

SKRIPSI

**PERAN *INSULINE LIKE GROWTH FACTOR (IGF) COMPLEX*
PLASMA SEMEN KAMBING PERANAKAN ETAWAH
TERHADAP PENINGKATAN KUALITAS
SPERMATOZOA HASIL *SWIM UP***



Oleh :

RIYAH DEWI ROKHMANI
NIM. 060213053

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**PERAN *INSULINE LIKE GROWTH FACTOR (IGF) COMPLEX*
PLASMA SEMEN KAMBING PERANAKAN ETAWAH
TERHADAP PENINGKATAN KUALITAS
SPERMATOZOA HASIL *SWIM UP***

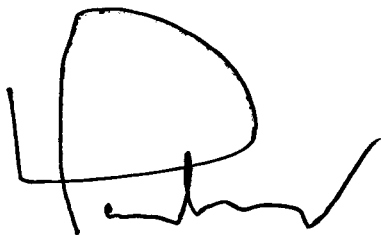
Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

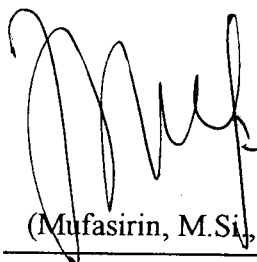
RIYAH DEWI ROKHMANI
NIM. 060213053

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Prof. Dr. H. Soehartojo H, M.Sc., drh)



(Mufasirin, M.Si., drh)

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Peran Insuline Like Growth Factor (IGF) Complex Plasma Semen Kambing
Peranakan Etawah terhadap Peningkatan Kualitas Spermatozoa Hasil
Swim up**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 16 Mei 2007

Riyah Dewi Rokhmani
NIM. 060213053

Telah diuji pada

Tanggal : 20 Maret 2007

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Tatik Hernawati, M.S., drh

Anggota : Maslichah Mafruchati, M.Kes., drh

Dr. Hardijanto, M.S., drh

Prof. Dr.H.Soehartojo Harjopranjoto, .M.Sc., drh

Mufasirin.,M.Si., drh

Surabaya, 16 Mei 2007

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh

NIP.130687305

**THE ROLES OF *INSULINE LIKE GROWTH FACTOR (IGF) COMPLEX*
SEMINAL PLASMA OF PERANAKAN ETAWAH GOATS ON THE
QUALITY INCREASED OF *SWIM UP* SPERMATOZOA**

Riyah Dewi Rokhmani

ABSTRACT

The aims of this research was to know the effect of IGF Complex of seminal plasma of Peranakan Etawah goats on the motility, viability and the integrity of sperm membrane.

The research was done at In vitro Fertilization Laboratory Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University and Biomoleculer Laboratory Faculty of Mathematic and Sciences Brawijaya University. The samples of this research were fresh semen of the Peranakan Etawah 2 years old, IGF Complex isolat, BO, HOS and eosin negrosin dissolved. Goat's semen examined by macroscopic and microscopic technique. This research using 3 treatments consisting of BO dissolved as control group (P0), IGF Complex group (P1), and BO dissolved + IGF Complex group (P2). Then semen after treatment motility, viability, and membrane integrity were examined at 30, 45, and 60 second. The data was analyzed by Two Way ANAVA and followed by Duncan test. The result shown that motility, viability, and membrane integrity of spermatozoa significant difference between control group (P0) and IGF Complex protein (P1) addition.

Key words : IGF-1Complex, IGF-1, spermatozoa, seminal plasma,

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayahNya sehingga penulis mampu menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“Peran *Insuline Like Growth Factor (IGF) Complex* Plasma Semen Kambing Peranakan Etawah terhadap Peningkatan Kualitas Spermatozoa Hasil *Swim up*”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih yang mendalam kepada :

Ibu Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Prof. Dr. Soehartojo.H, M.Sc., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Mufasirin, M.Si., drh selaku dosen pembimbing kedua yang telah banyak memberikan saran, nasehat serta waktu untuk memberikan bimbingan.

Ibu Dr. Hj. Ir. Moestikoweni.P., MAggr selaku dosen wali terima kasih atas nasehat yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan.

Ibu Suherni Susilowati, MKes., drh yang telah mempercayakan penelitian ini kepada penulis serta memberikan ide, saran, kritik dan bimbingan selama penelitian.

Ibu, Bapak dan keluarga yang tercinta, terima kasih atas kesabaran dan kasih sayang yang telah diberikan serta pengorbanan materi, dan doa yang tidak terhingga.

Rekan-rekan penelitian : Anik dan Hendrawan terima kasih atas kerjasama dan bantuannya selama ini.

Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Hewan Unair serta semua pihak yang telah membantu penyelesaian tulisan ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan penulisan ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam tulisan ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan dunia Kedokteran Hewan di Indonesia.

Surabaya, Mei 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
1.6 Landasan Teori.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Kambing Peranakan Etawah.....	8
2.2 Semen.....	8
2.2.1 Plasma Semen	9
2.2.2 Spermatozoa.....	9
2.3 Spermatogenesis	11
2.4 Metabolisme spermatozoa.....	12
2.5 Growth factor.....	14
2.6 Insuline Like Growth Factor-1 (IGF-1).....	14
2.7 Insuline Like Growth Factor-2 (IGF-2).....	15
2.8 IGF-BP 3.....	15
2.9 IGF-1 Complex.....	16
2.10 Acid Labile Subunit.....	16
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	18
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2 Materi Penelitian.....	18
3.2.1 Bahan penelitian.....	18
3.2.2 Alat – Alat Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Koleksi semen disertai pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.....	19
3.3.2 Perlakuan percobaan	19

3.3.3	Peubah yang diamati.....	20
3.3.3.1	Motilitas spermatozoa.....	20
3.3.3.2	Viabilitas spermatozoa.....	20
3.3.3.3	Keutuhan Membran spermatozoa	20
3.4	Rancangan penelitian dan Analisis data	21
BAB 4	HASIL PENELITIAN	23
4.1	Pemeriksaan semen sebelum perlakuan.....	23
4.2	Pemeriksaan mikroskopis semen setelah perlakuan.....	23
4.2.1	Motilitas spermatozoa.....	23
4.2.2	Viabilitas spermatozoa.....	25
4.2.3	Keutuhan membran spermatozoa.....	27
BAB 5	PEMBAHASAN.....	31
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
6.1	Kesimpulan.....	36
6.2	Saran.....	36
	RINGKASAN.....	37
	DAFTAR PUSTAKA.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rerata motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF Complex selama waktu 30, 45 dan 60 menit (%).....	24
4.2 Rerata motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF Complex (%).....	24
4.3 Rerata motilitas spermatozoa berdasarkan interaksi waktu dan perlakuan (%).....	25
4.4 Rerata viabilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF Complex - selama waktu 30, 45 dan 60 menit (%).....	26
4.5 Rerata viabilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan IGF Complex (%).....	26
4.6 Rerata viabilitas spermatozoa berdasarkan interaksi waktu dan perlakuan (%).....	27
4.7 Rerata keutuhan membran spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF Complex selama waktu 30, 45 dan 60 menit (%)	27
4.8 Rerata keutuhan membran spermatozoa setelah diberi perlakuan IGF Complex (%).....	28
4.9 Rerata keutuhan membran spermatozoa berdasarkan interaksi waktu dan perlakuan (%).....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	22
4.1 Spermatozoa pada pemeriksaan viabilitas dengan pewarnaan eosin negrosin perbesaran 400x.....	30
4.2 Spermatozoa pada pemeriksaan keutuhan membran dengan <i>Hypo Osmotic Swelling Test</i> (HOST).....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data motilitas spermatozoa sebelum dan setelah ditransformasi (%).....	41
2. Analisis statistik motilitas spermatozoa (%).....	42
3. Data viabilitas spermatozoa sebelum dan setelah ditransformasi (%).....	44
4. Analisis statistik viabilitas spermatozoa (%).....	45
5. Data keutuhan membran spermatozoa sebelum dan setelah transformasi %.....	47
6. Analisis statistik keutuhan membran spermatozoa (%).....	48
7. Prosedur pemeriksaan motilitas (gerak progresif) spermatozoa.....	50
8. Prosedur pemeriksaan viabilitas spermatozoa.....	51
9. Prosedur pemeriksaan keutuhan spermatozoa.....	52
10. Prosedur pembuatan larutan BO sebagai medium pencuci spermatozoa...	53
11. Prosedur pembuatan larutan eosin negrosin.....	54
12. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen sebelum perlakuan	55
13. Hasil isolasi protein IGF Complex dengan metode SDS PAGE 12%.....	56

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

PE	= Peranakan Etawah
IGF-1	= <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IGFBP-3	= <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3</i>
ALS	= <i>Acid Labile Subunit</i>
ATP	= <i>Adenosin Tri Phosohat</i>
ADP	= <i>Adenosin Diphosphat</i>
AMP	= <i>Adenosin Monophosphat</i>
SDS PAGE	= <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
FSH	= <i>Folicle Stimulating Hormone</i>
LH	= <i>Luteinizing Hormone</i>
BO	= <i>Brickest and Oliphant</i>
HOST	= <i>Hypo Osmotic Swelling Test</i>
Kda	= <i>Kilodalton</i>
ROS	= <i>Reactiv Oxygen Species</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kemajuan di bidang bioteknologi banyak sekali memacu pengembangan penelitian khususnya di bidang reproduksi. Berdasarkan kondisi di lapangan yang menunjukkan angka kebuntingan yang masih rendah pada ternak, kematian embrio dini, penularan penyakit melalui perkawinan alami serta kematian induk atau anak akibat distokia dan sebab lain maka dikembangkan suatu teknik yang dapat meningkatkan produktifitas ternak yang lazim disebut dengan Transfer Embrio. Transfer Embrio bisa dilakukan melalui teknik pembuahan *in vitro* yaitu pembuahan untuk memproduksi embrio secara buatan diluar tubuh induk betina. Seiring waktu berjalan, penelitian di bidang Transfer Embrio masih belum bisa menghasilkan embrio baik secara kualitas maupun kuantitas, hal ini disebabkan angka keberhasilan embrio berkualitas baik dalam proses pembuahan *in vitro* masih rendah. Keberhasilan pembuahan *in vitro* yang masih rendah pada Transfer Embrio perlu dikaji secara molekuler di bidang reproduksi, mengingat pada proses pematangan spermatozoa dibutuhkan protein plasma semen yang diduga berperan terhadap peningkatan kualitas spermatozoa. Saat ini sintesa dan fungsi protein dalam semen tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui.

