

SKRIPSI

**MOTILITAS DAN DAYA TAHAN HIDUP SPERMATOZOA DOMBA
SETELAH PENCUCIAN DENGAN BERBAGAI KECEPATAN
SENTRIFUGASI**



Oleh :

DWI RAHMAWATI

SURABAYA – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**MOTILITAS DAN DAYA TAHAN HIDUP SPERMATOZOA DOMBA
SETELAH PENCUCIAN DENGAN BERBAGAI KECEPATAN
SENTRIFUGASI**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

DWI RAHMAWATI

NIM 060112854

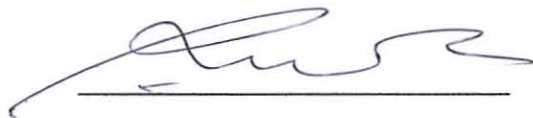
Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Indah Norma Triana, M.Si., Drh.

Pembimbing Pertama



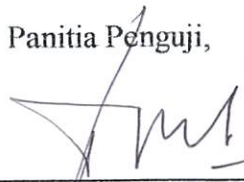
Moh. Sukmanadi M.Kes., Drh.

Pembimbing Kedua

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

Menyetujui

Panitia Penguji,



Dr. Wurlina Meles., MS.,Drh.

Ketua

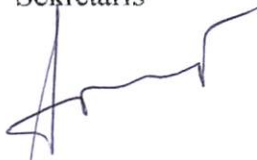


Tatik Hernawati, M.Si., Drh.



Budi Utomo, M.Si., Drh

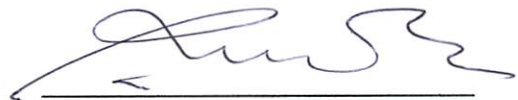
Sekretaris



Indah Norma Triana, M.Si., Drh

Anggota

Anggota



Moh. Sukmanadi, M.Kes., Drh.

Anggota

Surabaya, 24 Juni 2005.

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga,

Dekan



Prof. Dr. Ismudiono ., MS., Drh.

NIP. 130 687 297

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang Penelitian	1
Perumusan Masalah	3
Landasan Teori	4
Tujuan Penelitian	6
Manfaat Penelitian	6
Hipotesis Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
Domba	7
Reproduksi Domba Jantan	8
Pubertas Domba Jantan	10
Semen Domba	11
Spermatogenesis	12
Spermatozoa	13
Metabolisme Spermatozoa	17
Motilitas Spermatozoa	18
Daya Tahan Hidup Spermatozoa	21
Membran Spermatozoa	23

Kapasitasi dan Reaksi Akrosom	24
Plasma Semen	24
Pencucian Spermatozoa dengan Sentrifugasi	26
Bahan Pencuci Spermatozoa	28
III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN	31
Bahan Penelitian	31
Metode Penelitian	32
Peubah yang Diamati	35
Rancangan Penelitian	35
IV. HASIL PENELITIAN	36
Pemeriksaan awal semen domba segar sebelum perlakuan	36
Motilitas spermatozoa	37
Daya tahan hidup spermatozoa	38
V. PEMBAHASAN	41
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	49
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Pemeriksaan makroskopis semen domba sebelum perlakuan	36
2. Pemeriksaan mikroskopis semen domba sebelum perlakuan	36
3. Rata-rata motilitas spermatozoa domba setelah dicuci dengan berbagai macam kecepatan sentrifugasi	37
4. Rata-rata kumulatif motilitas spermatozoa domba yang telah dicuci dan disimpan selama interval waktu tertentu	38
5. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa domba yang telah dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi	39
6. Rata-rata kumulatif daya tahan hidup spermatozoa yang telah dicuci dan disimpan selama interval waktu	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Saluran reproduksi domba jantan	10
2.2 Spermatozoa dan bagian-bagiannya	17
9.1 Spermatozoa pada perlakuan P ₀	72
9.2 Spermatozoa pada perlakuan P ₁	72

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Karakteristik dan komponen kimiawi plasma semen domba	57
2. Diagram alur pelaksanaan penelitian	59
3. Data semen domba sebelum diberi perlakuan	61
4. Persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan	62
5. Persentase daya tahan hidup spermatozoa setelah perlakuan	63
6. Analisis statistik motilitas spermatozoa setelah perlakuan	64
7. Analisis statistik daya tahan hidup spermatozoa setelah perlakuan	67
8. Komponen bahan pencuci spermatozoa (medium BO, BSA dan kafein)	70
9. Gambar spermatozoa hidup dan mati	72

**MOTILITAS DAN DAYA TAHAN HIDUP SPERMATOZOA DOMBA
SETELAH PENCUCIAN DENGAN BERBAGAI KECEPATAN
SENTRIFUGASI**

Dwi Rahmawati

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pencucian spermatozoa dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba. Bahan penelitian adalah dua ekor domba jantan ekor gemuk berumur 3 tahun. Pengambilan semen dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Rancangan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap pola faktorial dan ulangan yang dipakai sebanyak enam. Penelitian ini terdiri dari empat perlakuan (P0, P1, P2, P3) dengan tiga sub perlakuan yakni (T0, T1, T2). Perlakuan P0 atau kontrol adalah sentrifugasi spermatozoa sebanyak kurang lebih 0,25 cc dengan kecepatan 1800 rpm tanpa penambahan media pencuci, sedangkan perlakuan P1, P2, P3 adalah sentrifugasi spermatozoa sebanyak $\pm 0,25$ cc dengan kecepatan 1800 rpm, 2400 rpm, dan 2800 rpm dengan penambahan media pencuci yakni BO, BSA dan kafein sebanyak ± 3 cc untuk tiap-tiap perlakuan. Kemudian pelet disimpan dalam suhu ruangan yakni nol jam (T0), setengah jam (T1), dan satu jam (T2). Motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa dicatat sesuai waktu penyimpanan.

Data dianalisis dengan ANAVA dua arah, bila terdapat perbedaan yang nyata analisis dilanjutkan dengan Uji Duncan dengan tarif signifikansi 5 %. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada kombinasi perlakuan pencucian spermatozoa dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu, tetapi faktor kecepatan (P) dan faktor waktu penyimpanan (T) berpengaruh sangat nyata pada motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa dimana motilitas tertinggi dicapai pada perlakuan P0 dengan rata-rata $63,22 \pm 5,164$; P1 dengan rata-rata $63,65 \pm 4,752$ dan P2 dengan rata-rata $63,28 \pm 4,474$. Motilitas terendah diperoleh pada perlakuan P3 dengan rata-rata $59,50 \pm 2,874$ yang berbeda nyata dengan perlakuan P0, P1, P2. Daya tahan hidup tertinggi diperoleh pada perlakuan P0 ($68,29 \pm 3,848$) dan berbeda nyata dengan P1, P2, P3 yang menghasilkan daya tahan hidup terendah yakni P1 ($64,13 \pm 3,705$); P2 ($63,78 \pm 3,865$); P3 ($63,36 \pm 4,452$). Untuk faktor T motilitas dan daya tahan hidup tertinggi dicapai pada interval penyimpanan nol jam atau 29 menit yakni $66,80 \pm 3,706$ dan rata-rata daya tahan hidup $68,58 \pm 3,527$.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, Dzat Yang Maha Pengasih, Maha Penyayang atas limpahan berkah dan rahmat yang diberikan kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Skripsi merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Perkembangan peternakan berkaitan erat dengan produktivitas ternak, produktivitas ternak dapat ditingkatkan melalui bioteknologi reproduksi antara lain embryo transfer dan fertilisasi *in-vitro*. Domba sebagai ternak alternatif selain ternak besar dan unggas memiliki potensi besar dalam bidang ini , karena domba merupakan ternak yang memiliki *calving interval* dan interval generasi yang lebih singkat dibandingkan ruminansia besar, oleh sebab itu aplikasi bioteknologi reproduksi pada domba perlu dikembangkan

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

- ❖ Bapak Prof. Dr. Ismudiono M.S., Drh selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- ❖ Para dosen penguji yang telah memberikan bimbingan dan saran yang sangat bermanfaat sehingga tulisan ini menjadi lebih baik.
- ❖ Ibu Indah Norma Triana, M.Si., Drh selaku dosen pembimbing pertama yang telah memberikan saran, petunjuk, bimbingan kepada penulis.
- ❖ Bapak Moh. Sukmanadi, M.Kes, Drh selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan saran dan petunjuk kepada penulis.

- ❖ Ibu Suherni Susilowati, M.Kes., Drh atas saran, petunjuk, bimbingan yang diberikan pada penulis selama penelitian.
 - ❖ Ibu, Bapak, kakak (Tuti F), adik-adik (Nurul A dan Asti L) yang telah memberikan dukungan berupa semangat, perhatian, doa, kasih sayang, “pelatihan mental”, serta berbagi keceriaan dan kebahagiaan kepada penulis.
 - ❖ Sari, Yulia, Yosa, Nurul, Anik , Mbak Tika serta teman- teman angkatan 2001 yang selalu memberikan semangat dan kritikan kepada penulis untuk segera menyelesaikan tulisan ini.
 - ❖ Bu Surti dan Pak Slamet yang telah membantu penulis selama penelitian.
- Akhirnya ,penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi perbaikan tulisan ini.

Sidoarjo, Juni 2005

Penulis

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Menurut Hardjopranto (1987) yang dikutip oleh Suhartati (2003) menyatakan bahwa produktivitas ternak dapat ditingkatkan melalui tata laksana dan efisiensi reproduksi. Bioteknologi reproduksi akhir-akhir ini menjadi topik yang sangat penting dalam meningkatkan produktivitas ternak. Salah satu bioteknologi reproduksi yang telah terbukti meningkatkan produktivitas ternak adalah inseminasi buatan dan *transfer embryo* (TE). Peningkatan produktivitas khususnya melalui penerapan TE, sangat bergantung pada ketersediaan embrio yang berkualitas unggul secara berkesinambungan. Upaya pengadaan embrio dengan kualitas unggul, seragam, jumlah yang banyak dan dalam waktu relatif singkat dewasa ini dapat dilakukan melalui penerapan teknologi pembuahan *in-vitro* (FIV) (Fitri, 2002).

Menurut Triwulaningsih (1992) yang dikutip oleh Hernawati dkk^b (2000) menyatakan pembuahan secara *in-vitro* adalah salah satu cara untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh dengan cepat dan murah. Melalui teknik ini kita tidak perlu memelihara donor yang harganya mahal dan biaya pakannya tinggi. Dalam pelaksanaan program *fertilisasi in-vitro* diperlukan spermatozoa hidup dengan motilitas progresif. Spermatozoa yang akan digunakan untuk *fertilisasi in vitro* terlebih dahulu harus dipisahkan dari plasma semen dan bahan-bahan yang bersifat racun pada sperma dengan metode tertentu (Fitri, 2002).

Menurut Harrison dan White (1972) menyatakan pencucian spermatozoa biasanya dilakukan di laboratorium menggunakan media fisiologis dengan pH netral . Pencucian semen bertujuan untuk memisahkan spermatozoa dengan plasma semen. Plasma semen mengandung bahan-bahan atau faktor-faktor yang dapat merusak daya pembuahan sel spermatozoa. Faktor-faktor ini tampaknya mengganggu reaksi dan pola pergerakan akrosom serta mencegah proses penempelan sel mani ke zona pelucida (Hinting, 1989).

Pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi merupakan cara yang paling mudah dalam proses kapasitasi secara *in-vitro*, namun seberapa besar gaya sentrifugasi yang tidak mengakibatkan kerusakan pada spermatozoa dan memudahkan terjadinya kapasitasi secara *in-vitro* belum banyak diketahui (Sardjito, 2003).

Medium yang digunakan untuk fertilisasi *in-vitro* antara lain *Brackett and Oliphant* (BO), *Earle's Balance Salt Solution* (EBSS), *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan medium BO yang ditambah kafein. Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dalam medium isotonis yang mengandung albumin serum sapi pada kecepatan dan waktu tertentu dapat meningkatkan motilitas spermatozoa (Fitri,2002).

Menurut Yanagimachi (1986) yang dikutip oleh Fitri (2002) menyatakan penambahan media EBSS dan BO dapat meningkatkan motilitas spermatozoa kambing menjadi 70-90% dalam waktu dua sampai empat jam, selain itu penyimpanan spermatozoa pada media EBSS dan BO akan memberikan kesempatan

pada sel spermatozoa untuk mengadakan perubahan fisiologis yang lebih lazim disebut dengan kapasitasi. Setelah spermatozoa kambing mengalami proses kapasitasi, maka dapat meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa. Penggunaan sentrifugasi dalam medium isotonis masih berorientasi pada indikator motilitas spermatozoa. Agar kualitas fungsi spermatozoa memenuhi maka perlu diadakan penelitian terhadap daya tahan hidup spermatozoa setelah mengalami pencucian dengan berbagai kecepatan sentrifugasi.

Berdasarkan uraian tersebut, maka pada penelitian ini akan dipelajari pengaruh berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan dengan interval waktu tertentu terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian dapat dirumuskan beberapa permasalahan yang perlu diteliti yakni

1. Apakah pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan dengan interval waktu tertentu berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa domba?
2. Apakah pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan sentrifugasi berpengaruh dan penyimpanan dengan interval waktu tertentu terhadap daya tahan hidup spermatozoa domba?

1.3 Landasan Teori

Menurut Steptoe dan Edwards (1978) yang dikutip Hinting (1989) menyatakan bahwa keberhasilan pembuahan *in-vitro* tergantung pada inseminasi oosit dengan spermatozoa yang telah dicuci.

Dalam upaya meningkatkan angka *fertilisasi in vitro*, spermatozoa terlebih dahulu harus dipisahkan dari plasma semen dan bahan-bahan krioprotektan serta bahan-bahan lain yang dapat berpengaruh terhadap kualitas fungsional spermatozoa (Hunter,1995). Berger (1989) ,Cohen dkk (1985) seperti yang dikutip Hinting (1989) menyatakan bahwa plasma semen memuat bahan-bahan atau faktor yang dapat merusak daya pembuahan spermatozoa. Plasma semen dapat juga mengandung mikroorganisme yang mencemari sistem kultur dan juga limfosit yang menghasilkan sekresi beracun yang menghambat pembuahan.

Harrison dan White (1972) menyatakan bahwa pemisahan sel spermatozoa dan plasma semen dapat dilakukan dengan pencucian spermatozoa (*washing spermatozoa*). Pencucian dengan sentrifugasi sendiri penting untuk menghasilkan sedimen yang mengandung spermatozoa dengan motilitas yang tinggi, selain itu pencucian spermatozoa dengan penambahan sejumlah medeia pencuci yang berfungsi untuk menghilangkan faktor dekapasitasi dari seminal plasma (VanderVoort, 2004).

Mahaputra (1996) melakukan pencucian sperma beku sapi Madura yang sudah dicairkan dengan menggunakan sentrifugasi dalam medium yang mengandung BSA pada kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, sehingga dapat diperoleh jumlah spermatozoa motil 85-90 %.

Menurut Singh *et all* (1992) menyatakan bahwa semakin besar gaya sentrifugasi makin besar pula gesekan yang terjadi membantu mempercepatnya berlangsungnya kapasitas *in-vitro*. Peneliti lain menyebutkan pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi akan menurunkan aktivitas metabolisme spermatozoa dan berpengaruh terhadap membran plasmanya (Jones *and* Holt,1974).

