

**SKRIPSI**

**PENGARUH INFEKSI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE  
H5N1 TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS DAN  
SPERMATOZOA HIDUP MONYET EKOR  
PANJANG (*Macaca fascicularis*)**



Oleh :

**CHINTA NURMALITASARI**

**NIM 060610198**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

**PENGARUH INFEKSI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE H5N1  
TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS dan SPERMATOZOA HIDUP  
MONYET EKOR PANJANG  
(*Macaca fascicularis*)**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

CHINTA NURMALITASARI

060610198

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Dr. Bambang Poernomo S., M.S., drh.)

Pembimbing Pertama



(Retno Bijanti, M.S., drh.)

Pembimbing Kedua

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PENGARUH INFEKSI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE H5N1  
TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS dan SPERMATOZOA HIDUP  
MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)**

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, Agustus 2010



Chinta Nurmalitasari  
NIM 060610198

**Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian**

**Tanggal : 06 Agustus 2010**

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

**Ketua : Dr.Rr. Sri Pantja Madyawati, drh, M.Si.**  
**Sekretaris : Dr.C.A. Nidom, drh., M.S.**  
**Anggota : Trilas sardjito, drh., M.Si.**  
**Pembimbing I : Dr.Bambang Poernomo S., drh., M.S.**  
**Pembimbing II : Retno Bijanti, drh., M.S.**

Telah diuji pada

Tanggal : 23 Agustus 2010

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr.Rr. Sri Pantja Madyawati, drh, M.Si.

Anggota : Dr.C.A. Nidom, drh., M.S.

: Trilas sardjito, drh., M.Si.

: Dr.Bambang Poernomo S., drh., M.S.

: Retno Bijanti, drh., M.S.

Surabaya, 24 Agustus 2010

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh  
NIP. 19531216 197806 2 001

**INFLUENCE OF THE *Avian influenza* VIRUS SUBTYPE H5N1  
INFECTION TOWARD SPERM MOTILITY AND LIFE IN LONG TAIL  
MONKEY  
(*Macaca fascicularis*)**

Chinta Nurmalitasari

**ABSTRACT**

Virus subtype H5N1 of Avian influenza was Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) that infected animals and human and showed disturbances in all organs (multi-organ), included the reproductive organs. The aim of this study was proved that the infection H5N1 virus in long tail monkey (*Macaca fascicularis*) could be reduced the percentage of sperm motility and life. Experimental animal used was a 8 years old male long tail monkey (*Macaca fascicularis*). Before infected by H5N1 virus, spermatozoa were collected using electroejaculator then counted to determine the sperm motility and life. The sperm was re-examined after four days being infected. The data obtained was analyzed using T-test to compare the result before and after infection. The result of this study showed that there's a significantly difference between before and after result of sperm motility and life percentage. This study's result showed that sperm motility and life were reducing after being infected.

**Key words :** *Avian influenza*, sperm motility and life, *Macaca fascicularis*

## UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan petunjukNya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **PENGARUH INFEKSI VIRUS *Avian influenza* SUBTIPE H5N1 TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS dan SPERMATOZOA HIDUP MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)**.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph. D., drh. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Dr.Bambang Poernomo S., M.S., drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Retno Bijanti, M.S., drh selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, bantuan dan pengarahannya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Dr. Rr. Sri Pantja M., MSi., drh. selaku ketua penguji skripsi dan selaku dosen penelitian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut dalam penelitian ini, Dr. C.A. Nidom, M.S., drh. selaku sekretaris penguji skripsi dan Trilas Sardjito. M.Si., drh selaku anggota penguji skripsi.

Seluruh staf pengajar Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bimbingan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh. selaku dosen wali atas bimbingan dan nasihat-nasihat yang membangun selama ini.

Ucapan terima kasih yang tidak kalah pentingnya penulis haturkan kepada kedua orang tua, kakakku yang selalu memberikan dukungan, nasihat, motivasi, semangat serta do'a dan bimbingannya baik secara material maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini.

Teman-teman di Laboratorium Avian Influenza ITD yang telah memberikan bantuan hingga terselesainya penelitian ini. Rekan-rekan penelitian, Andik Prastiawan dan Kartika Eka P. atas segala kerjasamanya dalam mengerjakan penelitian ini bersama-sama.

Sahabat-sahabat, Intan Dyah K., Liamalah Asri, Cindy Puspita Sari, dan Retno Yuli W. atas semua semangat dan bantuan yang diberikan, serta Gaus Frenda A.D. yang terus memberikan perhatian dan motivasi. Teman-teman Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2006 terimakasih atas bantuan serta semangat dalam penelitian ini dan semua pihak yang turut membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa membalas budi baik yang telah diberikan oleh mereka kepada penulis. Amin

Penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga makalah skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan sumbangan yang positif di bidang pendidikan Kedokteran Hewan dan dapat dijadikan sumber penelitian selanjutnya.

Surabaya, Agustus 2010

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN IDENTITAS .....	iv
ABSTRACT .....	vi
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Landasan Teori.....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
1.6 Hipotesis Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1 Tinjauan H5N1 .....	7
2.1.1 Klasifikasi Virus H5N1 .....	7
2.1.2 Penyebaran Virus H5N1 .....	8
2.1.3 Struktur Virus H5N1 .....	9
2.1.4 Patogenesis Virus H5N1 .....	9
2.1.5 Gejala Klinis.....	10
2.2 Tinjauan Monyet Ekor Panjang( <i>Macaca fascicularis</i> ) .....	11
2.2.1 Klasifikasi <i>Macaca fascicularis</i> .....	11
2.2.2 Morfologi <i>Macaca fascicularis</i> .....	11
2.2.3 Penyebaran <i>Macaca fascicularis</i> .....	12
2.2.4 Habitat <i>Macaca fascicularis</i> .....	12
2.2.5 Ekologi <i>Macaca fascicularis</i> .....	13
2.2.6 Reproduksi <i>Macaca fascicularis</i> .....	13
2.3 Tinjauan Tentang Spermatozoa.....	14
2.3.1 Morfologi Spermatozoa .....	14
2.3.2 Aktivitas Spermatozoa .....	15
2.4 Proses Fosforilasi Oksidatif Pada Mitokondria.....	16
BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
3.2 Materi Penelitian .....	19

3.2.1 Hewan Percobaan.....	19
3.2.2 Bahan Penelitian.....	19
3.2.3 Alat Penelitian.....	19
3.3 Metode Penelitian.....	19
3.3.1 Tehnik Pengambilan Spermatozoa.....	19
3.3.2 Menginfeksi <i>Macaca fascicularis</i> .....	20
3.3.3 Pemeriksaan Makroskopis .....	20
3.3.4 Pemeriksaan Motilitas Massa Spermatozoa.....	21
3.3.5 Pemeriksaan Motilitas Individu Spermatozoa.....	21
3.3.6 Pemeriksaan Spermatozoa Hidup .....	21
3.4 Rancangan Penelitian .....	22
3.5 Variabel Penelitian.....	22
3.5.1 Variabel Bebas .....	22
3.5.2 Variabel Tergantung.....	22
3.5.3 Variabel Terkendali.....	22
3.6 Analisis Data .....	22
3.7 Skema Penelitian.....	23
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
4.1 Pemeriksaan Semen <i>Macaca fascicularis</i> sebelum infeksi.....	24
4.2 Pemeriksaan Makroskopis Spermatozoa.....	25
4.3 Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa <i>Macaca fascicularis</i> .....	26
4.4 Pemeriksaan Kecepatan Spermatozoa <i>Macaca fascicularis</i> .....	27
4.5 Pemeriksaan Spermatozoa hidup <i>Macaca fascicularis</i> .....	28
4.6 Hasil Mikroskopis .....	29
<b>BAB 5 PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
5.1 Evaluasi Pemeriksaan Makroskopis.....	30
5.2 Evaluasi Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa .....	31
5.3 Evaluasi Pemeriksaan Spermatozoa Hidup.....	33
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>36</b>
6.1 Kesimpulan .....	36
6.2 Saran.....	36
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>37</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
1.	Hasil Pemeriksaan Makroskopis Sebelum Infeksi .....	24
2.	Hasil Pemeriksaan Makroskopis Sesudah Infeksi.....	24
3.	Hasil pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa Sebelum Infeksi.....	25
4.	Hasil pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa Sesudah Infeksi.....	25
5.	Rata-rata dan Standar Deviasi Motilitas Spermatozoa.....	26
6.	Rata-rata dan Standar Deviasi Kecepatan Individu Spermatozoa .....	27
7.	Rata-rata dan Standar Deviasi Spermatozoa Hidup .....	28

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Struktur Virus Influenza A, B dan C.....	7
2. <i>Macaca fascicularis</i> .....	11
3. Pembentukan Energi Pada Sel.....	16
4. Proses Fosforilasi Oksidatif .....	18
5. Skema penelitian pengaruh infeksi virus <i>Avian influenza</i> sub tipe H5N1 terhadap persentase motilitas dan spermatozoa hidup monyet ekor panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ).....	23
6. Grafik motilitas spermatozoa <i>macaca fascicularis</i> sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1 .....	26
7. Grafik kecepatan individu spermatozoa <i>macaca fascicularis</i> sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1 .....	27
8. Grafik spermatozoa hidup <i>macaca fascicularis</i> sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1.....	28
9. Sel spermatozoa hidup dan mati pada pembesaran 400x.....	29

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Foto Penelitian.....	45
2. Teknik Pengambilan Spermatozoa, Cara Perhitungan Volume Semen dan Cara Penentuan Konsistensi Semen.....	47
3. Cara Pengamatan Motilitas Massa Spermatozoa .....	48
4. Cara Penghitungan Motilitas Spermatozoa.....	49
5. Cara Penghitungan Spermatozoa Hidup .....	50
6. Hasil Uji T Motilitas Spermatozoa.....	51
7. Hasil Uji T Kecepatan Individu Spermatozoa.....	52
8. Hasil Uji T Spermatozoa Hidup .....	53

## DAFTAR SINGKATAN

AI	: <i>Avian Influenza</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BB	: Berat Badan
BSL3	: <i>Biosafety Level-3</i>
CPE	: <i>Coronary Penetrating Enzyme</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleid Acid</i>
FADH	: flavin adenine dinukleotida hidrogen
HA	: hemaglutinin
HPAI	: <i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>
kg	: kilogram
LPAI	: <i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>
M	: matriks
m	: meter
mg	: miligram
ml	: mililiter
mm	: milimeter
NA	: neuraminidase
NADH	: nikotinamida adenine dinukleotida hidrogen
NaCl	: natrium chlorida
NP	: nukleoprotein
NS	: non-Struktural
PA	: polimerase asidik
PB1	: polimerase basik 1
PB2	: polimerase basik 2
pH	: <i>potentia Hydrogenii</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
TCID <sub>50</sub>	: <i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i>

# BAB 1

# PENDAHULUAN

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit flu burung atau flu unggas (*Bird Flu, Avian influenza*) adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A dan ditularkan oleh unggas (Departemen Kesehatan RI, 2005). Unggas penular tersebut ialah burung, bebek, ayam, selain itu dapat ditularkan oleh beberapa hewan yang lain seperti babi, kuda, anjing laut, ikan paus, dan musang. Data lain menunjukkan penyakit ini bisa terdapat pada burung puyuh dan burung onta. Penyakit ini ditularkan dari burung ke burung tetapi dapat menular ke manusia (Mulyadi dan Prihatini, 2005).

Akhir tahun 2003 di sejumlah negara telah tertular penyakit influenza pada unggas dan bersifat mewabah (pandemi) seperti Korsel, Jepang, Vietnam, Thailand, Taiwan, Kamboja, Hongkong, Laos, RRC dan Pakistan termasuk Indonesia (Patu, 2007). Pada Januari 2004, di beberapa provinsi di Indonesia terutama Bali, Botabek (Bogor, Tangerang, Bekasi), Jawa Timur, Jawa Tengah, Kalimantan Barat, dan Jawa Barat dilaporkan kejadian kematian ayam yang luar biasa. Jumlah unggas yang mati akibat wabah penyakit *Avian influenza* di sepuluh provinsi diperkirakan 3.842.275 ekor dan paling tinggi di provinsi Jawa Barat sebesar 1.541.427 ekor. Awal kematian tersebut diduga akibat virus *New castle*, tetapi pengukuhan terakhir oleh Departemen Pertanian disebabkan oleh *Avian influenza* (H5N1) (Mulyadi dan Prihatini, 2005).