Plasma semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik yang mengatur fungsi spermatozoa. Dilaporkan bahwa faktor yang terdapat di dalam plasma semen dapat mempengaruhi viabilitas dan motilitas spermatozoa. Plasma semen dapat memelihara motilitas spermatozoa pada sapi

dan domba serta viabilitas spermatozoa domba. Ada beberapa komponen biokimia dari plasma semen yang dapat memperbaiki integritas membran spermatozoa domba pada keadaan *cold shock* (Perez *et al.*, 2000). Beberapa penelitian biomolekuler mengatakan bahwa dengan penambahan beberapa protein tertentu dapat memperbaiki proses fertilisasi dan dapat mempertahankan kehidupan sel spermatozoa

Salah satu komponen protein dari plasma semen yang dapat meningkatkan kualitas semen adalah *Insuline Like Growth Factor- 1* (IGF-1). Ada korelasi yang positif antara IGF-1 dalam plasma semen dengan kualitas semen pada semen manusia (Hirai *et al.*, 2001). Saat ini penelitian tentang peran protein IGF Complex plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap kualitas spermatozoa memang belum banyak diteliti, terutam di Indonesia. Untuk itu perlu ada penelitian lebih lanjut mengenai peran IGF Complex terhadap peningkatan kualitas spermatozoa.

Insuline Like Growth Factor-1 dapat mempertahankan motilitas spermatozoa melalui peningkatan metabolisme energi. *Insuline Like Growth Factor-1* telah menunjukkan dapat meningkatkan *uptake* glukosa, produksi asam laktat, aktifitas piruvat dehidrogenase dan konversi pada glukosa 6 phospat. Kemungkinan lain adalah terdapat antioksidan pada sistem IGF dalam kadar yang terbatas. Peroksidasi lipid dan *reactive oxygen species* yang dihasilkan oleh gerakan spermatozoa dapat menyebabkan kerusakan parah terhadap perlengkapan metabolik. Hal itu ditunjukkan dengan adanya penurunan fungsi dan motilitas spermatozoa. *Insuline Like Growth Factor-1* terhadap spermatozoa dapat

mencegah disfungsi mitokondria, mempengaruhi homeostasis kalsium dan dapat meningkatkan ketahanan sel (Henricks *et al.*, 1998)

1.2 Rumusan masalah

1. Apakah IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah berperan terhadap peningkatan motilitas spermatozoa hasil *swim up* ?
2. Apakah IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah berperan terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa hasil *swim up* ?
3. Apakah IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah berperan terhadap peningkatan keutuhan membran spermatozoa hasil *swim up* ?

1.3 Tujuan penelitian

Dalam penelitian ini kualitas spermatozoa yang bisa diamati adalah motilitas, keutuhan membran dan viabilitas spermatozoa, sehingga tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui peran IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap peningkatan motilitas spermatozoa hasil *swim up*.
2. Untuk mengetahui peran IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa hasil *swim up*.

3. Untuk mengetahui peran IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap peningkatan keutuhan membran spermatozoa hasil *swim up*.

1.4 Hipotesis penelitian

1. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah dapat meningkatkan motilitas spermatozoa hasil *swim up*.
2. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa hasil *swim up*.
3. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah dapat meningkatkan keutuhan membran spermatozoa hasil *swim up*.

1.5 Manfaat penelitian

1. Sebagai bahan informasi dalam rangka mengkaji peran IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap kualitas spermatozoa kambing hasil *swim up*.
2. Sebagai bahan pertimbangan untuk memperbaiki kualitas spermatozoa dalam rangka fertilisasi *in vitro*

1.6 Landasan teori

Semen sebagian besar tersusun atas plasma semen. Fungsi utama plasma semen adalah sebagai media pembawa baik dari saluran reproduksi jantan maupun dari saluran reproduksi betina. Plasma semen mengandung zat organik, anorganik

dan air. Zat organik yang terdapat dalam plasma semen adalah phosphoril kholine, glyceril, asam asetat, fruktosa, inusitol, sorbitol, ergothionin, dan spermine, sedangkan zat anorganik adalah kalium, kalsium dan bikarbonat (Partodihardjo, 1982)

Plasma semen terdiri dari beberapa komponen biokimiawi yang spesifik yang mengatur fungsi spermatozoa. Telah dilaporkan bahwa faktor yang terdapat di dalam plasma semen dapat mempengaruhi motilitas dan viabilitas spermatozoa. Plasma semen dapat memelihara motilitas spermatozoa pada sapi dan domba serta viabilitas spermatozoa domba. Komponen biokimia dari plasma semen dapat memperbaiki integritas membran spermatozoa pada keadaan *cold shock* (Perez *et al.*, 2000)

Insuline Like Growth Factor (IGF) atau somatomedin merupakan polypeptida *growth factor* yang disekresi oleh hati dan berbagai jaringan sebagai respon dari rangsangan *growth hormon*. *Insuline Like Growth Factor* bekerja melalui mekanisme endokrin atau autokrin dan parakrin (Hafez, 2000). *Insuline Like Growth Factor Complex* diduga terdapat dalam plasma semen dari air mani kambing (Susiaty, 2006)

Insuline Like Growth Factor (IGF -1 dan IGF-2) merupakan polipeptida rantai tunggal dengan struktur yang homolog dengan proinsulin. *Insuline Like Growth Factor* berfungsi untuk meregulasi proliferasi dari berbagai macam sel dan mengeluarkan efek metabolik dari *Growth Factor*, sedangkan IGF-BP adalah asam amino yang bekerja sebagai pembawa protein dan pengatur kerja *Insuline Like Growth Factor* (Wilson *et al.*, 1998).

Pada keadaan normal, bentuk dari sirkulasi *Insuline Like Growth Factor* (IGF) adalah GH-depedent 150 kDa Complex. Kompleks itu dibentuk dari ikatan protein IGF, IGF-BP 3 (IGF-Binding Protein 3), dan ALS (Acid Labile Subunit) (Barreca *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 2004)

Penambahan spermatozoa sapi dengan IGF-1 dapat meningkatkan motilitas spermatozoa progresif dibandingkan dengan spermatozoa yang tidak ditambah dengan protein IGF-1 (Macpherson *et al.*, 2002)

Usaha meningkatkan kualitas spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan dengan cara melakukan pencucian spermatozoa dari bahan dalam plasma semen yang dapat menurunkan kemampuan fertilisasi spermatozoa. (Hinting, 1989)

Salah satu media pencuci spermatozoa yang bersifat isotonis adalah media *Brickets and Oliphant* (BO). Media BO banyak mengandung kalsium, magnesium, natrium klorida serta glukosa dan piruvat sebagai bahan nutrisi spermatozoa serta asam amoniak yang sangat dibutuhkan bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Natrium sodium piruvat dan glukosa dalam medium BO sebagai sumber energi. Glukosa dalam media BO berfungsi sebagai sumber energi melalui proses glikolisis yang mengubah glukosa menjadi glukosa 6 phospat.. Glukosa 6 phospat diubah menjadi fruktosa 6 phospat, kemudian melalui bantuan enzim *difoscopyridin nukleotida* (DPN), fruktosa 6 phospat diubah menjadi asam monophospat gliserin menghasilkan sumber energi yang digunakan untuk motilitas spermatozoa serta metabolisme biosintesa sel (Rimayanti dkk., 1998)

Penambahan medium BO ke dalam spermatozoa dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba menjadi 70-80% dalam waktu 2-4 jam. Medium BO selain, dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, juga dapat meningkatkan kematangan hidup spermatozoa pada domba (Yanagimachi, 1986). Selain itu, medium BO juga berfungsi untuk sumber energi melalui proses glikolisis (Rimayanti dkk., 1998)

Swim up merupakan teknik untuk mendapatkan spermatozoa yang motil dan sekaligus untuk merangsang proses kapabilitas spermatozoa. Spermatozoa yang motil akan bergerak naik dari lapisan bawah menuju lapisan atas medium (Hinting, 1989)

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kambing Peranakan Etawah

Kambing Peranakan Etawah merupakan hasil persilangan antara kambing Kacang dan Etawah. Kambing merupakan penghasil daging dan susu. Jenis kambing ini banyak dipelihara di Indonesia dengan ciri sebagai berikut, warna bulu bervariasi mulai dari coklat muda, hitam dan lain-lain, daun telinga panjang 12 – 30 cm, tinggi badan mencapai 76 – 100 cm, berat badan sekitar 40 Kg untuk jantan dewasa dan 35 Kg untuk betina dewasa, kambing jantan berbulu agak panjang dan lebih tebal dan terdapat pada bagian atas dan bawah leher serta bagian pundaknya, sedangkan hewan betina pada bagian garis belakang paha memiliki bulu lebih panjang dan tebal (Mulyono, 2000)

2.2 Semen

Semen atau air mani adalah sekresi dari alat kelamin jantan yang diejakulasikan ke dalam saluran alat kelamin betina pada waktu kopulasi pada perkawinan alam. Untuk keperluan Inseminasi Buatan (IB), semen ditampung dengan beberapa cara seperti menggunakan vagina buatan, elektroejakulasi dan sebagainya. Semen terdiri dari spermatozoa dan plasma semen. Semen dihasilkan oleh tubulus seminiferus dari testis sedangkan plasma semen dihasilkan oleh campuran sekresi yang dihasilkan terutama oleh kelenjar vesikula seminalis dan sedikit tambahan sekresi dari kelenjar cowper, testis, epididimis, dan vas deferens (Evans and Maxwell, 1987)

2.2.1 Plasma semen

Sebagian besar volume semen terdiri dari plasma semen. Fungsi utama plasma semen adalah sebagai suatu media pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi jantan kedalam saluran reproduksi betina. Fungsi ini dapat dijalankan karena plasma semen mengandung bahan penyanggah dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Ismudiono, 1999)

Plasma semen mempunyai beberapa fungsi antara lain: meningkatkan aktifitas spermatozoa, meningkatkan volume semen, melicinkan saluran urethra, bahan makanan spermatozoa dan menetralkan urin yang mencampuri semen (Hardjopranjoto, 1995)

Plasma semen mengandung zat organik, anorganik dan air. Zat organik yang terdapat dalam plasma semen relatif lebih banyak dibandingkan dengan yang terdapat di bagian lain dalam tubuh, unsur tersebut adalah phosphoril kholine, glyceryl phosphorylkholin, asam asetat, fruktosa, inusitol, sorbitol, ergothionin, dan spermine. Zat anorganik adalah K, Ca dan Bikarbonat (Partodihardjo, 1982).

Menurut Hafez (1993), plasma semen mengandung nutrisi dan *buffer* untuk kapasitas spermatozoa. Plasma semen mengandung bahan pengencer yang berfungsi untuk merangsang motilitas dan metabolisme spermatozoa dalam epididimis.

