seks Y dengan teknik filtrasi dengan sephadex dan menghasilkan bayi perempuan pada manusia (Adimoelya, 1974-1975). Sedangkan pada hewan juga telah banyak dilakukan teknik pemisahan spermatozoa berkromosom X dan Y antara lain dengan lapisan suspensi Bovine serum albumin (Jaswandi, 1996), pemberian aliran listrik searah 1,5 volt (Junaedi, 1996), sentrifugasi dengan gradien densitas percoll (Isnaini, 1994) dan lain-lain. Mahaputra dkk (1989) telah berhasil memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y pada domba. Teknik ini didasarkan dari kemampuan sephadex untuk melepaskan molekul yang lebih besar dulu dan menahan molekul yang lebih kecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kepala sel spermatozoa yang berukuran  $>50$  mikrometer yang dicurigai spermatozoa berkromosom seks X dapat menembus sephadex lebih dulu dari pada sel spermatozoa yang mempunyai ukuran  $\leq 50$  mikrometer (kemungkinan spermatozoa berkromosom seks Y).

Cara lain pemisahan spermatozoa adalah dengan metode migrasi keatas. Teknik ini dilandasi oleh suatu teori bahwa spermatozoa yang mempunyai ukuran lebih kecil akan bergerak keatas lebih cepat dibanding spermatozoa yang mempunyai ukurannya lebih besar.



Tabel 1. Perbedaan Kromosom Seks Spermatozoa

Parameter	Perbedaan
Kandungan DNA	Lebih sedikit pada spermatozoa berkromosom Y
Ukuran	Spermatozoa berkromosom seks X lebih besar
Identifikasi	Spermatozoa berkromosom seks Y memancarkan <i>fluorescent</i>
Motilitas	Spermatozoa berkromosom seks Y lebih cepat
Tegangan permukaan	Spermatozoa berkromosom seks X bergerak ke arah Katoda
Kemotaksis*	Spermatozoa berkromosom seks X lebih tahan pada suasana asam

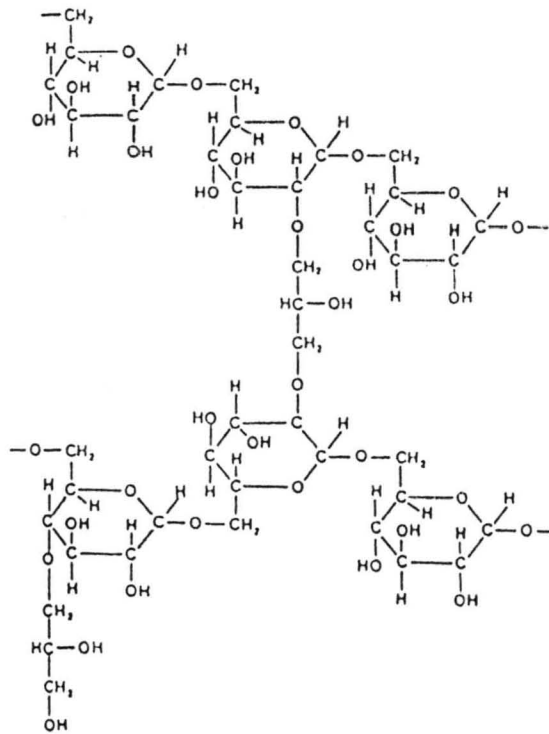
Sumber: Ericsson dan Glass (1982).

\* Mahaputra (1993).

AA Mahaputra, 1993, (1989)

#### 2.4. Tinjauan tentang Sephadex

Sephadex adalah gel yang berbentuk seperti embun crosslinking dextran dan epichlorohydrin. Struktur kimia partial dapat dilihat pada gambar 2. Banyak dari group hydroxylnya adalah gel yang hidrophilik. Sephadex akan mengembang dalam air dan larutan elektrolit juga dalam dimethylsuphoxide dan formamide. Derajat pengembangan dalam pelarut organik atau campurannya tidak akan sama seperti dilarutkan dalam air.



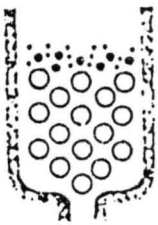
Gambar 1. Struktur Kimia Partial Sephadex

Sephadex tidak larut dalam semua pelarut. Sephadex stabil dalam air, larutan garam, pelarut organik, alkaline dan kurang stabil dalam larutan asam. Sedangkan dalam asam kuat sephadex akan terhidrolisa.

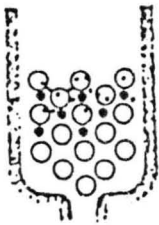
Sephadex tidak mencair dan dapat disterilisasi dengan sterilisasi basah pada PH netral atau sterilisasi kering dengan *autoclave* selama 30 menit pada suhu  $120^{\circ}\text{C}$ . Tetapi jika dipanaskan melebihi  $120^{\circ}\text{C}$  akan mengalami caramelisasi.

Mekanisme pemecahan dan pemisahan sephadex secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut : partikel yang mempunyai berat molekul lebih besar tidak dapat memasuki pori-pori sephadex gel, sehingga partikel tersebut

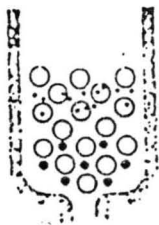
menerobos lewat ruang-ruang kosong yang berada disekitar sephadex gel. Partikel yang berat molekulnya lebih kecil akan turun lambat karena masih tersangkut pada pori-pori sephadex gel pada saat partikel yang lebih besar turun kebawah. Partikel yang mempunyai berat molekul yang lebih kecil ini akan dikeluarkan kemudian .



Larutan yang berbeda berat molekulnya dimasukkan kedalam permukaan sephadex column. Larutan ini ditunjukkan dengan gambar lingkaran yang lebih hitam, sedangkan lingkaran yang terbuka adalah sephadex.



Larutan ini kemudian turun, molekul yang lebih kecil dapat memasuki pori-pori sephadex gel dan akan dihambat, sedangkan molekul dengan ukuran lebih besar yang terletak di sela-sela partikel sephadex dapat menerobos kebawah.



Molekul yang kecil akan turun lambat (di dalam gel) karena masih tersangkut dalam partikel gel ketika molekul yang lebih besar turun ke bawah. Larutan yang mempunyai berat molekul lebih kecil dikeluarkan kemudian dengan pelarut yang lebih banyak.

Gambar 2. Skema yang Menunjukkan Bagaimana Partikel Terpisah pada Saat Dilewatkan Sephadex.

### BAB III

## MATERI DAN METODE

### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di sub laboratorium fertilisasi in vitro dan endokrin Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Dimulai tanggal 24 Agustus 1998 sampai tanggal 3 Oktober 1998.

### 3.2. Materi Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah sephadex G-200 sebagai pemisah spermatozoa dan media Earle's yang terbuat dari campuran EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) sebanyak 0,87 g, Hapes ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ ) sebanyak 1 g, (1% dari 100 ml), BSA (Bovine Serum Albumin) sebanyak 2,5 g (2,5% dari 100 ml), antibiotika Gentamycin sebanyak 5 $\mu$ l, larutan NaOH 1 N untuk membuat pH yang dikehendaki, serta tridest. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen sapi Madura dengan kemasan straw (BIB, Singosari) dan untuk pewarnaan spermatozoa memakai eosin negrosin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tabung filtrasi (sputit yang dimodifikasi), tabung reaksi, tabung sentrifus, sentrifus, obyek glass, cotton wool, gunting, mikroskop, standard statis, mikrometer okuler (pembesaran 10x), bunsen dan pipet.

### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian untuk mengetahui motilitas, daya hidup serta ukuran (panjang dan lebar) kepala spermatozoa dilaksanakan dengan memakai Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dilaksanakan dengan tiga perlakuan sebagaimana berikut:

1. Kontrol
2. Filtrasi dengan sephadex G-200
3. *Swim-up*.

Ulangan yang dilaksanakan dalam penelitian ini sebanyak 6 kali sehingga diperlukan unit percobaan  $6 \times 3 = 18$  staw sapi Madura.