Genom virus H5N1 terdiri dari protein Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), polimerase asidik (PA), polimerase basik 1 (PB1),



polimerase basik 2 (PB2), nukleoprotein (NP), non-struktural 1 dan 2 (NS) dan Matriks 1 dan 2 (M). Kesepuluh protein ini mempunyai fungsi yang berbeda-beda, sehingga sangat menentukan perubahan yang terjadi pada aktivitas sel induk yang terinfeksi (Yamada *et al.*, 2006, Nidom dkk., 2008).

Virus H5N1 yang telah menginfeksi hewan maupun manusia menunjukkan gangguan pada semua organ (multiorgan), dan diduga termasuk organ reproduksi. Sebagian besar kasus infeksi *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) pada manusia disebabkan penularan virus dari unggas ke manusia (Beigel *et al.*, 2005). Penyakit influenza pada unggas bersifat sangat akut dengan gejala klinis berupa gangguan pernafasan bagian atas dan gangguan reproduksi serta dapat menimbulkan kematian hingga 100% pada kasus virus yang sangat patogen (Easterday *et al.*, 1997).

Virus H5N1 juga dapat menyerang beberapa spesies hewan (multispesies). Kejadian ini juga dilaporkan pada mamalia, termasuk manusia (*World Health Organization*, 2005). Menurut Syamsul (2009), perkembangan riset eksperimental tentang sejumlah penyakit butuh percobaan dengan memakai primata seperti *Macaca fascicularis*. Hal tersebut disebabkan hewan ini lebih dekat dengan manusia secara fungsional dan anatomi daripada hewan pengerat, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi yang dapat diekstrapolasikan kepada manusia (Rahardjo dan Siti, 2009).

Faktor virulen virus *Avian influenza* yang paling berperan adalah hemaglutinin (HA) yang tersusun dari 560 asam amino. Asam amino yang menyusun regio *cleavage site* sangat menentukan keganasan virus tersebut. Virus

*Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) memiliki *multi basic amino acid* (arginin dan lisin) pada *cleavage site*-nya, sedangkan virus avirulen hanya memiliki arginin tunggal (Capua and Alexander, 2004, Whittaker, 2005). Proses *cleavage* virus dipengaruhi oleh keberadaan enzim protease. Proses *cleavage* pada virus *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) hanya terbatas pada keberadaan enzim protease ekstraseluler seperti *trypsin-like enzyme* (saluran pernafasan dan saluran pencernaan), sedangkan proses *cleavage* virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dapat dipicu oleh keberadaan enzim protease yang tidak spesifik seperti furin yang terdapat di apparatus golgi pada semua sel. Hal ini menyebabkan *cleavage site* dari virus HPAI dapat mengalami proses proteolitik yang tidak terbatas dan menyebabkan infeksi sistemik yang fatal pada hewan yang rentan (Whittaker, 2005).

Diduga kompleks gen polimerase merupakan faktor utama bagi adaptasi virus *Avian influenza* pada spesies tertentu. Kompleks enzim polimerase dari virus *Avian influenza* membentuk heterotrimer yaitu polimerase asidik (PA), polimerase basik 1 (PB1) serta polimerase basik 2 (PB2), dan diketahui terlibat dalam banyak tahapan replikasi virus dan berinteraksi dengan protein dari berbagai sel (Taubenberger *et al.*, 2005).

Membran pada mitokondria terdiri dari protein dan lemak. Apabila protein pada membran mitokondria terganggu maka fungsi mitokondria dalam menghasilkan energi juga akan terganggu, yang menyebabkan putusnya rantai oksidasi. Akibatnya, tidak ada lagi pasokan energi dari mitokondria yang berfungsi merangsang fungsi mikrotubul (Gazali dan Tambing, 2001).

Ekor spermatozoa merupakan alat gerak yang membutuhkan energi tinggi dari mitokondria (Ngili, 2004). Bagian leher spermatozoa merupakan pusat tenaga karena mitokondria terpusat di daerah ini. Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus asam trikarboksilat dan transport elektron serta fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP untuk gerakan spermatozoa (Frandsen, 1992).

Berdasarkan uraian di atas menjadi sangat penting dilakukan pengkajian tentang bahaya infeksi virus H5N1 pada persentase motilitas dan spermatozoa yang hidup pada monyet ekor panjang jantan (*Macaca fascicularis*). Penurunan motilitas dan persentase spermatozoa hidup dapat berpengaruh serta menurunkan kemampuan untuk membuahi sel telur.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan Apakah infeksi virus H5N1 pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dapat mempengaruhi persentase motilitas dan spermatozoa hidup?

## 1.3 Landasan Teori

Virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 lebih patogen daripada virus sub tipe lain sehingga disebut dengan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) (Radji, 2006). Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) mampu berkembang biak pada alat pernafasan, pencernaan, system syaraf dan peredaran darah sehingga mampu menyerang dan merusak semua organ tubuh (Raharjo dan Nidom, 2004). Virus influenza juga dapat berkembang biak dalam saluran pencernaan, ginjal dan

sistem reproduksi (Tabbu, 2000). Virus influenza tipe A dapat berubah-ubah bentuk (*Drift, Shift*), serta dapat menyebabkan epidemi dan pandemik (Departemen Kesehatan RI, 2005).

Genom eksternal virus Influenza A terdiri atas genom hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang akan mengekspresikan protein HA dan NA. Genom internal terdiri atas genom polimerase basik 1 (PB1), polimerase basik 2 (PB2), polimerase asidik (PA), nukleoprotein (NP), matriks (M) dan non-struktural (NS). Genom internal akan mengekspresikan delapan macam protein internal. Masing-masing genom menghasilkan satu macam protein, kecuali fragmen M dan NS, masing-masing menghasilkan dua macam protein yaitu protein M1 dan M2, serta protein NS1 dan NS2 (Horimoto and Kawaoka, 2001).

Diduga salah satu akibat dari infeksi virus H5N1 pada sistem reproduksi jantan adalah menurunnya motilitas serta viabilitas spermatozoa. Perkembangan penelitian yang telah dilakukan pada sel *Drosophila sp.*, menunjukkan bahwa protein PB1 dan PB2 mempunyai fungsi spesifik pada mitokondria. Protein PB1 dan PB2 dapat mempengaruhi gen COX6A1 dalam transport elektron enzim yang tergolong pada enzim sitokrom c, jika dirinci lebih lanjut maka protein PB2 mempunyai peran dalam *signal targetting* dalam mitokondria sedangkan PB1 akan mengganggu fungsi mitokondria pada membran dalam maupun luar mitokondria. Akibat gangguan virus H5N1 pada sistem di mitokondria, akan mengganggu produksi energi dalam bentuk ATP (Hao *et al.*, 2008).

Energi yang bersumber dari mitokondria berperan untuk menggertak mikrotubul sehingga terjadi pergesekan diantara mikrotubul dan akibatnya

spermatozoa dapat bergerak secara bebas. Bila mitokondria rusak, maka rantai oksidasi putus dan mengakibatkan spermatozoa berhenti bergerak karena tidak ada pasokan energi dari mitokondria (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Membuktikan bahwa infeksi virus H5N1 pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dapat mempengaruhi persentase motilitas dan spermatozoa hidup.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa infeksi virus H5N1 dapat menghambat pembentukan energi dalam mitokondria yang menurunkan persentase motilitas dan spermatozoa hidup, dan pada akhirnya dapat menurunkan angka fertilitas.

#### **1.6 Hipotesis Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka hipotesis penelitian yang dapat diajukan adalah infeksi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dapat menurunkan persentase motilitas dan spermatozoa hidup.

## BAB 2

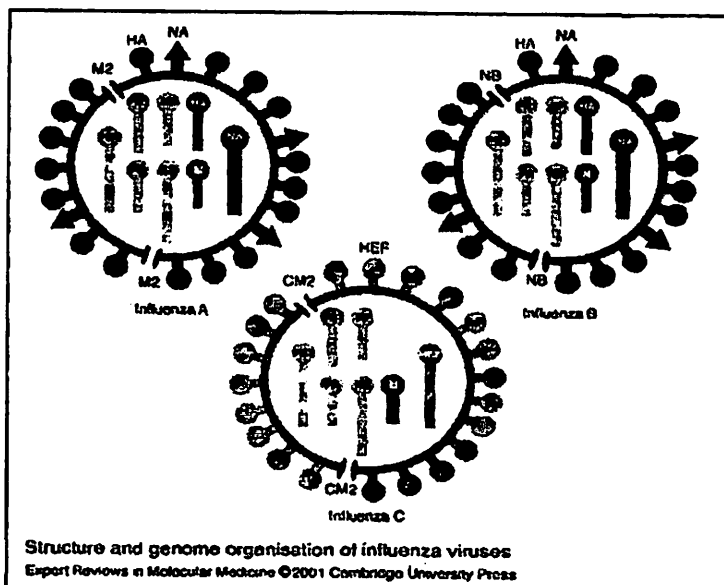
# TINJAUAN PUSTAKA

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Virus H5N1 (*Avian influenza*)

#### 2.1.1 Klasifikasi Virus H5N1

Virus *Avian influenza* merupakan virus Influenza tipe A, termasuk famili *Orthomyxoviridae*, merupakan virus RNA, mempunyai polaritas negatif, dengan diameter 20 nm dan strukturnya berfilamen. Selain tipe A, virus Influenza juga memiliki dua macam tipe lagi yaitu tipe B dan tipe C. Tipe A dan B memiliki delapan macam genom dan tipe C memiliki tujuh macam genom. Genom tersebut dikelompokkan menjadi dua macam yaitu genom eksternal dan genom internal. Kedelapan genom yang dimiliki oleh virus Influenza A terdiri atas 13.588 nukleotida (Nidom, 2005). Virus Influenza A selanjutnya dibagi dalam sub tipe berdasarkan struktur protein permukaannya. H5N1 merupakan salah satu sub tipe virus Influenza A (yang berarti alela HA ke lima dan NA pertama) (Nidom, 2009).



**Gambar 1.** Struktur Virus Influenza A, B dan C (dikutip dari Whitaker, 2001)

*Avian influenza* (AI) merupakan virus yang sangat mudah bermutasi dengan melakukan *genetic drift* dan *genetic shift*, sehingga muncul virus *Avian influenza* (AI) baru yang tidak dikenal oleh sistem kekebalan tubuh yang ada. Berdasarkan patotipe, virus *Avian influenza* (AI) dibedakan dalam dua kelompok, yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang bersifat ganas dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang bersifat kurang ganas (Dharmayanti, 2009).

### **2.1.2 Penyebaran Virus H5N1**

Sejak wabah *Avian influenza* (AI) meletup di Hongkong pada tahun 1997, sampai dengan tahun 2004 terdapat 9 negara di Asia Tenggara (Kamboja, RRC, Indonesia, Jepang, Laos, Malaysia, Korsel, Thailand dan Vietnam) melaporkan adanya *outbreak* pada unggas (World Health Organization, 2005). Penyebaran virus H5N1 sudah mulai masuk ke Eropa (Romania, Turki), Rusia, Kazakhstan dan Mongolia yang telah menambah daftar sebelumnya (Food and Agriculture Organization, 2004).

Di Indonesia, influenza pada unggas mulai terdeteksi pada tahun 1983 dengan prevalensi antara 6,76-100% pada itik (Ronohardjo, 1983). Sejak awal Agustus 2003 hingga sekarang penyakit influenza unggas mewabah pada peternakan ayam di beberapa daerah di Pulau Jawa, Bali, Sumatera dan Kalimantan dengan tingkat kematian yang sangat tinggi (Wiyono dkk., 2004, Damayanti dkk., 2004).