2.2.2 Spermatozoa

Spermatozoa adalah bagian dari semen yang diejakulasikan oleh testis. Spermatozoa merupakan suatu sel kecil, kompak dan sangat khas yang tidak

tumbuh membagi diri. Kepala spermatozoa yang membawa materi hereditas paternal dan ekor yang mengandung sarana penggerak. Spermatozoa melibatkan diri dalam pembuahan untuk terbentuknya individu baru sejenis. Spermatozoa tidak memiliki sitoplasma yang khas bagi kebanyakan sel, sebagai contoh volume spermatozoa diperkirakan satu persepuluh ribu dari volume satu ovum, namun keduanya mempunyai nilai hereditas yang sama (Hafez, 1993)

Spermatozoa merupakan hasil akhir dari sel jantan setelah mengalami proses pematangan. Spermatozoa adalah sel yang sudah sangat terspesialisasi dan padat dan tidak lagi mengalami pertumbuhan. Spermatozoa yang berkualitas baik adalah spermatozoa yang bergerak progresif, lurus dan cepat. Kepala spermatozoa berbentuk oval, memanjang, lebar dan datar. Kepala spermatozoa mengandung materi inti yaitu kromosom yang terdiri dari DNA, yang bersenyawa dengan protein bagian anterior selubung inti atau selubung dalam akrosom (Hafez., 2000).

Membran spermatozoa terdiri dari dua lapis fosfolipid, yaitu lapisan fosfolipid hidrofilik yang membentuk permukaan membran bagian luar dan permukaan membran bagian dalam, sedangkan lapisan fosfolipid hidrofobik dari spermatozoa bertemu di bagian tengah dari membran kepala (Darnell *et al.*, 1990; Subrata, 1998)

Membran spermatozoa di beberapa daerah mempunyai fungsi yang khusus. Membran pada bagian depan kepala spermatozoa berperan pada proses kapasitasasi, reaksi akrosom dan penembusan pada zona pelusida dari ovum pada waktu proses fertilisasi. Membran bagian belakang akrosom spermatozoa (*post acrosomal*

region) berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema ovum pada proses fertilisasi (*sperm egg recognition*). Membran pada bagian ekor spermatozoa berfungsi untuk mendapatkan energi serta membuat gerakan berbentuk gelombang bagi spermatozoa (Darnell *et al.*, 1990; Subrata, 1998)

2.3 Spermatogenesis

Spermatozoa berasal dari spermatogonia epitel germinalis yang terdapat dari lapisan dalam tubulus seminiferus. Pertumbuhan sel ini dengan suatu seri pembelahan sel yang berurutan diikuti perpindahan sel tersebut ke arah lumen tubulus. Sel spermatogonia akan melepaskan diri dari lingkungan sekitar dan berubah bentuk dan ciri. Beberapa waktu kemudian setelah sel ini melekat pada sel induk yang disebut sel Sertoli, spermatozoa akan melepaskan dari sel induk tadi dan bebas dalam saluran tubuli menuju ke saluran pengumpul. Keseluruhan proses pembentukan spermatozoa disebut *spermatogenesis*.

Spermatogenesis terdiri dari dua fase utama. Fase utama meliputi perkembangan awal sel spermatogonia dengan cara pembelahan mitosis, kemudian melalui pembelahan meiosis menghasilkan jumlah kromosom menjadi setengah dari sel induk, yaitu dari diploid menjadi haploid. Setelah itu dilanjutkan dengan pembelahan mitosis dari jumlah sel menjadi dua kali. Tingkatan spermatogenesis ini disebut *spermatocytogenesis*. Peristiwa ini berakhir dengan pembentukan spermatid. Fase kedua spermatogenesis adalah *spermiogenesis*. Pada fase ini spermatid mengalami metamorfosis dan berubah bentuk serta menghasilkan spermatozoa yang sempurna. Perubahan ini termasuk

pembentukan akrosom kepala, bagian tengah, ekor spermatozoa dan bagian-bagian dari berbagai materi seluler. Pada proses pembentukan, sebagian sitoplasma spermatid dikeluarkan dari bentuk terakhir spermatozoa, dan terjadi butir sitoplasma yang menggambarkan spermatozoa yang belum dewasa. Selama pendewasaan, sel spermatozoa melekat pada sel Sertoli atau disebut juga sel induk yang terbentuk dari membrana basalis tubuli seminiferi dan selama proses perlekatan tersebut spermatozoa menerima makanan dari sel Sertoli sampai sel spermatozoa dilepaskan dan masuk dalam lumen tubulu dan memulai perjalanan melalui saluran pengeluaran (Salisbury dan Vandemark, 1985)

Proses spermatogenesis ini dipengaruhi secara langsung oleh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan secara tidak langsung oleh *Luteinizing Hormone* (LH). *Follicle Stimulating Hormone* berfungsi merangsang sel germinatif dari tubulus seminiferus testis, sedangkan LH berfungsi merangsang pembentukan hormon androgen oleh sel Leydig. Androgen berperan merangsang spermatogenesis pada tahap akhir (Bearden and Fuquay, 1992)

2.4 Metabolisme spermatozoa

Kehidupan sel spermatozoa di dalam semen sangat bergantung pada besar kadar fruktosa sebagai sumber energi yang utama. Pada keadaan anaerobik, sel spermatozoa memakai karbohidrat sebagai sumber energi. Apabila sel spermatozoa disimpan dalam keadaan anaerobik, maka kadar fruktosa dalam semen akan berkurang sedangkan asam laktat akan bertambah. Sel spermatozoa pada mamalia sanggup mencerna beberapa zat yang ada di dalam cairan asesoris

atau cairan yang ada dalam alat kelamin betina serta yang ada di dalam cairan media pengencer. Pada keadaan aerobik sumber energi sel spermatozoa dapat juga diperoleh dengan jalan mengadakan oksidasi asam laktat menjadi CO_2 dan H_2O (Hardijanto dan Harjopranto, 1994)

Menurut Toelihere (1981) yang dikutip Hidayah (2005), Energi yang digunakan untuk motilitas spermatozoa berasal dari perombakan ATP di dalam selubung mitokondria melalui reaksi penguraian menjadi Adenosin Diphosphat (ADP) dan Adenosin Monophosphat (AMP). Kelangsungan pergerakan spermatozoa ini mengharuskan dibangun kembali ADP dan ATP (reaksi berlangsung bolak balik). Usaha yang dilakukan untuk membangun kembali ATP dan ADP maupun ADP dan AMP adalah dengan penambahan gugus phosphoril yang dapat diperoleh dari karbohidrat dan lemak.

Mekanisme metabolisme spermatozoa adalah sebagai berikut, glukosa secara difusi masuk melalui membran leher kemudian di dalam sitoplasma leher mengalami glikolisis dan menghasilkan asam piruvat, asam laktat, dan ATP. Asam piruvat dengan bantuan enzim *piruvat dehidrogenase* diubah menjadi asetil ko-A, kemudian masuk dalam *siklus Krebs* dengan bantuan oksigen, rantai respirasi dan sistem sitokrom akan terbentuk ATP, yang kemudian diserahkan pada serabut luar dan serabut dalam untuk menimbulkan pergerakan kontraktile (Hafez, 2000)

2.5 *Growth factor*

Growth factor secara langsung berperan dalam proses proliferasi dan differensiasi sel. Oleh karena itu, mereka memainkan peranan penting dalam proses morfogenesis, pertumbuhan sel dan differensiasi serta kelangsungan homeostasis jaringan. Berdasarkan perbedaan struktur dan afinitas biologisnya *growth factor* diklasifikasikan menjadi beberapa famili yaitu: *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Plateled Derivat Growth Factor* (PDGF), *Insuline Like Growth factor* (IGF), *Transforming Growth Factor B* (TGFB) dan *Hoemopoetic Growth Factor* (Hafez, 2000)

2.6 *Insuline Like Growth Factor-1 (IGF-1)*

Insuline Like Growth Factor -1 (IGF-1) tersusun atas 70 asam amino dengan berat molekul 7,65 kDa (Brzozowski *et al.*, 1998)

Insuline Like Growth Factor (IGF-1 dan IGF-2) merupakan ikatan tunggal protein polipeptida dengan struktur yang homolog dengan proinsulin. *Insuline Like Growth Factor* berfungsi untuk regulasi proliferasi dan differensiasi dari berbagai macam sel dan mengeluarkan efek metabolik dari *Insuline Like Growth Factor*, sedangkan IGF-BP adalah asam amino bekerja sebagai pembawa protein dan pengatur kerja IGF (Wilson *et al.*,1998)

2.7 *Insuline Like Growth Factor-2 (IGF-2)*

Growth factor adalah polypeptida yang berfungsi parakrin, autokrin dan atau pengatur endokrin sel pertumbuhan serta differensiasi sel. Terutama IGF-1 dan IGF-2 yang merupakan hormon peptida dan mempunyai potensi mitogenik, metabolik dan aksi diferensiasi sel pada tubuh. *Insuline Like Growth Factor* ini diproduksi di hati dan beberapa organ lain serta seringkali dihasilkan dalam respon sekresi *growth hormon* dari kelenjar pituitari anterior. Biosintesis IGF diatur terutama oleh *growth hormon*, dan sebagian besar dari aksi IGF-1 dan IGF-2 berdiri sendiri atau tidak tergantung dengan *growth hormon*. Aavailitas IGF dimodulasi oleh kelompok IGF binding protein (IGF-BP 1- IGF-BP 6) (Macpherson, 2002)

2.8 *Insuline Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGF-BP 3)*

Insuline Like Growth Factor Binding Protein 3 pada plasma semen mempunyai berat molekul yang terbesar diantara IGF-BP yang lain yaitu antara 40-46 kDa (Wilson *et al.*, 1998)

Seperti *Insuline Like Growth Factor Binding Protein* lain, IGF-BP 3 dapat bekerja menghambat kerja IGF dengan menghambat mitogenesis, differensiasi, dan memicu program kematian sel normal atau apoptosis (Firth and Baxter, 2002). Hal ini dapat terjadi terutama bila IGF-BP berdiri sendiri. Prinsip hambatan IGF-BP terhadap kerja IGF adalah dengan mengadakan isolasi IGF dari reseptornya. Kerja proteolisis IGF-BP 3 dapat menyebabkan

penurunan afinitas terhadap ikatan antara IGF dengan reseptornya (Wilson *et al.*, 1998)

2.9 *Insuline Like Growth Factor Complex (IGF complex)*

Secara umum seluruh IGF yang ada pada sirkulasi darah terdiri dari *Insuline Like Growth Factors*, *Insuline Like Growth Factor Binding Protein 3* (IGF-BP 3) dan *Acid Labile Subunit* (ALS) (L eong *et al.*, 1992; Dai and Baxter, 1992; Barreca *et al.*, 1995)