Spermatozoa mamalia tidak bisa dengan segera membuahi sel telur saat memasuki saluran reproduksi betina, tetapi perlu mengalami perubahan fisiologik yakni kapasitas terlebih dahulu, yang mengambil waktu 1-6 jam (Hunter,1995). Parrish (1985) dan Choon-Keun (1991) yang dikutip Hernawati^a (1998) mengemukakan kapasitas dan reaksi akrosom terjadi dalam waktu yang singkat yakni satu jam pada media BO dengan penambahan kafein dan heparin.

Menurut Hardjopranto dan Hardijanto (1994) banyaknya sel spermatozoa yang mati dan abnormal sangatlah menentukan arti nilai suatu semen. Sel spermatozoa yang hidup memiliki lapisan lipoid pada dinding yang dapat melindungi masuknya zat warna ke dalam sel spermatozoa. Jadi pada sel spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna sedang pada sel spermatozoa yang telah mati karena rusak atau hilangnya lapisan lipoid tersebut, maka zat pewarna sangat mudah masuk ke dalam spermatozoa.

1.4 Tujuan Penelitian.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba.

1.5 Manfaat Penelitian.

Memberikan informasi mengenai pengaruh pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan dan penyimpanan selama interval waktu tertentu terhadap motilitas serta daya tahan hidup spermatozoa domba yang selanjutnya diaplikasikan dalam program fertilisasi in vitro.

1.6 Hipotesis Penelitian.

Berdasarkan landasan teori dan rumusan masalah diatas, dapat dikemukakan hipotesis sebagai berikut:

1. Terdapat perbedaan persentase motilitas spermatozoa domba setelah mengalami pencucian dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu.
2. Terdapat perbedaan persentase daya tahan hidup spermatozoa domba setelah mengalami pencucian dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Domba

Domba merupakan ternak ruminansia kecil yang sudah memasyarakat, dan di negara kita distribusinya hampir merata. Domba memiliki kemampuan untuk hidup di macam lingkungan dan umumnya ras domba yang hidup di daerah tropis memiliki ekor yang gemuk, yang berguna untuk menyimpan cadangan energi. Domba memiliki keunggulan dibandingkan ternak lain, yaitu mereka mampu memakan pakan yang berkualitas rendah terutama berserat tinggi yang tidak dapat dimakan oleh manusia, hewan non ruminan, unggas dan babi. Selain itu domba mampu mengkonversi pakan yang berkualitas rendah menjadi produk yang bermanfaat seperti susu, daging dan wool. Domba merupakan investasi yang menguntungkan karena biaya pemeliharaan domba lebih rendah, kebutuhan pakan lebih sedikit, resiko kerugian relatif rendah dan mudah dijual ketika sedang membutuhkan uang. Manfaat lain berternak domba adalah memiliki tingkat reproduksi yang tinggi, pada kondisi yang mendukung seekor domba mampu melahirkan anak tiap delapan bulan dan interval generasi (waktu yang dibutuhkan seekor betina untuk melahirkan anak domba, sampai anak domba tersebut menjadi induk) adalah kurang dari dua tahun. Sedangkan untuk ternak besar *calving interval* sekitar dua tahun dan interval generasi sekitar empat tahun. (Gatenby,1991). Domba dan kambing sering digunakan sebagai hewan percobaan tetapi biasanya hanya dalam jumlah kecil. Alasan memelihara domba dan

kambing di laboratorium adalah sebagai sumber sel darah merah untuk media bakteriologis dan produksi antibodi. Tetapi hewan –hewan ini dapat digunakan juga untuk percobaan –percobaan dalam fisiologi , farmakologi, endokrinologi, biokimia, dan untuk studi terapan dalam fisiologi dan nutrisi hewan memamah biak.(Smith dan Soesanto,1988).

Menurut Robinson (1971) yang dikutip Juliana (2004) paling sedikit ada empat type domba yang berbeda di Indonesia yaitu domba Priangan, domba ekor gemuk, domba Garut dan domba Teksel.

Domba ekor gemuk dijumpai di Jawa Tengah dan Jawa Timur serta beberapa pulau lain di bagian tengah dan timur Indonesia .domba ekor gemuk memiliki tubuh yang sedikit lebih besar domba ekor kurus, woolnya sedikit, berwarna putih serta memiliki ekor yang panjang dan gemuk (Gatenby.1991).

2.2 Reproduksi domba jantan

Sistem reproduksi domba jantan terbagi menjadi tiga besar yaitu alat kelamin primer berupa gonad jantan atau testis, alat kelamin sekunder yang terdiri dari saluran alat kelamin dan kelenjar pelengkap.

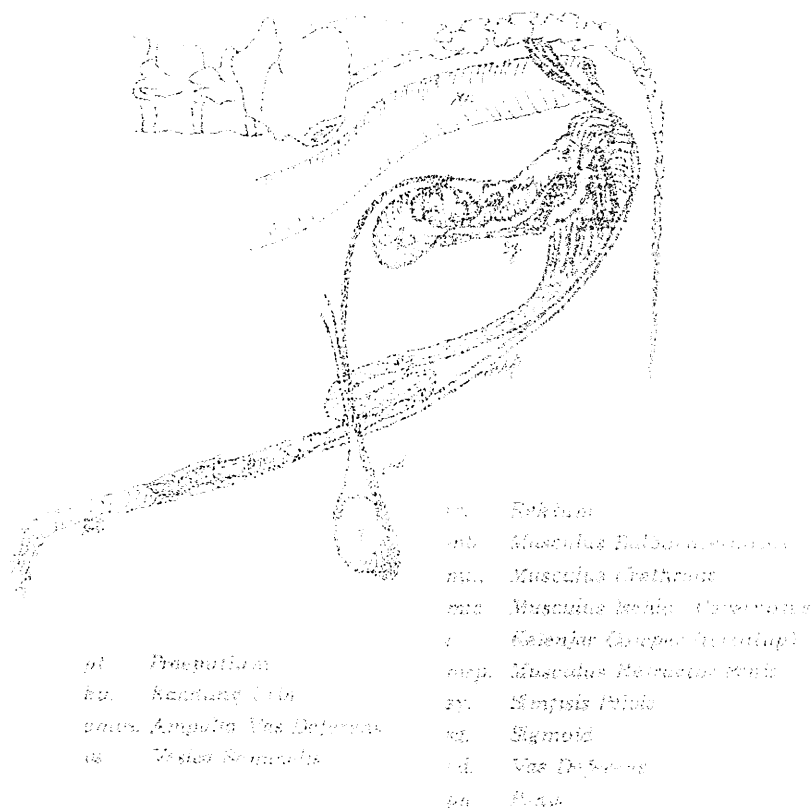
Testis terbungkus dalam kantong skrotum berisi dua lobi-lobi testis yang masing-masing mengandung 1 testis (Ismudiono 1999).

Epididimis terletak di belakang testis melekat pada tunica albugenia merupakan saluran berkelok-kelok yang menghubungkan testis ke arah luar. Epididimis terdiri dari tiga bagian yakni caput epididimis, corpus epididimis, dan cauda epididimis. Epididimis merupakan tempat produksi dengan fungsinya yang

khas untuk menghasilkan sperma yang matang dan fungsional. Pada domba jantan epididimis menampung 40×10^9 sampai 60×10^9 spermatozoa (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Duktus deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis. Dindingnya mengandung otot polos yang berperan dalam pengangkutan spermatozoa, diameter vas deferens 2 milimeter, berjalan sejajar dengan corpus epididimis, dekat dengan kepala epididimis, vas deferens menjadi lurus dan bersama-sama dengan pembuluh darah, limfe dan saraf membentuk funikulus spermatikus yang berjalan melalui canalis inguinalis ke dalam cavum abdominal. Kelenjar asesoris bervariasi antara spesies dalam hal bentuk dan ukurannya, yang termasuk kelenjar pelengkap adalah vesikula seminalis atau vesikularis, kelenjar prostata dan kelenjar bulbouretralis atau Cowper's. Pada domba dan kambing kelenjar ini tidak mempunyai corpus, hanya ada pars disseminata yang berdifusi dengan sebagian besar uretra pelvis. Uretra adalah saluran ekskretoris bersama urine dan semen. Uretra membentang dari daerah pelvis ke penis dan berakhir pada ujung glands penis sebagai orificium urethrae externa. Penis mempunyai tugas ganda yaitu pengeluaran urine dan peletakan semen dalam saluran reproduksi betina. Penis terdiri atas bagian akar, badan dan ujung yang berakhir pada glands penis. Penis membentang dari archus ischiadicus pelvis sampai daerah umbilical pada dinding ventral perut yang ditunjang oleh fascia penis dan kulit. Pada domba penis berukuran 5-7,5 cm dengan flexura sigmoid yang berkembang baik, diameter relatif kecil yaitu 1,5-2 cm. Pada glands penis terdapat penonjolan filiformis sepanjang 4-5 cm yang

disebut *proccesus urethrae* yang mengandung bagian terminal uretra (Ismudiono,1999).



Gambar 2.1: Saluran reproduksi domba jantan (Partodihardjo,1992)

2.3 Pubertas Domba Jantan

Pubertas atau dewasa kelamin ialah periode kehidupan makhluk jantan dan betina dimana proses –proses reproduksi mulai terjadi yang ditandai oleh kemampuan pertama kalinya memproduksi benih. Kejadian pubertas didasari oleh penyesuaian secara bertahap antara peningkatan gonadotropik dan kemampuan gonad secara simultan dalam steroidogenesis dan gametogenesis. Masa pubertas

domba jantan merupakan umur dimana domba menghasilkan sel mani dan diejakulasikan untuk pertama kali. Ejakulasi pertama terjadi pada umur empat sampai enam bulan, sedangkan kematangan seksual merupakan periode dimana hewan mencapai puncak kemampuan dalam memproduksi spermatozoa terjadi pada umur 18 bulan. (Lindsay et al, 1982; Ismudiono, 1999).

Pubertas domba sangat dipengaruhi oleh manajemen dan pakan. Pada pemeliharaan domba secara intensif, domba dapat mencapai pubertas pada umur empat bulan dan umur dua tahun pada pemeliharaan secara ekstensif (Gatenby, 1991).

2.4 Semen domba

Sebelum kopulasi, sperma akan bercampur dengan cairan yang selanjutnya akan menjadi semen yang diejakulasikan dalam saluran reproduksi domba betina (Gatenby, 1991).

Menurut Hardjopranjoto dan Hardijanto (1994) menyatakan semen merupakan sekresi kelamin jantan yang diejakulasikan dalam saluran alat kelamin betina waktu kopulasi, disamping itu dapat ditampung dengan beberapa cara untuk keperluan inseminasi buatan. Volume per ejakulat pada domba sekitar 0,5-2,0 cc dengan konsentrasi spermatozoa sebanyak 800-4000 juta/cc. Semen pada domba mengandung sel spermatozoa sebanyak sepertiga bagian dan sisanya adalah cairan asesoris yang banyak mengandung fruktosa dan asam sitrat yang semuanya berasal dari kelenjar vesikula seminalis. Plasma semen domba banyak

mengandung *glycerophosphokoline*, serta asam sitrat dalam jumlah besar ,namun asam sitrat ini hanya sedikit digunakan oleh spermatozoa .

2.5 Spermatogenesis

Menurut Ismudiono (1999) sel spermatozoa dihasilkan di dalam tubuli seminiferi atas pengaruh *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) sedangkan testosteron diproduksi oleh sel-sel interstitial Leydig oleh pengaruh *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH) atau *Luteinizing Hormone* (LH) (Ismudiono, 1999).

Hardjopranjoto (1995) membagi proses spermatogenesis (pembentukan sperma) menjadi empat tahap:

1. Tahap proliferasi, dimulai pada testis sejak lahir sampai beberapa waktu setelah lahir. Bakal sel kelamin pada lapisan basal tubulus seminiferus melepaskan diri dan membelah secara mitosis sampai dihasilkan banyak sel spermatogonia (tipe A dan B).
2. Tahap tumbuh, spermatogonia membagi diri secara mitosis sebanyak empat kali sehingga dihasilkan 16 spermatosit primer ($2n^1$). Lama periode ini 15-17 hari.
3. Tahap menjadi masak, terjadi pembelahan sel spermatosit primer menjadi sel spermatosit sekunder dan jumlah kromosom menjadi setengahnya (n). Periode ini berjalan selama 15 hari. Beberapa jam kemudian spermatosit sekunder akan menjadi spermatid.

¹ $2n$ =diploid; pada domba jumlah kromosom diploid adalah 56

4. Tahap transformasi, proses metamorfosis seluler sel spermatid menjadi sel spermatozoa. Periode ini membutuhkan waktu 15 menit.

Perubahan ini termasuk pembentukan akrosom, kepala, bagian tengah ekor spermatozoa, dan bagian-bagiannya dari berbagai materi seluler (Frandsen *et al.*, 2003)

2.6 Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel kelamin jantan yang dihasilkan dalam tubuli seminiferi testis atas pengaruh *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) melalui proses spermatogenesis (Ismudiono, 1999).

Spermatozoa merupakan sel benih yang tumbuh dan berkembang di dalam tubulus seminiferus Testis melalui proses spermatositogenesis. Berbentuk memanjang, dengan satu ujung meruncing dan ujung lain melebar yang berbentuk lonjong, seluruh bagian diselubungi oleh membran sel. Panjang keseluruhan dari kepala sampai ekor berkisar 50-70 mikron dengan berat satu sel spermatozoa $2,0-2,5 \times 10^{-10}$ gram. Panjang kepala kira-kira 8,0-10,0 mikron, lebar 4,0-4,5 mikron, leher 1 mikron. badan 8-10 mikron (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Partodihardjo (1992) menyatakan sperma sebagian besar terdiri dari:

1. *Deoxyribonucleoprotein* yang terdapat dalam nucleus dari kepala spermatozoa. Nukleoprotein dalam inti sperma semua spesies, terbentuk oleh asam deoxyribonucleoprotein yang terikat pada protein
2. *Muco-polysaccharide* yang terikat pada molekul –molekul protein terdapat di –acrosome, yaitu bagian pembungkus kepala, Polysaccharide yang

terdapat pada akrosome ini mengandung 4 macam gula-gula. Yakni fruktosa, manosa, galaktosa, dan heksosa .

3. Plasmalogen atau lemak aldehidogen yang terdapat di bagian leher, badan dan ekor dari sperma merupakan bahan yang dipergunakan oleh sperma itu untuk respirasi endogen.
4. Protein yang menyerupai kreatine yang merupakan selubung tipis yang meliputi seluruh badan, kepala dan ekor . protein ini banyak terdapat pada membran sel-sel dan fibril-fibrilnya. Mungkin protein yang banyak mengandung S (sulphur) ini bertanggung jawab terhadap elastisitas permukaan sel sperma .
5. Enzim dan koenzim. Sperma banyak mengandung bermacam-macam enzim dan koenzim untuk hidrolisis dan oksidasi.

Pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom, sebagai suatu struktur yang mempunyai topi yang menutupi dua pertiga bagian anterior kepala dan mengandung beberapa enzim proteolitik seperti akrosin, hyaluronidase, dan *corona penetrating enzym* (CPE) yang sangat penting untuk penetrasi sel telur pada proses pembuahan.

Sardjito (2003) lebih jauh menyatakan bahwa akrosom mempunyai peranan yang sangat penting, karena mengandung enzim yang esensial untuk proses fertilisasi, enzim tersebut antara lain ;

- Enzim Hyaluronidase yang berfungsi untuk menguraikan cumulus oophorus dan dengan enzim tersebut memungkinkan spermatozoa menembus lapisan terluar dari sel telur.

