SKRIPSI

PENGARUH JARAK PAPARAN SINAR ULTRA VIOLET (UV) TERHADAP MOTILITAS, ABNORMALITAS SPERMATOZOA SERTA GAMBARAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI PERAH

Oleh :

HARDANY PRIMARIZKY

SURABAYA – JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

PENGARUH JARAK PAPARAN SINAR ULTRA VIOLET (UV) TERHADAP MOTILITAS, ABNORMALITAS SPERMATOZOA SERTA GAMBARAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI PERAH

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

Oleh:
HARDANY PRIMARIZKY

NIM. 060112868

Menyetujui
Dosen Pembimbing,

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
(Sri Pantja Madyawati, M.Si.,drh)	**(Arimbi, M.Kes.,drh)**

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

Menyetujui

Komisi Penguji

Prof. Mas'ud Hariadi, M.Phill., Phd., Drh.

Ketua

Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh.

Sekretaris

Hermin Ratnani, M.Kes., Drh.

Anggota

Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh.

Anggota

Arimbi, M.Kes., Drh.

Anggota

Surabaya, 18 November 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,

Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh.

NIP. 130687297

PENGARUH JARAK PAPARAN SINAR ULTRA VIOLET (UV) TERHADAP MOTILITAS, ABNORMALITAS SPERMATOZOA SERTA GAMBARAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI PERAH

Hardany Primarizky

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa serta bagaimana gambaran dari membran spermatozoa sapi perah *Friesian Holstein* (FH) yang terpapar sinar Ultra Violet (UV) panjang gelombang 254 nm dilihat dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

Bahan utama penelitian ini berupa semen segar sapi perah jantan yang diperoleh dari Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Semen segar ditambah dengan media PBS Dulbeccos dengan perbandingan 1:1. Setelah itu dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol yang tanpa penyinaran UV (P_0), kelompok perlakuan I (P_1) dengan jarak penyinaran 15 cm, kelompok perlakuan II (P_2) dengan jarak penyinaran 20 cm, dan kelompok perlakuan III (P_3) dengan jarak penyinaran 25 cm. Penyinaran UV dilakukan selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pengamatan persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa. Gambaran membran spermatozoa dilihat dengan menggunakan SEM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase jumlah motilitas spermatozoa sapi perah yang telah terpapar radiasi sinar UV berturut – turut adalah kelompok P_0 sebesar 70,83±2,04, kelompok P_1 sebesar 40,00±7,07, kelompok P_2 sebesar 50,00±8,94, kelompok P_3 sebesar 61,67±5,16, dan hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Adapun data hasil persentase abnormalitas spermatozoa sapi perah berturut – turut adalah kelompok P_0 sebesar 2,00±0,63, kelompok P_1 sebesar 2,67±0,52, kelompok P_2 sebesar 2,50±0,55, kelompok P_3 sebesar 2,33±0,82, dan hasil penelitian di antara perlakuan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($P>0,05$). Spermatozoa sapi perah yang dipapar sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm yang dilihat dengan SEM memberikan gambaran lesi pada membran spermatozoa.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa paparan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm pada jarak penyinaran 15 cm dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa serta meruibah gambaran pada membran spermatozoa, tetapi radiasi sinar UV dengan jarak 15 cm, 20 cm, dan 25 cm tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa sapi perah FH.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas limpahan berkat, rahmat, hidayah, dan karunia – Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"PENGARUH JARAK PAPARAN SINAR ULTRA VIOLET (UV) TERHADAP MOTILITAS, ABNORMALITAS SPERMATOZOA SERTA GAMBARAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI PERAH."**

Serangkaian percobaan telah dilakukan dalam penelitian ini. Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati penulis menyampaikan terima kasih kepada:

- Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Ibu Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh. selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Arimbi, M.Kes., Drh. selaku dosen pembimbing kedua, yang selalu memberikan bimbingan, saran, petunjuk, nasehat, dan pengetahuan dalam penyusunan skripsi ini.
- Bapak Abdul Samik, M.Si., Drh. selaku dosen wali, Bapak Trilas Sardjito, M.Si., Drh. dan Bapak Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh. selaku penanggung jawab Taman Ternak Pendidikan, dan juga Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh. yang telah banyak sekali membantu dan selalu sabar membimbing serta memberikan saran – saran yang sangat berguna kepada penulis selama penelitian berlangsung.

- Ayahanda dr. H. Hari Sugeng Subagio, MM. dan ibunda Herny Ismawati yang tercinta serta adik satu – satunya Dwi Nastiti Permanasari yang tersayang atas dukungan, semangat , motivasi, dan doa yang terus diberikan kepada penulis.
- Seluruh rekan – rekan mahasiswa FKH angkatan 2001,teman – teman kelompok penelitian di Taman Ternak Pendidikan FKH, serta yang sangat spesial para sahabat Aam, Andi, Cici, Dion, Dita, Farah, Iin, Mulia, Nike, Rizky, dan Tito atas bantuan, dukungan dan dorongan moril yang kalian berikan selama ini.

Insya Allah, semoga Allah SWT membalas kebaikan bapak, ibu, teman – teman dan seluruh pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini, namun tidak sempat penulis sebutkan satu – persatu.

Penulis menyadari bahwa apa yang ada di dalam skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, dengan segenap kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang sangat berguna bagi kelanjutan penelitian di masa yang akan datang, khususnya di dunia peternakan. Semoga Allah SWT akan selalu memberikan petunjuk dan perlindungan kepada kita semua.

Surabaya, November 2005

Penulis

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

Halaman

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

DAFTAR SINGKATAN

ATP : Adenosin Trifosfat

BNT : Beda Nyata Terkecil

CPD : Critical Point Drying

DEG : Domba Ekor Gemuk

DHA : Decoxahexanoid Acid

DNA : Deoxyribonucleic Acid

FH : Friesian Holstein

HOS : Hypo Osmotic Swelling

IB : Inseminasi Buatan

PBS : Phosphat Buffer Saline

PUFA : Poly Unsaturated Fatty Acid

RAD : Radiation Absorption Dose

ROS : Reactive Oxygen Species

SEM : Scanning Electron Microscopy

SPSS : Statistic Program for Social Science

TCD : Tissue Culture Dish

TEM : Transmission Electron Microscopy

TTP : Taman Ternak Pendidikan

UV : Ultra Violet

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini, teknologi di bidang kedokteran hewan telah berkembang dengan sangat pesat . Seperti halnya bioteknologi di bidang peternakan yang telah terpecah menjadi beberapa bidang ilmu yang spesifik, diantaranya adalah bioteknologi reproduksi. Bioteknologi reproduksi ternak pertama kali yang diterima dan dilaksanakan adalah inseminasi buatan (IB). Program ini telah terbukti manfaatnya untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak, khususnya ternak lokal agar keturunannya menjadi lebih unggul karena adanya persilangan dengan bibit unggul luar negeri. Akan tetapi program inseminasi buatan ini belum mampu memenuhi keinginan peternak yang menginginkan jenis kelamin tertentu untuk ternaknya. Begitu pula dalam pelaksanaan program transfer embrio masih didapatkan banyak kendala, serta tingkat keberhasilannya masih rendah.

Bioteknologi reproduksi telah berhasil memenuhi keinginan dari peternak, yakni telah ditemukannya beberapa cara pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y, antara lain dengan teknik elektroforesis, sedimentasi, filtrasi menggunakan Sephadex maupun dengan kolom Percoll (Mahaputra dkk.,1989). Alternatif lain adalah dengan melalui pemaparan radiasi sinar ultra violet (UV). Hal ini telah dilakukan Ismudiono dkk.(2001) yang memapar semen beku sapi perah dengan menggunakan radiasi sinar UV dalam waktu yang berbeda yang

hasilnya menyatakan bahwa telah terjadi pergeseran rasio kromosom seks X dan Y, dimana rasio kromosom seks X lebih besar dibandingkan kromosom seks Y berdasarkan diameter ukuran kepala spermatozoa sapi perah. Diantara beberapa cara pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y di atas yang perlu diperhatikan adalah kualitas dari spermatozoa seperti motilitasnya harus tetap terjaga, sehingga bisa tetap membuahi sel telur.

Sinar ultra violet (UV) sebagai salah satu jenis dari sinar matahari yang tidak nampak oleh mata manusia memiliki daya tembus yang sangat tinggi dan mudah diserap oleh beberapa bahan seluler dari sel – sel sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada materi genetik sel tersebut (Ackerman,1988). Oleh karena itu, penyinaran dengan sinar UV dapat menyebabkan terjadinya suatu mutasi genetik (Crowder, 1988). Penyinaran dengan sinar UV ini juga berdampak pada rasio kromosom seks dari individu yang terkena radiasi. Kromosom seks X dan Y akan mengalami mutasi lethal sehingga diharapkan rasio seks keturunan jantan dan betina akan berubah (Pai,1985).

Sinar UV-C panjang gelombang 254 nm mempunyai kemampuan merubah struktur sel organ, tetapi tidak merusak rantai DNA dari sel organ yang dipapar (El-Saifi and El-Khayat, 1996). Lama waktu pemaparan sinar UV selama 5 menit merupakan waktu optimal berdasarkan penelitian Ismudiono dkk. (2001). Jarak paparan 15 cm dan 20 cm dari sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dapat mempengaruhi gambaran dan menurunkan integritas membran plasma spermatozoa sapi perah FH (Prajawati, 2005). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dipakai untuk memproduksi semen beku yang mengandung spermatozoa

berkromosom seks X dan Y untuk mendukung program perbaikan mutu genetik serta peningkatan produktifitas ternak melalui teknologi IB, sehingga peternak sapi perah dapat memiliki pedet dengan jenis kelamin sesuai yang diinginkan.

Keutuhan membran spermatozoa serta kecilnya persentase abnormalitas spermatozoa sangat menentukan motilitas dan kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur. Untuk pemeriksaan jumlah persentase motilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi perah FH menggunakan mikroskop cahaya. Sedangkan untuk melihat gambaran membran spermatozoa sapi perah FH menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dari latar belakang yang dipaparkan di atas dapat dirumuskan suatu masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat penurunan persentase motilitas spermatozoa sapi perah FH setelah dipapar dengan sinar UV pada jarak tertentu ?
2. Apakah terdapat peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa sapi perah FH setelah dipapar dengan sinar UV pada jarak tertentu ?
3. Apakah paparan sinar UV pada jarak tertentu dapat mempengaruhi struktur membran spermatozoa sapi perah FH dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) ?

1.3 Landasan Teori

Sinar UV dapat diserap oleh sel – tubuh dan kelamin dengan sangat mudah dan menimbulkan efek teratogen (Diffey, 1991). Kepekaan sel – sel tubuh terhadap radiasi berbeda – beda. Jaringan yang tersusun oleh sel – sel yang aktif membelah relatif lebih peka dibandingkan dengan jaringan yang sel – selnya tidak aktif membelah (Sassung dkk., 1996).

Sinar UV yang diberikan ke sel kuman dengan dosis radiasi di bawah dosis lethal, dimana dosis lethal radiasi sebesar 10 MRAD (*Mega Radiation Absorption Dose*), dapat menyebabkan perubahan pesan yang dibawa DNA, diantaranya mengubah kepekaan kuman terhadap antibiotika tertentu (Volk & Wheeler, 1988).