Konsentrasi tertinggi IGFs adalah pada darah, dimana IGFs mempunyai berat molekul sekitar 150 Kilodalton dalam bentuk kompleks yang terdiri dari IGF, IGF-BP 3 dan ALS (Boes *et al.*, 2003)

Insuline Like Growth Factor Binding Protein 3 adalah IGF-BP 3 yang paling dominan pada serum darah individu dewasa, IGF-BP 3 dapat membawa sekitar 75% - 80% dari total *Insuline Like Growth Factor*, terutama sebagai bagian dari kompleks protein dengan berat molekul 150 kDa. Komposisi terdiri dari satu molekul IGF-1, ditambah satu molekul IGF-BP 3 dan ditambah satu molekul protein lagi yang disebut *Acid Labile Subunit* (ALS), tetapi ALS mempunyai kemampuan berikatan setelah IGF-1 di dalam serum berikatan dengan IGF-BP 3 sebagai kompleks protein. Berat molekul sebesar 150 kDa ini adalah kompleks protein yang terlalu besar untuk meninggalkan sistem sirkulasi. Hal ini dapat memperpanjang waktu paruh IGF-1. Apabila IGF-1 berdiri sendiri hanya akan bertahan sekitar sepuluh menit, maka dalam kompleks protein spesifik IGF-1 dan IGF-BP 3 dapat bertahan sampai 12-15 jam (Wilson *et al.*, 1998)

2.10 *Acid Labile Subunit (ALS)*

Acid Labile Subunit adalah glikoprotein yang mengandung 578 residu asam amino dengan berat molekul sebesar 63,3 kDa. *Acid Labile Subunit* diproduksi oleh jaringan hati dan bentuk sederhana molekul yang ada dalam serum adalah glycoprotein doublet. Ukuran molekul ALS dapat bertambah dengan membentuk kompleks yang berperan penting dalam proses peredaran IGF-1 dan IGF-BP 3 secara extravascular. *Acid Labile Subunit* dilaporkan mampu berinteraksi dengan IGF dan IGF-BP 3 dan punya kemampuan untuk meningkatkan kapasitas ikatan antara IGF-BP 3 dengan ikatan IGF (Khosravi *et al.*, 1997)

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fertilisasi In vitro FKH Unair dan Laboratorium Biomolekuler FMIPA Unibraw selama tiga bulan yaitu mulai bulan Juni sampai bulan September 2006.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen dari kambing jantan Peranakan Etawah sebanyak 6 ekor, protein IGF Complex hasil isolasi SDS dari plasma semen, dan larutan *Brickets and Oliphants* (BO) untuk medium pencuci yang mempunyai komposisi tertentu dan dapat dilihat pada Lampiran 10.

Bahan untuk pemeriksaan viabilitas spermatozoa terdiri dari satu tetes semen dan larutan eosin negrosin. Komposisi larutan eosin negrosin dapat dilihat pada Lampiran 11.

Bahan untuk pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa adalah semen dan larutan *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOST) dengan perbandingan 1:10, serta larutan eosin.

3.2.2 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat vagina buatan untuk menampung semen dari kambing Peranakan Etawah jantan. Peralatan lain yang dibutuhkan terdiri dari, tabung reaksi, tabung sentrifus,

sentrifus, tabung eppendorf, pipet, mikropipet, gelas objek, gelas penutup, dan mikroskop.

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Koleksi semen kambing

Semen dari kambing Peranakan Etawah jantan yang mempunyai libido tinggi ditampung dengan menggunakan vagina buatan kemudian semen yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung berskala dan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Apabila kualitas dan kuantitas semen baik dilanjutkan dengan penelitian tahap berikutnya

3.3.2 Perlakuan percobaan

Semen segar diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis, setelah itu ditambahkan medium pencuci yaitu larutan BO (Brickets and Oliphant) dengan perbandingan 1: 2 kemudian diinkubasikan pada suhu 20° selama 30 menit, setelah itu dilakukan *swim up* dan diperiksa kembali secara mikroskopis. Kemudian dilakukan penelitian dengan tiga perlakuan. Perlakuan yang diberikan terdiri dari P0; P1 dan P2.

P 0 : 3 tetes semen + 0,25 ml larutan BO

P 1 : 3 tetes semen + 50 mikroliter IGF *Complex*

P 2 : 3 tetes semen + IGF *Complex* + 0,25 ml larutan BO

Setelah perlakuan berjalan sesuai dengan jadwal kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas, viabilitas dan integritas membran setelah waktu inkubasi 30 menit, 45 menit dan 60 menit

3.3.2 Peubah yang diamati setelah perlakuan.

3.3.2.1 Motilitas spermatozoa

Penilaian dilakukan berdasarkan persentase gerakan spermatozoa aktif atau bergerak progresif dibanding dengan seluruh spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang dan perhitungan dinyatakan dalam persen. Prosedur pelaksanaan pemeriksaan motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.3.2.2 Viabilitas spermatozoa.

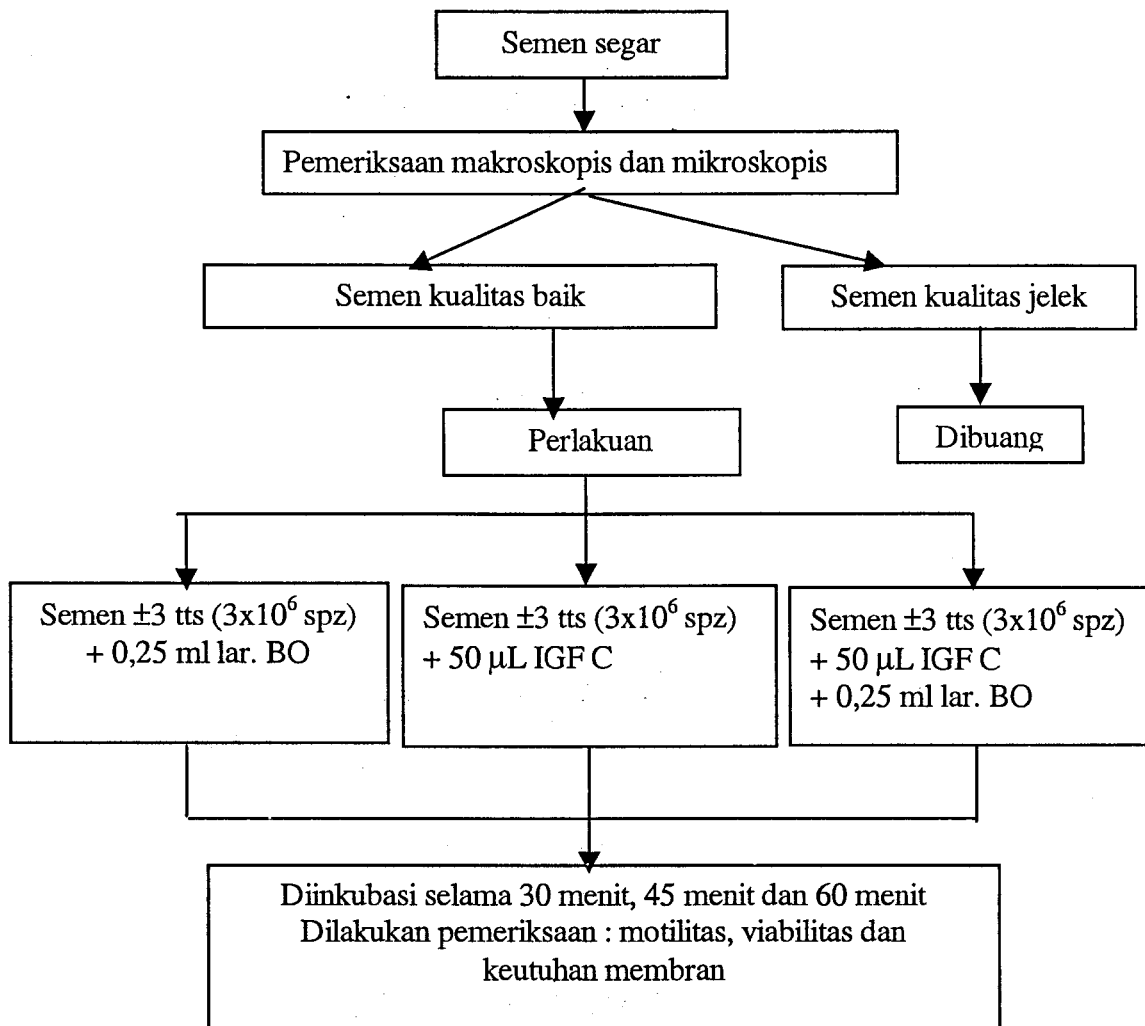
Viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang hidup dan yang mati. Cara penilaian adalah dengan menghitung jumlah 100 spermatozoa dari spermatozoa yang hidup (kepala tidak berwarna) dan spermatozoa yang mati (kepala berwarna merah) dan masing- masing dinyatakan dalam persen. Prosedur pelaksanaan pemeriksaan viabilitas spermatozoa dapat dilihat ada Lampiran 8.

3.3.2.3 Keutuhan membran spermatozoa.

Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dilakukan dengan melihat keadaan membran plasma spermatozoa yang dievaluasi dengan *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOST). Spermatozoa yang memiliki membran plasma yang utuh ditandai dengan ekor melingkar, sedangkan spermatozoa yang membran plasmannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus. Prosedur pelaksanaan pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.4 Rancangan Penelitian dan Analisis Data.

Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dan jika hasilnya ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan dan waktu pengamatan kemudian diteruskan dengan uji jarak berganda Duncan (Santoso, 2004).



Keterangan :

PE : Peranakan Etawah

BO : Brickets and Oliphant

IGF C : Insulin Like Growth Factor Complex

Gambar 3.1. Kerangka Operasional Penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Pemeriksaan Semen Kambing Sebelum Perlakuan

Sebelum diberi perlakuan, segera setelah dikumpulkan semen kambing diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, dan konsistensi, sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, motilitas dan viabilitas, serta keutuhan membran spermatozoa. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen kambing sebelum perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 12.