### 2.1.3 Struktur Virus H5N1

Virus *Avian influenza* (AI) termasuk dalam virus Influenza A dengan genom terdiri dari delapan fragmen yang akan menghasilkan protein masing-masing, yaitu terdiri dari HA atau H (hemagglutinin), NA atau N (neuraminidase), PA (polimerase asidik), PB1 (polimerase basik 1), PB2 (polimerase basik 2), NP (nukleoprotein), NS (non-struktural), dan M (matriks). Gen HA dan NA akan mengkode untuk menghasilkan protein permukaan, sisanya enam gen mengkode untuk menghasilkan protein internal. Gen M dan NS akan menghasilkan dua macam protein, secara berurutan yaitu protein M1, M2 dan NS1, NS2. Enam fragmen sisanya hanya mengkode untuk menghasilkan satu protein (Nidom, 2009).

### 2.1.4 Patogenesis Virus H5N1

Tipe sel target dari virus influenza adalah sel-sel pada lapisan epitel mukosa saluran pernafasan, yang memiliki permukaan apikal dan basolateral. Virus yang terhirup dari udara akan masuk sel epitel saluran pernafasan dari permukaan apikal. Setelah bereplikasi pada sel, virus dapat dikeluarkan melalui permukaan apikal sel, hal ini yang dapat menyebabkan penyebaran virus ke individu lain. Namun virus juga dapat menembus permukaan basolateral sel dan menyebabkan penyebaran secara sistemik dari sel ke sel (Whittaker, 2005).

Virus mengawali perlekatannya ke reseptor pada permukaan sel pada saat virus masuk ke tubuh inang. Virus influenza pada manusia akan melekat pada bagian yang mengandung *5-N-acetyl neurominic acid* (asam sialik) pada permukaan sel inang, namun pada babi dan kuda *N-glycolyl neurominic acid*

dapat digunakan (Chu *and* Whittaker, 2004). Setelah melekat pada reseptor inang virus akan masuk ke dalam endosom (vesikel sitoplasma), pada pH lingkungan yang rendah akan menggerak fusi virus dan melakukan *uncoating*. Ribonukleoprotein (RNP) virus yang sudah *uncoating* kemudian masuk ke inti dari sel inang untuk melakukan replikasi, sesudah replikasi virus, ribonukleoprotein meninggalkan inti dan pindah ke membran sitoplasma bergabung dengan glikoprotein virus sebelum akhirnya *budding* dan dilepaskan. Pelepasan virus dari permukaan sel terinfeksi didasarkan pada aktivitas dari NA virus. NA (sialidase) berperan sebagai enzim yang merusak reseptor, dengan memindahkan asam sialik dari permukaan sel inang. Tanpa tahapan ini partikel virus yang baru dibentuk akan kembali melekat pada reseptornya dan tidak dapat dilepaskan ke ekstraseluler (Whittaker, 2005).

#### **2.1.5. Gejala Klinis**

Masa inkubasi berkisar beberapa jam sampai 3 hari, tergantung dosis virus, rute kontak, dan spesies yang terserang. Gejala penyakit sangat bervariasi dan tergantung pada spesies yang terinfeksi, galur virus, dan faktor lingkungan. Gejala yang terlihat dapat berbentuk gangguan pada saluran pernafasan, pencernaan, reproduksi, dan sistem syaraf (Tabbu, 2000). Virus influenza tipe A dari berbagai sub tipe dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang berbeda, mulai dari penyakit yang menyebabkan mortalitas yang tinggi dengan kematian yang mendadak tanpa didahului oleh gejala klinik tertentu atau hanya menunjukkan gejala yang ringan sampai pada bentuk penyakit yang sangat ringan atau tidak tampak secara klinis (Tabbu, 2000).

## 2.2 Tinjauan Tentang monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*)

### 2.2.1 Klasifikasi *Macaca fascicularis*

Menurut Cawthon (2006), hewan *Macaca fascicularis* ini diklasifikasikan sebagai berikut : Suborder: Haplorrhini, Infraorder: Simiiformes, Superfamily: Cercopithecoidea, Family: Cercopithecidae, Subfamily: Cercopithecinae, Genus: *Macaca*, Species: *Macaca fascicularis*.

Nama lain *Macaca fascicularis* antara lain *M. cynomolgus* atau *M. irus*, *crab-eating macaque*, *cynomolgus monkey*, *keras macaque*, atau *longtail macaque*, *macaque crabier* atau *macaque de buffon* (Francis), *Macaca cangrejera* (Spanyol), *javaapa* atau *krabmakak* (Swedia) (Cawthon, 2006).



**Gambar 2.** *Macaca fascicularis*  
(dikutip dari Crockett, 2006)

### 2.2.2 Morfologi *Macaca fascicularis*

*Macaca fascicularis* mempunyai warna bulu yang bervariasi mulai dari warna coklat terang hingga coklat keabu-abuan pada bagian punggung, kaki, dan lengan (Rowe, 1996, Groves, 2001). Memiliki muka coklat kemerah-merahan dan terdapat bulu pada kepala sampai atas dahi, sering membuat rambut jambul di atas

kepala. Jantan mempunyai kumis dan jambang pada pipi yang menyerupai bingkai muka sementara betina mempunyai jenggot seperti halnya pada pipi. Kedua jantan dan betina mempunyai pewarnaan putih pada kelopak mata yang terletak di dekat hidung (Rowe, 1996). Ciri karakteristik dari monyet ekor panjang ini adalah panjang dari ekor yang luar biasa, panjangnya hampir selalu melebihi tinggi mulai dari kepala hingga pantat hewan, dan panjang berkisar antara 400 dan 655 mm (Groves, 2001). *Macaca fascicularis* adalah seksual dimorฟิก. Pejantan berukuran antara 412 dan 648 mm dan berat rata-rata antara 4,7 dan 8,3 kg. Betina hanya mempunyai ukuran 385-503 mm dan memiliki berat rata-rata antara 2,5 dan 5,7 kg. Monyet jantan lebih tinggi, lebih berat dan mempunyai gigi yang lebih besar dari betina (Dittus, 2004).

### **2.2.3 Penyebaran *Macaca fascicularis***

*Macaca fascicularis* tersebar di seluruh kepulauan Asia Tenggara sampai ke daratan Asia. Mereka ditemukan di Filipina, Malaysia dan daratan Borneo. Terdapat juga di Indonesia (Sumatra, Jawa, Timor, dan Pulau Sunda), Birma, India (Pulau Nicobar), Vietnam, Kamboja, Laos dan Thailand (Fittinghoff and Lindburg, 1980, Groves, 2001).

### **2.2.4 Habitat *Macaca fascicularis***

Monyet ekor panjang tinggal di pesisir, bakau, rawa, dan wilayah tepi sungai hutan 2000m di atas permukaan laut (Rowe, 1996, Supriatna dkk., 1996). Monyet ekor panjang banyak ditemukan di hutan hujan tropis yang hangat, iklim yang lembab dan curah hujan lebat (Supriatna dkk., 1996, Umaphy *et al.*, 2003).

Musim hujan di Asia Tenggara berlangsung dari sekitar September sampai Mei, dengan curah hujan rata-rata bulanan antara 140 dan 300 mm dan dengan curah hujan rendah dari Juni sampai Agustus atau September (Lucas and Corlett, 1991, Yeager, 1996, Umapathy *et al.*, 2003).

### **2.2.5 Ekologi *Macaca fascicularis***

Monyet ekor panjang disebut *frugivorous* dan *Borneo* di Kalimantan, 66,7% dari mereka memakan makanan masak, buah-buahan berair sementara monyet di Sumatera mempunyai persentase yang lebih tinggi untuk memakan buah (82%) (Yeager, 1996). Selama masa ketika buah tidak tersedia pada musim kemarau dan awal musim hujan, monyet ekor panjang fokus pada sumber makanan lainnya termasuk serangga, batang, dan daun muda, bunga, bibit, rumput, jamur, invertebrata, telur burung, tanah liat dan kulit batang pohon muda (Wheatley, 1980, Yeager, 1996).

### **2.2.6 Reproduksi *Macaca fascicularis***

*Macaca fascicularis* mulai berkembang biak pada usia muda sekitar 3 sampai 4 tahun dan mempunyai anak-anak yang memiliki kesempatan hidup yang tinggi (Noordwijk *and* Schaik, 1999) Beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat kelangsungan hidup betina meliputi sumber makanan yang banyak tersedia, kelompok yang bisa melindungi dari predator, rendahnya tingkat permusuhan dengan sesama betina (Noordwijk *and* Schaik, 1987).

*Macaca fascicularis* menunjukkan kelahiran musiman yang bervariasi, di Taman Nasional Gunung Leuser di Sumatra, sebagian besar kelahiran terjadi

antara Juli dan November (Noordwijk *and* Schaik, 1999). Di Jawa Barat, terdapat konsentrasi kelahiran pada bulan Januari dan Februari (Engelhardt *et al.*, 2004). Keberhasilan reproduksi pada betina terkait dengan ketersediaan pangan, pada periode dengan ketersediaan pangan yang melimpah menunjukkan tingkat kelahiran lebih tinggi daripada periode dengan kelangkaan pangan. Kelahiran lebih sering terjadi pada periode ketersediaan buah yang melimpah (Noordwijk *and* Schaik, 1987).

Kematangan seksual pada betina mencapai usia 4 tahun dan mulai bereproduksi sebelum usia 5,5 tahun. *Macaca fascicularis* jantan mencapai kematangan seksual pada usia 7 tahun. Estrus ditandai dengan pembengkakan, inflamasi kulit di sekitar alat kelamin serta tingkah laku (Engelhardt *et al.*, 2004). Reproduksi betina mencapai kapasitas puncak pada usia 10 tahun dan mereka terus bereproduksi sampai sekitar 24 tahun, meskipun reproduksi menurun secara signifikan setelah usia 20 tahun (Noordwijk *and* Schaik, 1999).

## **2.3 Tinjauan Tentang Spermatozoa**

### **2.3.1 Morfologi Spermatozoa**

Spermatozoa merupakan sel berukuran kecil, kompak dan sangat khas yang tidak bertumbuh dan membagi diri. Morfologi spermatozoa terdiri dari tiga bagian kepala, leher, dan ekor (Hardijanto dkk., 2008). Sel spermatozoa mempunyai perbedaan susunan kimiawi. Kepala spermatozoa terdiri dari *Deoxyribo Nucleid Acid* (DNA) yang terdapat di bagian nukleus spermatozoa. Bagian akrosom mengandung beberapa enzim *proteolitik* yaitu *hyaluronidase*,

*akrosin*, dan *Coronary Penetrating Enzyme* (CPE) yang penting untuk penembusan sel telur saat proses fertilisasi (Hafez, 2000).

Pada bagian leher spermatozoa mempunyai panjang 5-7  $\mu\text{m}$  dipisahkan dari ekor oleh cincin yang disebut dengan annulus. Dalam sitoplasma spermatozoa banyak mengandung *lipid*, juga terdapat mitokondria yang dikelilingi suatu filamen heliks. Bagian leher berhubungan dengan kebutuhan energi untuk motilitas serta berperan dalam metabolisme oksidatif. Beberapa zat yang dihasilkan di bagian spermatozoa antara lain enzim glikolitik, asam amino, sulfhidril, kolesterol, sitokrom oksida, lipoprotein, dan sitokrom yang penting dalam reaksi respirasi spermatozoa. Plasmalogen merupakan senyawa lemak terbanyak di dalam spermatozoa didapatkan di bagian ekor terutama pada bagian mitokondria yang merupakan sumber energi endogen untuk pergerakan spermatozoa. Beberapa enzim yang mengatur metabolisme aerob maupun anaerob pada sel spermatozoa banyak ditemukan pada bagian leher dan ekor, kecuali enzim *hyaluronidase* yang hanya ditemukan di bagian kepala dan akrosom (Toelihere, 1985).