Radiasi sinar UV-C mampu merusak membran spermatozoa sehingga sel spermatozoa yang terpapar akan mati. Pemaparan dengan sinar UV-C pada spermatozoa mampu mengganggu keseimbangan protein dan fosfolipid, baik yang ada di dalam membran spermatozoa maupun yang ada di dalam sel spermatozoa (Zenevald, 1985).

Tingkat kerusakan sel dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : jenis sumber radiasi, lama penyinaran, jarak sumber radiasi terhadap sasaran, serta ada tidaknya penghalang antara sumber radiasi dengan sasaran. Semakin dekat jarak radiasi dengan sel sasaran akan semakin parah kerusakan yang ditimbulkan (Sassung dkk., 1996).

Scanning Electron Microscopy (SEM) adalah alat yang mencakup pengetahuan tentang hal – hal yang berhubungan dengan penggunaan mikroskop

elektron dengan metode ulas (*scanned*), yaitu mulai diperolehnya bahan yang akan diteliti, sampai siap untuk diperiksa di bawah mikroskop elektron. Pengetahuan tentang *Electron Microscopy* sangat penting untuk diketahui oleh para peneliti di beberapa bidang yang berkaitan dengan ultrastruktur bahan yang akan diperiksa. Pada dasarnya, pemeriksaan terhadap bahan biologis adalah memeriksa struktur subseluler atau ultrastruktur dari suatu sel (Hoediasmoro, 1985).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan tujuan sebagai berikut :

- Untuk mengetahui apakah paparan sinar UV dengan jarak tertentu dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa sapi perah FH.
- Untuk mengetahui apakah paparan sinar UV dengan jarak tertentu dapat meningkatkan persentase abnormalitas spermatozoa sapi perah FH.
- Untuk mengetahui gambaran membran spermatozoa sapi perah FH setelah dipapar sinar UV dengan jarak tertentu menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi peneliti sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengetahui bagaimana gambaran struktur

dari membran spermatozoa sapi perah FH setelah mendapat paparan sinar UV dilihat dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), serta mengetahui penurunan kualitas spermatozoa sapi perah FH, dengan adanya penurunan persentase motilitas spermatozoa dan adanya peningkatan abnormalitas spermatozoa sapi perah FH.

1.6 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat penurunan persentase motilitas spermatozoa sapi perah FH setelah dipapar dengan sinar UV pada jarak tertentu.
2. Terdapat peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa sapi perah FH setelah dipapar dengan sinar UV pada jarak tertentu.
3. Paparan sinar UV pada jarak tertentu dapat mempengaruhi gambaran struktur membran spermatozoa sapi perah FH yang dapat dilihat dengan *Scanning Electron Mocroscopy* (SEM).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

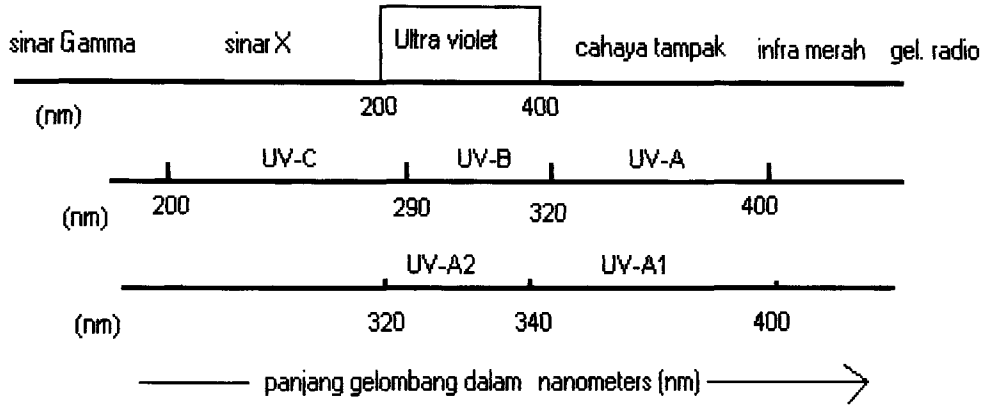
2.1 Sinar Ultra Violet

Salah satu jenis sinar yang dipancarkan oleh sinar matahari yang mempunyai panjang gelombang antara 100 nm sampai dengan 380 nm dengan frekuensi 8 x 10^{14} – 3,4 x 10^{16} Hz adalah sinar ultra violet (UV). Kekuatan radiasi sinar UV ditentukan oleh panjang gelombang dan frekuensi yang dimiliki. Letak sinar ini di bawah cahaya tampak dan meluas sampai perbatasan dengan sinar X. Sinar UV yang berasal dari matahari dapat ditahan oleh atmosfer bumi pada lapisan stratosfer dan trofosfer. Kedua lapisan atmosfer tersebut mengandung ozon (O_3) yang berguna menahan radiasi sinar UV secara langsung (Hecht, 1995).

Radiasi sinar ultra violet merupakan gelombang radiasi elektromagnetis dengan panjang gelombang besar (> 100 A^o) non ionisasi (Santoso dkk.,2001). Selanjutnya menurut Beehler *et al.*,(1992) sinar UV dengan spektrum panjang gelombang antara 320 – 380 nm dengan puncak 365 nm disebut sebagai sinar UV *long wave.* Daerah ini disebut Sinar UV 365 nm atau UV-A. Daerah spektrum A ini termasuk sebagian besar dari radiasi UV. Sinar UV *long wave* ini mempunyai resiko lebih kecil dibandingkan dengan sinar UV *short wave* dan sinar UV *medium wave*. Sinar UV dengan dengan spektrum panjang gelombang 280 – 320 nm dan puncak 312 nm disebut sebagai sinar UV *medium wave*. Daerah spektrum

ini disebut sinar UV 312 nm atau UV-B, karakeristiknya adalah mempunyai efek erythema atau pelepuhan. Sedangkan sinar UV yang mempunyai spektrum panjang gelombang antara 180 – 280 nm dengan puncak 254 nm disebut sebagai sinar UV *short wave*. Daerah spektrum ini disebut sebagai sinar UV 254 nm atau UV-C yang mempunyai efek bakterisidal sangat tinggi dan berbahaya bagi mata dan kulit.

Penembusan cahaya ultra violet dalam atmosfer awal disebabkan oleh adanya ozon. Protein dan asam – asam nukleat merupakan penyerap cahaya ultra violet yang kuat, penyerapan ini sangat karakteristik sehingga dapat digunakan untuk menentukan dengan cermat adanya berbagai makromolekul spesifik (Ackerman *et al.*,1988). Adanya radiasi sinar ultra violet pada spermatozoa akan mampu merusak gen – gen yang melengkapi spermatozoa dan dikatakan pula bahwa spermatozoa yang terkena radiasi sinar ultra violet masih mampu mengaktifkan dan membentuk pronuklei jantan serta mensintesis DNA, akan tetapi tidak dapat mendukung pembelahan dan perkembangan embrio secara *in vitro* (Hughes *et al.*,1998). Radiasi akan menembus bagian tertentu dari gen sehingga menyebabkan perubahan bahan DNA dan akibat radiasi ini menimbulkan perubahan secara tidak langsung pada susunan nukleotida (Crowder,1990).



Gambar 1. Letak Sinar Ultra Violet dalam Spektrum Panjang Gelombang Elektromagnet (Sumber : Diffey, 1991).

Pada setiap tahapan perkembangan suatu organisme dalam sel – sel jaringan somatis atau germinal dapat pula terjadi mutasi gen. Mutasi yang terjadi pada awal gametogenesis yakni pada spermatogenesis pada yang jantan atau oogenesis pada betina akan mempengaruhi beberapa individu. Apabila terjadi mutasi pada gen dominan akan menyebabkan perubahan pada individu dan keturunannya. Sedang bila mutasi terjadi pada gen resesif, gen mutan pada generasi berikutnya tersembunyi (Pai,1985).

2.1.1 Sinar Ultra Violet Sebagai Gelombang Elektromagnetik

Sinar UV merupakan gelombang elektromagnetik dengan cepat rambat sama dengan cepat rambat cahaya tampak, yaitu $3x10^8$ m/detik. Menurut Alonso (1982), panjang gelombang sinar UV berbanding terbalik dengan frekuensinya dan dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

c = cepat rambat gelombang elektromagnetik (m/detik)

λ = panjang gelombang (meter)

f = frekuensi (Hertz)

Teori kuantum cahaya menyatakan bahwa hubungan antara energi foton (E) dengan panjang gelombang (λ) dari sumber radiasi gelombang elektromagnetik, dinyatakan dengan rumus :

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

E = energi foton (eV)

h = tetapan Planck (6,63 X 10^{-34} Js atau 4,14 X 10^{-15} eV.sec)

c = kecepatan cahaya (3 X 10^{8} m/s)

λ = panjang gelombang (meter)

Panjang gelombang berbanding terbalik dengan energi foton(E). Semakin pendek panjang gelombang (λ) sumber radiasi maka semakin besar energi foton (E) yang dimiliki oleh sumber sinar, sedangkan besar (h) dan (c) adalah konstan (Ryer, 1997).

Sutrisno (1989) mengutip kesimpulan dari Max Karl Ernet Ludwig Planck bahwa energi cahaya yang terkumpul dalam partikel – partikel kecil disebut kwanta, dan kwantum energi cahaya disebut foton. Intensitas gelombang elektromagnetik sebanding dengan jumlah foton per detik yang melalui suatu satuan luas penampang, yang dapat dirumuskan sebagai :

$$I = \frac{P}{A}$$

I = intensitas gelombang elektromagnetik (mikrowattdetik/cm^2)

P = daya foton yang dipancarkan per detik (mikrowatt)

A = luas permukaan bahan yang menerima pancaran gelombang (cm^2) (Halliday & Resnick, 1996).

Perhitungan dosis radiasi, adalah intensitas gelombang elektromagnetik dikalikan dengan lama penyinaran dalam detik. Satuan radiasi yang diserap bahan adalah *Radiation Absorption Dose* (RAD), dengan ketentuan satu RAD = 10^2 erg, dan satu mikrowattdetik/cm^2 sama dengan 10 erg (Maat, 1981).

2.1.2 Mekanisme Kerja Radiasi Sinar Ultra Violet

Pengaruh radiasi menyebabkan terjadinya sistem abnormal dari DNA , akibatnya terjadi mutasi. Terjadinya perubahan – perubahan sintesis kemungkinan disebabkan karena perubahan aktifitas ensim – ensim yang bekerja dalam proses sintesis tersebut disamping juga disebabkan oleh perubahan karena disorganisasi dan reorganisasi (Anonimus, 1997). Daya bunuh mikroorganisme paling efektif adalah pada panjang gelombang 260 – 270 nm (lampu UV), karena mempunyai daya absorpsi maksimal terhadap DNA sel (Freeman, 1985).