Setelah pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis pada semen dilakukan dan ternyata kualitasnya baik, kemudian ditambahkan larutan *Brickets and Oliphant* (BO) dengan perbandingan 1 bagian semen dan 2 bagian larutan BO. Setelah itu diinkubasi pada suhu 20° C selama 30 menit. Kemudian semen diambil setelah dilakukan *swim up* dan diperiksa secara mikroskopis. Hasil pemeriksaan semen setelah dilakukan *swim up* dapat dilihat pada Lampiran 12

4.2 Pemeriksaan mikroskopis semen kambing setelah perlakuan

4.2.1 Motilitas spermatozoa

Setelah semen kambing ditambahkan larutan BO dan diinkubasikan pada suhu 20° C lalu dilakukan *swim up* dan diberi perlakuan P0, P1, dan P2 selama waktu 30, 45 dan 60 menit maka dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa. Hasil pemeriksaan spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2

Table 4.1 Rerata motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* selama waktu 30, 45 dan 60 menit (%)

Waktu Pengamatan	N	Motilitas spermatozoa Rataan \pm SD
T1 (menit ke 30)	18	42,1128 ^b \pm 16,48708
T2 (menit ke 45)	18	38,2972 ^b \pm 17,04483
T3 (menit ke 60)	18	32,3750 ^a \pm 18,7319

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan data di atas menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan antara ketiga waktu pengamatan tersebut terhadap motilitas spermatozoa.

Table 4.2 Rerata motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* (%)

Perlakuan	N	Motilitas spermatozoa Rataan \pm SD
P0 (larutan BO)	18	28,8261 ^a \pm 9,9115
P1 (IGF <i>Complex</i>)	18	59,6394 ^b \pm 4,8751
P2 (larutan BO+ IGF <i>Complex</i>)	18	24,3194 ^a \pm 7,7231

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil uji Duncan didapatkan perbedaan yang nyata antara ketiga perlakuan tersebut terhadap motilitas spermatozoa.

Peningkatan motilitas spermatozoa pada P1 berbeda sangat nyata dengan P0 dan P2. Pada Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa peningkatan motilitas spermatozoa terjadi pada perlakuan yang hanya diberi protein IGF *Complex* (P1) sedangkan perlakuan yang diberi larutan BO (P0) dan perlakuan kombinasi antara larutan BO

dan protein IGF *Complex* (P2) menunjukkan terjadi penurunan motilitas spermatozoa.

Berikut ini adalah Tabel untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara perlakuan dan waktu pengamatan.

Tabel 4.3 Rerata motilitas spermatozoa berdasarkan interaksi waktu dan perlakuan (%)

Perlakuan	Waktu pengamatan (Rataan \pm SD)		
	30	45	60
P0 (lar. BO)	34,227 \pm 8,906	29,913 \pm 8,960	22,339 \pm 9,912
P1 (<i>IGF-1Comp</i>)	62,960 \pm 3,378	60,039 \pm 2,104	55,920 \pm 5,912
P2(BO+ <i>IGF-1Comp</i>)	29,152 \pm 5,978	24,940 \pm 6,117	18,867 \pm 8,092

Tidak ada superskrip pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan atau tidak ada interaksi antara perlakuan dan waktu

Berdasarkan data di atas dapat dilihat bahwa tidak ada interaksi yang terjadi antara perlakuan dan waktu pengamatan (lihat Lampiran 2)

4.2.2 Viabilitas spermatozoa

Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan

Tabel 4.5

Tabel 4.4. Rerata viabilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* selama waktu 30, 45 dan 60 menit(%)

Waktu Pengamatan	N	Viabilitas spermatozoa Rataan \pm SD
T1 (menit ke 30)	18	45,8678 ^b \pm 16,48708
T2 (menit ke 45)	18	43,0667 ^b \pm 16,90669
T3 (menit ke 60)	18	37,0678 ^a \pm 16,48708

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0.05$)

Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara ketiga waktu pengamatan terhadap viabilitas spermatozoa

Tabel 4.5 Rerata viabilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* (%)

Perlakuan	N	Motilitas spermatozoa Rataan \pm SD
P0 (larutan BO)	18	34,4033 ^b +9,1137
P1 (IGF <i>Complex</i>)	18	63,2633 ^c \pm 4,9822
P2 (larutan BO+ IGF <i>Complex</i>)	18	28,3353 ^a \pm 7,3332

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil uji Duncan didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antara ketiga perlakuan tersebut terhadap viabilitas spermatozoa.

Peningkatan viabilitas spermatozoa pada P1 berbeda sangat nyata dengan P0 dan P2. Pada Tabel 4.5 dapat dilihat bahwa peningkatan viabilitas spermatozoa terjadi pada perlakuan yang hanya diberi protein IGF *Complex* (P1) sedangkan perlakuan yang diberi larutan BO (P0) dan perlakuan kombinasi antara larutan BO dan protein IGF *Complex* (P2) menunjukkan terjadi penurunan viabilitas spermatozoa.

Berikut ini adalah Tabel untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara perlakuan dan waktu pengamatan

Tabel 4.6 Rerata viabilitas spermatozoa berdasarkan interaksi waktu dan perlakuan (%)

Perlakuan	Waktu pengamatan (Rataan \pm SD)		
	30	45	60
P0 (lar. BO)	38,548 \pm 7,065	36,225 \pm 8,885	28,437 \pm 9,286
P1 (IGF <i>Comp</i>)	66,562 \pm 3,316	64,227 \pm 2,435	59,002 \pm 5,612
P2 (BO+IGF <i>Comp</i>)	32,493 \pm 5,674	28,748 \pm 6,891	23,765 \pm 7,333

Tidak ada superskrip pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan atau tidak ada interaksi antara perlakuan dan waktu

Berdasarkan data di atas dapat dilihat bahwa tidak terjadi interaksi antara perlakuan dan waktu pengamatan (lihat Lampiran 4)

4.2.3 Keutuhan membran spermatozoa

Hasil pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dengan *Hypo Osmotic Sweeling Test* (HOST) dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan Tabel 4.8.

Tabel 4.7 Rerata keutuhan membran spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* 30, 45, dan 60 menit (%)

Waktu Pengamatan	N	Viabilitas spermatozoa Rataan \pm SD
T1 (menit ke 30)	18	48,0783 ^a \pm 16,7305
T2 (menit ke 45)	18	45,4889 ^a \pm 16,8213
T3 (menit ke 60)	18	41,1517 ^a \pm 19,6690

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata antara ketiga waktu pengamatan terhadap keutuhan membran spermatozoa.

Tabel 4.8. Rerata keutuhan membran spermatozoa setelah diberi perlakuan protein IGF *Complex* (%)

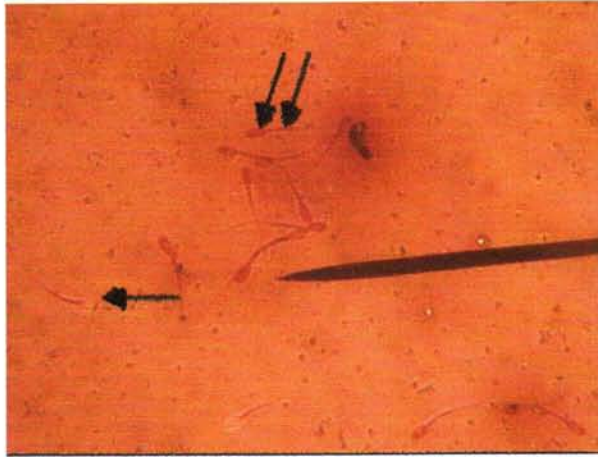
Perlakuan	N	Motilitas spermatozoa Rataan \pm SD
P0 (larutan BO)	18	41,3439 ^b \pm 12,6489
P1 (IGF <i>Complex</i>)	18	64,4178 ^c \pm 3,2453
P2 (larutan BO+ IGF <i>Complex</i>)	18	28,9572 ^a \pm 10,9213

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil uji Duncan didapatkan perbedaan yang sangat nyata antar ketiga perlakuan tersebut terhadap keutuhan membran spermatozoa.

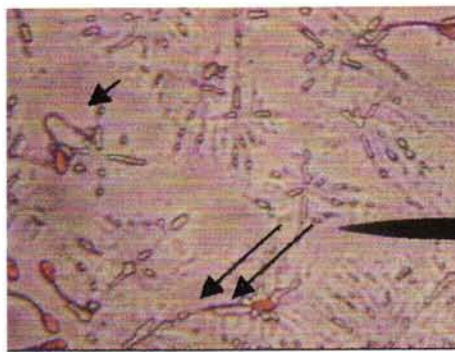
Peningkatan keutuhan membran spermatozoa pada P1 sangat berbeda nyata dengan P0 dan P2. Pada Tabel 4.8 dapat dilihat bahwa peningkatan keutuhan membran spermatozoa terjadi pada perlakuan yang hanya di beri protein IGF Complex (P1) sedangkan perlakuan yang di beri larutan BO (P0) dan perlakuan kombinasi antara larutan BO dan protein IGF Complex (P2) menunjukkan terjadi penurunan keutuhan membran spermatozoa.

Hasil pemeriksaan spermatozoa setelah perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Gambar 4.2 berikut ini.



Gambar 4.1 Spermatozoa pada pemeriksaan viabilitas dengan perwarnaan eosin negrosin perbesaran 400x

Keterangan : —▶ : spermatozoa yang hidup kepala tidak berwarna
 ==▶ : spermatozoa yang mati



Gambar 4.2 Spermatozoa pada pemeriksaan keutuhan membran dengan *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOST) perbesaran 400x

Keterangan : —▶ : spermatozoa ekor melingkar membrannya utuh
 ==▶ : spermatozoa ekor lurus membrannya rusak

BAB 5 PEMBAHASAN

Menurut Satmoko dan Soeradi (1992) yang dikutip oleh Darusman (2005), Kualitas spermatozoa menentukan keberhasilan dalam proses fertilisasi baik pada perkawinan alami maupun pada pembuahan *in vitro*, makin tinggi kualitas semen makin tinggi pula keberhasilan fertilisasi, untuk itu penentuan kualitas spermatozoa sangat perlu diperhatikan. Dalam kondisi segar atau diawetkan, persentase hidup dan motilitas spermatozoa merupakan faktor yang paling penting untuk dapat menentukan terjadinya fertilisasi. Motilitas spermatozoa yang kurang memenuhi syarat akan menyebabkan penurunan angka fertilisasi. Hal ini karena proses fertilisasi membutuhkan spermatozoa yang mampu bergerak maju, lurus ke depan dan mengalami kapasitasasi dan reaksi akrosom .

Kualitas dan kuantitas semen pada kambing Peranakan Etawah dipengaruhi oleh faktor pakan (protein, mineral, vitamin), suhu dan musim, frekuensi pengambilan air mani, perlakuan terhadap pejantan, penyakit, transportasi, umur, herediter dan latihan (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994).