- Enzim Penetrasi (CPE) yang berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada corona radiata, dengan adanya enzim ini corona radiata hancur.
- Enzim akrosin yang berguna pada proses penembusan spermatozoa melalui zona pelucida
- Enzim ATP-ase yang mempengaruhi akrosom untuk mengadakan kapasitas

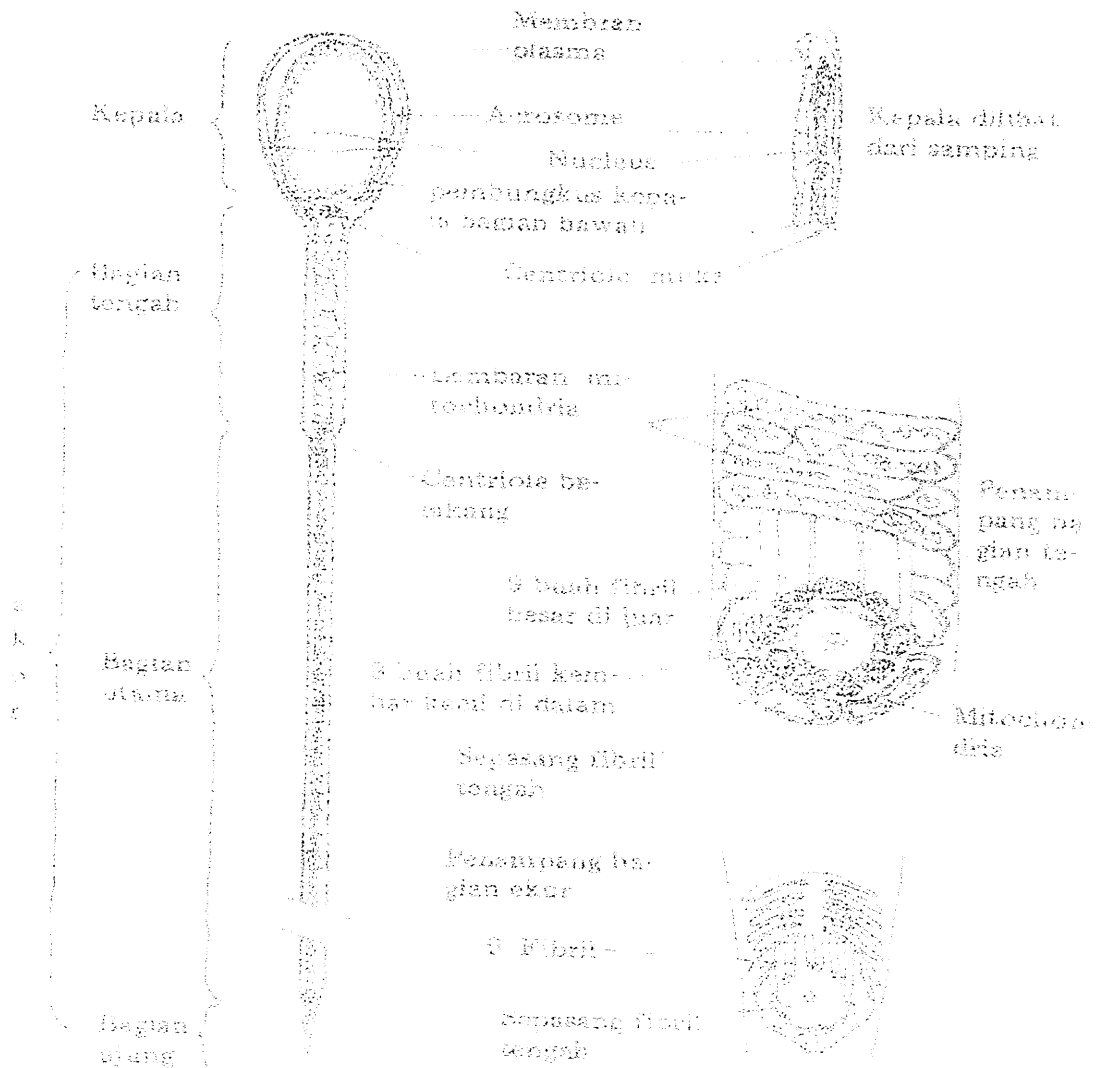
Setengah bagian posterior kepala sel spermatozoa dibungkus selubung inti posterior. Perbedaan struktur selubung akrosom dan selubung inti posterior menyebabkan perbedaan afinitas terhadap zat warna (Lindsay et al., 1982).

Perbedaan afinitas zat warna antara sel spermatozoa yang mati dan hidup dipergunakan untuk menghitung jumlah spermatozoa yang hidup secara obyektif. Zat warna yang dapat digunakan adalah eosin atau eosin negrosin . Pada waktu semen segar dicampur dengan zat warna, sel-sel spermatozoa yang hidup atau sedikit sekali menghisap warna, sedangkan sel – sel yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas meninggi sewaktu mati .Zat warna eosin negrosin akan mewarnai spermatozoa menjadi merah atau merah muda ,sedangkan spermatozoa yang hidup tetap tidak berwarna. Zat warna negrosin memberi latar belakang biru – hitam. Zat warna ini akan tetap stabil selama satu tahun.

Bagian tengah sel spermatozoa adalah pusat tenaga sebab mitokondria terpusat di daerah ini dalam bentuk heliks. Mitokondria mengandung sistem yang menggerakkan siklus asam trikarboksilat (siklus Krebs), transport elektron dan fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP untuk gerakan

sel spermatozoa. Selain itu bagian ini tersusun berkas fibril filamen ekor dan dibungkus kelopak halus yang mengandung bahan lipoid. Ujungnya berakhir di cincin centrio yang merupakan tempat tumbuhnya ekor. Untuk menghubungkan kepala dengan badan terdapat bagian leher dengan panjang $\pm 1\mu\text{m}$. Pada bagian leher terdapat berkas fibril yang terbentuk dari dua cincin yang masing-masing terdiri dari sembilan fibril (Salisbury and Van Demark, 1985).

Menurut Hardjopranjoto(1995) dan Fitri (2002) ekor spermatozoa merupakan bagian terpanjang yaitu 35-45 mikron dengan diameter 0,4-0,8 mikron, terdiri dari empat bagian yakni leher (*mid piece*) ekor bagian atas (*principle piece*), ekor bagian tengah (*middle piece*) dan ekor bagian ujung (*end piece*), ekor bagian atas merupakan bagian terpenting dari keseluruhan sel spermatozoa, karena disini terletak mitokondria yang merupakan pusat metabolisme yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphosphat* (ATP) untuk kehidupan dan pergerakan spermatozoa. Bagian ini juga mengandung sentriol proksimal dengan pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian tengah terletak antara *principle piece* dan *end piece* dengan diameter yang lebih kecil dari *middle piece*. Bagian ujung ekor merupakan bagian terpanjang dan berfungsi untuk menggerakkan spermatozoa ke depan. Pergerakan dari ekor berfungsi untuk mendorong spermatozoa dalam media cair (Evans dan Maxwell,1988).



Gambar 2.2 : Spermatozoa dan bagian-bagiannya (Toelihere, 1979^a)

2.7 Metabolisme Spermatozoa

Kurang tersedianya oksigen, maka kehidupan sel spermatozoa di dalam semen sangat bergantung pada besarnya kadar fruktosa sebagai sumber energi. Fase pertama dalam proses fruktolisis terjadi perubahan enzimatik dari *fosfotriose* menjadi *fosfogliceric acid* dan terjadi reduksi yang terus menerus terjadi dari NAD *Nikotinamid adenein dinukletida* (NAD) menjadi *Nikotinamide adeneine*

dinuklitide hydrogenase (NADH). Pada peristiwa oksidasi ini dibutuhkan fosfat organik untuk membentuk *adenosine triphosphate* (ATP) yaitu bentuk energi pada pemecahan *fosfoglyceric acid* menjadi *fosfopiruvic acid* yang membentuk juga asam piruvat dan ATP. Pada peristiwa oksidasi reduksi ke II, NADH dioksidasi menjadi NAD dan asam piruvat direduksi menjadi asam laktat. Pemecahan ATP berguna sebagai sumber energi untuk kontraksi fibril-fibril sel spermatozoa. Jumlah ATP yang tersedia tergantung dari kenormalan metabolisme fruktosa. Ada korelasi positif antara motilitas sel spermatozoa dan kecepatan fruktolisis. Jika spermatozoa dipisahkan dari plasma semen dengan pemusingan atau mencuci dengan cairan fisiologis, ternyata proses fruktolisis anaerobik tidak terjadi lagi. Fruktolisis dapat terjadi lagi bila ditambah cairan asesoris atau gula glukosa, manosa, fruktosa. Walaupun seluruh persediaan fruktosa di dalam semen diambil dengan pemusingan dan pencucian ternyata sel spermatozoa masih dapat bertahan hidup dan mengambil oksigen dengan kecepatan antara 100-200 ul O₂ setiap 10⁶ sel spermatozoa /jam pada suhu 37° celcius. Kecepatan pengambilan oksigen ini meningkat bila di dalamnya ditambahkan fruktosa, manosa, asam laktat, piruvat, asetat, gliserol dan sorbitol yang berkadar tinggi (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

2.8 Motilitas Spermatozoa

Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya gerakanya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan. Motilitas spermatozoa di dalam suatu contoh semen ditentukan

secara keseluruhan atau sebagai rata – rata dari populasi spermatozoa. Terhadap semen segar yang baru ditampung dan belum diencerkan ,dilakukan pemeriksaan gerakan massa dan gerakan individu (Toelihere,1979^a)

Spermatozoa dalam suatu kelompok mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersama sama ke satu arah merupakan gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat tergantung dari konsentrasi sperma hidup di dalamnya. Gerakan massa dilihat dengan jelas di bawah mikroskop dengan pembesaran kecil (10 kali10). Berdasarkan penelitian gerakan massa , kualitas semen dapat ditentukan sebagai berikut (a) sangat baik (+++) , terlihat gelombang –gelombang besar, banyak gelap dan aktif bagaikan gumpalan awan hitam, (b) baik (++) bila terlihat gelombang- gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas, dan bergerak lamban (c) lumayan (+) jika tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan – gerakan individual aktif progresif (d) buruk necrospermia atau 0 bila hanya sedikit atau tidak ada gerakan individual (Toelihere, 1993^b).

Untuk gerakan individu, spermatozoa diamati pada mikroskop dengan pembesaran 400 kali pada gelas obyek yang telah diberi satu tetes NaCl fisiologis diatas gelas obyek kemudian ditambahkan satu tetes kecil semen dan diaduk dengan homogen, lalu gelas obyek ditutup dengan gelas penutup. Penilaian kualitas semen berdasarkan motilitas sebagai berikut

P = gerakan progresif ,merupakan gerakan aktif maju ke depan

O(V) =gerakan oscilatoris atau vibratoris, merupakan gerakan ayun, berputar dan lamban.

C =gerakan circular, merupakan gerakan melingkar

r =gerakan reverse, merupakan gerakan mundur.

m =Necrospermia, yaitu tidak ada gerakan .

(Hardijanto dkk,2003)

Energi yang digunakan untuk motilitas sperma di dapat dengan cara memanfaatkan cadangan *Adenosin Triphosphat* yang tersimpan di intra seluler. Pemanfaatan dari ATP diatur secara endogen oleh tingkatan pada siklus Amino Mono Phosphat (AMP) (Hafez,2000).

Kecepatan bergerak spermatozoa dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan suhu. Pada suhu 37° Celcius, kecepatannya 100 mikron/detik. Dalam inseminasi buatan , pergerakan spermatozoa menunjukkan kemampuan membuahi sel telur (Poernomo dkk, 2002). Motilitas telah sejak lama dikenal sebagai alat untuk memindahkan spermatozoa melalui saluran reproduksi hewan betina. (Bearden dan Fuquay, 1992)

Sebelum spermatozoa bisa menembus pembungkus sel telur (sel corona dan sel cumulus) dan khususnya melalui membrana pelindung sel telur (zona pelucida), spermatozoa itu harus mengalami perubahan fisiologis yang dapat meningkatkan motilitas dan kemampuan melepaskan enzim proteolisis dari bagian akrosom di kepalanya. Menurut definisi , perubahan fisiologi yang disebut dengan kapasitas ini terjadi selama spermatozoa berada dalam saluran kelamin betina (Hunter,1995). Roldan dan Gomendio (1992) dan Yanagimachi (1994) yang dikutip oleh Sardjito (2003) menyatakan bahwa proses kapasitas *in- vitro* merupakan salah satu tahapan penting untuk menentukan keberhasilan produksi embrio secara in-vitro. Selama kapasitas ini terjadi peningkatan konsentrasi ion

Ca²⁺ intra seluler yang sangat dibutuhkan untuk menembus dinding tuba Fallopii. Peranan kapasitas ini sangat penting dalam meningkatkan motilitas (gerak progresif) spermatozoa menjadi lebih aktif untuk mengadakan penetrasi ke dalam cumulus oophorus dan mempersiapkan diri guna mempersiapkan reaksi akrosom sehingga mampu membuahi sel telur.

2.9 Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Kemampuan sel spermatozoa untuk tetap aktif bergerak setelah inkubasi pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar normal setelah disimpan pada suhu yang rendah disebut ketahanan hidup. Seringkali dalam satu seri sample semen dari konsentrasi sel spermatozoa yang sama, dengan sel spermatozoa yang bebas dari abnormalitas morfologik dan memiliki motilitas yang mula-mula sama, menunjukkan perbedaan besar dalam kemampuan sel untuk mempertahankan hidupnya dalam penyimpanan yang tidak diencerkan (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Spermatozoa sangat aktif dan tahan hidup lama pada sekitar pH 7. Spermatozoa domba dan sapi menghasilkan asam laktat dalam jumlah tinggi dari metabolisme fruktosa sehingga penting untuk menambahkan unsur –unsur penyanggah atau buffer ke dalam medium untuk mempertahankan pH . Spermatozoa tetap hidup untuk waktu lama di dalam media isotonik . Pada kondisi hipertonik ataupun hipotonik spermatozoa akan cepat rusak (Toelihere ,1979^a)

Penentuan persentase spermatozoa hidup dapat dilakukan dengan cara meneteskan satu titik zat warna dan satu titik semen diatas gelas obyek kemudian

secepat mungkin kedua larutan tersebut dicampur hingga homogen kemudian dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan pada nyala api. Pengerjaan ini harus kurang dari 15 detik. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan dan penghitungan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, terutama di daerah *post-nuclear cups*. Sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna dari zat warna yang dipakai . Sedangkan sel spermatozoa yang hidup tetap jernih (Hardijanto dkk, 2003).