Asam amino dari protein, basa purin dan basa pirimidin dari asam nukleat sel dapat menyerap radiasi UV. Basa pirimidin terutama timin dari DNA merupakan senyawa utama yang berperan sebagai aksi bakterisidal radiasi UV. Energi foton UV yang terserap timin menyebabkan terjadi reaksi fotokimia. Replikasi DNA dihalangi atau terganggu, karena pembentukan dimer timin hasil reaksi fotokimia. Sel bakteri yang terkena sinar UV dapat mati atau terbentuk

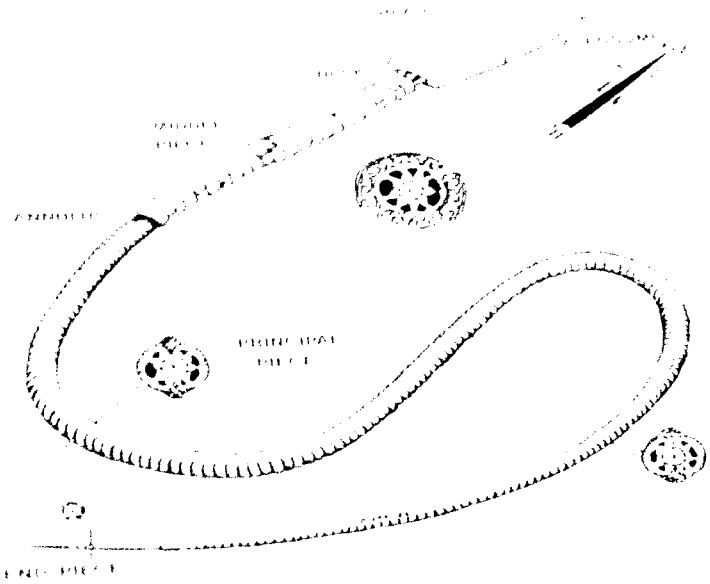
mutan baru, tergantung pada keseimbangan antara efisiensi mekanisme perbaikan selnya (Pelczar, 1988).

Radiasi sinar UV dapat menghambat terjadinya pergeseran rasio kolesterol dengan fosfolipid sehingga terjadi destabilisasi membran plasma spermatozoa dari reaksi akrosom dan mengakibatkan tidak terjadinya perubahan fusi pada reaksi akrosom (Liu and Backer, 1992). Radiasi yang dipancarkan oleh sinar UV-C yang mempunyai panjang gelombang pendek dan didukung adanya energi foton yang besar dapat menyebabkan meningkatnya panas (*heat*) dari radiasi tersebut, sehingga menimbulkan efek *heat shock* (Ryer, 1997).

2.2 Sel Spermatozoa

Kualitas spermatozoa dan sel telur merupakan hal yang sangat penting dalam proses produksi embrio, sedangkan kualitas seks sangat ditentukan oleh spermatozoa (Srianto, 2004).

Spermatozoa merupakan suatu sel kecil, kompak dan sangat khas. Terdiri dari kepala yang membawa materi genetik dan ekor sebagai sarana penggerak. Walaupun ukuran dan bentuknya berbeda – beda pada berbagai spesies namun struktur morfologinya sama. Panjang dan lebar kepala berkisar 8 – 10 mikron dan 4 – 4,5 mikron pada sapi, domba, dan babi. Tebalnya berkisar 0,5 – 1,5 mikron atau kurang pada semua spesies. Badan spermatozoa mempunyai panjang 1,5 – 2 kali panjang kepala, yaitu 10 – 15 mikron dan diameter 1 mikron pada semua spesies. Ekor spermatozoa panjangnya 35 – 70 mikron (Toelihere, 1981).



Gambar 2. Gambaran Morfologi Sel Spermatozoa (Sumber : Hafez, 2000).

Bagian kepala mengandung nukleus dan akrosom, sedangkan bagian ekor terdapat 4 bagian, yaitu leher, *middle piece*, *principle piece* dan *end piece*. Bagian kepala spermatozoa berbentuk oval memanjang dengan inti yang tersusun rapat oleh kromatin. Jumlah kromosom dan DNA yang terkandung dalam inti sel adalah haploid atau setengah dari jumlah sel somatik. Sel spermatozoa yang haploid merupakan hasil pembelahan meiosis selama spermatogenesis (Hafez,2000).

Setengah bagian anterior kepala spermatozoa terbungkus oleh akrosom yang memiliki struktur seperti kantong berdinding rangkap yang mengandung bahan – bahan seperti ensim akrosin, hyaluronidase, esterase dan asam hidrolase yang berperanan menembus dinding sel telur dalam fertilisasi (Hafez, 2000). Di dalam proses fertilisasi tersebut terjadi reaksi akrosom yang merupakan suatu fenomena yang sangat penting, karena terjadi berbagai proses rumit sebelum

spermatozoa mengalami reaksi akrosom. Tudung akrosom adalah faktor penting dalam fusi membran pada reaksi akrosom (Olson *et al.*, 1985).

Akrosom merupakan struktur seperti tudung yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala spermatozoa yang berperan penting pada saat fertilisasi. *Middle piece* terletak antara leher dan anulus. Pada bagian ini terdapat selaput mitokondria. *Principle piece* merupakan lanjutan dari annulus sampai dekat dengan *end piece*. *Principal piece* terdapat selaput pelindung, sedangkan *end piece* tidak terdapat selaput pelindung (Hafez,2000 ; Rimayanti, 1998). Bagian tengah sel spermatozoa merupakan pusat tenaga karena adanya mitokondria di daerah ini. Mitokondria tersebut berderet – deret dari ujung ke ujung dalam untaian spiral membentuk putaran helikal. Mitokondria mengandung sistem yang menggerakkan siklus asam trikarboksilat (siklus Kreb), transpor elektron serta fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP untuk pergerakan spermatozoa. Di bagian ini juga tersusun fibril filamen ekor yang terbungkus oleh selaput halus yang banyak mengandung bahan lipoid (Salisbury dan VanDemark,1985).

Bagian ekor mempunyai flagelum, yang di dalamnya terdapat dua fibril sentral yang dikelilingi fibril perifer. Fibril – fibril ini bersifat kontraktil dan menimbulkan gerakan ekor sel spermatozoa (Hafez,2000).

2.3 Spermatogenesis

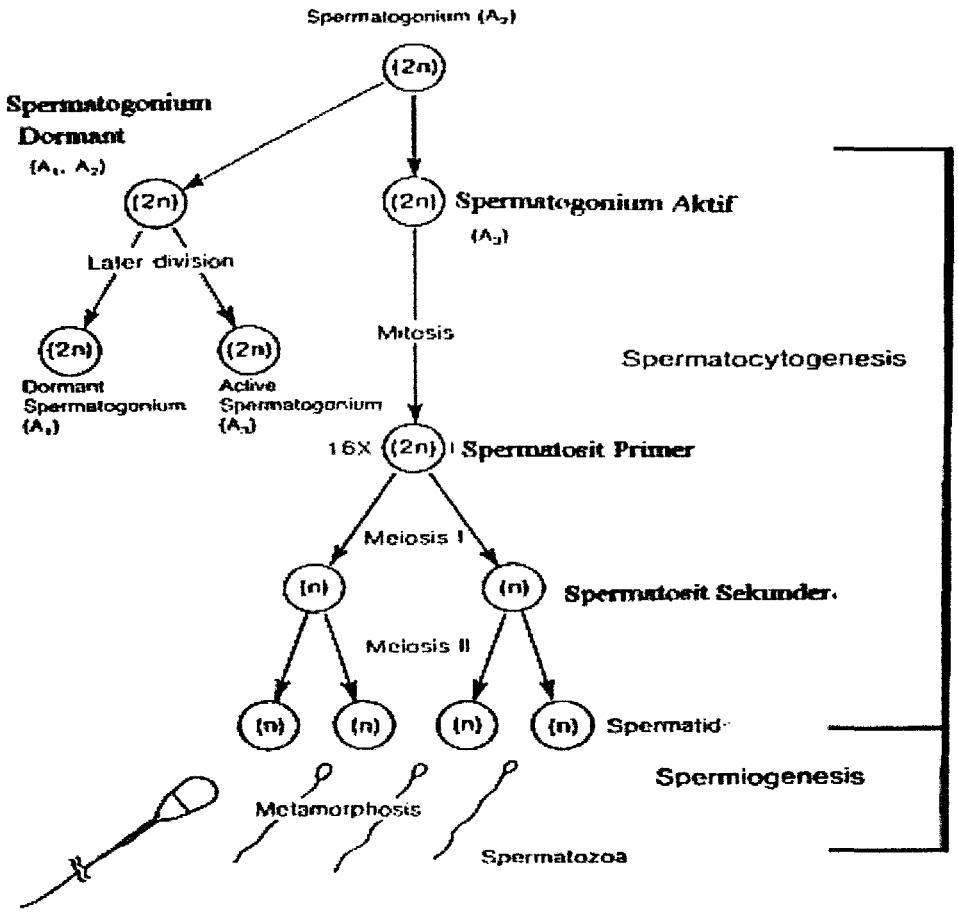
Spermatozoa berasal dari spermatogonia yang terdapat di lapisan dasar tubulus seminiferus. Spermatogonia akan melepaskan diri dari sel sekitarnya dan

setelah dewasa akan berubah bentuk dan ciri – cirinya. Setelah dewasa akan berada dalam saluran tubuli menuju ke epididimis. Keseluruhan proses pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis. Spermatogenesis merupakan proses pembentukan spermatid dari sel spermatogonia dengan cara pembelahan mitosis dan meiosis. Sedang spermiogenesis merupakan proses metamorfosa yang terjadi selama perubahan sel spermatid menjadi bentuk sel spermatozoa normal. Perubahan pada proses metamorfosa ini meliputi pembentukan akrosom, kepala, leher, dan ekor sel spermatozoa. Inti sel akan terlokalisir di bagian anterior kepala, badan golgi terdapat di bagian depan inti. Terbentuk pula vakuola yang berisi butiran akrosom (Hardjopranjoto,1995).

Spermatozoa yang merupakan hasil dari spermatogenesis ini bersifat kompleks dan ada di dalam tubulus seminiferus, karena harus melalui tahapan pembelahan dan deferensiasi sel. Selama proses tersebut, jumlah kromosom direduksi dari diploid menjadi haploid pada setiap sel, demikian juga terjadi reorganisasi beberapa komponen inti sel dan sitoplasma secara meluas. Spermatogenesis terbagi menjadi dua tahapan yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis (Ismudiono,1999).

Tahapan pertama adalah spermatositogenesis yaitu meliputi perkembangan awal spermatogonia dengan pembelahan secara mitosis yang jumlah kromosomnya masih bersifat diploid. Pembelahan mitosis dari jumlah sel semula akan berjumlah menjadi dua kali lipatnya. Disusul pembelahan secara meiosis yang jumlah kromosomnya telah berubah menjadi haploid. Akhir dari tahapan ini adalah terbentuknya spermatid. Tahapan kedua adalah spermiogenesis.

Spermatid akan mengalami metamorfosis dan berubah bentuk secara sempurna menjadi spermatozoa sempurna.



Gambar 3. Skema Spermatogenesis (Sumber : Ismudiono, 1999).

Dalam tubuli seminiferi, spermatozoa berpindah ke rete testis dan duktus deferens karena adanya pembentukan sperma yang baru. Di dalam epididimis, spermatozoa akan mengalami pendewasaan proses, kemudian menuju ke bagian ekor epididimis. Spermatozoa diejakulasikan karena kontraksi urat daging dinding saluran alat kelamin jantan, diawali dari duktus deferens yang diikuti oleh saluran – saluran yang menuju keluar dari kelenjar – kelenjar pelengkap (Ismudiono, 1999).