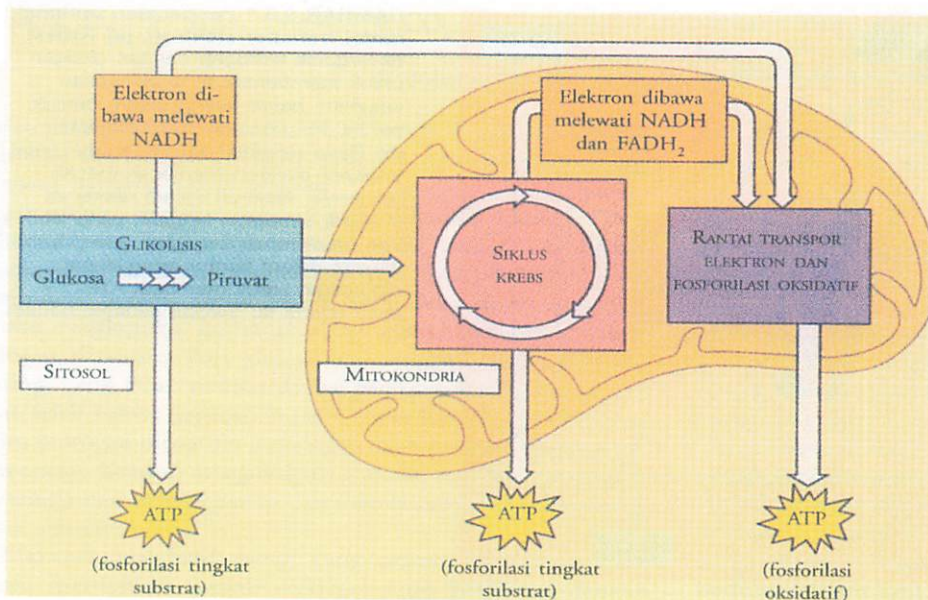
### 2.3.2 Aktivitas Spermatozoa

Ekor spermatozoa menyerupai flagellum. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria di dalamnya. Dua sentriol terletak dalam bagian tengah (*midpiece*) yang terdapat fibril serupa dengan silia terentang dalam ekor. Fibril-fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa. Fibril ini merupakan kerangka untuk berkontraksi dan berelaksasi, sama seperti kerjanya aktomiosin dari urat daging pada tubuh, yang menyebabkan

gerakan ekor seperti cambuk dan mendorong spermatozoa bergerak ke depan di dalam cairan (Hardijanto dkk., 2008).

Mitokondria adalah *organel* sel eukariot yang berfungsi sebagai organ respirasi pembangkit energi dengan menghasilkan *Adenosin Tri Phosphat* (ATP). Jumlah mitokondria tiap sel tergantung jenis sel dan organisme. Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang aktivitas metabolismenya tinggi yaitu sel-sel kontraktif seperti sperma pada bagian ekornya, sel otot jantung, dan sel yang aktif membelah seperti epitelium, akar rambut, dan epidermis kulit. Ekor sperma merupakan alat gerak yang membutuhkan energi tinggi dari mitokondria (Ngili, 2004).

## 2.4 Proses Fosforilasi Oksidatif Pada Mitokondria



**Gambar 3. Pembentukan Energi Pada Sel**



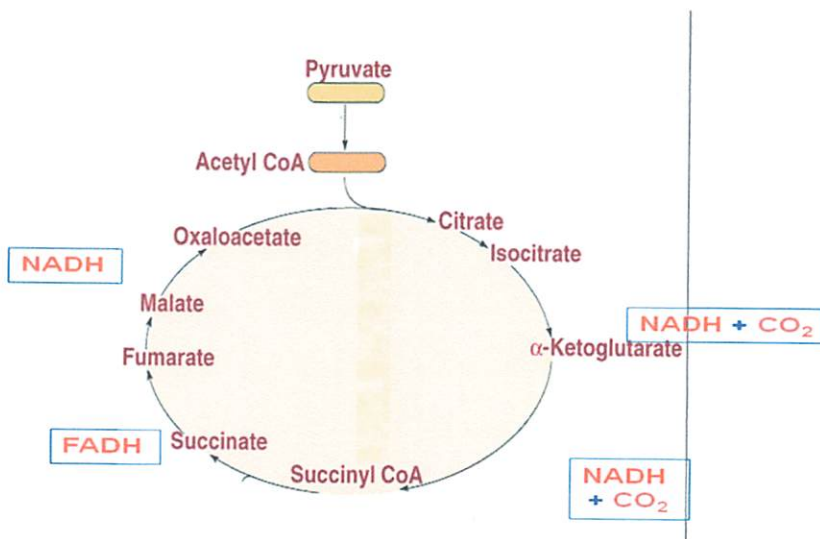
Pembentukan energi pada mitokondria adalah serangkaian proses perubahan glukosa menjadi energi. Proses metabolisme yang terjadi antara lain glikolisis yang terjadi di sitosol (luar mitokondria), siklus krebs dan fosforilasi oksidatif yang terjadi pada mitokondria. Selama glikolisis, molekul glukosa diubah menjadi 2 molekul senyawa piruvat. Piruvat melintasi membran mitokondria untuk memasuki matriksnya, dimana siklus krebs memecahnya menjadi karbondioksida (Strayer, 2000).

NADH mentransfer elektron dari glikolisis dan siklus krebs ke rantai transpor elektron yang berada di krista mitokondria. Rantai transport elektron ini mengubah energi kimiawi menjadi energi yang dapat digunakan untuk fosforilasi oksidatif, yang bertanggungjawab atas sebagian besar elektron ATP yang dihasilkan oleh respirasi seluler. Sejumlah kecil ATP dibentuk langsung selama glikolisis dan siklus krebs oleh fosforilasi tingkat substrat (David, 1997).

Elektron yang diambil dari makanan selama glikolisis dan siklus krebs ditransfer NADH ke flavoprotein dari rantai transpor elektron. Dalam reaksi redoks berikutnya, flavoprotein kembali ke bentuk teroksidasinya setelah mentransfer elektron ke FeS. Protein FeS ini kemudian mentransfer elektron ke senyawa yang disebut koenzim Q (*ubiquinone*). Sebagian besar pembawa elektron yang tersisa diantara koenzim Q dan oksigen berupa protein yang disebut sitokrom. Rantai transpor elektron memiliki beberapa jenis sitokrom yang memiliki fungsi yang berbeda-beda. Hasil akhir dari transpor elektron ini adalah setengah molekul oksigen. Sumber elektron lain untuk transpor yaitu  $FADH_2$  (Wolve, 2000).

Rantai transpor elektron tidak secara langsung membuat ATP. Fungsinya adalah untuk mempermudah jatuhnya elektron dari makanan ke oksigen, memecah penurunan energi bebas yang besar. Mitokondria mengkopel transport elektron dan pelepasan energi untuk sintesis ATP melalui mekanisme pengkopelan energi. Pada proses pengkopelan energi, peran ATP sintase sangat besar. ATP sintase adalah enzim yang membuat ATP. Enzim ini bekerja seperti sebuah protein ion yang beroperasi kebalikannya. kompleks energi dari gradien  $H^+$  untuk menggerakkan sintesis ATP, berada dalam membran mitokondria (Campbell, 1996).

Setiap NADH yang mentransfer sepasang elektron dari makanan ke rantai transport elektron menyumbangkan gaya gerak proton yang cukup besar untuk dapat menghasilkan maksimum 3 molekul ATP. Siklus krebs juga memasok elektron ke rantai transport elektron melalui  $FADH_2$ , tetapi setiap molekul pembawa elektron ini maksimum menghasilkan 2 ATP. Sehingga dari metabolisme 1 molekul glukosa menghasilkan 38 ATP (Wolve, 2000).



**Gambar 4. Proses Fosforilasi Oksidatif**

## **BAB 3**

# **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## **BAB 3 MATERI DAN METODE**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Animal BSL3, Laboratorium *Avian Influenza Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Agustus 2010.

### **3.2 Materi Penelitian**

#### **3.2.1 Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah satu ekor *Macaca fascicularis* jantan umur 8 tahun dengan berat badan 5 kg, berasal dari PT. Inquitex, Bogor. Hewan yang dipergunakan dalam keadaan sehat.

#### **3.2.2 Bahan Penelitian**

Semen *Macaca fascicularis*, virus H5N1 kode D4 berasal dari Menteri Kesehatan, zat warna eosin negrosin, NaCl fisiologis, ketamin HCl, atropin sulfat.

#### **3.2.3 Alat Penelitian**

Gelas obyek, gelas penutup, tabung berskala, pH meter, *syringe*, *needle*, api bunsen, pipet, *counter*, mikroskop binokuler, elektroejakulator dan *probe*.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Tehnik Pengambilan Spermatozoa**

Tehnik pengambilan spermatozoa sebelum infeksi virus H5N1 dilakukan tiap tiga hari selama delapan kali dengan cara sebagai berikut *Macaca fascicularis* dianestesi melalui intramuskuler menggunakan ketamin HCl dengan dosis 20-40

mg/kg BB, dan atropin sulfat 0,02-0,04 mg/kg BB. Selanjutnya dilakukan koleksi spermatozoa menggunakan elektroejakulator dengan cara memasukkan *probe* ke dalam anus *Macaca fascicularis*, kemudian diatur voltage awal yaitu 5 mA selama 10 detik, apabila belum terjadi ejakulasi voltage dinaikkan perlahan menjadi 10 mA hingga 25 mA, lama rangsangan tiap voltage selama 10 detik. Interval waktu setiap kenaikan voltage selama 5 detik. Spermatozoa hasil ejakulasi ditampung dalam tabung berskala, selanjutnya dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis pada spermatozoa.

Tehnik pengambilan spermatozoa pada *Macaca fascicularis* empat hari setelah infeksi virus H5N1 sama dengan langkah sebelum diinfeksi virus H5N1.

### **3.3.2 Menginfeksi *Macaca fascicularis***

Menginfeksi virus H5N1 kode D4 (virus yang telah menginfeksi manusia) pada *Macaca fascicularis* melalui mukosa mata, hidung (intranasal) dan trakea. Infeksi melalui kedua mukosa mata masing-masing sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi  $10^6$  TCID<sub>50</sub>, melalui hidung (intranasal) sebanyak 4 ml dengan konsentrasi  $10^6$  TCID<sub>50</sub> dan melalui trakea sebanyak 1 ml dengan konsentrasi  $10^6$ TCID<sub>50</sub> (Ruat *et al.*, 2007 ).

### **3.3.3 Pemeriksaan Makroskopis**

Semen yang diperoleh dilakukan pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH.

### **3.3.4 Pemeriksaan Motilitas Massa Spermatozoa**

Pemeriksaan motilitas massa spermatozoa dapat dilakukan dengan cara meletakkan satu tetes semen yang diperoleh pada gelas obyek, kemudian diamati motilitasnya di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali.

### **3.3.5 Pemeriksaan Motilitas Individu Spermatozoa**

Pemeriksaan motilitas individu spermatozoa dapat dilakukan dengan cara natif dengan meletakkan satu tetes semen yang diperoleh pada gelas obyek, tambahkan satu tetes larutan NaCl fisiologis campur sampai homogen, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas individu spermatozoa dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali dan 400 kali. Penilaian dilakukan secara subyektif berdasarkan arah gerakan dan kecepatan spermatozoa. Penilaian dilakukan terhadap spermatozoa yang bergerak maju (gerak progresif) dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Perhitungan dilakukan dari lapangan pandang yang berbeda (Hardijanto dkk, 2008).

### **3.3.6 Pemeriksaan Spermatozoa Hidup**

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dilakukan dengan cara membuat preparat ulas. Setetes suspensi semen ditetaskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian tetaskan zat warna eosin-negrosin dan dicampur dengan menggunakan gelas obyek lain. Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan cara bagian ujung gelas obyek lain ditempelkan pada ujung campuran semen,

kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin, selanjutnya difiksasi di atas api bunsen (proses tersebut harus selesai maksimal 15 detik). Penghitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedang yang berwarna ungu atau merah keunguan adalah spermatozoa yang mati (Partodihardjo, 1992).