### 3.4. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri dari : pembuatan campuran sephadex G-200, pencairan (*thawing*) semen beku dan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa, filtrasi spermatozoa dengan sephadex G-200, *swim-up* dan penghitungan banyaknya spermatozoa hidup dan mati serta penentuan spermatozoa berkromosom seks X dan Y.

Pembuatan campuran sephadex G-200 dilakukan dengan cara sebagai berikut : dibuat campuran sephadex 12,5% dalam media *Earle's* lalu dibiarkan selama 24 jam dalam suhu kamar. Selanjutnya campuran ini dituangkan dalam tabung filtrasi (sprit yang dimodifikasi) hingga ketinggian sephadex G-200 5 cm dengan cairan *Earle's* tetap sebagian ada di atasnya.

Pencairan (*Thawing*) semen beku dan pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara sebagai berikut: *straw* sapi Madura (berisi 0,25 ml semen)

diambil perlahan dari *canister* dengan pinset, lalu dianginkan selama 30 detik diudara, kemudian direndam dalam air yang bersuhu 35° C selama 60 detik. Tutup (*seal*) dipotong dan satu tetes dari isi *straw* semen sapi Madura diletakkan diatas obyek glass. Motilitas spermatozoanya dihitung dengan pemeriksaan mikroskopis. Lalu dibuat preparat ulas guna pemeriksaan lebih lanjut yaitu untuk mengetahui banyaknya spermatozoa yang hidup dan yang mati serta untuk mengetahui ukuran (panjang dan lebar) kepala spermatozoa.

Filtrasi spermatozoa dengan sephadex G-200 dilakukan dengan cara sebagai berikut: Semen sebanyak 0,25 ml diteteskan kedalam tabung filtrasi yang telah berisi campuran sephadex 12,5% dalam media *Earle's*, lalu katupnya dibuka dan tiap tetes diletakkan diatas obyek glass untuk diperiksa motilitas spermatozoanya, kemudian dibuat preparat ulas guna pemeriksaan lebih lanjut yaitu untuk dihitung spermatozoa yang hidup dan yang mati serta untuk pengukuran (panjang dan lebar) kepala spermatozoa.

Perlakuan *swim-up* dilakukan dengan cara sebagai berikut: setelah memotong tutup *straw*, semen dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berisi 3 ml larutan *Earle's* dan disentrifugasi 1800 rpm selama 10 menit kemudian supernatan dibuang. Endapan ditambah 3 ml larutan *Earle's* dan diresuspensi secara pelan lalu dibiarkan selama 1 jam hingga terjadi *swim-up*. Bagian atas diambil 1 tetes  $\pm 50\mu\text{l}$  lalu diletakkan diatas obyek glass dan dihitung motilitasnya dibawah mikroskop kemudian dibuat preparat ulas guna pemeriksaan lebih lanjut yaitu untuk dihitung spermatozoa yang hidup dan yang mati serta untuk pengukuran (panjang dan lebar) kepala spermatozoa.

Penghitungan banyaknya spermatozoa hidup dan mati serta penentuan spermatozoa berkromosom seks X dan Y dilakukan dengan cara sebagai berikut: spermatozoa pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200, metode migrasi keatas dan perlakuan kontrol yang telah diwarnai dengan eosin negrosin (preparat ulas) masing-masing diperiksa dibawah mikroskop. Penentuan hidup dan matinya spermatozoa didasarkan atas kemampuan menyerap zat warna. Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna sehingga warnanya menjadi gelap sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna sehingga warnanya terang.

Penentuan seks kromosom spermatozoa didasarkan pada panjang kali lebar kepala spermatozoa (Mahaputra dkk., 1989). Dari penentuan ukuran kepala tersebut ditentukan besar rata-rata dari seluruh pengukuran. Jika 100 (seratus) hitungan spermatozoa dari preparat ulas yang mewakili tiap-tiap perlakuan tersebut terdapat spermatozoa dengan ukuran panjang kali lebar kepala lebih besar atau sama dengan rata-rata maka dikatakan spermatozoa berkromosom seks X, sedangkan yang lebih kecil dari rata-rata dikatakan spermatozoa berkromosom seks Y.

### 3.5. Pengamatan Penelitian

Pengamatan penelitian dilaksanakan terhadap:

1. persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan menaksir jumlah spermatozoa yang bergerak dibanding yang tidak bergerak. Penaksiran dilakukan pada tiap 10 sel spermatozoa dalam satu lapangan pandang kecil dengan diulang 10 kali pada lapangan pandang yang lain,
2. persentase spermatozoa yang hidup dan yang mati dilakukan dengan menghitung spermatozoa yang menyerap zat warna dan yang tidak menyerap zat warna tiap 100 ekor spermatozoa,
3. penentuan kromosom seks didasarkan atas ukuran kepala spermatozoa, jika dari 100 (seratus) hitungan di dapatkan spermatozoa dengan ukuran panjang kali lebar lebih besar atau sama dengan rata-rata maka diklasifikasikan spermatozoa berkromosom seks X dan apabila lebih kecil dari rata-rata diklasifikasikan spermatozoa berkromosom seks Y.

### 3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji-F sesuai dengan rancangan yang dipakai yaitu RAL. Apabila terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan yang diberikan, dilakukan pengujian lebih lanjut dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) 5% untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik (Kusriningrum, 1989).



## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

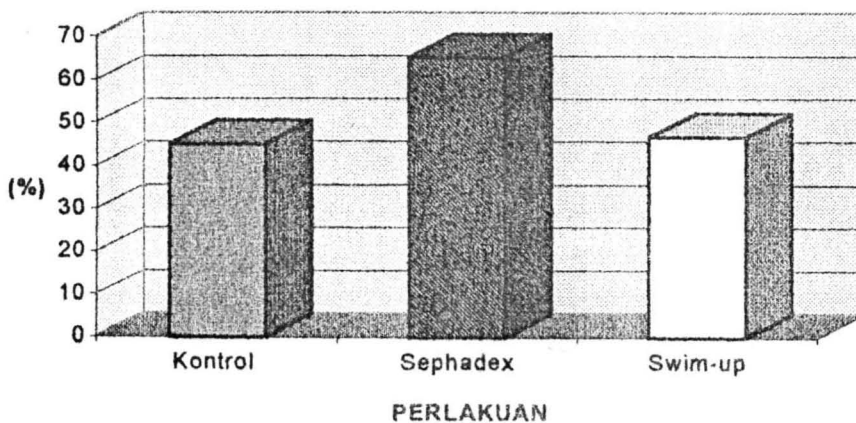
#### 4.1. Motilitas Sel Spermatozoa

Rata-rata motilitas sel spermatozoa di antara perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2 dan Lampiran 1.

Tabel 2. Rata -rata Jumlah Sel Spermatozoa Motil

Perlakuan	Jumlah Spermatozoa Motil (%)
Kontrol	45,00 <sup>b</sup>
Sephadex	65,00 <sup>a</sup>
Swim-up	46,67 <sup>b</sup>
BNT 5%	12,32

Tanda huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata dengan uji BNT 5%.



Gambar 3. Grafik Persentase Sel Spermatozoa Motil.

Berdasarkan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa motilitas sel spermatozoa pada perlakuan setelah filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan *swim-up* dan kontrol. Metode *swim-up* memberikan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol.