Beberapa bahan kimia yang menyusun sel spermatozoa antara lain adalah: Deoksiribonukleoprotein yang terdapat di dalam inti di bagian kepala spermatozoa. Mucopolisakarida, bagian pembungkus kepala yang mengandung fruktosa, galaktosa, manosa, dan hexoamine. Letaknya di bagian akrosom. Plasmalogen atau lemak aldehidrogen yang terdapat di bagian leher, badan, dan ekor dari sel spermatozoa digunakan untuk respirasi endogen. Protein yang menyerupai kreatin yang menyelubungi seluruh badan, kepala dan ekor sel spermatozoa. Protein ini mempunyai ikatan dengan unsur sulfur dan banyak terdapat pada membran sel dan fibril. Ensim dan ko-ensim digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi (Partodihardjo,1992).

Pembelahan meiosis selama proses spermatogenesis akan menghasilkan sel spermatozoa haploid artinya mengandung setengah jumlah DNA pada sel – sel somatik. Sel spermatozoa yang terbentuk terbagi menjadi dua macam kromosom seks yaitu spermatozoa dengan kromosom seks X dan kromosom seks Y. Spermatozoa pembawa kromosom seks X akan menghasilkan individu betina sedang pembawa kromosom seks Y akan menghasilkan individu jantan (Noor,2000 ; Toha,2001).

Spermatozoa pembawa kromosom seks Y secara morfologis bentuknya lebih kecil di bagian kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek serta mampu bergerak lebih cepat dibandingkan dengan spermatozoa pembawa kromosom seks X. Ukuran spermatozoa pembawa kromosom seks X 2,8 – 7 % lebih besar dibandingkan spermatozoa pembawa kromosom seks Y karena struktur kromatin

yang memadat penyusun bagian kepalanya merupakan bahan dasar pembentukan DNA (Johnson,1995).

2.4 Sapi Friesian Holstein (FH)

Sapi Friesian Holstein (FH) merupakan bangsa sapi perah yang paling banyak dipakai dalam industri sapi perah. Sapi ini berasal dari propinsi North Holand dan West Friesland di negara Belanda yang dikenal sebagai daerah yang mempunyai padang rumput sangat bagus. Ciri fisik yang menonjol adalah warna bulu hitam dan putih yang dominan dan sedikit yang berbulu merah dan putih. Produksi susunya sangat tinggi dan banyak dipakai dalam industri pengolahan susu. Bahkan dengan ukuran badan dan kecepatan pertumbuhan serta karkasnya yang bagus, sapi ini dapat berfungsi ganda (dwiguna) selain sebagai penghasil susu dapat juga sebagai ternak produksi daging untuk dipotong (Blakely & Bade, 1998).

2.5 *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Mikroskop elektron terdiri dari dua jenis yaitu *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Kedua jenis mikroskop elektron ini mempunyai kelebihan dan kekurangan masing – masing tergantung dari jenis pemeriksaannya. SEM memberikan informasi dengan cepat terhadap seluruh permukaan bahan yang diamati dan gambar yang dihasilkan dalam bentuk tiga dimensi. Sehingga SEM sering digunakan untuk pemeriksaan organ yang berukuran cukup besar. Sebaliknya pada mikroskop elektron jenis

TEM memberikan informasi tentang beberapa bagian permukaan bahan yang diamati dalam bentuk dua dimensi. Sehingga gambar yang dihasilkan terdiri dari potongan – potongan bagian permukaan yang diamati. Oleh karena itu TEM biasanya digunakan untuk memeriksa beberapa bagian tertentu dari organ yang diamati (Albert *et al.*, 2002).

Scanning Electron Microscopy (SEM) atau disebut juga mikroskop elektron pengulasan adalah sebuah alat yang menggunakan cahaya yang berasal dari elektron dengan energi yang tinggi. SEM menggunakan elektron – elektron yang dihamburkan atau dipancarkan oleh permukaan spesimen untuk dapat menampilkan sebuah gambar. Spesimen diamati sesudah difiksasi, dikeringkan dan dibungkus dengan selapis tipis logam berat atau emas. Setelah itu spesimen diulas (*scanned*) dengan seberkas elektron yang dihamburkan atau dipancarkan dan berkas utamanya akan mengenai setiap titik berurutan pada permukaan yang berlapis logam, kemudian diukur dan digunakan untuk mengendalikan intensitas dari berkas kedua, yang bergerak selaras dengan berkas utama dan membentuk sebuah gambar pada layar televisi. Dengan adanya metode inilah kita dapat memperoleh sebuah gambar permukaan secara menyeluruh yang diperbesar (Albert *et al.*, 2002).

Pemeriksaan dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dimaksudkan untuk melihat permukaan luar dari suatu benda dalam ruangan hampa udara. Mikroskop ini pada dasarnya mampu memeriksa sediaan dengan ukuran yang besar. Bahan yang akan diperiksa harus dibedakan apakah bahan biologik atau bukan. Benda mati berupa batu – batuan atau kristal untuk memeriksanya hanya

perlu dibersihkan. Sedangkan beberapa benda non konduktif seperti plastik dan kayu, perlu diberi pelapis bahan konduktif, misalnya karbon, emas, atau bahan yang lain yang dapat menghantarkan listrik. Untuk benda mati berupa bahan biologik, pemeriksaan lebih sulit, karena beberapa benda ini menyusut di dalam ruangan hampa udara dan menyebabkan bentuk anatominya berubah (Hoediasmoro, 1985).

Prinsip kerja *Scanning Electron Microscopy* (SEM) adalah menggunakan suatu sinar elektron yang halus dan terfokus untuk mengulas (*scanning*) permukaan sediaan atau sampel. Akibat dari jatuhnya sinar elektron ini pada sediaan akan terjadi elektron – elektron sekunder dan elektron – elektron yang dipantulkan kembali. Elektron – elektron sekunder adalah elektron dengan energi rendah yang dipancarkan dari daerah permukaan sediaan dimana sinar elektron jatuh. Elektron – elektron yang dipantulkan oleh sediaan, energinya hampir sama dengan elektron yang ditembakkan pada sediaan. Dibanding dengan elektron – elektron sekunder, elektron – elektron yang dipantulkan ini memberikan data dari permukaan yang lebih dalam dari sediaan. Kedua macam sinar elektron ini sebagai suatu isyarat ditangkap oleh detektor dan disinkronisasikan, kemudian dihubungkan dengan tabung sinar katoda. Dengan demikian pada tabung sinar katoda akan terlihat permukaan sediaan. Dengan mempertinggi pembesaran, akan terlihat juga gambaran permukaan yang semakin besar, walaupun daerah pengamatan menjadi semakin sempit (Hoediasmoro, 1985).

BAB III

METODE PENELITIAN

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini berlangsung mulai bulan Desember 2004 sampai Mei 2005 yang dilaksanakan di Taman Ternak Pendidikan (TTP) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan UPT Mikroskop Elektron Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Semen segar sapi perah yang diperoleh dari Taman Ternak Pendidikan (TTP) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) Dulbeccos (Cat. No. 21600 – 00, GIBCoBRL, Life Technology) sebagai media pengencer.
- Zat warna eosin – negrosin yang digunakan sebagai zat untuk pewarnaan spermatozoa.
- Bahan – bahan yang digunakan dalam proses penggunaan alat *Scanning Electron Microscopy* (SEM), yaitu *glutaraldehide* 2%,

larutan *buffer phosphat* pH 7,4 dan *osmic acid* 1%, larutan alkohol dengan konsentrasi yang bertingkat, larutan amyl asetat pekat, serta emas 24 karat atau karbon.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lampu UV sebesar 15 watt dengan panjang gelombang 254 nm yang diletakkan dalam kotak tertutup, *timer*, inkubator, *counter*, *mini tube*, penggaris, *Tissue Culture Dish* (TCD), gelas obyek dan *cover glass*, pipet eritrosit dan aspiratornya, mikroskop cahaya, tabung reaksi dan raknya, *water bath*, pembakar Bunsen, gelas ukur, gelas beker, serta kamera.

3.3 Metode Penelitian

Untuk mencapai sasaran yang diinginkan pada penelitian ini maka dilakukan beberapa langkah penelitian. Yang pertama adalah menyiapkan semen segar yang berasal dari sapi perah FH dewasa berumur $\pm$ 3 tahun dengan berat badan sekitar 800 – 900 kg yang mempunyai kualitas dan kuantitas sel spermatozoa yang baik, serta menyiapkan lampu UV panjang gelombang pendek (254 nm) dan kotak UVnya dengan dosis radiasi $6x10^4$ RAD.

Semen segar sapi perah sebelum dipapar sinar UV terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis dilakukan dengan memeriksa volume, pH dan bau semen serta melihat warna, konsistensinya. Sedangkan pemeriksaan secara makroskopis

dilakukan dengan menentukan konsentrasi semen serta menentukan gerakan massa dan gerakan individunya.

Penentuan konsentrasi semen dilakukan menggunakan cara Rusia dengan kriteria – kriteria yang membedakan konsentrasi sel spermatozoa yaitu seperti Densum (D), Semi Densum (SD), Rarum (R), dan Azoospermia (A). Cara memeriksanya adalah meletakkan satu tetes semen di atas gelas obyek lalu ditutup dengan *cover glass* dan kemudian dilihat di bawah mikroskop cahaya. Dalam hal ini diperhatikan jarak antara kepala sel spermatozoa yang satu dengan yang lain.

Gerakan massa adalah gerakan dari sel – sel spermatozoa yang secara bersama – sama membentuk gelombang. Gerakan massa mencerminkan daya gerak dan konsentrasi sel spermatozoa. Pemeriksaan gerakan massa dilakukan pada suhu 37^0C agar diperoleh gerakan sel spermatozoa yang optimal. Cara pemeriksaannya adalah dengan meletakkan satu tetes semen di atas gelas obyek dan mengamati gerakan massa di mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Kriteria – kriteria penilaiannya yaitu sangat baik (+++), baik (++), sedang (+), atau buruk (O/N). Gerakan massa yang memenuhi syarat untuk pelaksanaan IB dan diawetkan adalah yang bernilai (+++) dan (++).

Pemeriksaan gerakan individu dilakukan di dalam suhu kamar agar sel spermatozoa mempunyai pergerakan yang optimal. Pergerakan yang baik memungkinkan sel spermatozoa dapat mencapai sel telur di dalam saluran oviduct dalam waktu yang relatif singkat, sehingga memungkinkan terjadinya pembuahan yang sempurna. Cara pemeriksaannya adalah dengan meletakkan satu tetes larutan NaCl fisiologis di atas gelas obyek dan dicampur dengan satu tetes kecil semen

hingga homogen. Kemudian ditutup *cover glass* dan dilakukan pemeriksaan memakai mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Kriteria – kriteria penilaiannya yaitu seperti progresif (P), oscillatoris atau vibratoris (O/V), *circular* (C), *reverse* (r), dan necrospermia (m).