### **3.4 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan tipe *one only pre-test – pos- test design*.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas (*Independent Variable*)**

Dosis infeksi virus H5N1 pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*).

#### **3.5.2 Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)**

Persentase motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) setelah diinfeksi virus H5N1.

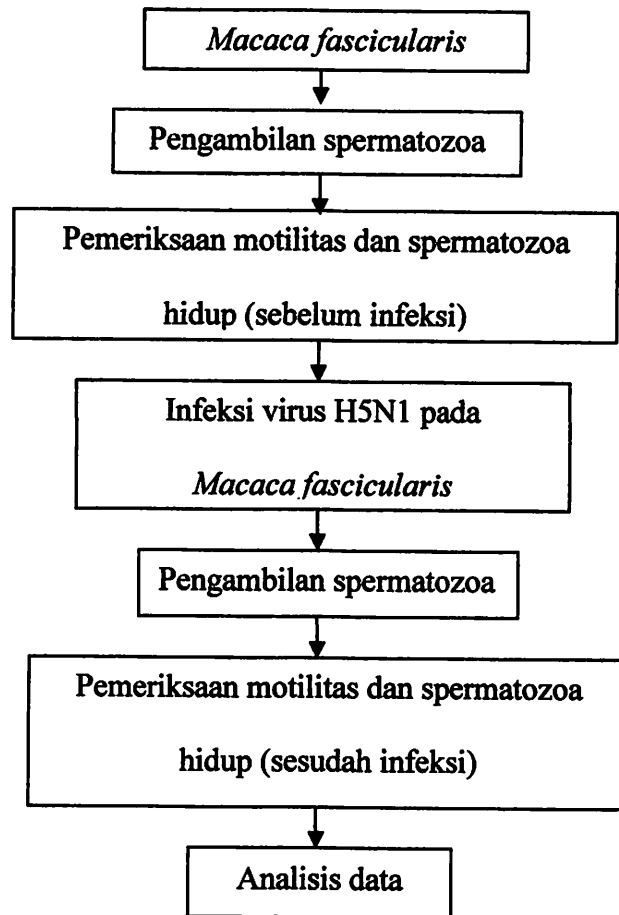
#### **3.5.3 Variabel Terkendali**

Umur monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), volume semen dan suhu.

### **3.6 Analisis Data**

Analisis data menggunakan uji T untuk mengetahui adanya perbedaan sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1.

### 3.7 Skema Penelitian





## **BAB 4**

# HASIL PENELITIAN

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Pemeriksaan Semen *Macaca fascicularis*

Spermatozoa *Macaca fascicularis* sebelum diinfeksi virus H5N1, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan makroskopis. Hasil pemeriksaan makroskopis sebelum dan sesudah diinfeksi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

**Tabel 1.** Hasil Pemeriksaan Makroskopis Sebelum Infeksi

Ulangan	Volume (ml)	Warna	Konsistensi	pH
1	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7
2	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7
3	0.5	Putih kekuningan	Pekat	7
4	0.5	Putih kekuningan	Pekat	7
5	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7
6	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7
7	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7
8	0.2	Putih kekuningan	Pekat	7

**Tabel 2.** Hasil Pemeriksaan Makroskopis Sesudah Infeksi

Ulangan	Volume (ml)	Warna	Konsistensi	pH
1	0.3	Putih	Encer	7
2	0.3	Putih	Encer	7
3	0.2	Putih	Sedang	7
4	0.2	Putih	Sedang	7
5	0.1	Putih	Sedang	7
6	0.1	Putih	Sedang	7
7	0.1	Putih	Sedang	7
8	0.1	Putih	Sedang	7

## 4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa

Hasil pemeriksaan mikroskopis spermatozoa sebelum dan sesudah infeksi dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

**Tabel 3.** Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa Sebelum Infeksi

Ulangan	Gerakan Massa	Motilitas (%)	Kecepatan	Spz Hidup (%)
1	+++	80	3	90
2	+++	76	2	85
3	+++	88	3	95
4	+++	80	3	90
5	+++	76	2	90
6	+++	78	3	85
7	+++	79	3	90
8	+++	77	2	85

**Tabel 4.** Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa Sesudah Infeksi

Ulangan	Gerakan Massa	Motilitas (%)	Kecepatan	Spz Hidup (%)
1	++	62	2	75
2	++	63	2	76
3	++	58	2	78
4	+	53	1	65
5	+	53	1	66
6	++	58	2	70
7	+	50	1	65
8	+	47	1	60

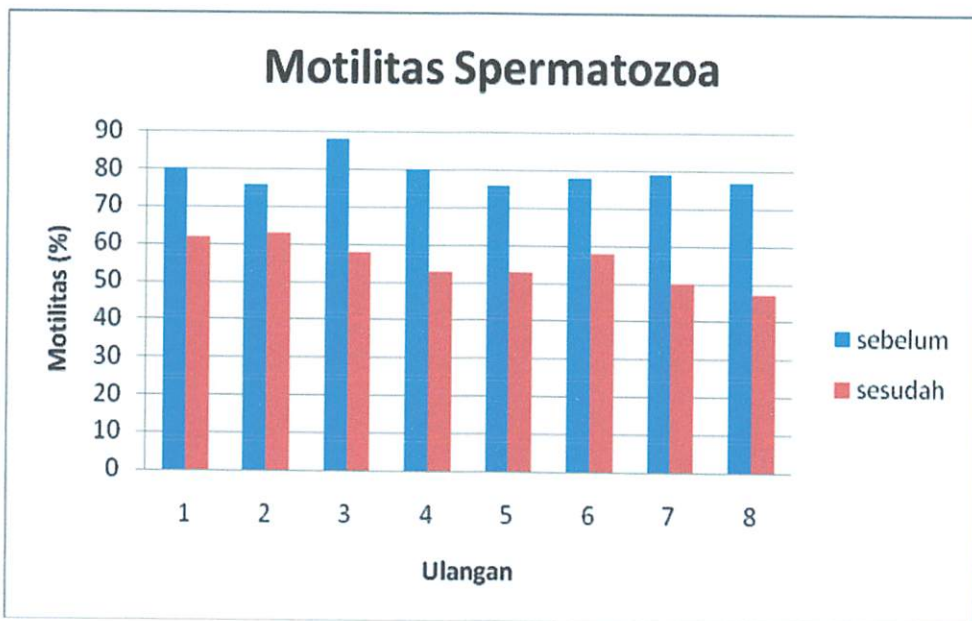
### 4.3 Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa *Macaca fascicularis*

Hasil dari pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1 dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Rata-rata dan Standar Deviasi Motilitas Spermatozoa

Perlakuan	Rata-rata ± Standar Deviasi Jumlah Motil (%)
Sebelum	79.25 <sup>a</sup> ± 3.882
Sesudah	55.55 <sup>b</sup> ± 5.682

Notasi : Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,000 < 0,05 atau 5%).



**Gambar 6.** Grafik Motilitas Spermatozoa *Macaca fascicularis* sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1

Berdasarkan analisis data persentase motilitas spermatozoa dengan uji T menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,000 < 0,5 atau 5%). Jumlah spermatozoa motil (%) menurun sesudah infeksi.

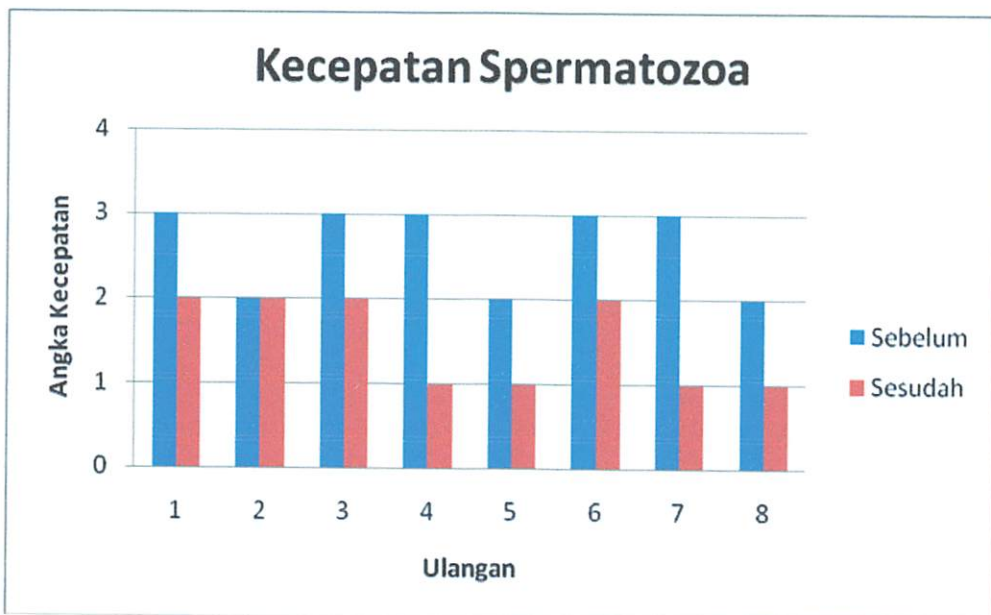
#### 4.4 Pemeriksaan Kecepatan Spermatozoa *Macaca fascicularis*

Pemeriksaan motilitas individu spermatozoa diikuti dengan pemeriksaan kecepatan individu spermatozoa. Hasil dari pemeriksaan kecepatan individu spermatozoa sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1 dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Rata-rata dan Standar Deviasi Kecepatan Individu Spermatozoa

Perlakuan	Rata-rata $\pm$ Standar Deviasi Kecepatan Individu Spz
Sebelum	2.62 <sup>a</sup> $\pm$ 0.517
Sesudah	1.50 <sup>b</sup> $\pm$ 0.534

Notasi : Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,002 < 0,05 atau 5%).



**Gambar 7.** Grafik Kecepatan Individu Spermatozoa *Macaca fascicularis* sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1

Berdasarkan analisis data persentase kecepatan individu spermatozoa dengan uji T menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,002 < 0,05 atau 5%). Kecepatan spermatozoa menurun sesudah infeksi.

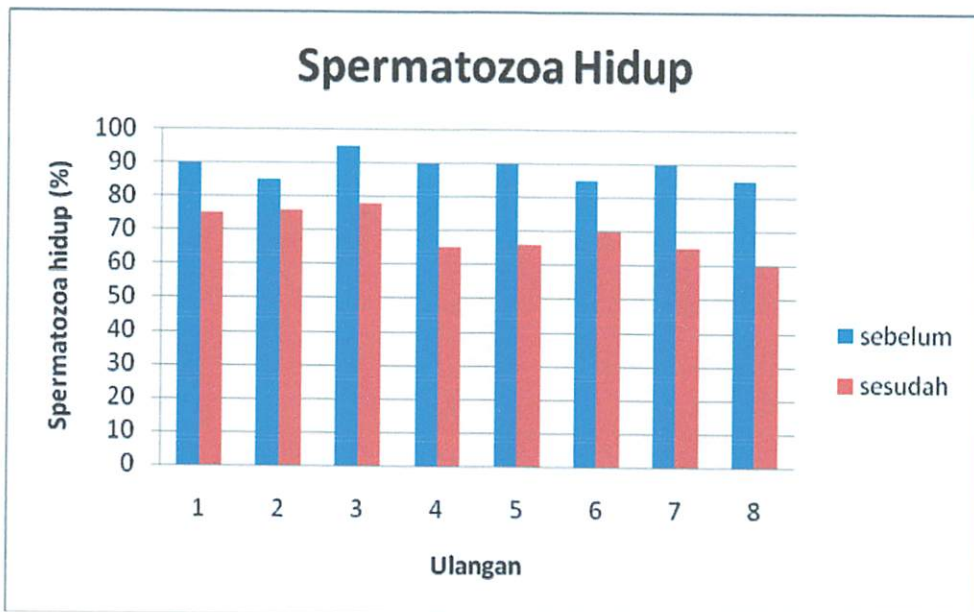
#### 4.5 Pemeriksaan Spermatozoa Hidup *Macaca fascicularis*

Hasil dari pemeriksaan spermatozoa hidup sebelum dan sesudah diinfeksi virus H5N1 dapat dilihat pada Tabel 7. Pada penelitian ini dihitung persentase jumlah spermatozoa yang hidup.