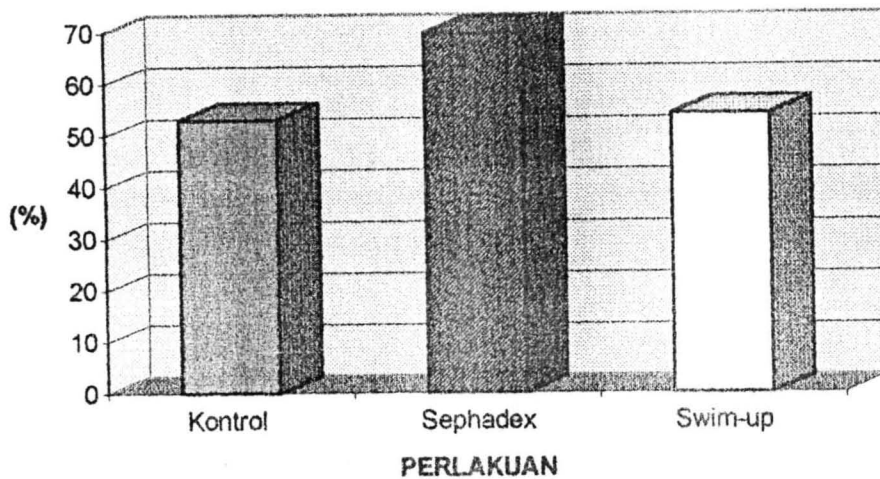
#### 4.2. Sel Spermatozoa yang Hidup

Berdasarkan hasil penghitungan jumlah sel spermatozoa yang hidup menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan ( $p < 0,05$ ). Hal ini seperti ditunjukkan pada Tabel 3 dan Lampiran 2.

Tabel 3. Rata-rata Jumlah Sel Spermatozoa Hidup

Perlakuan	Jumlah Spermatozoa Hidup	
	(%)	(arcsin $\sqrt{\%$ )
Kontrol	53,00	46,67 <sup>b</sup>
Sephadex	69,67	56,74 <sup>a</sup>
<i>Swim-up</i>	54,00	47,32 <sup>b</sup>
BNT 5%		6,70

Tanda huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata dengan uji BNT 5%.



Gambar 4. Grafik Persentase Sel Spermatozoa Hidup.

Berdasarkan uji BNT dengan taraf signifikansi 5% dapat diketahui jumlah sel spermatozoa yang hidup pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbaik yang berbeda nyata dengan *swim-up* dan kontrol, sedang metode *swim-up* tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol.

#### 4.3. Spermatozoa Kromosom Seks X dan Y

Penentuan kromosom seks X dan Y didasarkan pada ukuran panjang kali lebar kepala spermatozoa. Jika didapatkan ukuran panjang kali lebar lebih besar atau sama dengan rata-rata maka dikatakan mempunyai kromosom seks X dan bila lebih kecil dari rata-rata dikatakan kromosom seks Y.

Hasil penentuan ukuran panjang kali lebar kepala spermatozoa didapatkan rata-rata dari keseluruhan pengukuran sebesar  $40,29 \pm 0,08$  mikrometer<sup>2</sup>.

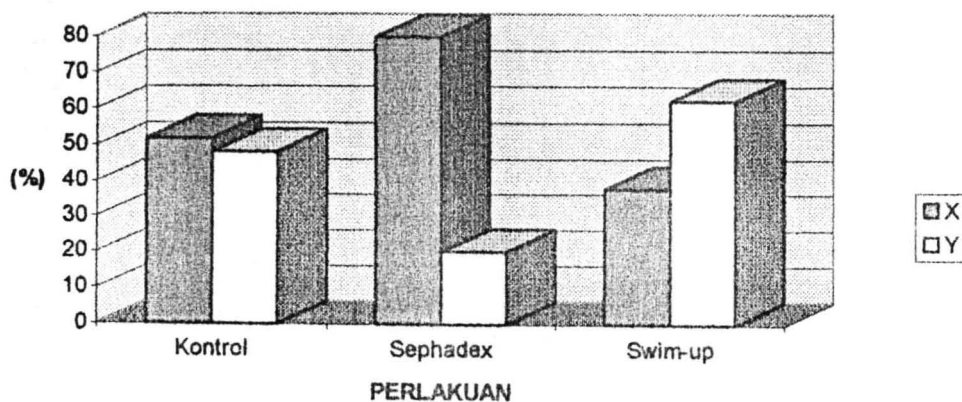
Menurut Toelihere (1981) ukuran panjang kali lebar kepala spermatozoa sebesar 32-45 mikrometer<sup>2</sup>.

Jumlah spermatozoa kromosom seks X dan Y diantara perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) seperti ditunjukkan Tabel 4 dan Lampiran 3.

Tabel 4. Rata-rata Jumlah Sel Spermatozoa Kromosom Seks X dan Y

Perlakuan	Kromosom Seks			
	X		Y	
	(54,00%)	(arcsin $\sqrt{\%}$ )	(%)	(arcsin $\sqrt{\%}$ )
Kontrol	51,83	46,05 <sup>b</sup>	48,17	43,95 <sup>b</sup>
Sephadex	79,83	69,49 <sup>a</sup>	20,17	26,63 <sup>c</sup>
Swim-up	37,83	37,88 <sup>b</sup>	62,17	52,12 <sup>a</sup>
BNT 5%		16,72		4,36

Tanda huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata dengan uji BNT 5%.



Gambar 3. Grafik Persentase Sel Spermatozoa Kromosom Seks X dan Y.

Berdasarkan uji BNT dengan tingkat signifikansi 5% dapat diketahui bahwa jumlah spermatozoa kromosom seks X yang terpisah pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, sedangkan jumlah spermatozoa kromosom seks Y yang terpisah pada perlakuan *swim-up* memberikan hasil terbaik.

## BAB V

### PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bahan berupa 18 buah *straw* mani beku sapi Madura dengan tiga macam perlakuan; kontrol, filtrasi dengan sephadex G-200 dan migrasi keatas (*swim-up*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara jumlah sel spermatozoa motil, jumlah spermatozoa hidup dan jumlah spermatozoa berkromosom seks X dan Y antara perlakuan filtrasi dengan sephadex dibanding migrasi keatas.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dalam suhu kamar agar sel spermatozoa mempunyai pergerakan yang optimal (Hardijanto, dkk., 1995). Pernyataan ini diperkuat oleh Toelihere (1979) yang menyatakan bahwa di Indonesia terutama di daerah panas, pergerakan spermatozoa dapat dinilai secara memuaskan pada suhu kamar. Pergerakan yang baik memungkinkan sel spermatozoa dapat mencapai sel telur di dalam oviduct dalam waktu yang relatif singkat, sehingga memungkinkan terjadinya pembuahan yang sempurna (Hardijanto, dkk., 1995).

Pergerakan spermatozoa diakibatkan oleh adanya aktifitas kontraktile dari ekor spermatozoa. Salisbury and Vandemark., (1985) mengatakan bahwa pada bagian tengah dari ekor spermatozoa terdapat substansi kontraktile filamen aksial yang merupakan tempat awal gelombang aktifitas terjadi lalu diteruskan ke seluruh ekor spermatozoa. Bila terdapat kelainan gerak ekor maka terjadi penyimpangan dari gerakan normal spermatozoa. Gerakan normal spermatozoa

ada tiga macam yaitu ; gerakan maju (*progresif*), gerakan bergetar dan gerakan berputar (Salisbury and Vandemark., 1985).

Persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan menaksir jumlah spermatozoa yang bergerak dibanding yang tidak bergerak. Penaksiran dilakukan pada tiap 10 sel spermatozoa dalam satu lapangan pandang kecil dengan diulang 10 kali pada lapangan pandang yang lain. Hasil penelitian ini memberikan gambaran bahwa *straw* mani beku sapi Madura yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas kurang baik (sel spermatozoa motil sebesar 45% dan sel spermatozoa hidup sebesar 53%) setelah *thawing*. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dari hasil penelitian Triwahyuningtyas (1997), dengan menggunakan bahan yang sama yaitu mani baku sapi Madura didapatkan spermatozoa motil 66,43% dan spermatozoa hidup 71,14% setelah *thawing*. Problema fertilisasi dengan mani beku pada pusat inseminasi buatan yang terurus baik terletak pada perlakuan semen yang tidak wajar. Permukaan nitrogen cair dalam *container depot* tidak boleh dibiarkan terlalu menurun, harus selalu berisi sewaktu mengambil ampul atau *straw*, *canister* ditarik keatas tetapi tidak boleh keluar melewati mulut *container*, pengambilah dilakukan sesegera dan *canister* segera pula dimasukkan kedalam nitrogen cair. Sedikitnya jumlah spermatoza motil dan hidup pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh penurunan suhu didalam *canister* atau mungkin oleh prosedur pengambilan *straw* dari *canister* yang kurang memperhatikan ketentuan seperti tersebut diatas.