Setelah itu, semen segar sapi perah yang sudah ditambah dengan larutan PBS Dulbeccos, dibagi secara acak menjadi 4 perlakuan berdasarkan jarak pemaparan, sebagai berikut :

1. Kelompok I, adalah bahan semen segar sebanyak 1 ml yang diletakkan dalam *Tissue Culture Dish* (TCD) tanpa dipapar dengan sinar UV (P_0).
2. Kelompok II, bahan semen segar sebanyak 1 ml yang diletakkan dalam TCD dan dipapar selama 5 menit dengan jarak 15 cm dari sinar UV (P_1).
3. Kelompok III, bahan semen segar sebanyak 1 ml yang diletakkan dalam TCD dan dipapar selama 5 menit dengan jarak 20 cm dari sinar UV (P_2).
4. Kelompok IV, bahan semen segar sebanyak 1 ml yang diletakkan dalam TCD dan dipapar selama 5 menit dengan jarak 25 cm dari sinar UV (P_3).

Untuk setiap perlakuan mendapat ulangan sebanyak 6 kali. Sebelum dan sesudah dipapar dengan sinar UV dilakukan pemeriksaan kualitas spermatozoa meliputi motilitas dan abnormalitas spermatozoa.

3.3.1 Pemeriksaan Motilitas Sel Spermatozoa Setelah Terpapar Sinar UV

Pemeriksaan motilitas dilakukan secara natif di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa yang bergerak dibandingkan dengan spermatozoa yang tidak bergerak dan kemudian dinyatakan dalam persen.

Penentuan ini bersifat subyektif sehingga perhitungan tiap individu dengan individu yang lain dapat berbeda, tetapi untuk kebenaran data selanjutnya dapat ditentukan dengan penghitungan viabilitas (daya hidup) spermatozoa dengan membuat preparat ulas. Hasil persentase motilitas spermatozoa dinyatakan lebih dari 50% jika pergerakan spermatozoa terlihat lebih banyak dibanding dengan spermatozoa yang tidak bergerak, demikian juga sebaliknya. Bila spermatozoa yang tidak bergerak terlihat sangat sedikit, maka dapat ditentukan bahwa persentase motilitas spermatozoa yang diperiksa tersebut lebih dari atau sama dengan 70%.

3.3.2 Pemeriksaan Abnormalitas Spermatozoa Setelah Terpapar Sinar UV

Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan mencampurkan setetes spermatozoa sapi perah dengan setetes zat warna eosin – negrosin yang dibuat preparat ulas dan kemudian dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Tiap 100 sel spermatozoa dicatat jumlah sel spermatozoa yang mempunyai bentukan abnormal dan dinyatakan dalam persen.

3.3.3 Gambaran Struktur Membran Spermatozoa Setelah Terpapar Sinar UV Dengan Menggunakan SEM

Gambaran struktur membran spermatozoa yang telah dipapar dengan sinar UV tersebut kemudian dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Adapun tahapannya sebagai berikut :

- Menyiapkan sampel berupa campuran spermatozoa dengan PBS Dulbeccos sebanyak 1 ml.
- Melakukan proses fiksasi dengan menggunakan glutaraldehide 2% selama 2 – 3 jam pada suhu 4°C.
- Setelah itu dicuci dengan menggunakan *buffer phosphat* dengan pH 7,4 selama 3x5 menit pada suhu 4°C.
- Kemudian melakukan proses post fiksasi dengan menggunakan *osmic acid* 1% selama 1 – 2 jam juga tetap pada suhu 4°C.
- Dilakukan pencucian lagi dengan menggunakan *buffer phosphat* dengan pH 7,4 juga selama 3x5 menit pada suhu 4°C.
- Selanjutnya, dilakukan proses dehidrasi dengan persentase bertingkat menggunakan alkohol 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % dan terakhir dengan persentase 100 % sebanyak 2 kali.
- Untuk bahan keras dikering – anginkan dalam atmosfer dan diusahakan agar penguapan larutan tidak terlalu cepat (diberi tutup dengan lubang yang kecil). Untuk bahan lunak, harus dilakukan pengeringan Titik Kritis (*Critical Point Drying / CPD*).
- Diberi larutan amyl asetat pekat dengan urutan sebagai berikut :

  25% Aseton – Amyl asetat 3 : 1 selama 15 menit

  50% Aseton – Amyl asetat 1 : 1 selama 15 menit

  75% Aseton – Amyl asetat 1 : 3 selama 15 menit

  100% Aseton – Amyl asetat selama 15 menit.

- Dilakukan pengeringan dengan menggunakan alat *Critical Point Drying* (CPD).
- Kemudian dilakukan pelapisan dengan memakai emas 24 karat atau juga dapat memakai karbon (*coating*).

Hasilnya dapat dilihat dengan pembesaran sesuai yang diinginkan oleh peneliti, dengan hasil berwarna hitam – putih.

Pemeriksaan gambaran struktur membran spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV yaitu adanya perubahan pada gambaran membran spermatozoa dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

3.4 Peubah Yang Diamati

Peubah yang diamati pada pemeriksaan motilitas spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV yaitu jumlah sel spermatozoa sapi perah yang mempunyai pergerakan progresif (maju), bergerak cepat dan lurus.

Peubah yang diamati pada pemeriksaan abnormalitas spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV yaitu sel spermatozoa yang mempunyai kelainan pada bentuknya seperti ekor putus, leher patah, dan beberapa bentuk abnormal yang lain seperti ekor tergulung atau ekor kusut.

Peubah yang diamati pada pemeriksaan gambaran struktur membran spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV yaitu visualisasi gambaran membran spermatozoa dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

3.5 Rancangan Penelitian dan Analisis Statistik

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam empat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (P_0), kelompok perlakuan I (P_1), kelompok perlakuan II (P_2), dan kelompok perlakuan III (P_3) yang masing – masing kelompok perlakuan mendapat ulangan sebanyak enam kali. Beberapa data yang diperoleh dari masing – masing kelompok perlakuan ditabulasikan berdasarkan peubahnya. Data hasil penelitian berupa persentase motilitas dan abnormalitas sel spermatozoa dilakukan proses pengolahan data secara analisis statistik dengan menggunakan *Analysis of Varian* (Anova) satu arah (Sarmanu, 1990). Setelah itu pengolahan data tersebut dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan selanjutnya disajikan dengan menggunakan program komputer dalam bentuk *Statistic Program for Social Science* (SPSS) 10.00 *for Windows*. Sedangkan data hasil penelitian berupa gambaran struktur membran sel spermatozoa disajikan dalam bentuk deskriptif.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Pengambilan data penelitian dilakukan sebanyak enam kali ulangan dengan empat perlakuan setiap kali pengambilan semen, dengan rentang jarak penyinaran yang berbeda yaitu 15 cm, 20 cm, dan 25 cm serta kontrol sebagai pembanding. Data hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen sapi perah FH (*Friesian Holstein*) tertera pada tabel 1 dan tabel 2 di bawah ini.

Tabel 1. Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Sapi Perah FH.

Pengambilan	Volume (ml)	Warna	Bau	Konsistensi	pH
1	4,5	Putih krem	Khas	Kental	7
2	13	Putih	Khas	Sedang	7
3	12	Putih	Khas	Sedang	6,5
4	10	Putih	Khas	Sedang	6,5
5	8	Putih krem	Khas	Sedang	6,8
6	8	Putih krem	Khas	Sedang	6,8

Tabel 2. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Sapi Perah FH.

Pengambilan	Konsentrasi	Gerakan Individu	Gerakan Massa
1	Densum	Progresif	+++
2	Semi Densum	Progresif	++
3	Semi Densum	Progresif	++
4	Semi Densum	Progresif	+++
5	Densum	Progresif	+++
6	Densum	Progresif	+++

4.1 Motilitas Spermatozoa

Data hasil rataan persentase motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa semakin dekat jarak sel spermatozoa sapi perah yang terpapar sinar UV, maka semakin banyak pula sel spermatozoa yang mengalami penurunan motilitas atau semakin sedikit sel spermatozoa yang mempunyai gerak progresif.

Hasil data rataan dan simpangan baku persentase motilitas spermatozoa setelah terpapar sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm selengkapnya dapat dilihat pada tabel 3 di bawah ini.

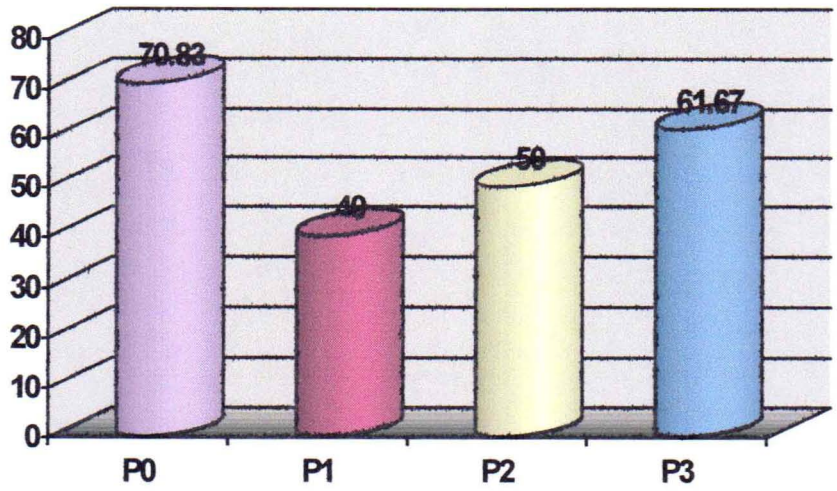
Tabel 3. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Perah Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

Jarak Paparan Radiasi Sinar Ultraviolet	Rataan dan Simpangan Baku Motilitas Spermatozoa (%)
Kontrol (P_0)	$70,83^a \pm 2,04$
15 cm (P_1)	$40,00^d \pm 7,07$
20 cm (P_2)	$50,00^c \pm 8,94$
25 cm (P_3)	$61,67^b \pm 5,16$

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

Setelah data dianalisis dengan anova satu arah dan diteruskan dengan uji BNT 5% ternyata menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P<0,05$) antara kelompok P_0 terhadap kelompok P_1, kelompok P_2, dan kelompok P_3. Antara kelompok P_1 terhadap kelompok P_2 dan kelompok P_3. Terdapat juga perbedaan yang nyata antara kelompok P_2 terhadap kelompok P_3.

Grafik persentase motilitas spermatozoa setelah terpapar sinar UV selengkapnya dapat dilihat pada gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Grafik Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Perah FH Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

4.2 Abnormalitas Spermatozoa

Perlakuan pemaparan dengan menggunakan radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm terhadap spermatozoa menghasilkan data peningkatan jumlah persentase abnormalitas sel spermatozoa. Jarak spermatozoa yang terpapar radiasi sinar UV yang berbeda – beda menghasilkan data kenaikan rataan persentase abnormalitas spermatozoa, namun persentase besar kenaikannya sangat rendah.