Pada spesies yang plasma semennya mengandung fruktosa dalam jumlah cukup di seluruh bagian semen, proses fruktolisis anaerob membantu spermatozoa tetap hidup dalam lingkungan yang tidak ada oksigen. Ketika spermatozoa dipisahkan dari plasma semen misalnya melalui pencucian atau sentrifugasi, fruktolisis anaerobik tidak dapat dilakukan, kecuali plasma semen disimpan atau diganti dengan gula lain yang mudah untuk dipecah seperti fruktosa, manosa, glukosa. Kemampuan spermatozoa untuk mendegradasi gula seperti fruktosa, manosa, dan glukosa ini akan menginisiasi beberapa reaksi enzimatik yang dikenal dengan enzim hexokinase. Enzim ini akan mengkatalisis dan mentransfer *Adenosin Triphosphate*. *Adenosin Triphosphate* adalah unsur pokok dalam spermatozoa dan merupakan koenzym yang penting untuk kehidupan sel spermatozoa (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

2.10 Membran Spermatozoa

Lapisan yang menyelimuti keseluruhan spermatozoa dikenal dengan membran plasma (Hafez, 2000). Membran ini terdiri dari dua lapis lipoprotein yang komposisinya terdiri dari 52 % protein, 40 % lipid, dan 8 % karbohidrat. Susunan dari membran spermatozoa adalah kepala lapisan lipoprotein hidrofilik membentuk permukaan bagian kepala bagian luar dan lapisan hidrofobik membentuk kepala bagian dalam. Lipid merupakan komponen utama yang bertanggung jawab untuk mengatur keadaan cair dari membran *lipid bilayer*, serta perubahan komposisi dari plasma membran spermatozoa, yakni saat spermatozoa mengalami pendewasaan di epididimis sampai terjadinya kapasitasi di saluran reproduksi betina. Komposisi lipid pada membran spermatozoa terdiri dari kolestrol, sphingomyelin, fosfolipid dan lain-lain. Lipid pada membran spermatozoa yang berperan dalam proses pengenalan sel spermatozoa dengan ovum adalah sulfogalactocylglycerolipid, dan lipid yang lain yakni lysophosphatidicholine berguna untuk menstimulasi kemampuan membuahi spermatozoa serta menginduksi perubahan komposisi dari zona pelucida sehingga memudahkan penggabungan antara spermatozoa dengan sel telur.

Kolestrol berfungsi untuk mengatur keadaan cair serta permeabilitas sel spermatozoa. Kolestrol keluar dari membran selama proses kapasitasi sehingga terjadi pemasukan besar-besaran Ca^{2+} dari luar sel. Peristiwa peningkatan jumlah Ca^{2+} intraselular ini merupakan proses yang penting dalam reaksi akrosom (Mafruchati, 1997; Sanocka and Kurpiz, 2004).

2.11 Kapasitas dan Reaksi Akrosom

Chang dan Austin (1951) yang dikutip Hafez (2000) menyatakan bahwa sebelum spermatozoa mampu melakukan pengaitan dan penetrasi pada sel telur, spermatozoa harus bertempat tinggal dulu pada saluran reproduksi betina. Proses ini dikenal dengan istilah kapasitas, proses ini tepatnya terjadi pada bagian isthmus dari oviduct. Komponen sperma di bagian permukaan bermodifikasi atau dipindahkan oleh sekresi cairan genital yang mengakibatkan lapisan *phospholipid bilayer* menjadi tidak stabil hal ini mempermudah terjadinya reaksi akrosom. Beberapa perubahan diantaranya penipisan kolestrol yang ada di permukaan spermatozoa, pengaktifan glycoamynoglycan serta perubahan ionik waktu spermatozoa melewati saluran reproduksi. Reaksi akrosom melibatkan penggabungan dari plasma membran spermatozoa dengan bagian terluar dari membran akrosom yang diikuti dengan penggelembungan secara luas dari seluruh segmen anterior akrosom.

2.12 Plasma Semen

Plasma semen adalah campuran sekresi dari epididimis, vas deferens, prostata, vesicula seminalis, dan kelenjar cowper; mengandung bermacam – macam zat organik , inorganik dan air. Unsur organik dalam plasma semen antara lain phosphorilcholine, *glycerophosphorrylcholine* (GPC), asam sitrat, fruktosa inositol, sorbitol, ergothieine, dan spermine. Sedang unsur inorganiknya adalah K, Ca dan bikarbonat .pH plasma semen adalah 7,0 dengan tekanan osmose yang sama dengan tekanan osmose darah (Partodihardjo,1992)

Fungsi utama plasma semen adalah sebagai suatu medium pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat dijalankan karena pada banyak spesies, plasma semen mengandung bahan-bahan penyanggah dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa baik yang dipergunakan secara langsung seperti fruktosa dan sorbitol, maupun secara tidak langsung seperti GPC (Ismudiono, 1999).

Semen domba jantan memiliki kadar GPC tinggi, zat ini bersifat stabil, GPC dipecah oleh enzim-enzim dalam saluran reproduksi betina, dari pemecahan itu di dapat energi yang dipergunakan sperma untuk mengarungi saluran reproduksi betina dan fertilisasi. Konsentrasi fruktosa dalam semen sapi, domba, dan kambing tinggi. Dalam semen jenis ternak ini diketahui bahwa fruktosa merupakan sumber energi yang terutama bagi spermanya. Pemecahan fruktosa oleh sperma untuk mendapatkan energi berlangsung melalui proses fruktolisis (Partodihardjo, 1992). Akan tetapi plasma semen mengandung substansi atau faktor yang dapat mengurangi atau mengganggu kemampuan fertilisasi dari spermatozoa. Faktor-faktor ini muncul serta mempengaruhi reaksi akrosom dan pola motilitas yang selanjutnya juga akan mempengaruhi *binding sperm* ketika akan mengadakan fertilisasi melalui zona pelucida. Plasma semen juga mengandung mikroorganisme yang dapat mengkontaminasi sistem jaringan dan limfosit yang menghasilkan toksin yang mampu mengakibatkan *block fertilisasi*. (Hinting, 1989).

Di samping itu pemberian plasma semen bebas spermatozoa secara langsung dalam *Tuba Fallopi* dapat menunda atau menghambat proses fertilisasi

dan juga berpengaruh buruk terhadap membran sel telur. Konsisten dengan pengamatan ini sejumlah percobaan menunjukkan bahwa suspensi spermatozoa epididimis, terutama yang diambil dari cauda epididimis dapat menghasilkan fertilisasi dan perkembangan embrio dengan normal. Sehingga ini menunjukkan tidak adanya peran yang menentukan dari plasma semen atau penyusun spesifiknya dalam berbagai kejadian yang mendahului penggabungan gamet (Hunter, 1995).

2.13 Pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi

Semen merupakan cairan atau suspensi seluler semi gelatin yang terdiri dari spermatozoa dan sekresi dari organ asesoris saluran reproduksi jantan. Bagian cair dari suspensi ini terbentuk saat ejakulasi, disebut dengan plasma semen (seminal plasma). Berger dkk (1982); Cohen dkk (1985) seperti yang dikutip Hinting (1989) mengatakan bahwa plasma semen mengandung bahan – bahan atau faktor – faktor yang merusak daya pembuahan spermatozoa. Plasma semen juga mengandung mikroorganisme yang mencemari sistem kultur, dan juga limfosit yang menghasilkan sekresi beracun yang menghambat pembuahan.

Menurut Sears Weston (1992) yang dikutip oleh Sardjito (2003) menyatakan bahwa sentrifugasi merupakan metode pencucian spermatozoa. Pada proses ini digunakan alat pemusing (*sentrifuge*). Kerja alat ini berdasarkan pemutaran sampel sehingga bekerja gaya sentrifugal, yang mempunyai arti kata harfiah “lari dari pusat”. Gaya ini merupakan lawan dari sentripetal yang arti harfiahnya “mencari pusat”. Bila dalam suatu partikel yang kerapatannya berbeda

maka partikel akan bergerak sepanjang tabung dengan partikel yang lebih rapat akan menuju jari-jari yang lebih besar. Kondisi spermatozoa pada saat disentrifugasi dapat digambarkan sebagai berikut; berdasarkan pengaruh gaya sentrifugal spermatozoa akan terkumpul pada ujung tabung yang jaraknya terjauh dari poros putaran dengan posisi bagian ekor berada paling jauh dari poros putar sehingga ekor akan menempel pada dinding tabung. Hal ini akibat bagian ekor mempunyai kerapatan jenis yang lebih besar dibandingkan bagian kepala. Tekanan gaya sentrifugal yang paling besar akan berada pada bagian ekor (Sardjito 2003).

Berikut ini rumus dasar dari sentrifugasi yang disesuaikan dengan gaya gravitasi:

$$\text{Relative Centrifugal Force (G-value)} = (11.18) \times (r) \times (n \times n) \times 10^{-6}$$

Dimana r = radius sentrifugal pada cm (jarak antara pusat rotasi dan pusat objek)
;dan n = revolusi per menit (Mottershead Jos, 1999).

Jadi bila kecepatan sentrifugasi sebesar 1800 rpm jika di transformasi ke satuan G maka kecepatan tersebut sama dengan 363 G, 2400 rpm = 645 G, 2800 rpm = 878 G.

Sentrifugasi merupakan suatu tehnik untuk memisahkan seminal plasma dan krioprotektan yang terdapat pada sel spermatozoa. Setelah semen disentrifugasi, pelletnya dicuci dengan cara penambahan media dengan volume lebih banyak untuk menghilangkan bekas-bekas plasma semen dan bahan krioprotektan. Sehingga seminal plasma dan krioprotektan akan terkikis dari permukaan sel spermatozoa sebelum mencapai tempat fertilisasi (Hinting, 1989). Pemisahan plasma semen melalui penambahan sejumlah besar media pencuci

diperlukan untuk mengeliminasi faktor dekapasitasi dari plasma semen (VanderVoort, 2004).

Tujuan dilakukan sentrifugasi adalah membuang elemen plasma dari permukaan spermatozoa dan pada waktunya memungkinkan terjadi pembentukan vesikulasi pada membran kepala spermatozoa yang menghasilkan reaksi akrosom (Hunter, 1995).

Metode pencucian dengan sentrifugasi sebagai prosedur baku dalam program pembuahan *in vitro* terdiri atas pengenceran cairan semen 0,5 ml dengan 5 ml media fisiologis. Suspensi berupa cairan semen dan media fisiologis tersebut di sentrifugasi pada 1800 rpm selama 10 menit dalam suhu ruangan. Setelah proses sentrifugasi selesai biasanya dilanjutkan dengan proses *swim-up*. Spermatozoa yang motil bergerak atau berenang naik dari lapisan bawah menuju lapisan atas medium (Hinting, 1989). Prosedur sentrifugasi dan *swim-up* adalah salah satu cara untuk mendapatkan spermatozoa yang terbebas dari plasma semen, media pembekuan semen dan zat-zat pencemar lainnya, dengan angka motilitas yang memenuhi syarat untuk fertilisasi *in vitro* (Fitri, 2002).

2.14 Bahan Pencuci Spermatozoa

Bahan yang digunakan sebagai pencuci sperma antara lain adalah BO, medium Tyrode yang ditambah BSA dan laktat, EBSS, dan medium BO yang ditambah kafein. Protein seminal plasma semen dan makromolekul dalam media diluar spermatozoa memiliki pengaruh yang besar terhadap membran plasma.

Analisis mikroskop elektron menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara membran plasma spermatozoa dengan BSA (Wolfe et all, 2001).

Hasil penelitian Niwa et all yang dikutip Hernawati dkk,^b (2000) membuktikan bahwa penambahan kafein dalam media pada waktu pra inkubasi akan meningkatkan daya penetrasi spermatozoa terhadap oosit.

Selain itu menurut Myamoto dan Ishibashi yang dikutip Hafez (1993) dan Hernawati dkk,^b (2000) menyatakan bahwa reaksi akrosom memerlukan ion-ion kalsium. Kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa lebih cepat dalam media yang berisi serum albumin dalam bentuk BSA. Pada media EBSS dan BO selain banyak mengandung mineral, kalsium, kalium, magnesium juga mengandung glukosa , BSA dan piruvat 1 % sebagai bahan nutrisi spermatozoa serta asam amino yang sangat diperlukan bagi kelangsungan hidup spermatozoa .

Disamping itu media EBSS & BO dapat bertindak sebagai media buffer atau keseimbangan, sehingga spermatozoa mampu bertahan hidup lebih lama. Umumnya dalam media ditambahkan phenol merah sebanyak 1-20 mg/liter atau hepes. Heparin ini berfungsi sebagai buffer yang berfungsi menjaga pH media berkisar antara 7,2 dan 7,4. Penambahan NaCl diperlukan untuk menjaga osmolaritas yang tetap (Hernawati ^a,1998).

Heparin merupakan suatu kompleks dari mukopolysakarida sulfat atau molekul sangat asam karena banyak mengandung sulfat anion. Heparin dapat membantu kapasitasi spermatozoa namun mekanismenya belum jelas, tetapi diduga kemampuan spermatozoa dengan mengikat residu sulfat membantu kapasitasi, selain itu menurut Parrish (1985) seperti yang dikutip Cox et all (1994)

dan Hernawati (1998) menyatakan bahwa heparin dapat memindahkan faktor dekapasitasi seperti *calmodulin binding protein*, dengan demikian memudahkan kalsium masuk ke dalam sel dimana kalsium diperlukan saat proses kapasitasi.

Pada media BO selain terdapat sodium piruvat dan glukosa sebagai sumber energi juga kafein untuk meningkatkan motilitasnya terutama proses kapasitasi, sehingga dapat meningkatkan angka persentase daya tahan hidup dan motilitas spermatozoa (Rimayanti,1998).

Menurut Boatman (1990) yang dikutip oleh Utomo dkk^b, (2000) menyatakan bahwa kafein dapat membantu kapasitasi spermatozoa dengan cara memindahkan faktor dekapasitasi yang melekat pada membran plasma seperti *calmodulin binding protein*. Secara in-vivo kafein dapat memelihara dan menstimulasi motilitas , kapasitasi dan reaksi akrosom. Penambahan kafein dalam media EBSS pada spermatozoa golden hamster dapat meningkatkan persentase motilitas dan kualitas motilitas spermatozoanya.

Glukosa pada media EBSS & BO sebagai sumber energi melalui proses glikolisis akan diubah menjadi glukosa - 6- fosfat , selanjutnya menjadi fruktosa Kemudian melalui bantuan enzim difosfopyridin nukletid (DPN) fruktosa – 6 – fosfat akan diubah menjadi 1-3-difosfogliserat yang pada akhirnya menjadi asam monofosfat gliserin. Asam monofosfat gliserin menghasilkan sumber energi yang dipakai untuk pergerakan motilitas serta metabolisme (biosintesa) sel spermatozoa (Rimayanti dkk,1998)

BAB III
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Inseminasi Buatan dan laboratorium Kebidanan Veteriner, Bagian Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya mulai 31 Juli sampai dengan 2 September 2004.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Peralatan

Seperangkat vagina buatan dengan tabung penampung berskala , termos, alat sentrifus, tabung sentrifus, gelas beker, erlenmeyer, tabung reaksi, kertas pH indikator universal, rak tabung, gelas obyek, gelas penutup, alat penghitung, pipet Pasteur, spuit 3 cc dan 1 cc, mikroskop, pemanas Bunsen, lemari es , kertas tissue, aluminium foil, jam dinding,, termometer, alat tulis dan kertas untuk mencatat.

2.2 Bahan

Semen domba , medium pencuci BO, BSA dan kaffein 250 cc, larutan Eosin – Negrosin , vaselin , alkohol 70 % , air hangat , air kran .