Penentuan persentase spermatozoa yang hidup dan yang mati dilakukan dengan pengecatan spermatozoa menggunakan zat warna eosin-negrosin.

Spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, terutama didaerah *postnuclear cups*, sehingga sel spermatozoa yang mati menyerap zat warna (gelap), sedang sel spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna atau jernih (Hardijanto, dkk., 1995).

Jumlah sel spermatozoa motil dan hidup setelah perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 ternyata memberikan hasil terbanyak (sel spermatozoa motil sebesar 65% dan sel spermatozoa hidup sebesar 69,67%). Hal ini disebabkan banyaknya spermatozoa berkromosom seks X hidup yang menembus sephadex lebih dulu dibandingkan spermatozoa berkromosom seks Y. Telah diketahui bahwa spermatozoa berkromosom seks X lebih tahan hidup dibandingkan spermatozoa berkromosom seks Y dan spermatozoa berkromosom seks X (yang mempunyai ukuran yang lebih besar dari spermatozoa berkromosom seks Y) akan menembus sephadex lebih dulu, sehingga spermatozoa yang menembus sephadex banyak ditemukan masih hidup dan motil. Sehubungan dengan kualitas spermatozoa Hafez (1987) berpendapat bahwa spermatozoa berkromosom seks X memiliki daya hidup lebih tinggi jika dibandingkan dengan spermatozoa berkromosom seks Y. Pendapat tersebut merupakan pendukung terhadap hasil penelitian ini, dimana pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 didapatkan spermatozoa motil dan hidup yang tinggi dibandingkan dengan perlakuan *swim-up* dan perlakuan kontrol. Disamping itu banyaknya spermatozoa yang hidup dan yang motil pada perlakuan dengan sephadex karena pada perlakuan dengan sephadex spermatozoa yang mati akan mengapung diatas sedangkan spermatozoa yang hidup akan bergerak searah gaya gravitasi kebawah menembus partikel



sephadex. Pada perlakuan *swim-up* setelah sentrifugasi dan dibiarkan 1 jam maka banyak spermatozoa yang mati, sehingga setelah diambil bagian atasnya dan diperiksa ditemukan banyak spermatozoa yang mati.

Jika ditinjau dari perbedaannya kepala spermatozoa berkromosom seks X lebih besar dalam ukurannya dibanding spermatozoa berkromosom seks Y. Hal ini dikarenakan kepala spermatozoa berkromosom seks X mempunyai kandungan DNA (Deokxyribonucleic acid) lebih banyak daripada spermatozoa berkromosom seks Y (Hafez, 1987). Menurut Bhattacharya (1966) spermatozoa berkromosom seks X mengandung kromatin yang lebih banyak di kepalanya sehingga ukurannya lebih besar dari spermatozoa berkromosom seks Y. Hal ini diperkuat oleh Frandson *et al*, (1992) yang menyatakan bahwa kromatin kelamin ditemukan pada 60-80% nuclei somatik betina dan tidak lebih dari 10% pada nuclei somatik jantan.

Penentuan kromosom seks didasarkan atas ukuran kepala spermatozoa, jika dari 100 (seratus) hitungan didapatkan spermatozoa dengan ukuran panjang kali lebar lebih besar atau sama dengan rata-rata maka diklasifikasikan spermatozoa berkromosom seks X dan apabila didapatkan lebih kecil dari rata-rata maka diklasifikasikan sebagai spermatozoa berkromosom seks Y. Penelitian Adimoelja (1984) didapatkan bahwa spermatozoa manusia yang berukuran kecil memancarkan *fluerescent* dan disebutnya spermatozoa berkromosom seks Y. Pada kontrol tidak terdapat perbedaan antara persentase spermatozoa berkromosom seks X dan Y ( $P > 0,05$ ). Hal ini memang sesuai secara teori bahwa

perbandingan normal antara spermatozoa berkromosom seks X dan Y adalah sekitar 50 : 50.

Pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 didapatkan persentase spermatozoa berkromosom seks X (79,83%) lebih besar daripada spermatozoa berkromosom seks Y (20,63%). Dari uji-t menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata persentase spermatozoa berkromosom seks X diantara perlakuan ( $P < 0,05$ ). Terlihat bahwa spermatozoa berkromosom seks X dapat menembus sephadex lebih banyak dibanding spermatozoa berkromosom seks Y. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut : sephadex mempunyai kemampuan untuk melepaskan molekul yang lebih besar duluan dan menahan molekul yang lebih kecil. Spermatozoa berkromosom seks Y yang mempunyai ukuran lebih kecil dari spermatozoa berkromosom seks X akan memasuki pori-pori sephadex gel dan akan dihambat, sedangkan spermatozoa berkromosom seks X yang mempunyai massa dan ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan spermatozoa berkromosom seks Y akan menerobos kebawah lebih dulu. Sehingga spermatozoa berkromosom seks X akan lebih dulu menembus sephadex. Teori yang menyebutkan bahwa spermatozoa berkromosom seks Y melaju lebih dulu dari spermatozoa berkromosom seks X (Schilling dkk., 1976) tidak berlaku pada pemisahan dengan sephadex. Hal ini kemungkinan berlaku hanya pada motilitas spermatozoa secara fisiologis saja. Tetapi teori yang menyebutkan ukuran kepala yang lebih besar pada spermatozoa berkromosom seks X, sejalan dengan hasil yang diperoleh.

Jumlah persentase spermatozoa berkromosom seks X pada *swim-up* didapatkan (37,83% lebih kecil dibandingkan spermatozoa berkromosom seks Y (62,17%). Terlihat bahwa spermatozoa berkromosom seks Y ditemukan lebih banyak dibandingkan spermatozoa berkromosom seks X pada perlakuan *swim-up*. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: spermatozoa berkromosom seks Y mempunyai pergerakan yang lebih cepat dibanding spermatozoa berkromosom seks X, karena massa dan ukuran spermatozoa berkromosom seks Y lebih kecil dibandingkan dengan spermatozoa berkromosom seks X, sehingga dalam waktu 1 jam spermatozoa berkromosom seks Y didapatkan lebih banyak dibagian atas karena mempunyai kesempatan *swim-up* lebih cepat dibanding spermatozoa berkromosom seks X. Selain itu setelah centrifugasi dan dibiarkan 1 jam pada perlakuan *swim-up* banyak sel spermatozoa yang berkromosom seks Y yang mati (tidak tahan hidup lama) kemudian mengapung diatas. Sedikitnya jumlah spermatozoa berkromosom seks X yang didapatkan pada perlakuan *swim-up* selain tersebut alasan di atas juga dikarenakan oleh pengaruh sentrifugal, dimana spermatozoa berkromosom seks X yang mempunyai berat lebih besar akan mudah membentuk endapan dibanding dengan spermatozoa berkromosom seks Y (Mohri, *et al.*, 1987).

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

1. Jumlah spermatozoa motil dan hidup dari mani beku sapi Madura setelah perlakuan kontrol, filtrasi dengan sephadex G-200 dan perlakuan *swim-up* menunjukkan adanya perbedaan.
2. Persentase spermatozoa motil dan hidup setelah filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbanyak dibanding kontrol dan migrasi keatas.
3. Persentase spermatozoa yang diduga berkromosom seks X setelah perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 didapatkan terbanyak, sedangkan setelah *swim-up* persentase spermatozoa yang diduga berkromosom seks Y didapatkan terbanyak.