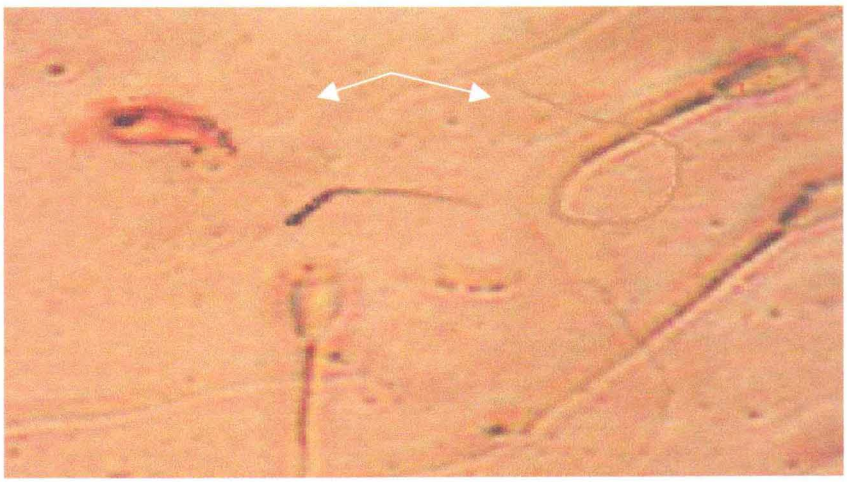
Hasil data rataan dan simpangan baku persentase abnormalitas spermatozoa setelah terpapar sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4 di bawah ini.

Tabel 4. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi Perah Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

Jarak Paparan Radiasi Sinar Ultraviolet	Rataan dan Simpangan Baku Abnormalitas Spermatozoa (%)
Kontrol (P_0)	$2{,}00^a \pm 0{,}63$
15 cm (P_1)	$2{,}67^a \pm 0{,}52$
20 cm (P_2)	$2{,}50^a \pm 0{,}55$
25 cm (P_3)	$2{,}33^a \pm 0{,}82$

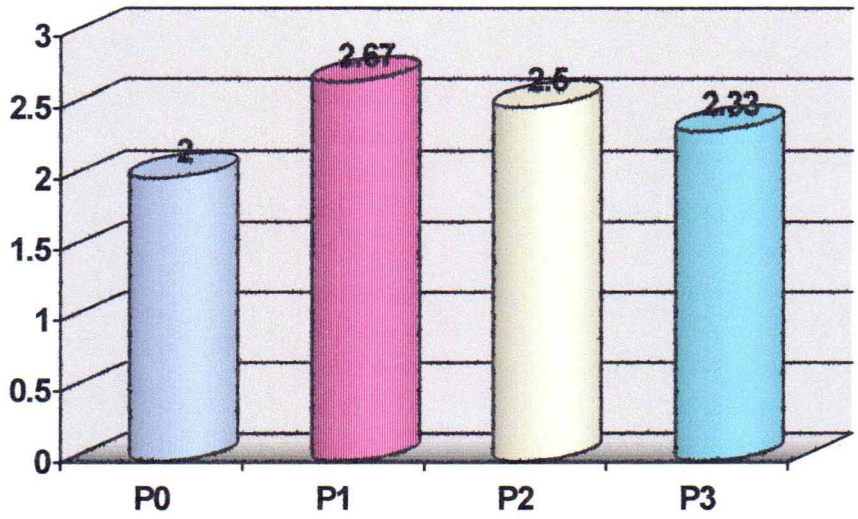
Setelah data dianalisis dengan menggunakan anova satu arah dan diteruskan dengan uji BNT 5% ternyata menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0{,}05$) antara kelompok P_0 terhadap kelompok P_1, kelompok P_2, dan kelompok P_3. Antara kelompok P_1 terhadap kelompok P_2 dan kelompok P_3. Antara kelompok P_2 dan P_3 juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata.

Untuk melihat bagaimana gambaran dari spermatozoa yang abnormal dapat dilihat pada gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Gambaran abnormalitas spermatozoa yang ditandai kepala spermatozoa terpisah dari ekor dan spermatozoa dengan ekor melingkar dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000x.

Grafik persentase motilitas spermatozoa setelah terpapar sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dapat dilihat pada gambar 6 di bawah ini.



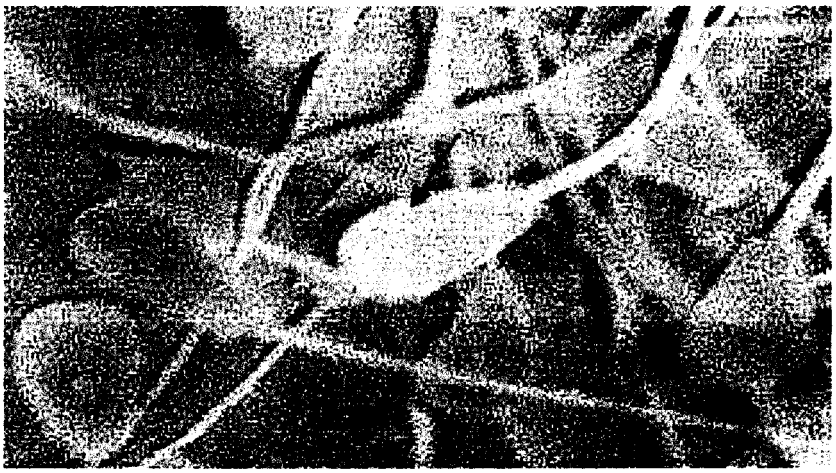
Gambar 6. Grafik Rataan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi Perah FH Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

4.3 Gambaran Membran Spermatozoa

Membran spermatozoa setelah dilihat dengan menggunakan hasil gambar yang telah didapat dari *Scanning Electron Microscopy* (SEM) menunjukkan adanya perubahan pada gambaran membran spermatozoa. Semakin dekat jarak dari sel spermatozoa yang terpapar radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm maka akan semakin mempengaruhi gambaran membran spermatozoa tersebut karena terlihat semakin banyak sel spermatozoa yang mengalami perubahan berupa lesi pada membrannya. Spermatozoa pada kelompok perlakuan

P_0 (kontrol) permukaan selnya tampak mulus dan rata, tidak nampak adanya lesi pada membran spermatozoanya. Pada kelompok perlakuan P_1 (15 cm), P_2 (20 cm), dan P_3 (25 cm) tampak adanya perubahan pada gambaran membran spermatozoa, seperti pengelupasan pada permukaan sel spermatozoa sehingga nampak tidak mulus dan rata, serta terlihat adanya lesi pada membran di bagian kepala dan ekor sel spermatozoa.

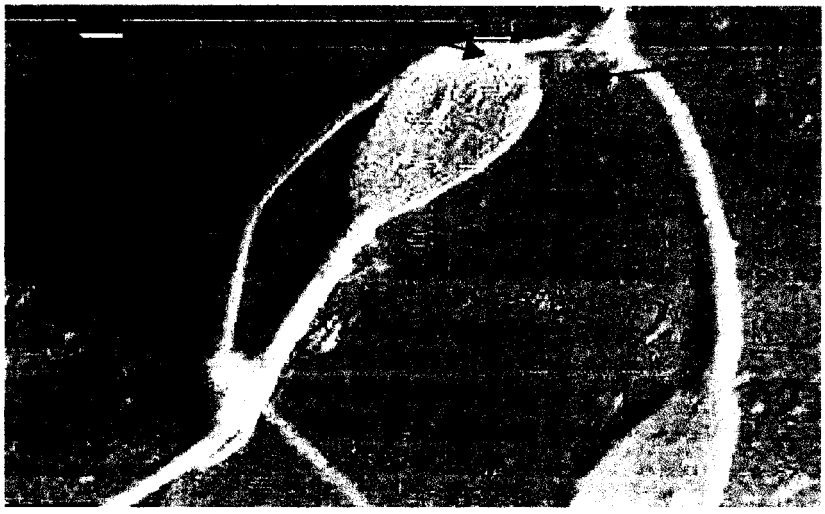
Untuk hasil gambar dari *Scanning Electron Microscopy* (SEM) yang mewakili masing – masing perlakuan yaitu P_0 (kontrol), P_3 (25 cm), P_2 (20 cm), dan P_1 (15 cm) dapat dilihat dalam gambar – gambar di bawah ini.



Gambar 7. Gambaran spermatozoa kelompok perlakuan P_0 (kontrol) dilihat dengan SEM perbesaran 5000x dimana panah menunjukkan gambaran membran spermatozoa yang terlihat normal.

Gambar 8. Gambaran spermatozoa kelompok perlakuan P_3 dengan jarak radiasi sinar UV 25 cm dilihat dengan SEM perbesaran 5000x yang ditandai dengan adanya lesi di membran, sehingga sel menjadi tidak rata seperti yang ditunjuk panah.

Gambar 9. Gambaran spermatozoa kelompok perlakuan P_2 dengan jarak radiasi sinar UV 20 cm dilihat dengan SEM perbesaran 5000x dimana terlihat perubahan adanya lesi pada membran di bagian kepala dan ekor seperti yang ditunjukkan panah.



Gambar 10. Gambaran spermatozoa kelompok perlakuan P_1 dengan jarak radiasi sinar UV 15 cm dilihat dengan SEM perbesaran 5000x yang ditandai dengan adanya lesi pada membran yang sangat jelas di bagian ekor dan kepala yang ditunjukkan oleh panah.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Motilitas Spermatozoa

Sesuai dengan bentuk morfologi spermatozoa dan pola metaboliknya yang khusus, spermatozoa yang hidup dapat mendorong dirinya sendiri untuk maju ke depan di dalam lingkungan zat cair. Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya geraknya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk IB (Toelihere, 1981). Motilitas spermatozoa yang baik dan sehat dinilai dengan melihat gerakan progresif dari spermatozoa tersebut. Gerakan spermatozoa yang progresif sangat diperlukan dalam proses fertilisasi. Menurut Yatim (1982), kemandulan antara lain ditentukan oleh sifat gerakan spermatozoa. Kalau gerakan terlalu lambat atau gerakan tidak menentu arahnya, maka pembuahan sulit berlangsung. Ada batas waktu menunggu bagi sel telur untuk dapat dibuahi. Kalau spermatozoa terlambat datang, maka ovum sudah tidak subur lagi.

Menurut Salisbury dan Van Demark (1985), terdapat substansi kontraktilitas filamen axial pada bagian tengah dari spermatozoa, yang merupakan tempat awal terjadinya gelombang aktifitas yang kemudian diteruskan ke seluruh bagian ekor. Substansi kontraktil tersebut serupa dengan myosin otot dan kontraksinya merupakan fungsi kompleks aktomiosin pada penambahan ATP

dengan katalisator ATPase, yang merupakan bagian dari kompleks aktomiosin itu sendiri.

Proses kapasitasi memerlukan pasokan energi yang melimpah, dimana ATP selama metabolisme akan dirombak dan menghasilkan energi yang diperlukan untuk kontraksi fibril – fibril spermatozoa. Menurut Noiles *et al.* (1997), terdapat korelasi antara jumlah ATP di dalam spermatozoa dengan gerakan progresif spermatozoa tersebut.