3.3 Metode

3.3.1 Penampungan Semen Domba.

Penelitian ini menggunakan domba ekor gemuk sebanyak tiga ekor yang terdiri dari dua ekor domba jantan dan satu ekor domba betina sebagai pemancing. Sebelum dilakukan pengambilan semen keadaan fisik domba diamati terlebih dahulu. Selanjutnya vagina buatan dirakit dan pada bagian dalamnya diisi dengan air hangat bersuhu 41- 43° Celcius, dan pada bagian luar dari corong diolesi dengan vaselin gunanya sebagai pelicin sejauh setengah sampai sepertiga bagian . Bagian ujung belakang vagina buatan diberi plastik dan tabung berskala yang ditutup kertas agar sperma yang tertampung dalam tabung terlindung dari sinar matahari. Selanjutnya tabung berskala disimpan dalam suhu 5° Celcius. Kemudian sebelum pengambilan semen , dilakukan pencucian pada preputium domba menggunakan sabun dan air hangat, selanjutnya preputium dikeringkan. Untuk memperoleh kualitas air mani yang baik diusahakan merangsang libido pejantan dengan cara membiarkan pejantan menaiki betina tetapi dicegah agar jangan sampai terjadi ejakulasi terlebih dahulu. Rangsangan dilakukan sebanyak 2-3 kali,lalu penis yang terjulur karena ereksi diarahkan ke vagina buatan. Pengambilan semen dilakukan dengan cara memegang preputium domba tepat di pangkal penis dengan tangan kiri saat pejantan naik dan melakukan gerakan ejakulasi.

3.3.2 Pemeriksaan Semen

Semen yang diperoleh sebelum diberi perlakuan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume,

warna, pH, bau, konsistensi, konsentrasi. Sedangkan untuk pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, gerakan massa, gerakan individu, persentase hidup mati sperma.

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop, untuk gerakan individu, spermatozoa diamati pada mikroskop dengan pembesaran 400 kali pada gelas obyek yang telah diberi satu tetes NaCl fisiologis diatas gelas obyek kemudian ditambahkan satu tetes kecil semen dan diaduk dengan homogen, lalu gelas obyek ditutup dengan gelas penutup

Untuk penghitungan persentase hidup mati spermatozoa dilakukan dengan cara; meneteskan spermatozoa di obyek glass, selanjutnya ditambahkan larutan Eosin negrosin pada sperma kemudian dibuat preparat ulas dan difiksasi diatas api Bunsen. Sperma dihitung dengan mikroskop dengan perbesaran 400 kali, jumlah sperma yang dihitung sebanyak 200 sperma.

3.3.3 Pencucian Spermatozoa dengan Berbagai Kecepatan Sentrifugasi

Sebelum dilakukan pencucian mula-mula medium pencuci yakni BO, BSA, kafein dari lemari es di thawing terlebih dahulu atau disesuaikan suhunya. Kemudian dengan menggunakan spuit 1 cc semen yang memenuhi syarat pemeriksaan awal diambil diletakkan pada empat tabung sentrifus yang berbeda melalui dinding tabung .Pada masing masing tabung diberi label P0, P1 ,P2 ,P3 dengan perincian sebagai berikut:

1. Kontrol (P0). Semen sebanyak 0,25 cc tanpa medium pencuci disentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit.

2. Perlakuan I (P1). Semen sebanyak 0,25 cc dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berisi medium BO,BSA, kafein 3 cc kemudian disentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit.
3. Perlakuan II (P2). Semen sebanyak 0,25 cc dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berisi medium BO,BSA, kafein 3 cc kemudian disentrifus dengan kecepatan 2400 rpm selama 10 menit.
4. Perlakuan III (P3). Semen sebanyak 0,25 cc dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berisi medium BO,BSA, kafein 3 cc kemudian disentrifus dengan kecepatan 2800 rpm selama 10 menit.

3.3.4 Penyimpanan Spermatozoa Selama Interval Waktu Tertentu

Semen yang telah di sentrifus dengan kecepatan tertentu pada perlakuan P1, P2, P3 supernatnya dibuang sehingga yang tersisa dalam tabung hanya spermanya saja. Sedangkan untuk P0 setelah disentrifus supernatnya tidak dibuang. Selanjutnya semua tabung dari 4 perlakuan ini diletakkan pada gelas beker yang berisi air pada suhu ruangan, kemudian sperma diambil sedikit dengan menggunakan pipet Pasteur dan diletakkan pada dua gelas obyek yang berbeda, yang pertama untuk mengamati motilitas spermatozoa, dan yang kedua untuk pembuatan preparat ulas, untuk menghitung persentase hidup mati spermatozoa. Pengamatan ini dicatat sebagai pengamatan pada T0 (nol jam). Kemudian pellet disimpan dalam suhu ruangan selama tiga puluh menit lalu dilakukan pemeriksaan kembali dengan cara yang sama seperti pada pengamatan T0. Pengamatan ini dicatat sebagai pengamatan T1 (setengah jam). Hal yang sama dilakukan setelah

60 menit dan pengamatan ini dicatat sebagai pengamatan T2 (satu jam).Perlakuan ini dilakukan untuk semua tabung (P0,P1,P2,P3).

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan percobaan faktorial dengan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan (P0, P1, P2, P3) dan tiga sub perlakuan (T0, T1, T2) dan ulangan yang dipakai sebanyak enam.

3.5 Peubah yang Diamati

Dalam penelitian peubah yang diamati adalah

1. Persentase motilitas spermatozoa yang telah dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan yang disimpan pada interval waktu nol jam, setengah jam, satu jam.
2. Persentase hidup mati spermatozoa yang telah dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan yang disimpan pada interval waktu nol jam, setengah jam, satu jam.

3.6 Analisis Data

Data penelitian ini akan dianalisis dengan menggunakan menggunakan ANAVA dua arah dan bila terjadi perbedaan nyata diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak Duncan untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik (Kusriningrum,1989).

BAB IV
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Pemeriksaan Awal Semen Domba Segar Sebelum Perlakuan

Pemeriksaan semen domba segar meliputi pemeriksaan makroskopis pada tabel 1 dan mikroskopis ditunjukkan tabel 2.

Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis semen domba segar sebelum perlakuan

Pemeriksaan	Hasil
Volume	1,0-1,3 ml
PH	6,8-7
Bau	Khas
Warna	Krem
Konsistensi	Kental

Tabel 2. Pemeriksaan mikroskopis semen domba segar sebelum perlakuan

Pemeriksaan	Hasil
Konsentrasi	Densum
Gerakan Massa	(+++) <i>baik sekali</i>
Gerakan Individu	Progresif
Persentase daya tahan hidup	90-98%

4.2 Motilitas Spermatozoa Setelah Perlakuan

Sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung interaksi yaitu pencucian dengan berbagai kecepatan dan penyimpanan dengan interval waktu tertentu (P x T) ternyata tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P \geq 0,05$) sehingga tidak perlu dilakukan analisis lebih lanjut (Kusriningrum, 1990). Akan tetapi perlakuan pencucian spermatozoa dengan kecepatan (P) dan perlakuan penyimpanan spermatozoa (T) masing – masing berpengaruh sangat nyata terhadap motilitas spermatozoa. Untuk melihat P atau T manakah yang terbaik analisis dilanjutkan dengan uji Duncan .

a. Pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan sentrifugasi (P)

Tabel 3. Rata –rata motilitas spermatozoa domba setelah dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan	Rata-rata dan Standard Deviasi
Kontrol (P0)	65,22 ^a ± 5,1642
1800 rpm (P1)	63,65 ^a ± 4,752
2400 rpm (P2)	63,28 ^a ± 4,474
2800 rpm (P3)	59,50 ^b ± 2,874

superskripberbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$)

Berdasarkan uji jarak Duncan dengan signifikansi 5 % diketahui bahwa perlakuan P0 kontrol memberikan rata-rata motilitas yang tertinggi yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan P1 (kecepatan sentrifugasi 1800 rpm) dan P2 (kecepatan sentrifugasi 2400 rpm). Sedangkan perlakuan P3 (sentrifugasi 2800 rpm) memberikan pengaruh terendah terhadap motilitas spermatozoa.

b. Penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu tertentu

Tabel 4. Rata-rata kumulatif motilitas spermatozoa domba yang telah dicuci dan disimpan selama interval waktu tertentu

Perlakuan	Rata-rata dan Standart Deviasi
T0 (nol jam)	66,80 ^a ± 3,706
T1 (setengah jam)	62,83 ^b ± 3,728
T2 (satu jam)	59,11 ^c ± 3,555

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p \leq 0,05$).

Berdasarkan uji jarak Duncan dengan taraf signifikansi perlakuan penyimpanan dengan interval waktu T0 (nol jam atau 29 menit) memberikan motilitas tertinggi pada spermatozoa yang telah dicuci yang berbeda nyata dengan perlakuan T1 (penyimpanan selama setengah jam) dan perlakuan T2 (penyimpanan selama satu jam). Perlakuan penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu satu jam (T2) memberikan motilitas terendah.

4.3 Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung interaksi yaitu pencucian dengan berbagai kecepatan dan penyimpanan dengan interval waktu tertentu ($P \times T$) ternyata tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P \geq 0,05$ sehingga tidak perlu dilakukan analisis lebih lanjut (Kusriningrum, 1990). Akan tetapi perlakuan pencucian spermatozoa dengan kecepatan (P) dan perlakuan penyimpanan spermatozoa (T) masing –masing berpengaruh sangat nyata terhadap daya tahan

hidup spermatozoa. Untuk melihat P atau T manakah yang terbaik analisis dilanjutkan dengan uji Duncan.

a. Pencucian spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan sentrifugasi.

Tabel 5. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa domba setelah dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan	Rata –rata dan Standart Deviasi
Kontrol (P0)	68,29 ^a ± 3,848
1800 rpm (P1)	64,13 ^b ± 3,705
2400 rpm (P2)	63,78 ^b ± 3,865
2800 rpm (P3)	63,36 ^b ± 4,452

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$).

Uji jarak Duncan dengan taraf signifikansi 5 % memperlihatkan bahwa perlakuan kontrol P0 memberikan daya tahan hidup terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan P1 (kecepatan sentrifugasi 1800 rpm), P2 (kecepatan sentrifugasi 2400 rpm), P3 (kecepatan sentrifugasi 2800 rpm).

b. Penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu tertentu

Tabel 6. Rata-rata kumulatif daya tahan hidup spermatozoa domba yang telah dicuci dan disimpan selama interval waktu tertentu.

Perlakuan	Rata rata dan Standart Deviasi
T0 (nol jam)	68,58 ^a ± 3,3270
T1 (setengah jam)	64,84 ^b ± 2,7177
T2 (satu jam)	61,25 ^c ± 3,5575

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p \leq 0,01$)

Berdasarkan uji jarak Duncan dengan taraf signifikansi 5 %. perlakuan penyimpanan dengan interval waktu T0 (nol jam) memberikan daya tahan hidup terbaik pada spermatozoa yang telah dicuci yang berbeda nyata dengan perlakuan T1 (penyimpanan setelah setengah jam) dan perlakuan T2 (penyimpanan setelah satu jam). Perlakuan penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu satu jam (T2) memberikan daya tahan hidup terendah.

BAB V
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Motilitas Spermatozoa

Semen yang disentrifugasi akan memisahkan bagian padat atau pellet dengan bagian cair (plasma). Sentrifugasi dengan gaya 700 g pada semen sapi dapat menurunkan intergritas spermatozoa (Nakatsukosa et al 2001 dalam Sardjito 2003). Verbeckmoes et al menyatakan bahwa gaya sentrifugasi menentukan integritas membran spermatozoa. Sentrifugasi dengan gaya 700 g menyebabkan kerusakan membran spermatozoa sehingga menurunkan intergritas membran spermatozoa. Kerusakan seluler dari membran spermatozoa sangat terkait dengan kondisi intergritas membran, motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Kondisi diatas sangat menentukan angka fertilitas dan produksi embrio secara *in vitro*.

Kapasitasi merupakan kejadian yang terkait dengan membrana yang khususnya terekspresi sebagai destabilisasi dalam bagian anterior kepala spermatozoa, yang berfungsi melepaskan enzim lisis akrosom dengan bantuan enzim ini spermatozoa bisa menembus permukaan vitelina sel telur. Akan tetapi, peningkatan aktivitas respirasi dan flagella juga terjadi setelah tercapainya kapasitasi. Perubahan dalam motilitas yang diperkirakan dapat mempermudah penetrasi membran sel telur (Hunter, 1995).

Perlakuan kombinasi sentrifugasi spermatozoa dengan berbagai kecepatan dan dengan penyimpanan selama interval waktu tertentu, berdasarkan sidik ragam ternyata tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Dengan

ternyata tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Dengan demikian kombinasi perlakuan sentrifugasi spermatozoa domba dengan berbagai kecepatan dan penyimpanan selama interval waktu tertentu tidak berpengaruh terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba, karena menurut Susilawati (1999) seperti yang dikutip oleh Fitri (2002) menyatakan bahwa kerusakan integritas membran spermatozoa setelah di sentrifugasi dapat diakibatkan karena adanya pengaruh fisik dan kimia, pengaruh fisik misalnya gaya sentrifugal terjadinya gaya gesekan antar spermatozoa dengan tabung, sedangkan pengaruh kimia adalah pengaruh medium. Medium yang digunakan kemungkinan mempunyai sifat hidrofilik sehingga medium menarik komponen-komponen cairan dari spermatozoa. Kejadian ini mengakibatkan komponen penyusun membran akan berubah dan proses fisiologis membran terganggu, jadi dapat disimpulkan dua faktor ini memberi pengaruh sendiri-sendiri terhadap motilitas spermatozoa.

Penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan pencucian dengan berbagai kecepatan tertentu ternyata memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap motilitas spermatozoa dan diketahui perlakuan kontrol (P0) yakni pencucian spermatozoa dengan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm memberikan rata-rata motilitas $65,22 \pm 5,164$; dan pada perlakuan pencucian spermatozoa dengan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm, ditambah dengan medium (P1) memberikan rata-rata motilitas $63,65 \pm 4,75$; dan pada perlakuan pencucian spermatozoa ditambah medium dengan kecepatan sentrifugasi 2400 rpm (P2) menghasilkan rata – rata motilitas $63,28 \pm 4,474$; terlihat bahwa rata-rata motilitas spermatozoa

pada P1, P2, P3 lebih rendah dibandingkan dengan P0, ini terjadi karena saat pengambilan spermatozoa pada P1, P2, P3 pipet agak masuk ke bagian dasar dari tabung sehingga spermatozoa yang berada di dasar tabung ikut terambil, sedangkan menurut Chang (1977) menyatakan bahwa pengambilan spermatozoa yang telah dicuci sebaiknya diambil pada bagian tengah tabung, karena di dasar dan atas tabung kebanyakan mengandung spermatozoa yang kurang motil, namun secara umum motilitas spermatozoa pada penelitian ini masih memenuhi syarat motilitas dan daya tahan hidup minimal spermatozoa yang ditetapkan oleh Yanagimachi (1986) seperti yang dikutip Utomo^a (1997) yaitu 55% untuk motilitas dan 50-60% untuk daya tahan hidup. Berdasarkan uji Duncan perlakuan P1 dan P2 memberikan motilitas yang sama baiknya dengan P0. Artinya kecepatan sentrifugasi 1800 rpm dan 2400 rpm tidak menimbulkan kerusakan pada membran spermatozoa domba sehingga spermatozoa masih dapat melakukan kapasitasi yang memberi pengaruh peningkatan motilitas. Sedangkan pada perlakuan pencucian spermatozoa dengan kecepatan 2800 rpm ditambah dengan medium menghasilkan rata-rata motilitas terendah yakni $59,50 \pm 2,874$, ini berarti pada kecepatan sentrifugasi 2800 rpm bisa jadi mengakibatkan membran spermatozoa mengalami gangguan dengan demikian integritas membran spermatozoa akan rusak sehingga terjadi penurunan motilitas spermatozoa, apabila membran spermatozoa mengalami kerusakan maka proses kapasitasi pada spermatozoa tidak berjalan baik. Hal ini menunjukkan bahwa pencucian spermatozoa dengan kecepatan sentrifugasi yang tinggi membawa dampak buruk bagi spermatozoa. Pemusingan mempunyai pengaruh yang kurang baik terhadap sel – sel mani

domba dalam bahan pengencer air susu sapi pada penyimpanan 5 ° Celcius dan dengan makin meningkatnya kecepatan pemusingan pengaruhnya terhadap penurunan sel-sel mani semakin nyata. Pemusingan dengan kecepatan 5500 rpm dapat menekan baik motilitas maupun persentase hidup sel-sel mani domba . (Hariadi dkk, 1980).