Banyak sekali faktor yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa baik yang bersifat endogen maupun eksogen. Faktor endogen meliputi keadaan individu spermatozoa itu sendiri yang berkaitan erat dengan umur spermatozoa, tingkat pendewasaan spermatozoa, morfologi spermatozoa dan sifat biokimia semen, juga faktor-faktor yang menyangkut penyediaan energi untuk pergerakan spermatozoa. Faktor eksogen meliputi faktor luar yang berada diluar tubuh spermatozoa, seperti

faktor lingkungan dan faali meliputi viskositas, pH, suhu dan komposisi ion dalam media yang ada di sekitarnya (Hernawati, 1998).

Menurut Hafez (1993) yang dikutip oleh Hidayah (2005), metabolisme didalam spermatozoa bertujuan untuk pembentukan *Adenosin Triphospat (ATP)*. *Adenosin Triphospat* ini digunakan menyokong mekanisme pergerakan spermatozoa dan mempertahankan keseimbangan osmose. Oleh karena itu besarnya gaya metabolisme spermatozoa berhubungan secara langsung dengan motilitas (gerak progresif). Tempat terjadinya metabolisme adalah di sitoplasma dan mitokondria leher spermatozoa (Hafez, 1993).

Adenosin Triphospat yang dibutuhkan dengan cara glikolisis atau fruktolisis tersebut dapat dengan cara anaerob atau aerob yaitu melalui *siklus Krebs*. Metabolisme aerob melibatkan pengambilan oksigen yaitu dengan mitokondria (Tournaye, 1994).

Substrat atau bahan bakar pada umumnya berasal dari bahan-bahan yang terdapat pada plasma semen (eksogen) antara lain : glukosa, fruktosa, manosa, galaktosa, piruvat, sorbitol, asam oksalat, asam suksinat, dan asam lemakjenuh. Substrat juga dapat berasal dari dalam spermatozoa sendiri (endogen), antara lain : fosfolipid terutama pada keadaan mendesak. Bahan bakar eksogen berupa glukosa dan piruvat lebih siap dimetabolisme dibanding eksogen lain. Besarnya kecepatan metabolisme sangat tergantung pada tingginya jumlah nukleotida (ATP, ADP, AMP) dan akan lebih tinggi bila didukung oleh faktor-faktor seperti : mudahnya substrat digunakan, konsentrasi enzim dan transpor ion-ion pada membran (Ismudiono, 1999).

Secara *in vivo*, daya tahan hidup spermatozoa di dalam alat reproduksi betina merupakan modal dasar yang utama untuk terjadinya proses fertilisasi yang baik. Begitu juga pada pembuahan secara *in vitro*, daya tahan hidup spermatozoa dalam media biakan merupakan faktor yang penting untuk keberhasilan suatu pembuahan, sedangkan motilitas spermatozoa merupakan ciri utama dalam penilaian semen pada ternak (Hernawati, 1998)

Data penelitian ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa meningkat pada perlakuan (P1) yaitu spermatozoa yang hanya ditambahkan protein IGF *Complex* dan berbeda nyata dengan semua perlakuan (P0) dan (P2) seperti yang terlihat pada Tabel 4.2. Tetapi pada pengamatan waktu yaitu menit ke 30, 45, dan 60 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata seperti yang terlihat pada Tabel 4.1.

Viabilitas spermatozoa pada perlakuan yang hanya ditambahkan protein IGF *Complex* (P1) juga menunjukkan perbedaan yang nyata bila dibandingkan dengan semua perlakuan (P0) dan (P2) seperti yang terlihat pada Tabel 4.5. Sedangkan pada pengamatan waktu yaitu menit ke 30, 45, 60 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, seperti yang terlihat pada tabel 4.6. Begitu juga pada keutuhan membran spermatozoa, perlakuan yang hanya ditambahkan protein IGF *Complex* (P1) menunjukkan perbedaan yang nyata bila dibandingkan (P0) dan (P2). Sedangkan pada pengamatan waktu tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Peningkatan persentase angka motilitas, viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa pada perlakuan yang hanya ditambahkan protein IGF *Complex* menunjukkan bahwa protein tersebut mampu berperan pada perbaikan kualitas

spermatozoa. Tetapi pada data diatas tidak ditemukan adanya korelasi antara perlakuan dan waktu pengamatan.

Perlakuan (P0) atau kontrol dan (P2) yaitu spermatozoa yang hanya ditambah larutan BO menunjukkan penurunan motilitas, viabilitas dan keutuhan membran. Ini terjadi disebabkan kemungkinan dari konsentrasi larutan BO yang dibuat kurang seimbang sehingga larutan tidak bersifat isotonis dan menyebabkan kematian spermatozoa, ada kesalahan teknis penyimpanan larutan BO dalam lemari es sehingga suhunya tidak stabil. Kemungkinan yang lain adalah karena dosis larutan BO yang berlebih ketika ditambahkan pada perlakuan (P0) dan (P2) dimana spermatozoa hasil *swim up* tersebut sebelum perlakuan telah dicuci dengan larutan BO.

Menurut Machperson (2002) pada sistem reproduksi kuda jantan, IGF-1 telah diidentifikasi di dalam testis, dimana protein IGF-1 tersebut disekresi oleh sel Leydig dan sel Sertoli. Receptor IGF-1 telah diidentifikasi pada sel Sertoli, sel Leydig, spermatozoa sekunder, spermatid dan spermatozoa. IGF-1 dipercaya mampu berperan dalam spermatogenesis dan steroidogenesis.

Penambahan spermatozoa sapi dengan IGF-1 secara *in vitro* menunjukkan adanya total peningkatan motilitas spermatozoa progresif bila dibandingkan dengan spermatozoa yang tidak ditambahkan protein IGF-1

Kemungkinan IGF-1 dalam mempertahankan motilitas spermatozoa adalah dengan jalan metabolisme energi. *IGFs* telah menunjukkan peningkatan pengambilan glukosa, produksi laktat, aktivitas dehidrogenase dan konversi pada glukosa-6 phosphat. Kemungkinan yang lain adalah efek anti-oksidan dari *IGFs*, peroksidase

lipid dan *Reactiv Oxygen Species (ROS)* dapat menyebabkan kerusakan metabolisme kimia yang sangat berat, itu dibuktikan dengan adanya penurunan motilitas dan fungsi spermatozoa (Henricks *et al.*, 1998).

Insuline Like Growth Factors mencegah disfungsi mitokondrial, mempertahankan keseimbangan kalsium dan meningkatkan ketahanan sel. Peran IGFs bertindak sebagai antioksidan, dengan meningkatkan viabilitas spermatozoa. (Henricks *et al.*, 1998).

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah mampu berperan dalam meningkatkan motilitas spermatozoa hasil *swim up*.
2. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah mampu berperan dalam meningkatkan keutuhan membran spermatozoa hasil *swim up*.
3. Protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah mampu berperan dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa hasil *swim up*.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut dalam hal dosis efektif penambahan protein IGF *Complex*

RINGKASAN

Insuline Like Growth Factor Complex dibentuk oleh tiga fraksi yaitu IGFs, IGF-BP 3 dan ALS. *Insuline Like Growth Factor Complex* dipercaya berperan penting terhadap kualitas spermatozoa dengan cara meningkatkan motilitas, viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa.

Plasma semen mengandung bahan baku atau faktor yang dapat merusak daya pembuahan spermatozoa. Plasma semen dapat juga mengandung mikroorganisme yang mencemari system kultur dan juga limfosit yang menghasilkan sekresi beracun yang menghambat fertilisasi. Untuk itu perlu dilakukan pencucian spermatozoa dari bahan dalam plasma semen dengan medium isotonis yaitu larutan *Brickets and Oliphant* (BO).

Teknik *swim up* merupakan teknik untuk mendapatkan spermatozoa yang motil dan sekaligus untuk merangsang terjadinya kapasitasi spermatozoa. Spermatozoa yang motil akan bergerak naik ke lapisan atas medium.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran IGF *Complex* plasma semen kambing Peranakan Etawah terhadap kualitas spermatozoa hasil *swim up*.

Penelitian ini terdiri dari 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok semen dengan penambahan larutan BO sebagai kontrol (P0), penambahan protein IGF *Complex* (P1) dan penambahan larutan BO+protein IGF *Complex* (P2).

Semen dari hasil penampungan dengan seperangkat alat vagina buatan diambil 0,5 ml dan ditambahkan larutan BO 1 ml (perbandingan 1:2) kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 20⁰ C. Semen diambil 3 tetes dengan cara

swim up kemudian diletakkan pada 3 tabung perlakuan, yaitu perlakuan P0, P1, dan P2. Setelah diinkubasi dilakukan pemeriksaan mikroskopis pada menit ke- 30, 45 dan 60 yang meliputi motilitas, viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan. Pada kelompok perlakuan (P1) menunjukkan ada peningkatan motilitas, viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa bila dibandingkan dengan kontrol (P0) dan (P2). Dari data tersebut tidak menunjukkan ada korelasi antara waktu dan perlakuan. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa dengan penambahan protein IGF *Complex* pada plasma semen kambing Peranakan Etawah pada spermatozoa hasil *swim up* dapat meningkatkan persentase motilitas, viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Barreca A, Ponzani P, Arvigo M, Gadano G, Minuto F. Effect of Acid Labile Subunit on The Binding of Insuline Like Growth Factor (IGF)-Binding Protein-3 to (125I) IGF-1. *J. Clon. Endocrinol Metab.* 80 (4). Universty of Genova. Italy. 1318-24
- Bearden, J. H. and J. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction* 3rd edition. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey. 136-137, 141
- Boes M, Brian L, Dake, Barbara A, Booth, Alexander Sandra, Mathew B, Kevin L, Knudtson and Robert S. Bar. 2003. IGF-1 and IGF-BP 33 Transport in the Rat Heart. *AJP Endocrinology and Metabolisme.* Vol.284.E 237-K 239
<http://A:/IGF-1 and IGFBP-3 transport in the rat heart-Boes IGF in Rat.htm>. [7 Maret 2007]
- Brzozowski, A. M. , F de Bree and G. Dodson. 1998 Structural studies on Insuline Like Growth Factor. *Expression and Purification* 13: 319-325
- Dai J, Baxter R.C. 1992. *Moleculer Cloning of The Acid Labile Subunit of Threat Insuline Like Growth Factor Binding Protein Complex.* *Biochem. Biophys Res. Commun.* 188 (1). Departement of Medicine University of Sidney, NEW. Australia. 304-9
- Darnel, J. H. Lodish and Baltimore. 1990. *Moleculer cell Biology*, second edition *Sci. Am. Books.* 491-527
- Evans, G and W. M. C. Maxwell. 1987. *Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats.* Botter Worth. Hal : 25-32
- Hafez, E. S. E. 1993. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animal.* Lea and Febiger. Philadelphia. P 114-188
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animal.* 7th Ed. Lippincont Williams and Wilkins. 49-52, 107-108
- Hardjopranjoto, H. S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak.* Airlangga University Press. Unair. Surabaya. 55-57, 66-69
- Hardjianto dan Hardjopranjoto, 1994. *Ilmu Inseminasi Buatan.* Fakultas Kedokteran Hewan Uniersitas Airlangga. Surabaya. 34-36