#### 6.2. Saran

Saran yang dapat diberikan penulis dalam penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian ulangan menggunakan semen sapi Madura segar untuk mendapatkan spermatozoa hidup dan motil yang lebih banyak agar nantinya layak untuk proses pembuahan.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melakukan pembuahan secara *in vitro* maupun *in vivo* memakai spermatozoa hasil pemisahan dengan metode filtrasi dengan sephadex G-200 dan metode *swim-up* untuk mengetahui jenis kelamin anak yang dilahirkan.

## Ringkasan

Pada manusia dan mammalia jenis kelamin anak ditentukan oleh type spermatozoa (kromosom seks X dan Y), yang membuahi sel telur. Bila sel telur dibuahi spermatozoa kromosom seks Y, akan dilahirkan anak jantan dan sebaliknya jika sel telur dibuahi spermatozoa kromosom seks X akan dilahirkan anak betina. Usaha untuk mengatur kelahiran anak dapat dilakukan dengan memisahkan atau merubah proporsi kedua type spermatozoa dalam semen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemisahan spermatozoa kromosom seks X dan Y serta perbandingan daya motil dan daya hidup spermatozoa setelah perlakuan kontrol, filtrasi dengan sephadex G-200, dan perlakuan *swim-up*.

Bahan utama penelitian ini adalah 18 buah *straw* mani beku sapi Madura didapatkan dari Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan diproduksi oleh BIB (Balai Inseminasi Buatan) Singosari Malang. Media pemisah spermatozoa adalah sephadex G-200 dan media *Earle's* terbuat dari campuran: EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) sebanyak 0,87 g, Hepes ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ ) sebanyak 1 g (1% dari 100 ml), BSA (Bovine Serum Albumin) sebanyak 2,5 g (2,5% dari 100 ml), antibiotika Gentamisin sebanyak 5  $\mu$ l, larutan NaOH 1N untuk membuat pH yang dikehendaki, serta tridest.

Untuk menghitung jumlah spermatozoa motil dilakukan penetesan semen yang ada dalam *straw* setelah dilakukan *thawing* diatas obyek glass, lalu diperiksa dibawah mikroskop. Penghitungan motilitas dilakukan dalam puluhan persen. Penghitungan jumlah spermatozoa hidup dilakukan dengan membuat preparat ulas memakai zat warna eosin-negrosin , spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna (jernih).

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup diantara perlakuan. Jumlah spermatozoa motil dan hidup pada perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil paling banyak dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ( $p < 0,05$ ).

Untuk mengetahui jumlah spermatozoa kromosom seks X dan Y yaitu berdasarkan besarnya kepala (panjang X lebar) spermatozoa. Pemeriksaan dilakukan dibawah mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okuler. Klasifikasi pengelompokan didasarkan atas ukuran panjang x lebar kepala yang lebih besar atau sama dengan rata-rata dan yang lebih kecil dari rata-rata. Dari keseluruhan pengukuran didapatkan rata-rata besar (panjang x lebar) kepala spermatozoa adalah  $40,29 \pm 0,08$  mikrometer<sup>2</sup>.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode filtrasi dengan sephadex G-200 didapatkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,05$ ) proporsi antara spermtozoa kromosom seks X yaitu sebesar 79,83% dan kromosom seks Y sebesar 20,17%. Metode *swim-up* didapat perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,05$ )

proporsi antara spermatozoa kromosom seks X yaitu sebesar 37,83% dan spermatozoa kromosom seks Y sebesar 62,17%.


Melihat hasil penelitian diambil kesimpulan bahwa metode filtrasi dengan sephadex G-200 persentase kromosom seks terpisah tertinggi adalah spermatozoa kromosom seks X sedangkan pada metode *swim-up* persentase kromosom terpisah tertinggi adalah spermatozoa kromosom seks Y.

Berdasarkan dari hasil penelitian ini disarankan menggunakan sel mani beku sapi Madura yang berkualitas baik agar diperoleh jumlah spermatozoa motil dan hidup yang lebih banyak supaya nantinya layak digunakan untuk proses pembuahan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelya, A . 1984. Separation of X- Spermatozoa with The Sephadex Gel Filtration Method for Female Sex Preselection. Airlangga University 2:9-17, 51 - 53.
- Adimoelja,A. 1994. Studi Perbandingan tentang Penentuan Jenis Kelamin dengan Teknik Sephadex Filtrasi dan Teknik Pemusingan Terhadap Semen Domba Melalui IB. Lemlit. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Bhattacharya, B.C., A.D. Bangham, R.J. Cro, R.D. Keynes and L. Rowson .1966. A Attempt to Determine The Sex of Calves by Artificial Insemination with Spermatozoa Separated by Sedimentation. Nature, 211 : 863.
- Ericsson, .R.J. and R.H. Glass. 1982. Fungtional Differences Between Sperm Bearing the X- or Y- Chromosom in prospects for Sexing Mammalian Sperm . R. P. In Reproduction In Farm Animals, by Hafez, E.S.E. 1987. 5<sup>th</sup> Edition. Copyright by Lea & Febriger. Philadelphia.
- Frandsen, R.D. 1986. Original Anatomic and Physiology of Farm Animals. Trans. by; Srigondono,B., Koen Praseno. 4<sup>th</sup> Edition. hal: 706. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Hafez, E.S.E. 1970. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Copyright by Lea & Febriger. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 1987. Reproduction in Farm Animals. 5<sup>th</sup> Edition. Copyright by Lea & Febiger.Philadelphia.
- Huitema, H. 1986. Peternakan didaerah Tropis, Arti Ekonomi dan Kemampuannya. Penelitian dibeberapa Daerah. Yayasan Obor Indonesia dan Penerbit PT. Gramedia. Jakarta.
- Hardjopranyoto, S. 1993. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga Unversity Press, Surabaya.
- Hardijanto dan S. Hardjopranyoto. 1994. Ilmu Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Hardijanto, T. Sarjito, T. Hernawati, S. Susilowati, T.W. Suprayogi dan S. Hardjopranjoto. 1995. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. hal: 11,13



- Hedah,D. 1988. Peranan ISIB Singosari Sebagai Sumber Mani Beku untuk Menunjang Pengembangan Sapi Perah Di Jawa Timur. Disampaikan pada Simposium Nasional Sapi Perah. Dalam rangka Peringatan Sewindu (1972-1988). Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Jaswandi, 1996. Penggunaan Lapisan Suspensi Bovine Serum Albumin untuk Memisahkan Sperma X dan Y Dalam Semen Sapi Guna Mengatur Jenis Kelamin. *Jurnal Peternakan dan Lingkungan* vol.2. no.03. hal: 45-49.
- Junaidi, D. 1997. Penggunaan Aliran Listrik Searah 1,5 Volt pada Pemisahan Spermatozoa Kromosom Seks X dan Y pada Domba. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Kusriningrum, R. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Legates,J.E., and E.J. Warwick. 1990. Breeding and Improvement of Farm Animals. 8<sup>th</sup> Ed.. McGRAW-Hill Publishing Company. p. :37.
- Mohri, H., S. Oshio, S. Kaneko, Kobayashi and R. Lizuka. 1987. Separation and Characterization of Mammalian X and Y Bearing Sperm New Horizon in Sperm Cell Reseach (Mohri, H ed) pp. 469-481. Japan Sci. Soc. Press Tokyo/Gordon and Breach Sci Publ. New York.
-  Mahaputra,L., Wurlina, T.D. Sulistiyati dan S. Mulyati. 1989. Pemisahan Sel Spermatozoa Domba dengan Sephadex Colum G-200. *Media Kedokteran Hewan*.vol.5. No.1.ISSN 2015-8930. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.Surabaya. hal 31-38.
- Mahaputra, L. 1993. Ilmu Kebidanan I. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.Surabaya
- Nurul, I. 1994. Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Friestian Holland dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Universitas Brawijaya*. vol. 6. no.2 hal: 68-74.
- Putu, I.G., K. Dwiyanto, P. Sitepu, dan T.D. Soedjana, 1997. Ketersediaan dan Kebutuhan Teknologi Produksi Sapi Potong. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Bogor, 7-8 Januari 1997.
- Schilling , E., R. Lafrenz and F. Klobassa.1978. Failure to Separate Human X and Y Chromosom Bearing Spermatozoa by Sephadex Gel Filtration. *Andrologia* 10. 215. In Hafez, E.S.E., 1987, *Reproduction in Farm Animal*. 5<sup>th</sup> Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.