**Tabel 7.** Rata-rata dan Standar Deviasi Spermatozoa Hidup

Perlakuan	Rata-rata ± Standar Deviasi Jumlah Hidup (%)
Pre	88.75 <sup>a</sup> ± 3.535
Post	69.37 <sup>b</sup> ± 6.412

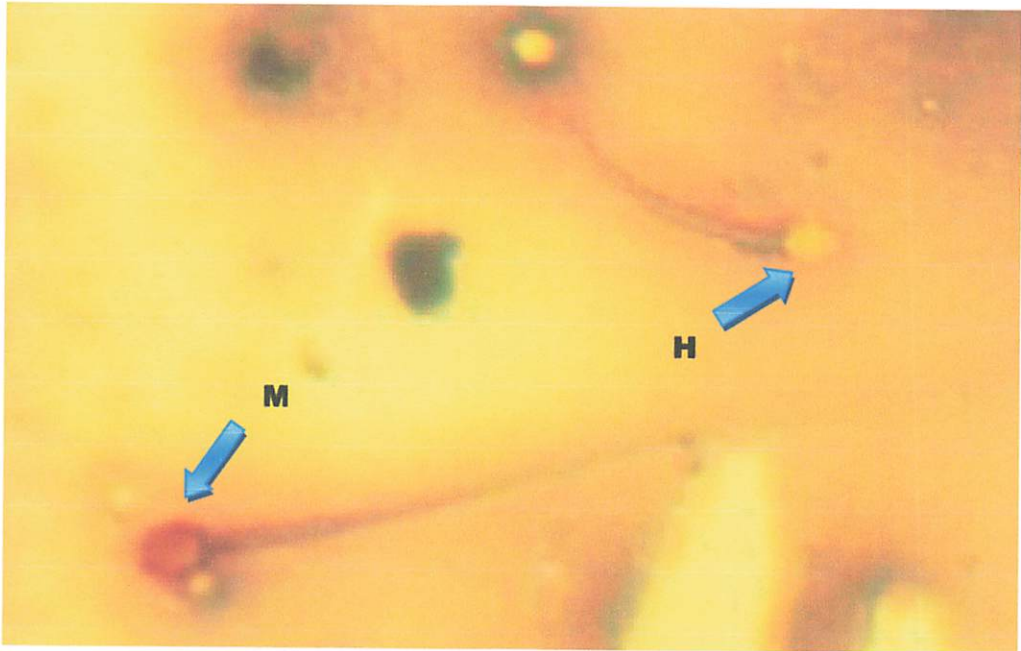
Notasi : Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,000 < 0,05 atau 5%)



**Gambar 8.** Grafik Spermatozoa hidup *Macaca fascicularis* sebelum dan sesudah infeksi virus H5N1

Berdasarkan analisis data persentase spermatozoa hidup dengan uji T menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (*p-value* 0,000 < 0,5 atau 5%). Jumlah spermatozoa hidup (%) menurun sesudah infeksi.

#### 4.6 Hasil Mikroskopis



**Gambar 9.** Sel spermatozoa hidup dan mati pada pembesaran 400x

Keterangan :

H : Sel spermatozoa hidup

M : Sel spermatozoa mati

Sel spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna, sehingga kepalanya akan berwarna merah seperti yang ditunjukkan pada huruf M. Sedangkan sel spermatozoa yang masih hidup tetap jernih atau tidak berwarna seperti yang ditunjukkan pada huruf H.

**BAB 5**  
**PEMBAHASAN**



## BAB 5 PEMBAHASAN

### 5.1 Evaluasi Pemeriksaan Makroskopis

Perkembangbiakan *Macaca fascicularis* dimulai dari *infant* (bayi) 6-12 bulan, *weaning* (anak) 14 bulan, *juvenile* (remaja) 12-42 bulan, *subadult* (dewasa muda) 42-54 bulan dan *adult* (dewasa) diatas 54 bulan (Purba, 2008). Pada usia lanjut jumlah spermatogonia tipe A akan berkurang, selain itu sel sertoli yang merupakan sumber nutrisi spermatozoa akan berkurang jumlahnya dan terakumulasi lipid sehingga tidak berfungsi dengan optimal yang menyebabkan jumlah spermatozoa yang dihasilkan dapat menurun. Penurunan jumlah spermatozoa akan mempengaruhi volume semen saat ejakulasi (Prasetyo, 2008).

Pengambilan spermatozoa menggunakan elektroejakulator dapat berpengaruh terhadap volume semen pada saat ejakulasi. Volume semen dalam satu ejakulasi sangat bervariasi. Pada umumnya volume semen yang berbeda dipengaruhi antara lain oleh umur, besar tubuh, status kesehatan, status reproduksi, kualitas pakan, dan frekuensi penampungan (Toelihere, 1993). Volume semen yang lebih besar didapatkan pada saat *Macaca fascicularis* jantan berada dalam satu kandang dengan betina dan memiliki konsistensi pekat serta menunjukkan jumlah spermatozoa yang tinggi.

Warna semen dapat berubah seperti berwarna kemerahan karena bercampur darah, berwarna kuning atau putih kotor karena semen bercampur nanah dan produk-produk radang yang lain. Apabila warna semen tidak normal merupakan indikasi adanya kelainan pada alat kelamin (Hardijanto dkk., 2008).

Semen dari setiap jenis hewan yang normal mempunyai bau yang spesifik (khas). Bau semen yang tidak normal, misalnya busuk atau anyir merupakan indikasi adanya radang dalam saluran reproduksi hewan jantan tersebut (Hardijanto dkk., 2007).

Hasil pemeriksaan semen menunjukkan pH 7. pH semen diukur menggunakan pH meter. Makin rendah pH semen (asam), makin kurang baik kualitasnya. Sebaliknya, makin tinggi pH (basa) menunjukkan tingkat kematian spermatozoa yang tinggi (Hafez, 2000).

## **5.2 Evaluasi Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa**

Menurut Hardijanto dkk. (2008) berdasarkan penelitian motilitas massa, kualitas semen dianggap sangat baik (+++) apabila terlihat gelombang kecil sampai besar yang tebal, jumlah banyak, dan bergerak cepat. Penilaian baik (++) apabila terlihat gelombang yang tipis, jarang dan bergerak lambat. Penilaian sedang (+) apabila tidak terlihat gelombang, gerakan spermatozoa sendiri-sendiri, dan penilaian buruk (0) atau N apabila hanya sedikit atau tidak ada sama sekali gerakan individu.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan adanya motilitas massa positif tiga (+++) sebelum diinfeksi virus H5N1. Hasil motilitas massa setelah infeksi hari keempat menunjukkan penilaian yang baik yaitu positif dua (++) dan sedang yaitu positif satu (+). Pada keadaan positif dua (++) dimungkinkan persentase spermatozoa yang hidup cukup tinggi, tetapi banyak diantaranya yang lemah atau mudah mati. Sedangkan pada keadaan positif satu (+) bahwa semen tidak banyak

mengandung spermatozoa atau mengandung cukup banyak spermatozoa tetapi sebagian besar banyak yang mati (Hardijanto dkk., 2008).

Penilaian motilitas individu spermatozoa dilakukan secara subyektif berdasarkan arah gerakan dan kecepatan spermatozoa maju (gerak progresif) dibanding seluruh spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. motilitas adalah gerak maju atau gerak progresif dari spermatozoa (Direktorat Jenderal Peternakan, 2000). Motilitas individu spermatozoa merupakan indikator untuk menentukan kualitas semen, karena parameter ini paling mudah dan cepat yang dapat ditentukan. Daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang sangat penting untuk keberhasilan fertilisasi (Kostaman dan Utama, 2006).

Penilaian pada motilitas individu selain arah gerakan juga dilakukan penilaian kecepatan individu. Menurut Direktorat Jenderal Peternakan (2000), adapun penilaian kecepatan gerakan individu spermatozoa adalah sebagai berikut angka 0 apabila tidak ada spermatozoa yang bergerak atau sedikit, angka 1 apabila gerakan spermatozoa pelan, angka 2 apabila gerakan spermatozoa sedang, angka 3 apabila gerakan spermatozoa cepat, dan angka 4 apabila gerakan spermatozoa sangat cepat.

Hasil penelitian motilitas individu setelah empat hari *pasca* infeksi menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (*p-value*  $0,000 < 0,05$  atau 5%) antara sebelum dan sesudah dilakukan infeksi virus H5N1, dengan rata-rata dan standar deviasi masing-masing  $79.25 \pm 3.882$  sebelum infeksi dan  $55.55 \pm 5.682$  setelah infeksi. Hasil pada kecepatan individu spermatozoa juga menunjukkan penurunan dengan perbedaan yang sangat nyata (*p-value*  $0,002 < 0,05$  atau 5%),

dengan rata-rata dan standar deviasi masing-masing  $2.62 \pm 0.517$  sebelum infeksi dan  $1.50 \pm 0.534$  setelah infeksi.

### 5.3 Evaluasi Pemeriksaan Spermatozoa Hidup

Persentase spermatozoa yang hidup adalah jumlah spermatozoa hidup yang terhitung dalam persen dengan pembesaran 400 kali. Besarnya persentase spermatozoa hidup dari semen adalah suatu nilai perbandingan antara jumlah spermatozoa yang hidup di dalam suatu sampel terhadap seluruh spermatozoa yang terdapat di dalam sampel tersebut (Hardijanto dkk., 2007).

Spermatozoa hidup mempunyai lapisan lipoid pada dinding sel yang dapat melindungi masuknya zat warna ke dalam spermatozoa hidup sehingga pada sel yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna. Spermatozoa yang mati, lapisan lipoid akan rusak atau hilang sehingga zat warna sangat mudah menembus masuk ke dalam spermatozoa. Penggunaan pewarna eosin negrosin dapat digunakan untuk membedakan antara spermatozoa mati berwarna merah keunguan dan yang hidup berwarna putih tanpa warna (Hardijanto dkk., 2008).

Hasil penelitian spermatozoa hidup menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (*p-value*  $0,000 < 0,05$  atau 5%) antara sebelum dan sesudah dilakukan infeksi virus H5N1, dengan rata-rata dan standar deviasi masing-masing  $88.75 \pm 3.535$  sebelum infeksi dan  $69.37 \pm 6.412$  setelah infeksi.

Infeksi virus *Avian influenza* subtipe H5N1 pada spermatozoa dimungkinkan telah mempengaruhi persentase gerakan individu dan spermatozoa yang hidup. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil pemeriksaan sesudah infeksi yang

menunjukkan adanya penurunan pada persentase motilitas individu dan spermatozoa hidup *Macaca fascicularis*.

Penurunan pada motilitas individu maupun spermatozoa hidup mempunyai beberapa faktor antara lain terdapat gangguan penyakit pada alat reproduksi, gangguan hormon, pakan serta kondisi psikologis (Ratnawati dkk., 2008). Faktor-faktor tersebut pada penelitian ini mempunyai kemungkinan kecil karena penelitian ini digunakan hewan percobaan *Macaca fascicularis* dalam keadaan sehat secara fisik serta bebas dari penyakit, pemberian pakan berkualitas telah diberikan secara teratur. Faktor terbesar pada penurunan hasil sesudah infeksi diduga karena virus H5N1 telah menginfeksi spermatozoa. Sehubungan dengan adanya gejala klinis dan perubahan patologis yang bervariasi, maka diagnosis definitif hanya didasarkan atas isolasi dan identifikasi virus (Beard, 2004).

Pada mitokondria proses pembentukan energi pada fosforilasi oksidatif terdiri atas lima tahapan reaksi enzimatik yang melibatkan kompleks enzim yang terdapat pada krista mitokondria. Proses pembentukan ATP melibatkan proses transpor elektron dengan bantuan empat kompleks enzim yang terdiri atas kompleks I, kompleks II, kompleks III, dan kompleks IV. Sedangkan yang berfungsi memompa elektron adalah kompleks I, III, dan IV (Strayer, 2000).