Motilitas berfungsi sebagai faktor penembus kepala spermatozoa untuk dapat masuk ke dalam ovum. Motilitas spermatozoa di dalam infundibulum bertugas sebagai alat penyebaran spermatozoa secara acak ke seluruh saluran kelamin betina dimana terdapat ovum yang mampu untuk dibuahi, sehingga menjamin kepastian secara statistik pada proses pertemuan antara spermatozoa dan ovum (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Kerusakan membran spermatozoa juga akan mempengaruhi jumlah motilitas spermatozoa. Sinar UV merupakan salah satu penyebab terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang biasa disebut dengan radikal bebas. Keadaan ini juga akan membuat terbentuknya *hydrogen peroksidase* (H_2O_2) dan anion superoksida (O_2^+) di dalam membran spermatozoa yang menyebabkan terjadinya reaksi dengan asam lemak poli tak jenuh (*Poly Unsaturated Fatty Acid* = PUFA), misalnya *decoxahexanoid acid* (DHA) (Aitken *et al.*, 1998). Hal ini menyebabkan reaksi berantai yang disebut "peroksidasi lipid" dan akan menyebabkan pemutusan rantai DHA sehingga kandungan DHA dan fluiditas membran spermatozoa menurun, dan akhirnya terjadi kerusakan integritas membran, sehingga akan

menurunkan motilitas dari membran spermatozoa (Agarwal *et al.*, 2003 ; Sudjarwo, 2000).

Pemeriksaan mikroskopis spermatozoa salah satunya digunakan untuk mengetahui persentase pergerakan atau motilitas spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang bergerak ditaksir dan dinyatakan dalam persen, dibandingkan dengan jumlah spermatozoa yang tidak bergerak (penaksiran dalam puluhan persen). Dalam hal ini penaksiran pada pemeriksaan tiap individu dengan individu yang lain dapat berbeda. Akan tetapi prosedur yang benar dapat dikuatkan dengan penaksiran hidup dan mati spermatozoa setelah diwarnai (Partodihardjo, 1992).

Data hasil paparan radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm menunjukkan angka rataan dan simpangan baku persentase motilitas spermatozoa berturut – turut adalah P_0 sebesar 70,83±2,04, kelompok P_1 sebesar 40,00±7,07, kelompok P_2 sebesar 50,00±8,94, dan kelompok P_3 sebesar 61,67±5,16. Data hasil penelitian di atas menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) di antara semua perlakuan.

Hal ini menunjukkan bahwa jarak pemaparan radiasi sinar UV mampu mempengaruhi jumlah sel spermatozoa yang bergerak progresif, semakin dekat jarak sel spermatozoa yang terpapar radiasi sinar UV maka akan semakin banyak sel spermatozoa yang mengalami kerusakan membran, sehingga terjadi gangguan metabolisme dan berkurangnya pasokan energi. Akibatnya jumlah spermatozoa yang bergerak progresif menjadi berkurang.

5.2 Abnormalitas Spermatozoa

Kelainan bentuk dan struktur spermatozoa biasanya disebut abnormalitas spermatozoa. Menurut Partodihardjo (1992), bentuk abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan antara bentuk abnormal primer dan bentuk abnormal sekunder. Bentuk abnormal primer berasal dari suatu gangguan atau kecacatan pada testis. Beberapa bentuk abnormal ini dapat terlihat apabila kita melakukan pengamatan berulang – ulang sampai beberapa kali . Pada umumnya bentuk abnormal primer ini terletak pada kepala spermatozoa seperti kepala kecil, kepala besar, kepala kerucut, kepala miring, kepala dua, kepala bulat, atau kepala salah bentuk. Ada juga bentuk abnormal spermatozoa berekor dua, akrosom salah bentuk, atau berleher besar. Sedangkan bentuk abnormal sekunder biasanya berasal dari kesalahan pengolahan atau perlakuan setelah semen meninggalkan testis, misalnya mendapat kocokan yang keras dalam tabung penampung, dikeringkan terlalu cepat, dipanaskan dengan temperatur yang terlalu tinggi, penggesekan yang tidak hati – hati ketika membuat sediaan, dan sebagainya. Beberapa bentuk abnormal sekunder antara lain adalah kepala terpisah dari leher, leher patah, leher dan ekor kusut, ekor patah, atau ekor tergulung (Partodiharjo, 1992).

Sedangkan menurut Hafez (2000), abnormalitas spermatozoa terbagi menjadi tiga bentuk yaitu abnormalitas primer, sekunder, dan tersier. Abnormalitas primer terjadi selama proses spermatogenesis, abnormalitas sekunder terjadi setelah spermatozoa meninggalkan testis hingga spermatozoa diejakulasikan, sedangkan abnormalitas tersier terjadi akibat penanganan semen yang salah sehingga timbul kelainan struktur pada sel spermatozoa. Bentuk abnormalitas yang

banyak dijumpai yaitu kepala yang terpisah dari leher, leher dan ekor kusut, adanya protoplasmic droplet, serta ekor yang putus. Seekor pejantan normal mampu mengejakulasikan semen dengan jumlah spermatozoa yang motil sebanyak 70% - 90% dan hanya 5% - 25% saja yang mempunyai kelainan atau abnormal (Hafez, 2000).

Hasil penelitian diperoleh data rataan dan simpangan baku abnormalitas spermatozoa berturut – turut adalah P_0 sebesar 2,00±0,63, kelompok P_1 sebesar 2,67±0,52, kelompok P_2 sebesar 2,50±0,55, kelompok P_3 sebesar 2,33±0,82, dan hasil penelitian tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) di antara semua perlakuan.

Hal ini menunjukkan bahwa jarak pemaparan radiasi sinar UV tidak berpengaruh terhadap jumlah persentase abnormalitas spermatozoa sapi perah yang artinya tidak mempengaruhi kerusakan sel spermatozoa yang dapat memutuskan hubungan antara kepala dan ekor spermatozoa dan mendorong terjadinya abnormalitas.

5.3 Gambaran Membran Spermatozoa

Sinar ultra violet mempunyai peranan penting dalam unsur biologis tetapi unsur tersebut sulit diperhitungkan karena spektrum elektromagnetiknya mengandung berbagai energi penting. Menurut Ackerman (1988), sinar ultra violet mampu diserap oleh protein dan asam nukleat, termasuk sel spermatozoa yang mengandung kedua hal tersebut di atas.

Jarak penyinaran dengan menggunakan radiasi sinar ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm menyebabkan perubahan terhadap membran spermatozoa. Semakin dekat jarak paparan, semakin banyak jumlah sel spermatozoa yang mengalami parubahan struktur membran yang mungkin akan berakibat kematian pada sel tersebut. Pemaparan dengan menggunakan radiasi sinar ultra violet membuktikan bahwa semakin dekat jarak paparan menuju sel maka akan terjadi gangguan keseimbangan protein dan fosfolipid baik yang ada di dalam membran ataupun yang ada di dalam sel spermatozoa.

Untuk melihat secara visual gambaran dari struktur membran spermatozoa setelah dipapar sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm pada jarak tertentu digunakan alat berupa *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

Sedangkan untuk dapat mengetahui lebih jelas tentang permeabilitas dari membran spermatozoa dapat diamati dengan melihat reaksi sel spermatozoa dalam kondisi hipoosmotik. Hal ini dapat dilakukan dengan bantuan HOS (*Hypo Osmotic Swelling*) Test dengan mengamati perubahan berupa pemutaran ekor dari sel spermatozoa. Metode HOS test yang digunakan dapat berfungsi untuk menguji keutuhan membran spermatozoa yang masih aktif, dimana dalam kondisi yang hipoosmotik tersebut menyebabkan nilai permeabilitas membran meningkat. Hal ini disebabkan karena adanya pergerakan transport air yang masuk ke dalam membran spermatozoa akan dapat menyebabkan membran spermatozoa membengkak. Sedangkan spermatozoa yang mengalami kerusakan pada membran tidak dapat menyesuaikan tekanan osmosis sehingga membran tidak membengkak.

Berdasarkan hasil penelitian Purwanto (2004), diperoleh kesimpulan bahwa kekuatan radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm ternyata mampu merusak permeabilitas membran spermatozoa sapi perah FH dengan kerusakan paling parah terdapat pada kelompok perlakuan pemaparan sinar UV pada waktu 15 menit yang ditamdai dengan penurunan angka persentase permeabilitas membran spermatozoa yang diamati dengan menggunakan metode HOS Test.

Daya permeabilitas membran memberikan suatu korelasi atau hubungan yang nyata dengan inseminasi buatan. Sebagai indikatornya yaitu infertilitas pada manusia ditentukan apabila jumlah keutuhan membran spermatozoa kurang dari angka 50% (Revell and Mrode, 1994). Pada kelompok P_2 dan P_3, spermatozoa mengalami penurunan daya fertilitas, sehingga pada kelompok tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan utama dalam pembuatan semen beku.

Menurut penelitian Prajawati (2005) tentang permeabilitas membran spermatozoa Domba Ekor Gemuk (DEG) setelah terpapar sinar UV pada jarak tertentu dengan menggunakan metode HOS (*Hypo Osmotic Swelling*) Test, dapat diketahui bahwa pemaparan spermatozoa dengan sinar UV panjang gelombang 254 nm pada jarak 25 cm selama lima menit tidak mengalami penurunan integritas membran plasma yang berarti. Tetapi pemaparan UV panjang gelombang 254 nm pada jarak 15 cm dan 20 cm mampu menurunkan integritas membran plasma spermatozoa.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan bahwa :

1. Radiasi sinar UV panjang gelombang 254 nm dengan jarak yang semakin dekat dapat menurunkan motilitas spermatozoa sapi perah FH. Persentase motilitas spermatozoa sapi perah FH yang paling kecil terjadi pada perlakuan pemaparan sinar UV dengan jarak 15 cm.
2. Radiasi sinar UV panjang gelombang 254 nm pada jarak 15 cm, 20 cm , dan 25 cm tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa sapi perah FH.
3. Kekuatan radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) ternyata merubah gambaran berupa adanya lesi pada membran spermatozoa sapi perah FH .

6.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut di waktu yang akan datang, sebaiknya dapat dilakukan hal – hal sebagai berikut :

1. Dilakukan pengamatan tentang gambaran membran spermatozoa setelah terpapar sinar UV menggunakan SEM dengan perbesaran yang lebih besar

sekitar 30.000 – 40.000 kali, atau dapat menggunakan alat berupa *Transmission Electron Microscopy* (TEM) agar visualisasi membran spermatozoa dapat terlihat lebih jelas.

2. Menggunakan radiasi sinar UV *long wave* (UV-A) dengan spectrum panjang gelombang antara 320 – 380 nm dengan puncak 365 nm. Hal ini disebabkan karena sinar UV *long wave* mempunyai resiko yang lebih kecil apabila dibandingkan dengan sinar UV *short wave* dan sinar UV *medium wave*, karena mengeluarkan energi yang lebih kecil dan mengurangi tingkat kerusakan jaringan dari sel spermatozoa sapi perah yang terpapar radiasi sinar UV *long wave* tersebut.

RINGKASAN

HARDANY PRIMARIZKY. Pengaruh jarak paparan sinar Ultra Violet (UV) terhadap motilitas, abnormalitas spermatozoa serta gambaran membran spermatozoa sapi perah, di bawah bimbingan Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh dan Arimbi, M.Kes., Drh.