- Salisbury, G.W., N.L. Vandemark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Januar, R. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. ✓
- Syafei, S. 1986. Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Memakai Percoll. Tesis FPS Universitas Indonesia. Jakarta.
- Surjoatmodjo, M. 1992. Analisis Sitogenik dan Morfometrik Beberapa Bangsa Sapi di Indonesia. Disertasi . Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya. hal 13 - 15.
- Toelihere, M.R. 1979. Inseminasi Buatan pada Ternak. Panerbit Angkasa Bandung. ✓
- Toilehere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung. ✓
- Trinil,S., I. Nurul, B.S. Sutiman, A.H. Agus. 1984. Teknologi Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Perah Friesien Holland dengan Senrifugasi Gradien Percoll. Proseeding Pertemuan Ilmiah Pengolahan dan Komunikasi Hasil Penelitian Sapi Perah. Sub Balai Penelitian Ternak Grati Pasuruan. Hal : 96-101.
- Triwahyuningtyas, E. 1997. Daya Hidup Mani Beku Sapi Madura Sebelum, Setelah Pencucian dan pada Akhir Kapasitasi dengan Media Earle's. Skripsi. Fakultas Kedoktera Hewan. Universitas Airlangga Surabaya ✓

## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Hasil Pengamatan Rata-rata Jumlah Sel Spermatozoa Motil pada Berbagai Perlakuan (%)**

Ulangan	Perlakuan		
	Kontrol	Sephadex	Swim-up
1	40	60	40
2	60	70	50
3	40	60	50
3	40	60	30
5	50	70	60
6	40	70	50
Total	270	390	280
Rata-rata	45	65	46,67
SD	8,37	5,48	10,33

**Perhitungan Sidik Ragam**

$$FK = \frac{(940)^2}{6 \times 3} = 49088,889$$

$$JKT = (40)^2 + (60)^2 + \dots + (50)^2 - 490988,889 = 2511,111$$

$$JKP = \frac{(270)^2 + (390)^2 + (280)^2}{6} - 49088,889 = 1477,778$$

$$JKS = 2511,111 - 1477,778 = 1033,333$$

**Sidik Ragam Untuk Hasil Pengamatan Motolitas Spermatozoa**

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	1,477,778	1,255,556	18,226**	3,68	6,36
Sisa	15	1,033,333	68,889			
Total	17	2,511,111				

Keterangan :

\*\* Fhitung > Ftabel maka motilitas sel spermatozoa berbeda sangat nyata diantara perlakuan

**Uji BNT untuk Motilitas Sel Spermatozoa**

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= t \text{ } 5\% \text{ (db sisa)} \times \sqrt{\frac{2kts}{n}} \\ &= (2,571) \times 4,792 = 12,320 \end{aligned}$$

**Perbedaan Jumlah Sel Spermatozoa Motil dengan Uji Beda Nyata Terkecil**

Perlakuan	Rata-rata (X)	Beda		BNT 5%
		(X-Kontrol)	(X-Swim)	
Sephadex	65 <sup>a</sup>	20*	18,33*	12,320
Swim-up	46,67 <sup>b</sup>	1,67		
Kontrol	45 <sup>b</sup>			

**Menentukan notasi:**

Sephadex	Swim-up	Kontrol
a		
	b	
		b

Kesimpulan : Perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan swim-up dan kontrol. perlakuan swim-up tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol.

**Lampiran 2. Hasil Pengamatan Rata-rata Jumlah Sel Spermatozoa Hidup pada Berbagai Perlakuan (%)**

Ulangan	Perlakuan		
	Kontrol	Sephadex	Swim-up
1	45	64	44
2	62	69	59
3	49	57	56
4	57	73	45
5	54	80	66
6	51	75	54
Total	318	418	324
Rata-rata	53	69,67	54
SD	6,03	8,34	8,41

**Transformasi Data dalam Arcsin  $\sqrt{\%}$**

Ulangan	Perlakuan		
	Kontrol	Sephadex	Swim-up
1	42,13	53,13	41,55
2	51,92	56,17	50,18
3	44,43	49,02	48,45
4	49,02	58,69	42,13
5	47,29	63,44	54,33
6	45,57	60,00	47,29
Total	280,36	340,45	283,93
Rata-rata	46,73	56,74	47,32
SD	3,47	5,14	4,87

$$FK = \frac{(904,74)^2}{6 \times 3} = 45475,248$$

$$JKT = (42,13)^2 + (51,92)^2 + \dots + (47,29)^2 - 45475,248 = 690,173$$

$$JKP = \frac{(280,36)^2 + (340,45)^2 + \dots + (283,93)^2}{6} - 45475,248 = 384,456$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKS} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\
 &= 690,173 - 384,456 \\
 &= 305,717
 \end{aligned}$$

### Sidik Ragam untuk Hasil Pengamatan Sel Spermatozoa Hidup

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	384,456	192,228	9,432**	3,68	6,36
Sisa	15	305,717	20,381			
Total	17	690,173				

Keterangan:

\*\*Fhitung > Ftabel maka sel spermatozoa hidup berbeda sangat nyata diantara perlakuan.

### Uji BNT untuk Jumlah Sel Spermatozoa Hidup

Fhitung > Ftabel 0,01

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5\% &= T \ 5\% \ (\text{db sisa}) \times \sqrt{\frac{2kts}{n}} \\
 &= \frac{(2,571) \times 2,602}{\sqrt{2}} = 6,70
 \end{aligned}$$

### Perbedaan Jumlah Sel Spermatozoa Hidup dengan Uji BNT

Perlakuan	Rata-rata (%)	Rata-rata (arcsin %)
Sephadex	69,67	56,74 <sup>a</sup>
Swim-up	54	47,32 <sup>b</sup>
Kontrol	53	46,73 <sup>b</sup>
BNT (5%)		6,70

Kesimpulan : Perlakuan filtrasi dengan sephadex memberikan hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan kontrol tidak berbeda nyata dengan perlakuan *swim-up*.

**Lampiran 3. Hasil Pengamatan Rata-rata Jumlah Spermatozoa Seks Kromosom X dan Y pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex G-200, Migrasi Keatas (*swim-up*) dan perlakuan Kontrol**

Ulangan	Kontrol		Sephadex		<i>Swim-up</i>	
	X	Y	X	Y	X	Y
1	53	47	84	16	46	54
2	48	52	75	25	40	60
3	54	46	82	18	43	57
4	51	49	80	20	33	67
5	54	46	79	22	39	61
6	51	49	80	20	26	74
Jumlah	311	289	479	121	227	373
Rata-rata	51,83	48,17	79,83	20,17	37,83	62,17
SD	2,32	2,32	3,13	3,13	7,25	7,25

**Transformasi Data dalam Arcsin  $\sqrt{\%}$**

Ulangan	Kontrol		Sephadex		<i>Swim-up</i>	
	X	Y	X	Y	X	Y
1	46,72	43,28	66,42	23,58	42,71	47,29
2	43,85	46,15	60,00	30,00	39,23	50,77
3	47,29	42,71	64,90	25,10	40,98	49,02
4	45,57	44,43	63,44	26,56	35,06	54,94
5	47,29	42,71	62,72	27,97	38,65	51,35
6	5145,57	44,43	63,44	26,56	30,66	59,34
Jumlah	256,29	263,71	380,92	159,77	227,29	312,71
Rata-rata	46,05	43,95	63,49	26,63	37,88	52,12
SD	1,33	1,33	2,16	2,16	4,37	4,37