Pengaruh penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci dalam medium selama interval waktu tertentu menunjukkan hasil bahwa penyimpanan spermatozoa dengan interval waktu nol jam (T0) atau 29 menit menghasilkan rata-rata motilitas terbaik yakni $66,80 \pm 3,706$ dan berbeda nyata dengan perlakuan penyimpanan dengan interval waktu setengah jam (T1) yang menghasilkan rata-rata motilitas $62,83 \pm 3,728$ serta perlakuan penyimpanan dengan interval waktu satu jam (T2) yang menghasilkan rata-rata motilitas $59,11 \pm 3,555$. Hal ini berarti bahwa pada penyimpanan spermatozoa dengan interval waktu nol jam spermatozoa telah mengalami peningkatan aktivitas metabolisme dan respirasi spermatozoa yang terjadi akibat adanya kapasitasasi. Hal ini berarti bahwa pada penyimpanan spermatozoa dengan interval waktu 29 menit spermatozoa telah mengalami peningkatan aktivitas metabolisme dan respirasi akibat adanya kapasitasasi, karena pada perlakuan P1, P2, P3 motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh zat-zat dalam media pencuci seperti serum albumin, glukosa, kafein, sodium piruvat, heparin dan sebagainya yang memicu terjadinya kapasitasasi spermatozoa. Media BO misalnya, selain terdapat sodium piruvat dan glukosa sebagai sumber energi ternyata juga mengandung kafein untuk motilitasnya terutama untuk proses kapasitasasi. Glukosa pada media EBSS dan BO sebagai

sumber energi melalui proses glikolisis akan diubah menjadi glukosa - 6- fosfat , selanjutnya menjadi fruktosa. Kemudian melalui bantuan enzim difosfopyridin nukletid (DPN) fruktosa – 6 – fosfat akan diubah menjadi 1-3-difosfogliserat yang pada akhirnya menjadi asam monofosfat gliserin. Asam monofosfat gliserin menghasilkan sumber energi yang dipakai untuk pergerakan motilitas serta metabolisme (biosintesa) sel spermatozoa (Rimayanti dkk,1998).

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh adanya cAMP dalam sel. Bila cAMP dalam sel spermatozoa meningkat motilitas spermatozoa juga akan meningkat (Suhartati, 2003).

Kafein merupakan zat yang bekerja sebagai inhibitor adenosin dan fosfodiesterase (Murray et all,1999). Penghambatan adenosin tersebut akan menyebabkan penumpukan adenil siklase. Adenil siklase merupakan enzim yang bekerja merangsang pembentukan *cyclic AminoMonophosphat* (cAMP) dari ATP, sehingga apabila adenil siklase tersebut semakin banyak maka ATP yang diubah menjadi cAMP akan lebih banyak, selain itu kafein juga menghambat fosfodiesterase, yang berfungsi mengubah sehingga cAMP menjadi 5'AMP oleh enzim fosfodiesterase tidak berlangsung. Kedua proses tersebut akan menyebabkan konsentrasi cAMP di dalam sel meningkat. Peningkatan cAMP ini akan merangsang proses produksi energi, dengan demikian ATP yang dihasilkan dalam jumlah banyak (Katzung, 2001) .

Sedangkan pada perlakuan kontrol (P0) penyimpanan spermatozoa setelah sentrifugasi dengan interval waktu nol jam juga menghasilkan rata-rata motilitas yang tinggi, namun dalam perlakuan ini spermatozoa menggunakan seminal

plasma untuk motilitasnya. Selain itu kadar *glycerophosphorylcholine* yang tinggi pada domba memberikan substrat untuk metabolisme dan motilitas spermatozoa domba (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994). Brinsko et all (2001) menyatakan pula bahwa sentrifugasi spermatozoa dengan pemisahan sebagian plasma semen dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang bergerak progresif.

Pada perlakuan penyimpanan spermatozoa selama interval waktu setengah jam (T1) dan satu jam mengakibatkan rata rata motilitas spermatozoa (T2) menjadi menurun . Hal ini disebabkan karena pada saat pencucian berlangsung, sejumlah zat koagulum akan terbawa oleh spermatozoa dan ini akan menyebabkan spermatozoa mengalami aglutinasi dalam jumlah sekitar 10-12 spermatozoa, namun apabila spermatozoa yang telah dicuci didiamkan lebih dari tiga puluh menit maka zat koagulum akan direabsorpsi oleh spermatozoa dan terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa.

5.2 Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Perbedaan afinitas menghisap zat warna antar sel spermatozoa yang mati dan yang hidup memberi kemungkinan untuk menaksirkan jumlah spermatozoa yang hidup lebih obyektif dibandingkan dengan spermatozoa yang mati, di bawah mikroskop terlihat jelas perbedaan antara sel spermatozoa yang hidup tidak menghisap zat warna sedang sel spermatozoa yang mati, yang menghisap zat

warna dan terlihat sangat kontras sesuai dengan zat warna yang diberikan (Partodihardjo,1992).

Sifat-sifat fisik dan kimiawi bahan pengencer dan faktor suhu dan cahaya adalah penting pada perlakuan dan penyimpanan semen untuk inseminasi buatan. Selain itu pH, tekanan osmotik, ion-ion elektrolit dan ion-ion non elektrolit mempengaruhi daya tahan hidup spermatozoa secara *in vitro* (Toelihere^a, 1979).

Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa domba pada perlakuan kontrol yakni sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm merupakan rata-rata daya tahan hidup terbaik yaitu sekitar $68,29 \pm 5,164$ dan berbeda nyata dengan perlakuan pencucian spermatozoa pada P1, P2,P3 yang ternyata memberikan rata-rata daya tahan hidup terendah, hal ini terjadi karena pada perlakuan P0, seminal plasma yang tersisa dalam pelet masih mengandung inhibitor enzim akrosom sehingga spermatozoa pada perlakuan ini belum mengalami reaksi akrosom. Berbeda dengan perlakuan P1 dengan daya tahan hidup rata-rata $64,13 \pm 3,705$; dan P2 dengan daya tahan hidup rata-rata $63,78 \pm 3,865$; serta perlakuan P3 $63,36 \pm 4,452$; pada ketiga perlakuan ini penurunan daya tahan hidup spermatozoa dipengaruhi oleh media pencucian, kecepatan, serta terpisahnya spermatozoa dengan plasma semen. Secara alami plasma semen berfungsi melindungi spermatozoa dari pengaruh luar, ketika spermatozoa masuk ke dalam semen membran spermatozoa menjadi lebih stabil. Jadi dengan terpisahnya spermatozoa dari plasma semen mengakibatkan membran spermatozoa menjadi tidak stabil. Membran spermatozoa yang tidak stabil ini akan mempermudah terjadinya

kapasitas dan reaksi akrosom (Susilawati dkk,1999), hal ini dibuktikan dalam percobaan yang dilakukan Jones dan Holt (1974) yakni mencuci spermatozoa domba dalam media *Krebs-Henseleit ringer solution* dengan kecepatan 700 g selama sepuluh menit, dan ternyata spermatozoa mengalami perubahan akrosom secara signifikan. Reaksi akrosom yang terjadi mengikuti kapasitas merupakan perubahan struktur yang luar biasa pada bagian anterior kepala spermatozoa yang dan memungkinkan pelepasan enzim dari organel yang seperti kantung ini sehingga dapat membantu penetrasi bungkus sel telur, khususnya zona pelucida. Hilangnya enzim akrosom sebagai pelengkap jelas menjadikan spermatozoa sebagai sel yang tak berfungsi, sebagaimana pengaruh yang berkaitan dengan habisnya metabolisme yang akan terjadi (Hunter,1995).

Pada perlakuan penyimpanan spermatozoa setelah disentrifugasi dengan interval waktu nol jam atau 29 menit menghasilkan rata-rata daya tahan hidup terbaik karena pada interval penyimpanan ini, pelet dalam spermatozoa masih mengandung mikroorganisme serta bahan lain seperti leukosit yang tidak hilang jika tidak ditambahkan media pencuci ke dalamnya. Sehingga meskipun dalam seminal plasma masih mengandung zat-zat yang mendukung kehidupan spermatozoa tetapi penyimpanan spermatozoa *in-vitro* pada suhu 37° Celcius, spermatozo hanya dapat hidup beberapa jam saja karena kehabisan, penurunan pH, penimbunan asam laktat serta adanya pertumbuhan mikroorganisme (Toelihere,1979^a).

Kondisi ini berbeda perlakuan P1, P2 dan P3 dimana meski seminal plasma sudah dipisahkan dengan penambahan media pencuci yang didalamnya juga

mengandung bahan-bahan yang mendukung kelangsungan hidup spermatozoa, tetapi daya tahan hidup spermatozoa terbaik diperoleh pada waktu penyimpanan dengan interval waktu nol jam atau 29 menit, karena selama waktu penyimpanan ini spermatozoa telah mengalami kapasitasi. Adanya perubahan metabolisme dan struktur yang terjadi selama proses kapasitasi mengakibatkan spermatozoa yang mencapai stadium ini diperkirakan dalam kondisi rapuh dengan masa hidup yang singkat (Hunter,1995).

Sehingga meskipun dalam seminal plasma masih mengandung zat-zat yang mendukung kehidupan spermatozoa tetapi penyimpanan spermatozoa *in vitro* pada suhu 37 °Celcius , spermatozoa hanya dapat hidup beberapa jam saja karena kehabisan substrat, penurunan pH, penimbunan asam laktat serta adanya pertumbuhan mikroorganisme (Toelihere^a, 1979).

Kondisi ini berbeda perlakuan P1,P2 dan P3 dimana meski seminal plasma sudah dipisahkan dengan penambahan media pencuci yang di dalamnya juga mengandung bahan – bahan yang mendukung kelangsungan hidup spermatozoa, tetapi daya tahan hidup spermatozoa terbaik diperoleh pada waktu penyimpanan dengan interval waktu nol jam. Hal ini sesuai dengan pendapat Cox (1994) seperti yang dikutip Utomo^b dkk, (2000) yang menyatakan bahwa setelah proses kapasitasi spermatozoa akan mengalami pergerakan yang lebih aktif sehingga mempercepat habisnya energi dan pada akhirnya menyebabkan kematian.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan kombinasi pencucian spermatozoa dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu tertentu tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa .
2. Perlakuan kombinasi pencucian spermatozoa dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci selama interval waktu tertentu tidak berpengaruh terhadap daya tahan hidup spermatozoa .

6.2 Saran

Saran yang dapat penulis berikan pada penelitian ini adalah:

1. Perlakuan pencucian spermatozoa domba untuk fertilisasi *in-vitro* sebaiknya menggunakan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm, 2400 rpm dan dengan menambahkan media BO,BSA, kafein .
2. Penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci untuk fertilisasi *in-vitro* sebaiknya dilakukan selama interval waktu nol jam atau 29 menit.
3. Perlu diterapkan uji *Hypo Osmotic Swelling Tissue* (HOST) untuk mengetahui keutuhan tudung akrosom serta integritas membran plasma spermatozoa domba yang telah dicuci.

RINGKASAN

Dwi Rahmawati. Pembuaian secara *in-vitro* adalah salah satu cara untuk memproduksi embrio secara buatan dengan cepat, melalui teknik ini kita tidak perlu lagi memelihara donor yang harganya mahal dan biaya pakannya tinggi.

Metode pencucian dengan sentrifugasi merupakan prosedur baku dalam program pembuaian *in-vitro*. Prosedur sentrifugasi dan swim-up adalah salah satu cara untuk mendapatkan spermatozoa yang terbebas dari plasma semen, media pembekuan semen dan zat-zat pencemar lainnya, dengan angka motilitas yang memenuhi syarat untuk fertilisasi *in-vitro*.

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengetahui motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba yang dicuci dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan disimpan dalam interval waktu tertentu. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan faktorial dengan rancangan acak lengkap, domba yang digunakan sebanyak tiga ekor, domba jantan dan seekor domba betina. Pengambilan semen dilakukan menggunakan vagina buatan. Penelitian ini terdiri dari 4 perlakuan yakni kontrol P0 sentrifugasi spermatozoa dengan kecepatan 1800 rpm tanpa penambahan medium, dan perlakuan P1, P2, P3 sentrifugasi spermatozoa masing-masing dengan kecepatan 1800 rpm, 2400 rpm, 2800 rpm dan penambahan medium pencuci BO, BSA, dan kafein. Setelah di sentrifugasi spermatozoa dari masing-masing perlakuan disimpan selama interval waktu tertentu yakni nol jam (T0), setengah jam (T1), dan satu jam (T2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan pencucian spermatozoa dengan berbagai kecepatan sentrifugasi dan penyimpanan selama interval waktu tertentu ternyata tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa domba, tetapi faktor kecepatan (P) dan waktu penyimpanan (T) memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa.

Uji Duncan untuk faktor (P) menunjukkan bahwa motilitas tertinggi diperoleh pada perlakuan P0, P1, P2 dan motilitas terendah pada P3 dan daya tahan hidup terbaik diperoleh pada diperoleh pada P0, sedangkan untuk faktor (T) motilitas dan daya tahan hidup terbaik dicapai pada waktu penyimpanan nol jam atau 29 menit.