- Henricks, D. M., A. J. Kouba, B. R. Lackey, W. R. Boone and S. L. Gray. 1998. Identification of Insuline-like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasm and Its Receptor on Spermatozoa : Influence on Sperm Motility. *J. Biol. Repro.* 59 : 330-337
- Hernawati, T. 1998. Peranan Heparin, Hipotaurin dalam media. Kapasitasi terhadap persentase hidup motilitas Spermatozoa dan pembuahan invitro pada sapi perah. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal: 61
- Hinting, A. 1989. Assesment of Human Spermatozoa Ability. Tesis. Ruks Universiteit. Belgium. Hal : 1-16
- Hirai, M., A. Boersma, A. Hoeflich, E. Wolf, J. Foll, R. Aumuller and J. Braun. 2001. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus sacrova*) : Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. USA. *J. Androl.* 22 (1): 104-110
- Ismudiono, 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi ke 2. fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal: 27-29
- Khosravi, M.J., A. Diamandi, J. Mistry., R.G. Krishna, and A. Khare. 1997. Acid Labile Subunit of Human Insuline Like Growth Factor Bindng Protein Complex : Measurement Molecular and Clinical Evaluation. *J. Clin. Endocrnol. Metb.* 82 : 3944-3951
- Leong, S. R., C. Baxter, T. Cameroto, J. Dai and W. I. Wood. 1992. Structure and Functional Expression of The Acid Labile Subunit of The Insuline Like Growth Factor-Binding Protein Complex. California. *J. Mol. Endocrinol.* 6 (6): 870-876
- Liu F, Hintz RL, Khare A, Diaugustine RP, Powell DR, Lee PD. 1994. Immunoblot Studies of The IGF Related Acid Labile Subunit. *J. Clin. endocrinol. Metab.* 79 (6). Departement of Pediatrics, Stanford University. 1883-6
- Macpherson, M. L., R. C. M. Simmen, F. A. Simmen, J. Hernandez, B. R. Sheerin, D. D. Varner, P. Looms, M. E. Cadario, C. D. Miller, S. P. Brinsko, S. Rigby and T.L. Blanchard. 2002. Insuline Like Growth Factor Binding Protein-2 and -5 in Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility.. Florida. *J. Biol. Repro.* 67 : 648- 654
- Mulyono. S. 2000. Teknik Pembibitan Kambing dan Domba. PT. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal 8
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara. Jakarta. Hal 521

- Perez, C., J. A. Beatriz, P. Rosaura, C. Margareta, T. Agustin, O. Jesus and M. B. Teresa. 2000. Seminal Plasma Protein Revert the Cold Shock Damage on ram Sperm Membrane. *J. Biol. Reprod.* 63 : 1531-1537
- Rimayanti., T. Hernawati, S. Suherni, H. Agoes dan B. Utomo. 1998. Pengaruh Pengenceran Media EBBS dan BO pada semen Beku Kambing Etawa terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing local. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 12-15
- Salisbury, G. W dan N. L. Vandenmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi buatan pada sapi. Gajah Mada University Press. P : 237-238
- Santoso, S. 2004. SPSS Versi 10 Mengolah Data Stastitik Secara Profesional. PT Elektro Komputindo. Jakarta. Hal 282-283
- Satmoko dan Soeradi, O. 1992. Study kafein terhadap kualitas spermatozoa manusia invitro. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya yang dikutip Darusman.2005. Pengaruh sentrifugasi dan Swim up terhadap Motilitas dan Persentase Hidup Spermatozoa Domba Pada Media BO dan BSA. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 28
- Subrata. 1998. Pemberian fosfolipid Esensial dan Anti oksida (vitamin E) meningkatkan Integritas Membran Spermatozoa. Disertasi. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 2-7
- Susiati, A. 2006. Karakterisasi dan Isolasi Insuline Like Growth Factor-1 (IGF-1) Complex Plasma Semen Kambing Peranakan Etawah. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Uniiiversitas Airlangga. Surabaya. Hal 25
- Toelihere, M. R. 1981. Fisiologi Pada Ternak. Edisi Pertama. Penerbit Angkasa. Bandung yang dikutip Hidayah, N.2005. Pengaruh Frekuensi Pencucian Spermatozoa Domba pada Medium BSA dan Kafein Terhadap Persentase Motilitas dan Jumlah Spermatozoa Hidup. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 14
- Tournaye, H. 1994. The effect of Pentixity on Sperm Function and Embryonic Development of Male Factor Infertility. Tesis. Vrise Universiteit. Briussel. P : 22
- Wilson, J. D., D. W. Foster, M. K. Henry and P. R. Larsen. 1998. Endocrine Disease. William Textbock of Endocrinology. 9th edition. W. B. Saunders Company
- Yanagimachi, R. 1986. The Movement of Goat spermatozoa Before and After capacitation. *J. Reproe. Fest.* Vol 23. p : 193-196

Yan X, Forbes B.E, M Kerie A, Baxter R.C, Firth S.M. 2004. Role of N and C-Terminal Residues of Insuline Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-3 in Regulating IGF Complex Fformation and Receptor Activation. http://A:/CAT_INIST.htm. [7 Maret 2007]

Lampiran 1. Data motilitas spermatozoa sebelum ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	30	35	50	10	30	40
	45'	20	20	45	10	20	40
	60'	10	10	40	5	10	20
P1	30'	85	80	80	70	80	80
	45'	80	75	75	70	75	75
	60'	75	75	65	75	70	50
P2	30'	40	20	30	15	20	20
	45'	35	15	20	15	15	10
	60'	30	5	15	5	10	5

Data motilitas spermatozoa setelah ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	33,21	36,27	45,00	18,44	33,21	39,23
	45'	26,56	26,56	42,13	18,44	26,56	39,23
	60'	18,44	18,44	39,23	12,92	18,44	26,56
P1	30'	67,21	63,44	63,44	56,79	63,44	63,44
	45'	63,44	60,00	60,00	56,79	60,00	60,00
	60'	60,00	60,00	53,73	60,00	56,79	45,00
P2	30'	39,23	26,56	33,21	22,79	26,56	26,56
	45'	36,27	22,79	26,56	22,79	22,79	18,44
	60'	33,21	12,92	22,79	12,92	18,44	12,92

Lampiran 2. Analisis statistik motilitas spermatozoa (%)

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	P0	18
	2	P1	18
	3	P2	18
Waktu	1	30'	18
	2	45'	18
	3	60'	18

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Arc.Sin V(ym%)

Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
P0	30'	34,2267	8,90572	6
	45'	29,9133	8,96012	6
	60'	22,3383	9,35358	6
	Total	28,8261	9,91155	18
P1	30'	62,9600	3,37796	6
	45'	60,0383	2,10375	6
	60'	55,9200	5,91166	6
	Total	59,6394	4,87513	18
P2	30'	29,1517	5,97769	6
	45'	24,9400	6,11737	6
	60'	18,8667	8,09190	6
	Total	24,3194	7,72307	18
Total	30'	42,1128	16,48708	18
	45'	38,2972	17,04483	18
	60'	32,3750	18,73192	18
	Total	37,5950	17,58629	54

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Arc.Sin V(ym%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14209,206 ^a	8	1776,151	36,621	,000
Intercept	76322,737	1	76322,737	1573,654	,000
Perlakuan	13303,644	2	6651,822	137,150	,000
Waktu	866,733	2	433,366	8,955	,001
Perlakuan * Waktu	38,829	4	9,707	,200	,937
Error	2182,515	45	48,500		
Total	92714,458	54			
Corrected Total	16391,721	53			

a. R Squared = ,867 (Adjusted R Squared = ,843)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Arc.Sin V(y_m%)

Duncan^{a,b}

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
P2	18	24,3194	
P0	18	28,8261	
P1	18		59,6394
Sig.		,058	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 48,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = .05.

Waktu

Arc.Sin V(y_m%)

Duncan^{a,b}

Waktu	N	Subset	
		1	2
60'	18	32,3750	
45'	18		38,2972
30'	18		42,1128
Sig.		1,000	,107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 48,500.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 3. Data viabilitas spermatozoa sebelum ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	35	40	55	20	40	45
	45'	25	23	55	20	45	45
	60'	15	12	50	15	20	30
P1	30'	87	87	85	75	85	85
	45'	85	80	79	85	80	77
	60'	80	78	75	76	75	55
P2	30'	45	25	35	20	25	25
	45'	45	17	25	17	20	18
	60'	35	6	20	10	15	17

Data viabilitas spermatozoa setelah ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	36,27	39,23	47,87	26,56	39,23	42,13
	45'	30,00	28,66	47,87	26,56	42,13	42,13
	60'	22,79	20,27	45,00	22,79	26,56	33,21
P1	30'	68,87	68,87	67,21	60,00	67,21	67,21
	45'	67,21	63,44	62,72	67,21	63,44	61,34
	60'	63,44	62,03	60,00	60,67	60,00	47,87
P2	30'	42,13	30,00	36,27	26,56	30,00	30,00
	45'	42,13	24,35	30,00	24,35	26,56	25,10
	60'	36,27	14,18	26,56	18,44	22,79	24,35

Lampiran 4. Analisis statistik viabilitas spermatozoa (%)

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	P0	18
	2	P1	18
	3	P2	18
Waktu	1	30'	18
	2	45'	18
	3	60'	18

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Arc.Sin V(yv%)

Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
P0	30'	38,5483	7,06487	6
	45'	36,2250	8,88523	6
	60'	28,4367	9,28563	6
	Total	34,4033	9,11371	18
P1	30'	66,5617	3,31582	6
	45'	64,2267	2,43479	6
	60'	59,0017	5,61356	6
	Total	63,2633	4,98225	18
P2	30'	32,4933	5,67421	6
	45'	28,7483	6,89094	6
	60'	23,7650	7,55920	6
	Total	28,3356	7,33325	18
Total	30'	45,8678	16,14209	18
	45'	43,0667	16,90669	18
	60'	37,0678	17,60634	18
	Total	42,0007	16,98290	54

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Arc.Sin V(yv%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13284,505 ^a	8	1660,563	37,331	,000
Intercept	95259,360	1	95259,360	2141,511	,000
Perlakuan	12538,003	2	6269,002	140,932	,000
Waktu	727,637	2	363,819	8,179	,001
Perlakuan * Waktu	18,864	4	4,716	,106	,980
Error	2001,704	45	44,482		
Total	110545,569	54			
Corrected Total	15286,209	53			

a. R Squared = ,869 (Adjusted R Squared = ,846)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Arc.Sin V(yv%)

Duncan^{a,b}

Perlakuan	N	Subst		
		1	2	3
P2	18	28,3356		
P0	18		34,4033	
P1	18			63,2633
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 44,482.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = ,05.