**Analisis Proporsi Kromosom Seks X yang Terpisah Pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex, Migrasi Keatas (*Swim-up*) dan Perlakuan Kontrol**

$$FK = \frac{(864,5)^2}{6 \times 3} = 41520,014$$

$$JKT = (46,72)^2 + (43,85)^2 + \dots + (30,66)^2 - 41520,014 = 4123,756$$

$$JKP = \frac{(256,29)^2 + (380,92)^2 + (227,29)^2}{6} - 41520,014 = 2220,878$$

$$\begin{aligned} JKS &= JKT - JKP \\ &= 4123,756 - 2220,878 \\ &= 1902,878 \end{aligned}$$

**Sidik Ragam Untuk Hasil Pengamatan Spermatozoa Kromosom Seks X pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex G-200, Migrasi Keatas dan perlakuan Kontrol**

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	2220,878	1110,439	8,75**	3,68	6,36
Sisa	15	1902,878	126,859			
Total	17	4123,756				

Keterangan:

\*\*Fhitung > Ftabel maka spermatozoa kromosom seks X yang terpisah berbeda sangat nyata diantara perlakuan.

**Uji BNT Untuk Jumlah Spermatozoa Kromosom Seks X**

Fhitung > Ftabel 0,01

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= T \ 5\% \ (\text{db sisa}) \times \sqrt{\frac{2kts}{n}} \\ &= (2,571) \times 6,503 = 16,719 \end{aligned}$$

**Perbedaan Jumlah Spermatozoa Kromosom Seks X dengan Uji BNT**

Perlakuan	Rata-rata (%)	Rata-rata (arcsin %)
Sephadex	79,83	63,49 <sup>a</sup>
<i>Swim-up</i>	51,83	46,05 <sup>b</sup>
Kontrol	37,83	37,88 <sup>b</sup>
BNT (5%)		16,72

Kesimpulan : Perlakuan filtrasi dengan sephadex G-200 memberikan hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan *swim-up* dan kontrol. Perlakuan migrasi keatas (*swim-up*) dan kontrol tidak berbeda nyata.

**Analisis Proporsi Kromosom Seks Y Yang Terpisah pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex, Migrasi Keatas (*Swim-up*) dan Perlakuan Kontrol**

$$FK = \frac{(736,19)^2}{6 \times 3} = 30109,762$$

$$JKT = (43,28)^2 + (46,15)^2 + \dots + (59,34)^2 - 30109,762 = 2162,13$$

$$JKP = \frac{(263,71)^2 + (159,77)^2 + (312,71)^2}{6} - 30109,762 = 2033,065$$

$$\begin{aligned} JKS &= JKT - JKP \\ &= 2162,13 - 2033,065 \\ &= 129,065 \end{aligned}$$

**Sidik Ragam untuk Hasil Pengamatan Spermatozoa Kromosom Seks Y pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex G-200, Migrasi Keatas dan perlakuan Kontrol**

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	2033,065	1016,533	118,142**	3,68	6,36
Sisa	15	129,065	8,604			
Total	17	2162,130				

Keterangan:

\*\*Fhitung > Ftabel maka spermatozoa kromosom seks Y yang terpisah berbeda sangat nyata diantara perlakuan.

**Uji BNT untuk Jumlah Spermatozoa Kromosom Seks Y**

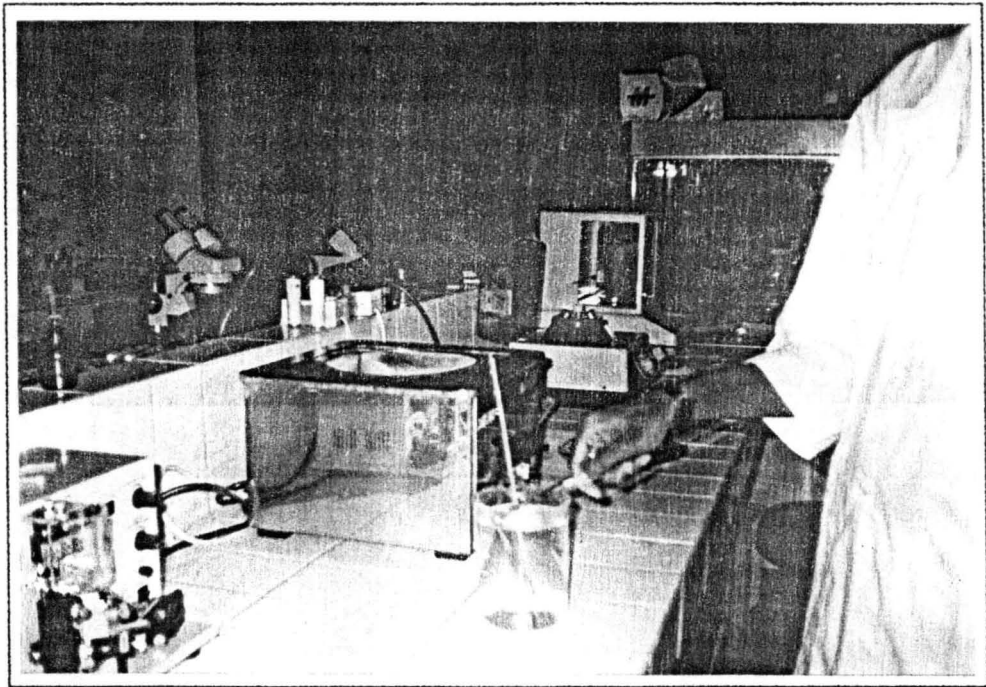
Fhitung > Ftabel 0,01

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= T \text{ 5\% (db sisa)} \times \sqrt{\frac{2kts}{n}} \\ &= (2,571) \times 1,694 = 4,355 \end{aligned}$$

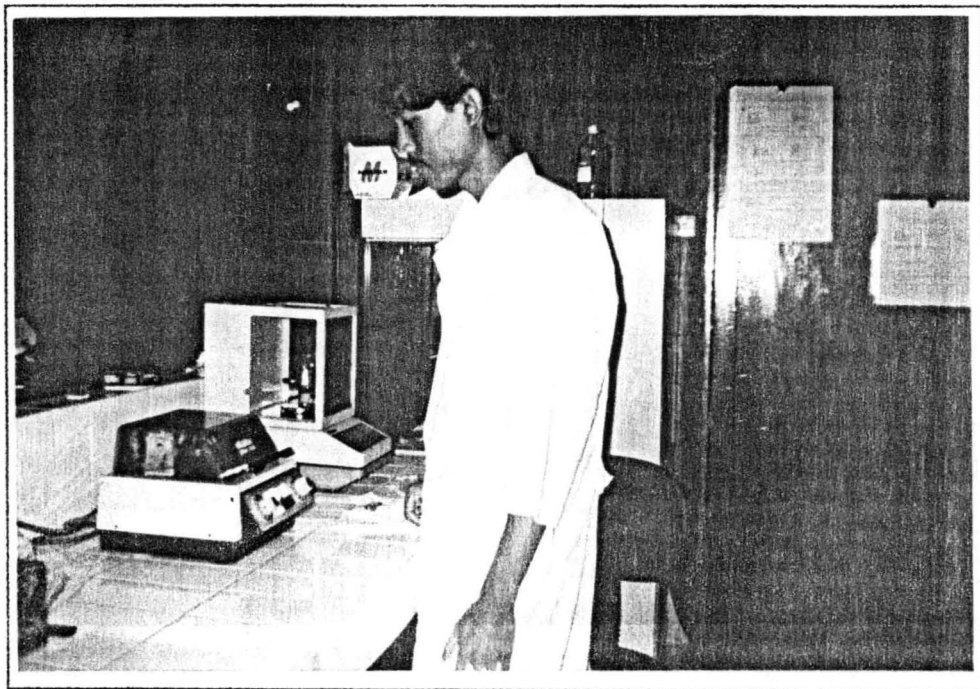
**Perbedaan Jumlah Spermatozoa Kromosom Seks Y dengan Uji BNT**