Saran yang dapat penulis berikan adalah perlakuan pencucian spermatozoa domba untuk fertilisasi *in-vitro* sebaiknya menggunakan kecepatan sentrifugasi 1800 rpm dan 2400 rpm dan dengan menambahkan medium BO, BSA, dan kafein selain itu penyimpanan spermatozoa yang telah dicuci sebaiknya dilakukan selama interval waktu nol jam atau 29 menit, perlu dilakukan uji *Hypo Osmotic Swelling Tissue* (HOST) untuk mengetahui keutuhan tudung akrosom serta integritas membran plasma spermatozoa domba yang telah dicuci.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden, H.J. and J.W.Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction. 3rd ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 163-175, 177-194.
- Brinsko S.P, Crockett E.C, Squires E.L. 2001. Effect of Centrifugation and Seminal Plasma Removal on Equine Spermatozoa Motility after Cooling and Storage. Journal Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory (Abstract):3.
- Chang, M C.1977.A Detrimental Effect Of Seminal Plasma On The Fertilizing Capacity Of Sperm. Nature, London.258-259.
- Evans G, Maxwell WMC. 1988. Salamon's Artificial Inseminations of Sheep and Goats. Butterworths. Sydney. 22-26,30
- Fitri A Triana. 2002. Pengaruh Pengaruh Kecepatan dan Waktu Sentrifugasi Terhadap Keutuhan Membran Plasma dan Tudung Akrosom Spermatozoa Sapi Madura . Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. 1-4, 30-35
- Frandsen, R.D., W.L.Wilke and A.D.Fails. 2003. Anatomy and Physiology of Domestic Animals. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland and Philadelphia. 383-384
- Garner, D.L. and E.S.E.Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: E.S.E. Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 96-109.
- Gatenby. M.T .1991. *Sheep*. Australia Publishing Comp p 2-3,23,62-63
- Hafez, E.S.E. 2000. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryo. In: E.S.E. Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 437-441.
- Hardijanto dan S.Hardjopranto. 1994. Diktat Kuliah Ilmu Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 9-13, 18-44, 58-64, 70-86.
- Hardijanto, T.Sardjito, T.Hernawati, S.Susilowati dan T.W.Suprayogi. 2003. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 3, 7-14

- Hariadi M, Hardijanto, Ismudiono, Mahaputra L DNK, Tjondronegoro S, Hardjopranto S. 1980. Pengaruh Pemusingan atau Centrifuge Terhadap Umur Motilitas dan Persentase Hidup Sel-Sel Mani Domba Ekor Gemuk Dalam Pengencer Air Susu Sapi. Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya. p12.
- Harrison, R.A.P and White, J.G. 1972. Some Method For Washing Spermatozoa From Bull, Boar and Ram: A Comparison Using Biochemical And Other Criteria. *Journal Reproduction Fertility*(29).271.
- Hinting A. 1989. Assesment of Human Sperm Fertilizing Ability. Tesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of special doctor in reproductive medicine. Rijksuniversiteit Gent. Belgium
- Hernawati T^a. 1998. Peranan Heparin, Hipotaurin dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa, Pembelahan dan Pembuahan In-vitro Pada Sapi Perah. Tesis. Penelitian Eksperimental Labortorik. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya. 15.
- Hernawati T^b, Suherni, Sardjito T. 2000. Pengaruh Penambahan Heparin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa dan Pembelahan (Cleavage) Embrio Pada Pembuahan *In-Vitro* Sapi Perah. Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya. 1-9.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik (Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animal). Diterjemahkan oleh D.K.Haryaputra. Edisi Pertama. Penerbit Institut Teknologi Bandung. 124, 172-179, 272-274.
- Mottershead.Joss. 1999. Why Centrifuges Semen? <http://www.equinereproduction.com/articles/centrifuge.html>.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Edisi Kedua. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 7-12, 21-29.
- Jones R C, Holt W V. 1974. The Effect Of Washing On the Ultrastructure And Cytochemistry Of Ram Spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility* (41):159-167.
- Juliana L. 2004. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Diluter Terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Keutuhan Membran Spermatozoa Domba. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. 11-25

- Katzung G B. 2001. Basic and Clinical Pharmacology Eight Edition. The McGraw-Hill Company. USA.p 338
- Kusriningrum R. 1990. Perancangan Percobaan ;Rancangan Acak Kelompok, Rancangan Bujursangkar Latin , Percobaan Faktorial. Universitas Airlangga. Surabaya.p 105-107.
- Lindsay, D.R., K.W.Entwhistle and A.Winantea. 1982. Reproduction in Domestic Livestock in Indonesia. Australian Vice Chancellors Committee, Australian Universities International Development Program, University of Queensland Press, Hedges and Bell Pty Ltd. Melbourne. 11-12,63-72.
- Mahaputra L. 1996. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitas ,dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga .Surabaya.
- Mafruchati M, Luqman Muhammad Epy, Harijani Neny, Widjiati, Poernomo Bambang.1997. Pemeriksaan Membran Spermatozoa Pada Semen Beku Domba. Setelah Dicairkan. Fakultas Kedokteran Hewan. Lembaga Penelitian .Universitas Airlangga. Surabaya.
- R. K. Murray, D.K. Graner, P.A. Meyes,V.W.Rodwell.1999. Biokimia Harper; Harper Biochemistry. Penerjemah A. Hartono, A.H Santoso. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Salisbury, G.W. and N.L.Van Demark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 538-540.
- Sanocka D and Maciej Kurpisz. 2004. Reactive Oxygen Species And Sperm Cells. Reproduction Biology Endocrinology Journal (2):3,12.
- Sardjito T., 2003. Pengaruh Sentrifugasi Spermatozoa Sapi Terhadap Integritas Membran , Resistensi dan Kelayakan Kondisi Pada Proses Kapasitasi *In-Vitro*. Thesis. Penelitian Eksperimental Laboratorik . Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. 2-4,20-22.
- Singh. R.S, N.S. Tumar, K.C.Sharma and K.B Sharma.1992.Studies On Acrosomal Abnormalities Of Cattle and Buffalo In Relation To Other Semen Characteristics and Fertility. Journal Indian Veteriner (69):267-268

- Susilawati, T., S.B.Sumitro, S.Hardopranjoto, M.S.Djati dan G.Ciptadi. 1999. Kaji Banding antara Pengencer Tris dengan TCM-1999 dalam Upaya Pembekuan Semen Sapi Hasil Penyaringan Sephadex G-200. *Media Veteriner* 6 (4): 9-13
- Suhartati M., 2003 . Pengaruh penambahan Kafein dalam Media Pencuci Terhadap Persentase Hidup dan Motilitas Spermatozoa Domba. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Smith.B.J, Soesanto M.1988. Pemeliharaan , Pembiakan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Penerbit Universitas Indonesia
- T, Mann.1969. Semen and Male Tract In : H.H Cole and P.T. Cupps (Ed). *Reproduction In Domestic Animal*, Second Edition. Academic Press. NewYork, San Francisco, London.299.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Poernomo,B.,E.M Luqman, M Mafruchati, Wdjati, E.D Masithah. 2002 .Diktat Ilmu Mudigah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rimayanti, Utomo. B, Susilowati S, Hermadi Agoes H, Hernawati T.1998. Pengaruh Pengenceran Media EBSS dan BO pada Semen Beku Kambing Etawa terhadap Kejadian kebuntingan Kambing Lokal. Penelitian Rutin Dosen. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
- Toelihere, M.R. 1979^a. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung
- Toelihere, M.R. 1993^b. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 64-86.
- Utomo^a, B. 1997. Pengaruh Pengenceran dan Kapasitas Spermatozoa Kambing Degan Media BO, EBSS Dan EBSS + Serum Terhadap Proses Fertilisasi *In-Vitro*. Tesis. Penelitian Eksperimental Laboratorik . Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Utomo^b B, Rimayanti, H Agoes Hermadi. 2000. Pengaruh Penambahan Kafein Pada Media Pencucian dan Kapasitas Spermatozoa Terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal. Laporan Penelitian DIP UNAIR.Fakultas Kedokteran Hewan. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.15.

- VanderVoort A Catherine. 2004. High Quality Sperm For Nonhuman Primate:Production and Assesment. *Reproduction Biology Endocrinology Journal*(2): 33,1,4.
- Verbeckmoes S.I. de Pauw, G Vanroose, A Vansoom and A De Kruff. 2000. Influence Of Ultra centrifugation On Motility And Membrane Integrity Of Fresh Bull Sperm. *Journal Theriogenology*.490
- Wolfe CA, James P.S, Gunning AP, Ladha S, Christova Y, Jones R. 2001. Lipid Dynamics In The Plasma Membrane Of Ram And Bull Spermatozoa After Washing And Exposure To Macromolekul BSA And PVP. *Mol Reprod Dev*, Jul;59 (3):306-13.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Karakteristik dan Komponen Kimiawi Plasma Semen Domba

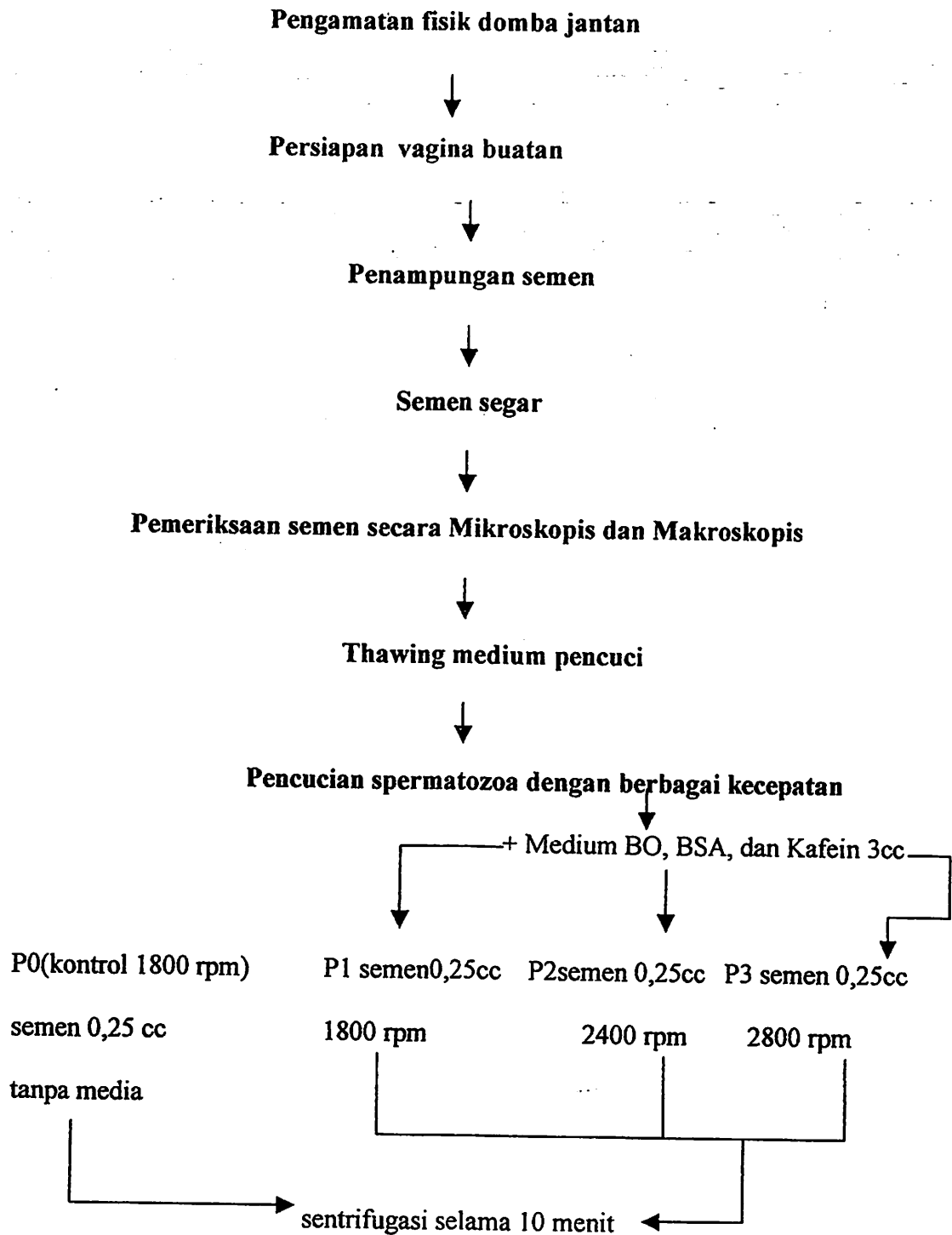
Protein (g/100 ml)	5.0
Ph	5.9 –7.3
Fruktosa	250
Sorbitol	26 –170
Asam sitrat	110 –260
<i>Glycerophosphorylkholine (GPC)</i>	7 –14
Erghothionine	0
Natrium	178 ± 11
Kalium	89 ± 4
Kalsium	6 ± 2
Magnesium	6± 0.8
Klorida	86
Besi*	0,16
Seng*	0,28
Adenosine triphospat NH ₂ -N*	0.0
Plasmalogen*	15.5
Inositol (bebas)*	14,8
Total Phosphorus*	141,8
<i>Phospholipid-phosphorus*</i>	2,9
<i>Acid -soluable phosphorus*</i>	132,0
α-Manosidase	5,000
β-N-acetylglucosaminidase	1,600,000

Komposisi Semen Domba

	Rata- rata
Berat kering	14820
Klorida	87
Natrium	
Dalam semen utuh	192
Dalam seminal plasma	178
Dalam spermatozoa	111
Kalium	
Dalam semen utuh	92
Dalam seminal plasma	89
Dalam spermatozoa	132
Magnesium	
Dalam semen utuh	8.8
Dalam seminal plasma	5.8
Dalam spermatozoa	13.3
Kalsium	9
Phosphor in organik	12
Total nitrogen	875
Non protein nitrogen	57
Urea	44
Asam urat	11
Ammonia	2
Fruktosa	247
Asam laktat	36
Kadar CO ₂ *	16
Asam sitrat	137
Asam askorbat	5

* dalam mg/100ml.

Sumber: (Hafez, 2000;T Mann, 1969)

Lampiran 2. Diagram Alur Pelaksanaan Penelitian

Penyimpanan spermatozoa selama interval waktu tertentu

Supernatan dibuang kemudian tabung berisi pellet disimpan pada gelas beker

berisi air pada suhu ruangan untuk P1,P2,P3



Pelet diambil sedikit diletakkan pada 2 gelas obyek yang berbeda



Pemeriksaan motilitas dan pembuatan preparat ulas hidup mati

dicatat sebagai pengamatan T0 (nol jam)



Simpan selama 30 menit



Pemeriksaan motilitas dan pembuatan preparat ulas hidup mati

Dicatat sebagai pengamatan T1 (setengah jam)



Simpan selama 60 menit



Pemeriksaan motilitas dan pembuatan preparat ulas hidup mati

Dicatat sebagai pengamatan T2 (satu jam)

Lampiran 3. Data Semen Domba Sebelum diberi Perlakuan

n	volume	ph	warna	bau	konsistensi	konsentrasi	gerakan massa	gerakan individu	perseentase hidup
1	1,2	6,8	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	95
2	1,0	6,8	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	96
3	1,0	7	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	90
4	1,3	6,8	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	97
5	1,0	6,8	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	98
6	1,0	7	krem	khas	kental	densum	+++	progresif	90

*Keterangan

n= ulangan

Lampiran 4. Persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan

Kecepatan	Waktu penyimpanan	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0 (kontrol)	T0 (nol jam)	90	90	90	90	90	85
	T1 (setengah jam)	80	85	85	85	80	80
	T2 (satu jam)	75	70	75	80	70	75
P1 (1800 rpm)	T0 (nol jam)	88	85	85	85	85	85
	T1 (setengah jam)	85	80	80	70	83	82
	T2 (satu jam)	80	78	78	60	70	80
P2 (2400 rpm)	T0 (nol jam)	88	85	85	80	85	80
	T1 (setengah jam)	88	82	82	80	75	75
	T2 (satu jam)	85	70	80	70	70	70
P3 (2800 rpm)	T0 (nol jam)	80	75	75	85	75	80
	T1 (setengah jam)	75	70	70	75	72	75
	T2 (satu jam)	75	70	70	72	70	70

Data Motilitas Spermatozoa Setelah ditransformasi dengan arc sin $\sqrt{\text{persen}}$