Kompleks I terdiri dari NADH dehidrogenase dan pusat sulfur. Kompleks II terdiri atas suksinat dehidrogenase dan pusat sulfur. Kompleks III terdiri dari sitokrom d dan c<sub>1</sub> serta pusat bersulfur spesifik. Kompleks IV terdiri dari sitokrom a dan a<sub>3</sub>. Koenzim Q (*ubiquinone*) merupakan rantai yang menghubungkan di antara kompleks I, II, dan III. Sitokrom c merupakan rantai penghubung di antara

kompleks III dan IV. Molekul yang berperan penting dalam reaksi tersebut adalah NADH dan FADH<sub>2</sub>, yang dihasilkan pada reaksi glikolisis, dekarboksilasi oksidatif, dan siklus Krebs. Selain itu, molekul lain yang juga berperan adalah molekul oksigen, koenzim Q (*Ubiquinone*), sitokrom b, sitokrom c, dan sitokrom a (Strayer, 2000).

Berdasarkan perkembangan penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa genom PB1 dan PB2 pada virus H5N1 berpengaruh terhadap gen COX6A1 dalam transpor elektron enzim yang tergolong pada enzim sitokrom c (Hao *et al.*, 2008). Apabila enzim sitokrom c pada mitokondria spermatozoa terganggu maka kompleks enzim III dan IV pada proses transpor elektron akan terputus, sehingga pembentukan ATP juga akan terganggu. Sehingga ATP untuk pergerakan spermatozoa hanya berasal dari proses fosforilasi substrat yang menghasilkan sedikit energi. Hal tersebut mengakibatkan menurunnya motilitas dan spermatozoa hidup.

## BAB 6

# KESIMPULAN DAN SARAN

## **BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan data hasil penelitian yang telah didapatkan, maka hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Infeksi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 dapat menurunkan persentase motilitas dan spermatozoa hidup monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*).

### **6.2 Saran**

1. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemeriksaan integritas membran spermatozoa yang diinfeksi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1.
2. Penelitian lebih lanjut tentang pengaruh infeksi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 terhadap organ reproduksi jantan pada unggas.
3. Melakukan isolasi dan identifikasi virus *Avian influenza* sub tipe H5N1 pada organ reproduksi.



# RINGKASAN

## RINGKASAN

**Chinta Nurmalitasari Pengaruh Infeksi Virus *Avian influenza* Subtipe H5N1 Terhadap Persentase Motilitas dan Spermatozoa Hidup Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) Di bawah bimbingan Dr. Bambang Poernomo S., M.S., drh. selaku pembimbing pertama dan Retno Bijanti, M.S., drh. selaku pembimbing kedua.**

Penyakit flu burung atau flu unggas (*Bird Flu, Avian influenza*) adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A dan ditularkan oleh unggas. Penyakit ini ditularkan dari burung ke burung tetapi dapat juga menular ke manusia. Virus H5N1 yang telah menginfeksi hewan maupun manusia menunjukkan gangguan pada semua organ (multisistemik), termasuk organ reproduksi.

Perkembangan riset eksperimental tentang sejumlah penyakit butuh percobaan dengan memakai primata seperti *Macaca fascicularis*. Hal tersebut disebabkan hewan ini lebih dekat dengan manusia secara fungsional dan anatomi daripada hewan pengerat, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi tentang bahaya infeksi virus H5N1 kepada manusia.

Diduga salah satu akibat dari infeksi virus H5N1 pada sistem reproduksi jantan adalah menurunnya motilitas serta persentase spermatozoa hidup. Perkembangan penelitian yang telah dilakukan pada sel *Drosophila sp.*, menunjukkan bahwa protein PB1 dan PB2 mempunyai fungsi spesifik pada mitokondria. Protein PB1 dan PB2 dapat mempengaruhi gen COX6A1 dalam transport elektron enzim yang tergolong pada enzim sitokrom c, jika dirinci lebih

lanjut maka protein PB2 mempunyai peran dalam *signal targetting* dalam mitokondria sedangkan PB1 akan mengganggu fungsi mitokondria pada membran dalam maupun luar mitokondria. Akibat gangguan virus H5N1 pada sistem di mitokondria, akan mengganggu produksi energi dalam bentuk ATP.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa infeksi virus H5N1 pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dapat mempengaruhi persentase motilitas dan spermatozoa hidup.

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah seekor *Macaca fascicularis* jantan umur 8 tahun. Pemeriksaan dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu dan spermatozoa hidup.

Hasil yang diperoleh setelah infeksi virus H5N1 menunjukkan penurunan baik pada motilitas maupun spermatozoa hidup *Macaca fascicularis*. Penurunan tersebut dimungkinkan karena infeksi virus H5N1. Hal tersebut disebabkan virus H5N1 mempunyai genom internal yaitu genom PB1 dan PB2 yang dapat mengganggu fungsi pada membran dalam dan luar mitokondria yang merupakan penghasil ATP sebagai sumber energi pada pergerakan spermatozoa. Bila mitokondria rusak, spermatozoa berhenti bergerak karena tidak ada pasokan energi dari organel mitokondria.

# DAFTAR PUSTAKA

**DAFTAR PUSTAKA**

- Beard, C. W. 2004. *Avian Influenza*. <http://www.vet.uga.edu/VPP/grey-book/FAD/aka.htm>. [20 Juli 2009]
- Beigel JH, J. Farrar, and A.M. Han. 2005. *Avian influenza (H5N1) in humans*. *N Engl J Med*. Vol : 1374-1385.
- Campbell. 1996. BIOLOGI jilid 1. Jakarta: Erlangga
- Capua I and D.J Alexander, 2004. Review article avian influenza: Recent developments. [http://www.scielo.br/pdf/jpbneu/v31n5/en\\_27161](http://www.scielo.br/pdf/jpbneu/v31n5/en_27161) [08 Juni 2010]
- Cawthon, K. 2006. Primate Factsheets: Long-tailed Macaque (*Macaca fascicularis*) Taxonomy, Morphology, & Ecology . [http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/long-tailed\\_macaque](http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/long-tailed_macaque). [20 Juli 2009].
- Chu, V. C. and G. R. Whittake, 2004. Influenza viruses entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *PNAS*. 101: 18153-18158.
- Damayanti, R., A. Wiyono, R. Indriani, N.L.P.I. Dharmayanti dan Darminto. 2004. Gambaran Klinis dan Patologis pada Ayam Terserang Flu Burung Sangat Pathogenic (HPAI) di Beberapa Peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV* 9: 128-135
- David, P. 1997. Prinsip-Prinsip Biokimia edisi kedua. Jakarta: Erlangga.
- Departemen Kesehatan RI. 2005. Flu Burung. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan [http://www.litbang.depkes.go.id/maskes/072005/flu\\_burung.pdf](http://www.litbang.depkes.go.id/maskes/072005/flu_burung.pdf) [10 Juli 2009]
- Dharmayanti, I. 2009. Flu Burung: Penyakit yang Mematikan. <http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/wr273057.pdf> [15 Juli 2009]
- Dittus, W. 2004. Demography: a window to social evolution. In: Thierry B, Singh M, Kaumanns W, editors. *Macaque societies: a model for the study of social organization*. Cambridge: Cambridge Univ Pr. p 87-112.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (Protap) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Easterday, B.C., V.S Hinshaw and D.A. Halvorson. 1997. *Influenza: Diseases of Poultry*. Iowa. pp. 583-595

- Engelhardt A., J.B. Pfeifer, M. Heistermann, C. Niemitz, V.H. Jaram, and J.K. Hodges. 2004. Assessment of female reproductive status by male longtailed macaques, *Macaca fascicularis*, under natural conditions. *Anim Behav* 67(5): 915-24.
- Food and Agriculture Organization. 2004. Transboundary Animal Disease. Avian Influenza. *EMPRES Bulletin*. 25: 9-10
- Fittinghoff Jr. NA and D.G. Lindburg. 1980. Riverine refuging in east Bornean *Macaca fascicularis*. In: Lindburg DG, editor. *The macaques: studies in ecology, behavior and evolution*. New York: Van Nostrand Reinhold. p 182-214.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak Edisi Ke-4*. Penerbit Gajah Mada University Press. Yogyakarta. P: 785-789.
- Gazali, M., dan S.N. Tambing. 2001. *Kriopreservasi Sel Spermatozoa*. Makasar.
- Groves, C. 2001. *Primate Taxonomy*. Washington DC: Smithsonian Inst Pr. 350p.
- Hafez, E.S., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup>. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hao L., T. Watanabe , E. Sorencen, C.A. Nidom, M.A. Newton, P. Ahlquist, and Y. Kawaoka. 2008. RNAi Screen Identifies Host Genes Important for Influenza Virus Replication. *Nature*. 564: 378-382
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito, dan T.W. Suprayogi. 2007. *Penuntun Pratikum Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito, dan T.W. Suprayogi. 2008. *Diktat Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Horimoto T., and Y. Kawaoka, 2001. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149.
- Kostaman, T. dan I. K. Utama. 2006. Studi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer Pada Pengencer Tris-Sitrat-Fruktosa. *Jurnal Sain Veteriner*. Halaman 24.

- Lucas PW, and R.T. Corlett. 1991. Relationship between the diet of *Macaca fascicularis* and forest phenology. *Folia* 57(4): 201-15.
- Mulyadi, B, dan Prihatini. 2005. Diagnosis Laboratorik Flu Burung (H5N1) (Laboratoric Diagnosis of Avian Influenza (H5N1)). [http://www.litbang.depkes.go.id/maskes/072005/flu\\_burung.pdf](http://www.litbang.depkes.go.id/maskes/072005/flu_burung.pdf) [13 Juli 2009]
- Ngili, Y. 2004. Mengenal DNA Mitokondria dan Aplikasinya. <http://kompas.com/kompas-cetak/0311/04/inspirasi/664826.htm> [14 Juli 2009].
- Nidom, C.A. 2009. Analisis Molekuler Genoma Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. <http://www.adln.lib.unair.ac.id/htm> [15 Juli 2009]
- Nidom, C.A. 2010. Menelusuri Penyebaran Virus Flu Burung di Indonesia. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nidom, C.A. 2005. Upaya Pencegahan dan Penanggulangan Pandemi Flu Burung. <http://www.ebooks.lib.unair.ac.id/download.php?id=132> [13 Juli 2009].
- Nidom, C.A, M. Sasayama, M. Yamaoka, V.N. Reviany, L.A. Arlita, M. Yusuf, M. Amin, Y. Suzuki, Y. Kawaoka, and H. Hotta. 2008. Isolation of Avian Influenza Viruses in Stray Cats (*Felis silvestris cats*) in Indonesia By Using Serological Test and Real Time PCR. Bangkok International Conference on Avian Influenza, Bangkok, Thailand, 23-25 January 2008.
- Noordwijk, M.A. and Schaik C.P. 1987. Competition among female long-tailed macaques, *Macaca fascicularis*. *Anim Behav* 35(2): 577-89.
- Noordwijk, M.A and Schaik C.P. 1999. The effects of dominance rank and group size on female lifetime reproductive success in wild long-tailed macaques, *Macaca fascicularis*. *Primates* 40(1): 105-30.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Veteriner. Jurusan Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Mutiara Sumber Widya. Jakarta Pusat
- Patu, I. 2007. Flu Burung di Indonesia. <http://www.infeksi.com/articles.php?lng=in&pg=36> [10 Juli 2009]
- Prasetyo, W.E. 2008. Usia Tua Mempengaruhi Kualitas Sperma. <http://www.genetika21.wordpress.com> [17 Agustus 2008].