Perlakuan	Rata-rata (%)	Rata-rata (arcsin %)
<i>Swim-up</i>	62,17	52,12 <sup>a</sup>
Kontrol	48,17	43,95 <sup>b</sup>
Sephadex	20,17	26,63 <sup>c</sup>
BNT (5%)		4,355

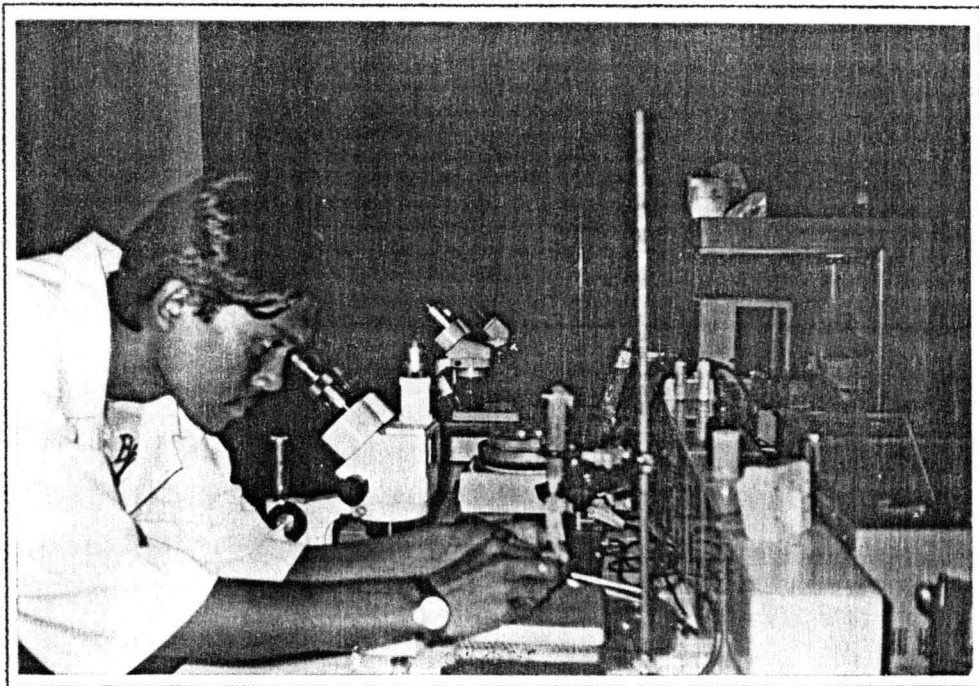
Kesimpulan : Perlakuan swim-up memberikan hasil tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan filtrasi dengan sephadex memberikan hasil terendah.



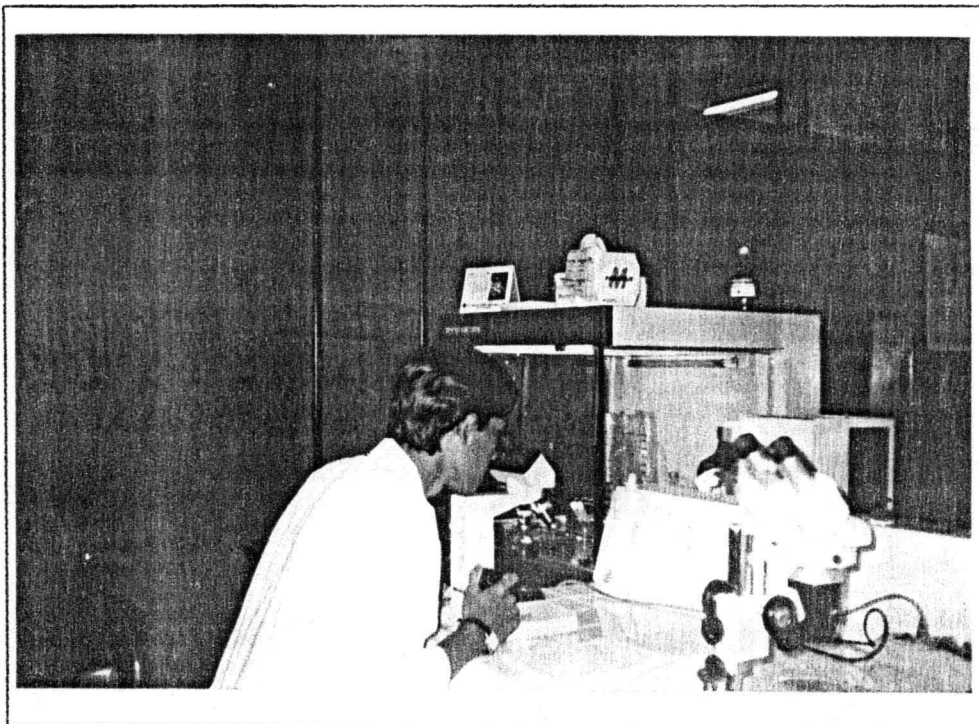
Lampiran 5. *Thawing* (Pencairan) Mani Beku Sapi Madura.



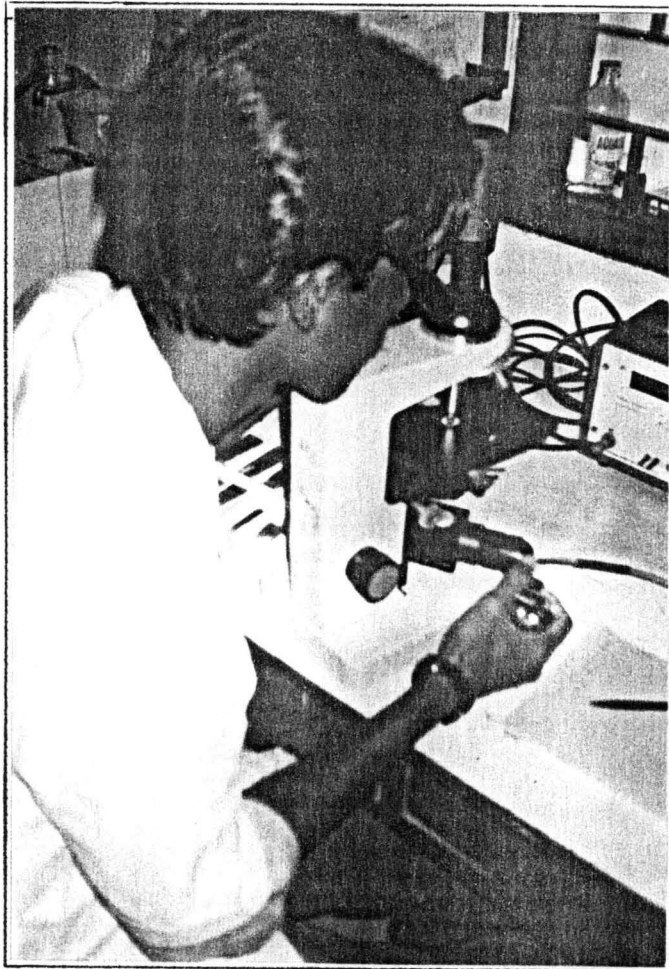
Lampiran 6. Sentrifugasi Semen Untuk Perlakuan Migrasi Keatas (*Swim-up*).



Lampiran 7. Penampungan Spermatozoa pada Perlakuan Filtrasi dengan Sephadex G-200.



Lampiran 8. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa.



Lampiran 10. Penghitungan Jumlah Spermatozoa Hidup dan Mati serta Pengukuran Besar (Panjang dan Lebar) Kepala Spermatozoa.