Kecepatan	Waktu penyimpanan	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0 (kontrol)	T0 (nol jam)	71,56	71,56	71,56	71,56	71,56	67,21
	T1 (setengah jam)	63,44	67,21	67,21	67,21	63,44	63,44
	T2 (satu jam)	60,00	56,79	60,00	63,44	56,79	60,00
P1 (1800 rpm)	T0 (nol jam)	69,73	67,21	67,21	67,21	67,21	67,21
	T1 (setengah jam)	67,21	63,44	63,44	56,79	65,65	64,90
	T2 (satu jam)	63,44	62,03	62,03	50,77	56,79	63,44
P2 (2400 rpm)	T0 (nol jam)	69,73	67,21	67,21	63,44	67,21	63,44
	T1 (setengah jam)	69,73	64,90	64,90	63,44	67,21	63,44
	T2 (satu jam)	67,21	56,79	63,44	56,79	56,79	56,79
P3 (2800 rpm)	T0 (nol jam)	63,44	60,00	60,00	67,21	60,00	63,44
	T1 (setengah jam)	60,00	56,79	56,79	60,00	58,05	60,00
	T2 (satu jam)	60,00	56,79	56,79	58,05	56,79	56,79

Lampiran 5. Persentase hidup spermatozoa setelah perlakuan

Kecepatan	Waktu penyimpanan	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0 (kontrol)	T0 (nol jam)	95	92	91	90	92	87
	T1 (setengah jam)	87	85	83	85	86	83
	T2 (satu jam)	84	82	80	82	82	82
P1 (1800 rpm)	T0 (nol jam)	82	86	86	85	88	85
	T1 (setengah jam)	78	83	81	83	83	80
	T2 (satu jam)	73	71	75	80	70	75
P2 (2400 rpm)	T0 (nol jam)	85	86	80	85	82	87
	T1 (setengah jam)	81	79	79	82	80	89
	T2 (satu jam)	80	76	70	75	73	85
P3 (2800 rpm)	T0 (nol jam)	88	80	85	87	82	88
	T1 (setengah jam)	83	76	80	80	72	85
	T2 (satu jam)	81	70	70	72	71	82

Data Persentase Hidup Spermatozoa Setelah Ditransformasi dengan arc sin $\sqrt{\text{persen}}$

Kecepatan	Waktu penyimpanan	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0 (kontrol)	T0 (nol jam)	77,08	73,57	72,54	71,56	73,57	68,87
	T1 (setengah jam)	68,87	67,21	65,65	67,21	68,03	65,65
	T2 (satu jam)	66,42	64,90	63,44	64,90	64,90	64,90
P1 (1800 rpm)	T0 (nol jam)	64,96	68,03	68,03	67,21	69,73	67,21
	T1 (setengah jam)	62,03	65,65	64,16	65,65	65,65	63,44
	T2 (satu jam)	58,69	57,42	60,00	63,44	56,79	60,00
P2 (2400 rpm)	T0 (nol jam)	67,21	68,03	63,44	67,21	64,90	68,87
	T1 (setengah jam)	64,16	62,72	62,72	64,90	63,44	70,63
	T2 (satu jam)	63,44	60,67	56,79	59,34	58,69	67,21
P3 (2800 rpm)	T0 (nol jam)	69,73	63,44	67,21	68,87	64,90	69,73
	T1 (setengah jam)	65,65	60,67	63,44	63,44	58,05	67,21
	T2 (satu jam)	64,16	56,79	56,79	58,05	57,42	64,90

Lampiran 6. Analisis statistik motilitas spermatozoa setelah perlakuan

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{4529,64^2}{6(4 \times 3)} \\ (\text{FK}) &= 284967,2018 \end{aligned}$$

Kecepatan (K)	Waktu penyimpanan			total	Rata-rata	Standard deviasi
	T0	T1	T2			
P0	425,01	391,95	357,02	1173,98	65,22	5,1642
P1	405,78	381,43	358,50	1145,71	63,65	4,7528
P2	398,74	382,97	357,81	1139,02	63,68	4,4743
P3	374,09	351,63	345,21	1070,93	59,50	2,8759
Total	1603,12	1507,98	1418,54	4529,64		
Rata-rata	66,80	62,83	59,11			

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 71,56^2 + 69,73^2 + \dots + 56,79^2 - \text{FK} \\ &= 286603,6682 - \text{FK} \\ &= 1636,4664 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{425,01^2 + 398,24^2 + \dots + 345,21^2}{6} - \text{FK} \\ &= \frac{1716436,13}{6} - \text{FK} \\ &= 1105,4865 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk P} &= \frac{1173,98^2 + 1145,71^2 + \dots + 1070,93^2}{3 \times 6} - \text{FK} \\ &= \frac{5135138,07}{18} - \text{FK} \\ &= 318,2465 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk T} &= \frac{1603,12^2 + 1507,98^2 + \dots + 1418,54^2}{4 \times 6} - \text{FK} \\ &= \frac{6856253,146}{24} - \text{FK} \\ &= 710,012633 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk Px T} &= \text{JKP} - \text{Jk P} - \text{Jk T} \\ &= 1105,4865 - 318,2465 - 710,012633 \\ &= 77,2274 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKS} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 1636,4644 - 1105,4865 \\ &= 530,9799 \end{aligned}$$

ANALISIS VARIAN

Sidik ragam	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	11	1105,4865	100,4988			
P(kecepatan)	3	318,2465	106,0822	11,9871**	2,76	4,13
T(waktu penyimpanan)	2	710,0126	355,0063	40,1151**	3,15	4,98
P x T	6	77,2274	12,8712	1,4544	2,25	3,12
Sisa	60	530,9799	8,8497			
Total	71	1636,4664				

(** Superskrnp yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P≤0,05))

Sidik ragam menunjukkan bahwa , F hitung interaksi pada kombinasi perlakuan antara kecepatan dan waktu penyimpanan (P xT) tidak menunjukkan pengaruh yang nyata (P≥0,05),sehingga analisis selanjutnya tidak perlu dilakukan (Kusriningrum,1990). Sedangkan perlakuan kecepatan (P) dan waktu penyimpanan (T) menunjukkan pengaruh yang sangat nyata (P≤0,01).Untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik , analisis dilanjutkan dengan uji Duncan.

Uji Duncan taraf 5% untuk faktor P(kecepatan)

$$se = \frac{\sqrt{KTS}}{nxb} = \frac{\sqrt{8,8497}}{6 \times 3}$$

$$= 0,7012$$

$$LSR = SSR \times se$$

Perlakuan	X	X - P3	X - P2	X - P1	P	SSR	LSR
P0 ^a	65,22	5,72*	1,94*	1,57	4	3,07	2,1527
P1 ^a	63,65	4,15*	0,37		3	2,98	2,0896
P2 ^a	63,28	3,78*			2	2,83	1,9844
P3 ^b	59,50						

Uji Jarak Duncan

P0	P1	P2	P3
65,22	63,65	63,28	59,50

a

b

Perlakuan kontrol (P0), dan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm (P1), 2400 rpm (P2) menghasilkan motilitas terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan P3. Perlakuan 2800 rpm (P3) menghasilkan motilitas terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan P0, P1, P2.

Uji Duncan taraf 5% untuk faktor T (waktu penyimpanan)

$$se = \frac{\sqrt{KTS}}{n \times a} = \frac{\sqrt{8,8497}}{6 \times 4}$$

$$= 0,6072$$

$$LSR = SSR \times se.$$

Perlakuan	\bar{X}	$\bar{X} - T2$	$\bar{X} - T1$	P	SSR	LSR
T0 ^a	66,80	7,69*	3,97*	3	2,98	1,8095
T1 ^b	62,83	3,72*		2	2,83	1,7184
T2 ^c	59,11					

Uji Jarak Duncan

T0	T1	T2
<u>a</u>		
	<u>b</u>	
		<u>c</u>

Perlakuan penyimpanan dengan interval waktu nol jam (T0) memberikan motilitas tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan penyimpanan setengah jam (T1) dan satu jam (T2). Perlakuan penyimpanan dengan interval waktu satu jam (T2) memberikan motilitas terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan T0, T1.

Lampiran 7. Analisis statistik persentase daya tahan hidup spermatozoa setelah perlakuan

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi} &= \frac{4672,12^2}{6 \times (4 \times 3)} \\ (\text{FK}) &= 303176,4624 \end{aligned}$$

Kecepatan (P)	Waktu penyimpanan			total	Rata-rata	Standard deviasi
	T0	T1	T2			
P0	437,19	402,62	389,46	1229,27	68,29	3,8484
P1	405,11	386,58	356,34	1148,03	63,78	3,8656
P2	399,66	388,57	366,14	1154,37	64,13	3,7050
P3	403,88	378,46	358,11	1140,45	63,36	4,4527
Total	1645,84	1556,23	1470,05	4672,12		
Rata-rata	68,58	64,84	61,25			

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= 77,08^2 + 73,47^2 + \dots + 64,90^2 - \text{FK} \\ &= 304535,8832 - \text{FK} \\ &= 1359,4208 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{437,19^2 + 405,11^2 + \dots + 358,11^2}{6} - \text{FK} \\ &= \frac{1824820,514}{6} - \text{FK} \\ &= 960,2831994 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk P} &= \frac{1229,27^2 + 1148,03^2 + \dots + 1140,45^2}{18} - \text{FK} \\ &= \frac{5462273,913}{18} - \text{FK} \\ &= 283,1994 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk T} &= \frac{1645,84^2 + 1556,23^2 + \dots + 1470,05^2}{24} - \text{FK} \\ &= \frac{7291688,121}{24} - \text{FK} \\ &= 643,8760 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jk P x T} &= \text{JKP} - \text{Jk P} - \text{Jk T} \\ &= 960,2899 - 283,1994 - 643,8760 \\ &= 33,2145 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKS} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 1359,4208 - 960,2899 \\ &= 399,1309 \end{aligned}$$

ANALISIS VARIAN

Sidik ragam	Derajat bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	11	960,2899	87,2991			
P (kecepatan)	3	283,1994	94,3988	14,1908**	2,76	4,13
T(waktu Penyimpanan)	2	643,8760	321,9380	48,3957**	3,15	4,98
P x T	6	33,2145	5,5358	0,8322	2,25	3,12
Sisa	60	399,1309	6,6522			
Total	71	1359,4208				

(** Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P \leq 0,05$))

Sidik ragam menunjukkan bahwa , F hitung interaksi pada kombinasi perlakuan antara kecepatan dan waktu penyimpanan (P xT) tidak menunjukkan pengaruh yang nyata ($P \geq 0,05$), sehingga analisis selanjutnya tidak perlu dilakukan (Kusriningrum,1990). Sedangkan perlakuan kecepatan (P) dan waktu penyimpanan (T) menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ($P \leq 0,01$). Untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik, analisa dilanjutkan dengan uji Duncan.

Uji Duncan taraf 5 % untuk faktor kecepatan (P)

$$se = \frac{\sqrt{KTS}}{nxb} = \frac{\sqrt{8,8497}}{6 \times 3}$$

$$= 0,6079$$

$$LSR = SSR \times se$$

Perlakuan	X	X - K3	X - K2	X - K1	P	SSR	LSR
P0 ^a	68,29	4,93*	4,51*	4,16*	4	3,07	1,8663
P1 ^b	64,13	0,77	0,35		3	2,98	1,8115
P2 ^b	63,78	0,42			2	2,83	1,7204
P3 ^b	63,36						

Uji Jarak Duncan

P0	P1	P2	P3
68,29	64,13	63,78	63,36
a	b	b	b

Perlakuan kontrol (P0) menghasilkan persentase hidup terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan kecepatan 1800 rpm (P1), 2400 rpm (P2), 2800 rpm (P3). Dan perlakuan P1,P2,P3 menghasilkan persentase hidup terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan P0.

Uji Duncan taraf 5% untuk faktor T (waktu penyimpanan)

$$se = \frac{\sqrt{KTS}}{n \times a} = \frac{\sqrt{8,8497}}{6 \times 4} = 0,6072$$

LSR = SSR x se.

Perlakuan	\bar{X}	$\bar{X}-t2$	$\bar{X}-t1$	P	SSR	LSR
T0 ^a	68,58	7,33*	3,74*	3	2,98	1,5690
T1 ^b	64,84	3,59*		2	2,83	1,4900
T2 ^c	61,25					

Uji Jarak Duncan

T0	T1	T2
68,58	64,84	61,25

a

b

c

Perlakuan penyimpanan dengan interval waktu nol jam (T0) memberikan daya tahan hidup tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan penyimpanan setengah jam (T1) dan satu jam (T2). Perlakuan penyimpanan dengan interval waktu satu jam (T2) memberikan daya tahan hidup terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan T0, T1.

Lampiran 8. Komposisi Bahan Pencuci Spermatozoa (medium BO, BSA, kafein)

Medium yang digunakan untuk pencucian spermatozoa pada penelitian ini adalah medium BO (*Brackett and Oliphant's Medium*), BSA (*Bovine Serum Albumin*) dan Kafein.

Bahan-bahan untuk pembuatan medium tersebut adalah sebagai berikut:

MEDIUM BO

MEDIUM A

1. NaCl	4309,02 mg
2. KCl	197,4 mg
3. CaCl ₂ .2H ₂ O	217,1 mg
4. NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	84 mg
5. MgCl ₂ .6H ₂ O	69,7 mg
6. Phenol Red 0,5 %	0,1 ml
7. Air distilasi	500,0ml

8. Simpan dalam botol tertutup rapat (dengan tutup putar)

MEDIUM B

NaHCO ₃	2587,3 mg
Phenol Red	0,5%
Air distilasi	200 ml

BO MEDIUM

1. Medium A	76,0 ml
2. Medium B	24,0 ml

3. Glukosa 150 mg
4. Sodium Piruvat 13,7 mg
5. Gentamycin.

MEDIUM PENCUCI SPERMA /2,5 mM KAFEIN-BO MEDIUM

1. BO Medium 50 ml
2. Kafein Sodium Benzoat 48,55 mg

MEDIUM PENGECERAN /BO MEDIUM

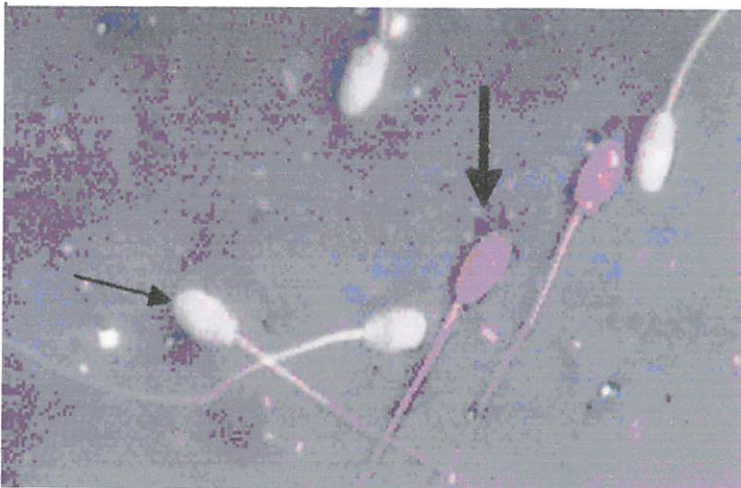
1. BO Medium 10,0 ml
2. BSA 200 mg
3. Heparin

Lampiran 9. Gambar spermatozoa hidup dan spermatozoa mati



gambar 9. 1 Spermatozoa pada perlakuan P₀

- ➔ Spermatozoa mati memiliki kepala berwarna merah
- ➔ Spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna putih



gambar 9.2 Spermatozoa pada perlakuan P₁

- ➔ Spermatozoa mati memiliki kepala berwarna merah
- ➔ Spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna putih