- Purba, D.M. 2008. Hentikan Eksploitasi terhadap Monyet Ekor Panjang. <http://www.internationalanimalrescue.org> [17 Agustus 2010]
- Radji, M. 2006. Avian Influenza A (H5N1) : Patogenesis, Pencegahan dan Penyebaran pada Manusia. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. III, No.2: 55-62.
- Rahardjo, T., dan N. Siti. 2009. Studi I Toksisitas Dekontaminan Prussian Blue pada Kera Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*). <http://www.nhc.batan.go.id/dokumen/tur2.pdf> [19 Juli 2009].
- Raharjo, J., dan Nidom, C.A. 2004. *Avian influenza; Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya*. Hasil Investigasi Lapangan. GITA Pustaka. Jakarta.
- Ratnawati D., L. Affandhy, W.C. Pratiwi dan P.W. Prihandini. 2008. Pengaruh Pemberian Suplemen Tradisional Terhadap Kualitas Semen Jantan Sapi Bali. <http://www.lolitsapi.litbang.deptan.go.id/eng/images/dokumen/10.pdf> (07 Agustus 2010).
- Ronohardjo, P. 1983. Penyakit Cengesan atau Selesma pada Itik Tegal, Bali dan Alabio. *Penyakit Hewan* 15(25): 61-71.
- Ross, A. B., M. J. Shepherd, M. Schüpphaus, V. Sinclair, B. Alfaro, E. A. Kamal, and P. Aman. 2003. Alkylresorcinols in cereals and cereal products. <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/133/7/2222> [19 Juni 2010]
- Rowe, N. 1996. *The Pictorial Guide to the Living Primates*. East Hampton (NY): Pogonias Pr. 263 p.
- Ruat C., C. Caillet, A. Bidaut, J. Simon, and D. M. E. Albert. 2007. Vaccination of Macaques with Adjuvanted Formalin-Inactivated Influenza A Virus (H5N1) Vaccines: Protection against H5N1 Challenge without Disease Enhancement. Osterhaus forest, Vietnam. *Lab Prim News* 42(4): 1-5.
- Strayer, L. 2000. *Biokimia vol 2 edisi 4*. Jakarta. Buku kedokteran EGC.
- Supriatna, I. dan F.H. Pasaribu. 1992. *In Vitro Fertilization, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Supriatna, J., A. Yanuar, Martarinza, H.T. Wibisono, R. Sinaga, I. Sidik, dan S. Iskandar. 1996. A preliminary survey of long-tailed and pig-tailed macaques (*Macaca fascicularis* and *Macaca nemestrina*) in Lampung,



- Bengkulu, and Jampi provinces, Southern Sumatera, Indonesia. *Tropic Biodiv* 3(2): 131-40.
- Syamsul. 2009. Primata Transgenik Menjanjikan. <http://www.apasihbiotek.com> [14 Juli 2009].
- Tabbu, C.R. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya : Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral. Kaninus. Yogyakarta.
- Taubenberger JK, A.H. Reid, R.M. Lourens, R. Wang, G. Jin, and T.G. Fanning. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437: 889-893
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. 6<sup>th</sup>. Ed. Penerbit Angkasa Bandung.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Umapathy, G, M. Singh, and S.M. Mohnot. 2003. Status and distribution of *Macaca fascicularis umbrosa* in the Nicobar Islands, India. *Int J Primatol* 24(2): 281-93.
- Wheatley, B.P. 1980. Feeding and ranging of east Bornean *Macaca fascicularis*. In: Lindburg DG, editor. The macaques: studies in ecology, behavior, and evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 215-46.
- Whittaker G.R. 2005. Intracellular trafficking of influenza virus : Clinical implications for molecular medicine. <http://www.expertreviews.org/> [08 Juni 2010]
- Wolve, S.L. 2000. *Introduction to Cell Biology*. Wadsworth Publising Company Melmont, California.
- World Health Organization. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network . *Emerg Infect Dis* (serial in the Interned). Available from [http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11 no 10/05-0644.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11_no_10/05-0644.htm) [14 Juli 2009]
- Wiyono, A., R. Indriani, N.L.P.I. Dharmayanti, R. Damayanti dan Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5 dari Ayam Asal Wabah di Indonesia. *JITV* 9: 61-71.
- Yamada, S., Y. Suzuki, Mai Q Le, C.A. Nidom, Y.S. Takagawa, Y. Muramoto, M. Ito, T. Horimoto, K. Shinya, and Y. Kawaoka. 2006. Haemagglutinin

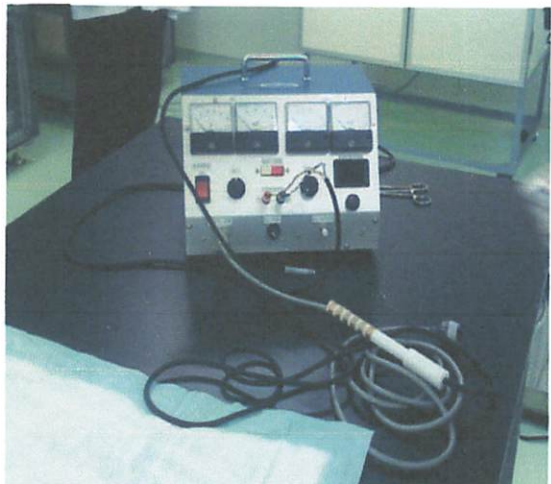
**Mutations Responsible for the Binding of H5N1 Influenza A Viruses to Human-type Receptors. *Nature*. 444 : 378-382**

**Yeager, C.P. 1996. Feeding ecology of the long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*) in Kalimantan Tengah, Indonesia. *Int J Primatol* 17(1): 51-62.**

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Foto penelitian**

a. *Macaca fascicularis* jantan



b. Elektroejakulator



c. Teknik pengambilan spermatozoa



d. Penampungan spermatozoa



e. Mikroskop binokuler



f. Mukosa mata



g. Infeksi hidung (Intranasal)



h. Infeksi trakea



i.

Keterangan gambar i :

- |                    |             |
|--------------------|-------------|
| 1. Tabung berskala | 5. Vaseline |
| 2. NaCl fisiologis | 6. Pipet    |
| 3. Gelas penutup   | 7. pH meter |
| 4. Gelas obyek     |             |

## **Lampiran 2. Tehnik Pengambilan Spermatozoa, Cara Perhitungan Volume Semen dan Cara Penentuan Konsistensi Semen**

### **1. Tehnik Pengambilan Spermatozoa**

Sebelum dilakukan pengambilan, terlebih dahulu *Macaca fascicularis* dianestesi menggunakan ketamin HCl dengan dosis 20-40 mg/kg BB, dan atropin sulfat 0,02-0,04 mg/kg BB. Selanjutnya dilakukan koleksi spermatozoa menggunakan elektroejakulator dengan cara memasukkan *probe* ke dalam anus *Macaca fascicularis*, kemudian diatur voltage awal yaitu 5 mA, kemudian dinaikkan perlahan menjadi voltage 10 mA, 15 mA sampai maksimal 25 mA hingga terjadi ejakulasi, lama rangsangan tiap voltage selama 10 detik. Interval waktu setiap perubahan voltage selama 5 detik. Saat akan terjadi ejakulasi, tabung penampung didekatkan pada alat kelamin jantan sehingga saat ejakulasi sperma bisa tertampung pada tabung.

### **2. Cara Perhitungan Volume Semen**

Volume semen dihitung dengan cara melihat pada skala tabung yang digunakan untuk menampung semen (Hardijanto dkk., 2007).

### **3. Cara Penentuan Konsistensi Semen**

Menentukan konsistensi semen dapat dilakukan dengan memiringkan tabung tempat menampung semen kemudian ditegakkan kembali, maka akan tampak cairan yang menempel pada dinding tabung. Semen yang kental atau pekat meninggalkan cairan pada dinding tabung sedangkan semen yang encer tidak meninggalkan cairan yang membekas pada dinding tabung (Hardijanto dkk., 2007).

### Lampiran 3. Cara Pengamatan Motilitas Massa Spermatozoa

Menurut Hardijanto dkk. (2008) cara untuk mengamati motilitas massa adalah dengan meneteskan satu tetes semen di atas gelas obyek kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X.

Penilaiannya sebagai berikut :

1. Sangat baik (+++) : merupakan gelombang kecil sampai besar yang tebal, jumlah banyak, dan bergerak cepat. Pada keadaan (+++) memberikan gambaran yang jelas bahwa semen tersebut mengandung spermatozoa hidup yang banyak dan aktif.
2. Baik (++) : merupakan gelombang yang tipis, jarang dan bergerak lambat. Semen tersebut menggambarkan kemungkinan persentase sel spermatozoa yang hidup tinggi, tetapi banyak diantaranya yang lemah atau mudah mati, dapat juga dikarenakan jumlah sel spermatozoa yang hidup sedikit.
3. Sedang (+) : Tidak terlihat gelombang, gerakan spermatozoa sendiri-sendiri yang berarti bahwa semen tersebut tidak banyak mengandung spermatozoa atau juga dapat mengandung cukup banyak spermatozoa tetapi sebagian besar banyak yang mati.
4. Buruk (0) atau N : Hanya sedikit atau tidak ada sama sekali gerakan individu.

#### **Lampiran 4. Cara Penghitungan Motilitas Individu Spermatozoa**

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan cara natif dengan meletakkan satu tetes semen yang diperoleh pada gelas obyek, tambahkan satu tetes larutan NaCl fisiologis campur sampai homogen, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas spermatozoa dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Penilaian dilakukan secara subyektif berdasarkan gerakan spermatozoa maju (gerak progresif) dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Perhitungan dilakukan dari lapangan pandang yang berbeda (Hardijanto dkk, 2008).

Menurut Direktorat Jenderal Peternakan (2000), penilaian kecepatan gerakan individu spermatozoa adalah sebagai berikut :

- Angka 0 : tidak ada spermatozoa yang bergerak atau sedikit
- Angka 1 : gerakan spermatozoa pelan
- Angka 2 : gerakan spermatozoa sedang
- Angka 3 : gerakan spermatozoa cepat
- Angka 4 : gerakan spermatozoa sangat cepat



## Lampiran 5. Cara Penghitungan Spermatozoa Hidup

Menurut Hardijanto dkk. (2007), spermatozoa yang mati permeabilitas selnya meningkat sehingga spermatozoa yang mati akan menyerap warna dari zat warna yang dipakai. Sedangkan sel spermatozoa yang hidup tetap berwarna jernih. Dalam penelitian ini menggunakan eosin negrosin sebagai zat pewarna.

Pemeriksaan spermatozoa hidup dengan membuat preparat ulas. 10  $\mu$ l suspensi semen ditetaskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian tetaskan zat warna eosin-negrosin dan dicampur dengan menggunakan gelas obyek lain. Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan cara bagian ujung gelas obyek lain ditempelkan pada ujung campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin, selanjutnya dipanaskan di atas api bunsen (proses tersebut harus selesai maksimal 15 detik) (Partodihardjo, 1992).

Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedang yang berwarna ungu atau merah keunguan adalah spermatozoa yang mati. Cara perhitungan persentase spermatozoa hidup adalah sebagai berikut : total hidup spermatozoa yang tampak pada lapangan pandang dibagi total keseluruhan spermatozoa pada lapangan pandang kemudian dikali 100%.

**Lampiran 6. Hasil Uji T Motilitas Spermatozoa****T-Test****Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	79,2500	8	3,88219	1,37256
	VAR00002	55,5000	8	5,68205	2,00891

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	8	,168	,690

**Paired Samples Test**

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	23,75000	6,31891	2,23407	18,46726	29,03274	10,631	7	,000

**Lampiran 7. Hasil Uji T Kecepatan Individu Spermatozoa****T-Test****Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	VAR00001	2,6250	8	,51755	,18298
	VAR00002	1,5000	8	,53452	,18898

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	VAR00001 & VAR00002	8	,258	,537

**Paired Samples Test**

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	VAR00001 - VAR00002	1,12500	,64087	,22658	,58922	1,66078	4,965	7	,002

**Lampiran 8. Hasil Uji T Spermatozoa Hidup****T-Test****Paired Samples Statistics**

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 VAR00001	88,7500	8	3,53553	1,25000
VAR00002	69,3750	8	6,41288	2,26729

**Paired Samples Correlations**

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 VAR00001 & VAR00002	8	,339	,412

**Paired Samples Test**

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 VAR00001 - VAR00002	19,37500	6,18610	2,18712	14,20329	24,54671	8,859	7	,000