Waktu

Arc.Sin V(yv%)

Duncan^{a,b}

Waktu	N	Subst	
		1	2
60'	18	37,0678	
45'	18		43,0667
30'	18		45,8678
Sig.		1,000	,214

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 44,482.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = ,05.

Lampiran 5. Data keutuhan membran spermatozoa sebelum ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	60	50	60	25	50	65
	45'	50	50	50	20	50	60
	60'	50	45	50	20	45	60
P1	30'	85	89	80	85	85	80
	45'	85	85	80	80	83	75
	60'	80	83	76	80	80	70
P2	30'	60	20	40	10	30	15
	45'	55	20	30	10	25	10
	60'	50	15	25	5	20	10

Data keutuhan membran spermatozoa setelah ditransformasi (%)

Perlakuan	Waktu	Ulangan					
		1	2	3	4	5	6
P0	30'	50,77	45,00	50,77	30,00	45,00	53,73
	45'	45,00	45,00	45,00	26,56	45,00	50,77
	60'	45,00	2,13	45,00	26,56	42,13	50,77
P1	30'	67,21	70,63	63,44	67,21	67,21	63,44
	45'	67,21	67,21	63,44	63,44	65,65	60,00
	60'	63,44	65,65	60,67	63,44	63,44	56,79
P2	30'	50,77	26,56	39,23	18,44	33,21	22,79
	45'	47,87	26,56	33,21	18,44	30,00	18,44
	60'	45,00	22,79	30,00	12,92	26,56	18,44

Lampiran 6. Analisis statistik keutuhan membran spermatozoa (%)

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	P0	18
	2	P1	18
	3	P2	18
Waktu	1	30'	18
	2	45'	18
	3	60'	18

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Arc.Sin V(vi%)

Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
P0	30'	45,8783	8,52256	6
	45'	42,8883	8,32552	6
	60'	35,2650	18,17019	6
	Total	41,3439	12,64892	18
P1	30'	66,5233	2,73105	6
	45'	64,4917	2,77516	6
	60'	62,2383	3,10211	6
	Total	64,4178	3,24535	18
P2	30'	31,8333	11,86739	6
	45'	29,0867	10,98851	6
	60'	25,9517	11,09814	6
	Total	28,9572	10,92134	18
Total	30'	48,0783	16,73036	18
	45'	45,4889	16,82125	18
	60'	41,1517	19,66900	18
	Total	44,9063	17,69040	54

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Arc.Sin V(yi%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12178,171 ^a	8	1522,271	15,540	,000
Intercept	108895,074	1	108895,074	1111,630	,000
Perlakuan	11659,709	2	5829,855	59,513	,000
Waktu	440,973	2	220,486	2,251	,117
Perlakuan * Waktu	77,489	4	19,372	,198	,938
Error	4408,192	45	97,960		
Total	125481,437	54			
Corrected Total	16586,363	53			

^a. R Squared = ,734 (Adjusted R Squared = ,687)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Arc.Sin V(yi%)

Duncan^{a,b}

Perlakuan	N	Subset		
		1	2	3
P2	18	28,9572		
P0	18		41,3439	
P1	18			64,4178
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogenous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 97,960.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = .05.

Waktu

Arc.Sin V(yi%)

Duncan^{a,b}

Waktu	N	Subset
		1
60'	18	41,1517
45'	18	45,4889
30'	18	48,0783
Sig.		,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 97,960.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18,000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 7. Prosedur pemeriksaan motilitas (gerak progresif) spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dengan:

1. Ambil semen atau pellet dari masing- masing perlakuan dan kontrol.
2. Ambil satu tetes dari masing- masing perlakuan dan teteskan pada objek khusus permukaan cekung.
3. Tutup sediaan dengan gelas penutup dan periksa dibawah mikroskop perbesaran 400 kali.
4. Hitung presentase sel spermatozoa yang bergerak progresif dengan penilaian 0% (tidak ada yang bergerak) sampai 100% (semua spermatozoa bergerak kedepan)
5. Pengamatan dilakukan pada 5 lapangan pandang.

Sumber : Toelihere (1989)

Lampiran 8. Proses pemeriksaan viabilitas spermatozoa.

Pemeriksaan dan penghitungan jumlah hidup spermatozoa dilakukan dengan cara:

1. Ambil setetes semen atau pellet yang diperiksa, tempatkan pada salah satu ujung gelas objek.
2. Ambil setetes besar larutan eosin negrosin tempatkan disebelah tetesan semen.
3. Campur kedua tetesan tersebut dengan cepat sampai homogen.
4. Buat preparat ulas dari campuran tersebut diatas
5. Panaskan diatas nyala api Bunsen
6. Pencampuran sampai dengan pemanasan harus dilakukan dengan kurang dari 15 detik
7. Preprat ulas diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali
8. Spermatozoa hidup berwarna putih sedangkan yang mati berwarna merah
9. Dibuat presentase dari pengamatan 100 ekor spermatozoa dalam satu atau 2 lapangan pandang, berapa yang hidup dan berapa yang mati

Sumber: Toelihere (1989)

Lampiran 9. Prosedur pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa

Pemeriksaan keutuhan membran dilakukan dengan:

1. Ambil setetes semen yang sudah diinkubasi dengan HOST dari masing-masing perlakuan pada gelas objek bersih
2. Ambil setetes larutan eosin negrosin, tempatkan disebelah tetesan semen
3. Campur kedua tetesan tersebut dengan cepat sampai homogen
4. Buat preparat ulas dari campuran tersebut diatas
5. Panaskan diatas nyala api Bunsen
6. Preparat ulas diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali
7. Membran plasma yang utuh ditandai dengan dengan ekor melingkar sedangkan spermatozoa yang membrane plasmanya rusak ditandai dengan ekor yang lurus
8. Dilakukan penghitungan minimal 100 sel spermatozoa

Sumber : Hafez (1993)

Lampiran 10. Prosedur pembuatan larutan BO sebagai medium pencuci spermatozoa

Medium A (500 ml)

1. Nacl	4.3092 gr
2. Kcl	0,1974 gr
3. CaCl ₂ 2H ₂ O	0,2171 gr
4. NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,0840 gr
5. MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0697 gr
6. Phenol red 0,5%	0,1 ml
7. Distilled water	500 ml

Simpan dalam botol tertutup rapat

Medium B (200 ml)

1. NaHCO ₃	2,5873 gr
2. Phenol red 0,5%	0,04 ml
3. Distilled water	200 ml.

Gasing dengan mengalirkan CO₂ dalam medium B selama 30 menit, simpan dalam botol dengan tutup putar (rapat)

BO medium

1. Medium A	76 ml
2. Medium B	24 ml
3. Glukosa	0.15 gr
4. Sodium piruvat	0,0137 gr

Filtrasi dengan mikrofilter 0.22 mikrometer, lalu simpan dalam water bath 37^o C

Sumber : Sigma, Lab. Bio Analitik (2004)

Lampiran. 11 Prosedur pembuatan larutan eosin negrosin

1. Buat larutan A: 20 gr Negrosin ad 100ml aqua aduk dan panaskan
2. Buat larutan B: 200ml larutan a (21,628 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 500ml aqua)
ditambah larutan b (22,254 gram KH_2PO_4 ad 500ml aqua)
3. Buat larutan C: 43,3 gram glukosa ad 500ml aqua
4. Campurkan bahan berikut dengan pemanasan :

A	150ml
B	30ml
C	20ml
Eosin negrosin	5gram
Aqua ad	300ml

Sumber : Sardjito (2003)

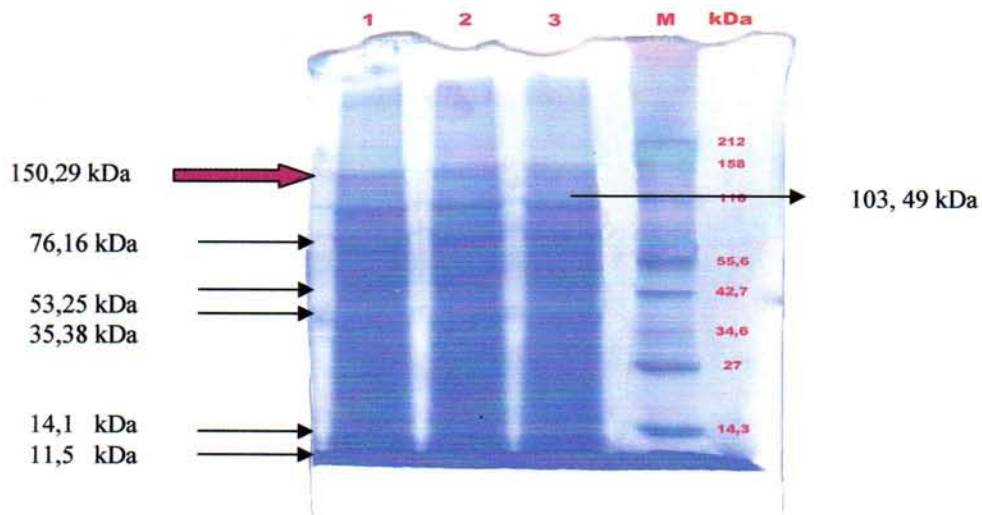
Lampiran 12. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen sebelum perlakuan

Data pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan kambing ke-					
	1	2	3	4	5	6
Volume	1ml	1,6 ml	0,8 ml	0,8 ml	1 ml	1 ml
Warna	Putih kekngan	Putih kekngan	Putih kekngan	Putih kekngan	Putih kekngan	Putih kekngan
Bau	khas	khas	khas	khas	khas	khas
Konsistensi	pekat	pekat	pekat	pekat	pekat	pekat
Gerakan massa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gerakan individu	progresif	progresif	progresif	progresif	progresif	progresif
Motilitas	90	95	90	90	95	95
Viabilitas	95	97	95	93	96	97
Integritas membran	90	85	80	92	93	88

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen setelah di lakukan *swim up*

Data pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan kambing ke-(%)					
	1	2	3	4	5	6
Motilitas	85	85	85	85	85	90
Viabilitas	90	86	88	90	86	94
Integritas membran	88	80	79	88	88	82

Lampiran 13. Pita protein IGF Complex plasma semen kambing Peranakan Etawah dengan metode SDS PAGE



Keterangan : M : Marker
 1, 2, 3 : plasma semen kambing
 kDa : Kilodalton