Teknologi di bidang kedokteran hewan khususnya bioteknologi peternakan dewasa ini telah berkembang dengan pesat, diantaranya adalah bioteknologi reproduksi yang sangat populer yaitu inseminasi buatan (IB). Program ini bermanfaat meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak, agar keturunannya jadi lebih unggul dari induknya. Akan tetapi ada keinginan dari peternak untuk mendapatkan keturunan dengan jenis kelamin yang sesuai dengan harapan mereka. Bioteknologi reproduksi telah berhasil memenuhi keinginan peternak dengan penemuan tentang beberapa metode pemisahan spermatozoa berkromosom seks X dan Y, agar dapat menentukan keturunan ternak berkelamin jantan atau betina. Salah satunya adalah dengan cara pemaparan radiasi sinar ultra violet (UV). Sinar UV sebagai salah satu jenis sinar yang berasal dari matahari yang tidak kasat mata dimana memiliki daya tembus yang sangat tinggi dan mudah diserap oleh beberapa bahan seluler sel – sel sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada materi genetik sel tersebut. Oleh karena itu, penyinaran dengan sinar UV dapat menyebabkan terjadinya suatu mutasi genetik Penyinaran dengan sinar UV ini juga berdampak pada rasio kromosom seks dari individu yang

terkena radiasi. Kromosom seks X dan Y akan mengalami mutasi lethal sehingga diharapkan rasio seks keturunan jantan dan betina akan berubah.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui motilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi perah *Friesian Holstein* (FH), serta bagaimana gambaran membran spermatozoa setelah terpapar radiasi sinar UV dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

Semen segar sapi perah FH yang telah diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis diambil sebanyak 1 ml dan dicampur dengan larutan pengencer PBS Dulbeccos sejumlah 1 ml. Kemudian masing – masing diletakkan dalam suatu kotak yang telah terpasang lampu UV 254 nm dengan perlakuan jarak yang berbeda. Perlakuan I (P_1) dipapar dengan jarak 15 cm, perlakuan II (P_2) dipapar dengan jarak 20 cm, perlakuan III (P_3) dipapar dengan jarak 25 cm, dan kontrol (P_0) sebagai acuan pembanding yang tidak dipapar dengan sinar UV. Ketiga perlakuan di atas (P_1, P_2, dan P_3) dipapar sinar UV selama 5 menit.

Untuk menghitung persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan pemeriksaan natif di atas gelas obyek di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Penghitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan membuat preparat ulas menggunakan zat warna eosin-negrosin. Tiap 100 spermatozoa dihitung jumlah spermatozoa yang abnormal.

Analisis statistik yang digunakan adalah Anova satu arah dan dilanjutkan dengan uji BNT menggunakan program komputer SPSS (*Statistical Program for Social Science*) 10.0 *for Windows*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase jumlah motilitas spermatozoa yang telah terpapar radiasi sinar UV berturut – turut adalah kelompok P_0 sebesar 70,83±2,04, kelompok P_1 sebesar 40,00±7,07, kelompok P_2 sebesar 50,00±8,94, kelompok P_3 sebesar 61,67±5,16 dan hasil penelitian menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Sedangkan data hasil penelitian tentang persentase abnormalitas spermatozoa berturut – turut adalah P_0 sebesar 2,00±0,63, kelompok P_1 sebesar 2,67±0,52, kelompok P_2 sebesar 2,50±0,55, kelompok P_3 sebesar 2,33±0,82, dan hasil penelitian tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa paparan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm pada jarak tertentu dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa, serta menyebabkan perubahan gambaran berupa adanya lesi pada membran spermatozoa, akan tetapi tidak berpengaruh terhadap jumlah persentase abnormalitas sel spermatozoa sapi perah FH.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

Ackerman,E.,L.B.M.Ellis and L.E.William,1988. Ilmu Biofisika. Terjem. Redjani dan A.Basir. Airlangga University Press. Surabaya. 283 – 286.

Agarwal, A., R.A. Saleh and M.A. Bedaiwy. 2003. Role of Reactive Oxygen Species in Pathophysiology of Human Reproduction. Fertility and Sterility. 79 : 829 – 843.

Aitken R.J., E. Gordon, H. Diana, J.P. Twigg, M. Philip, J. Zoe and D.S. Irvine. 1998. Relative Impact of Oxydative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. Biology of Reproduction. 59 : 1037 – 1046.

Alberts, B. A.Johnson, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, P.Watson, 2002. Moleculer Biology of the Cell. 4th Edition, New York. USA. 560–566, 583–588.

Alonso, M. and E.J. Sinn. 1982. Physics. Eddison – Wesley Publishing Company, USA. 24 : 558 – 578.

Anonimus, 1997. Environmental Health Criteria 14. Ultraviolet Radiation. World Health Organization. Geneva. 26-33, 56-58, 91-92.

Beehler,D.N.,1992. Kapita Selekta Patologi Klinik. Terjem. Andrianto G. dan Gunawan J.EGC.Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.

Blakely,J. and D.H.Bade. 1998. Ilmu Peternakan. Edisi Keempat. Terjemahan B. Srigandono. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 284.

Crowder, L.V.,1988. Plant Genetics.Terjem. L.Kusdiarto. Gajah Mada University Press.Yogyakarta. 322 – 256.

Diffey, B.L. 1991. Solar Ultraviolet Radiation Effects on Biological Systems. Review in Physics in Medicine and Biology. 36 : 299 – 328.

El-Saifi, A., and Z.A.M.El-Khayat. 1996. Scanning Electron Microscopy of Human Spermatozoa In : E.S.E. Hafez, Human Semen and Fertility Regulation In Men. Chapter 8. C.V. Mosby Company. St. Louis. London. 78.

Feldman, L. 1997. Evolution of Light and Gravity Sensing Genes in Plants. University of California, Berkeley.

Freeman, B.A. 1985. Text Book of Microbiology. 22nd Ed. Bagian Farmakologi FK UI. Jakarta. 588 – 592.

Hafez,E.S.E., 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th.Edition. Lea & Febiger. Philadelphia. 96 – 109.

Halliday, D. and R. Resnick. 1996. Fisika. Edisi III. Jilid 2. Erlangga Press. Jakarta. 41 : 537 – 564.

Hardjopranjoto, S.,1995. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya. 65 – 66.

Hecht, E. 1995. Optics 2nd Ed. Philadelphia University. USA.

Hoediasmoro, D.S., H. Santoso, S. Hardjopranjoto, dan Kristanto. 1985. Petunjuk Praktis Mikroskopi Elektron. Unit Laboratorium Mikroskop Elektron Universitas Airlangga. Airlangga University Press. Surabaya. 1–2 dan 63–70.

Hughes, CM.,SE.Lewis, VJ.Mckelvey Martin and W.Thompson.1998.Ultra Violet Irradiated Spermatozoa to Activate Oocytes for Nuclear Transfer. Human Reprod. 13 : 1240-1247.

Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Laboratorium Fisiologi Reproduksi. Jurusan Reproduksi dan Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 21–24.

Ismudiono, P.Srianto dan SP.Madyawati, 2001. Penyinaran dangan Sinar Ultra Violet pada Semen Beku setelah Thawing sebagai Upaya Pemisahan Kromosom Seks X dan Y.Laporan Penelitian DIK Suplemen Universitas Airlangga. Surabaya. 2–22.

Johnson,L.A.,1995. Sex Preselection by Flow Cytometric separation of X and Y Chromosome Bearing Sperm Based on DNA Difference a Review.J.Reprod.Fert.4 : 893-903.

Liu and Baker. 1992. Test of Human Sperm Function and Fertilization In Vitro, in J. Fertility and Sterility. 182 : 472-473.

Mahaputra,L.,Wurlina,TD.Sulistyawati, dan S.Mulyati.1989. Pemisahan Sel Spermatozoa Domba dengan Sephadex Collum G-20. Media Kedokteran Hewan. Vol. 5 no. 1. hal. 2015-8930.

Noiles, E.E., K. A. Thomson, and B. T. Storey. 1997. Water Permeability, L. P. of The Mouse Sperm Plasma Membrane and its Activation Energy are

Strongly Dependent on Interaction of The Plasma Membrane With The Sperm Cytoskeleton. Journal Cryobiology. 35 : 79-92.

Noor,R.R.,2000. Genetika Ternak. Cetakan II.Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta.

Olson, G.E., P. Winfrey, D.L. Garbers, and T.D. Noland. 1985. Isolation and Characterixation of a Macromolecular Complex Associated with the Outer Acrosomal Membrane of Bovine Spermatozoa. Journal Biology of Reproduction. 33 : 761 – 779.

Pai,C.A.1985, Foundation of Genetics. McGraw – Hill Publ.Co.New York.

Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi Ketiga. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta. 519 – 560.

Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1988. Element of Microbiology. Mc Graw Hill Book Company. UI Press. Jakarta. 450 – 472.

Prajawati, D.F. 2005. Pengaruh Paparan Sinar Ultra Violet C Dengan Berbagai Jarak Penyinaran Terhadap Integritas Membran Plasma Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Menggunakan Metode *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Purwanto, K.A. 2004. Pengaruh Lama Waktu Paparan Radiasi Ultra Violet C (UV–C) terhadap Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas, dan Permeabilitas Membran Spermatozoa Sapi Perah. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Revell S.G and R.A. Mrode. 1994. An Osmotik Resistanel Test for Bovine Semen. Aniem. Reprod. Sci. 36: 77 – 86.

Rimayanti. 1998. Pengaruh Pengenceran Media EBSS & BO pada Semen Beku Kambing Ettawa terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal. Laporan Penelitian. Dikti. Depdikbud.

Ryer, A.D., 1997. Light Measurement Handbook. Newburyport, MA : International Light, Inc.

Salisbury,GW. dan N.L. VanDemark,1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gadjah Mada University Press. Yogjakarta. Terjemahan R. Djanuar. 1 – 22 dan 314 – 333.

Santoso,G.,I.Ekayanti, IL.Kriswandari, dan Sugiharto,2001. Radiasi Dosis Rendah dan Pengaruhnya terhadap Kesehatan. Program Studi Ilmu Kedokteran. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.

Sarmanu, 1990. Analisis Varian. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.

Sassung, J.S., S.Asminah, S.Jatiman. 1996. Buku Materi Pokok Pengetahuan Nuklir PIPA 4432 / Modul 6-9. Universitas Terbuka. Penerbit Karunika. Jakarta.

Srianto, P., A.Samik, S.P. Madyawati, 2004. Profil DNA Spermatozoa Sapi Perah yang Mendapat Paparan Sinar Ultra Violet : Sebagai Upaya Awal Pengembangan Sexing Kromosom Untuk Memperoleh Keturunan Sesuai Harapan. Laporan Penelitian Hibah Proyek Due-Like Batch III. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 7 – 11.

Sudjarwo, 2000. Korelasi Senyawa Oksigen Reaktif dengan Kualitas Semen Manusia. Majalah Kedokteran. Indonesia. Volume 50 no. 10. Oktober. hal. 456 – 459.

Sutrisno, 1989. Fisika Dasar. Seri Fisika 4. ITB Press. Bandung. 2 : 35-55.

Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.

Toha,A,H.A.,2001.Deoxyribonucleic Acid. Keanekaragaman, Ekspresi, Rekayasa dan Efek Pemanfaatannya. Cetakan I. Penerbit Alfabeta. Bandung.

Volk, W.A. and M.F. Wheeler. 1988. Basic Microbiology. 5th Ed. Harper and Raw Publisher Inc.

Yatim, W. 1982. Reproduksi dan Embriologi. Penerbit Tarsito. Bandung. 20 dan 45.

Zenevald, L.J.D. 1985. the Biology of Human Spermatozoa. Presented In : Kongres Nasional III PANDI. Jakarta. 15-39.

LAMPIRAN

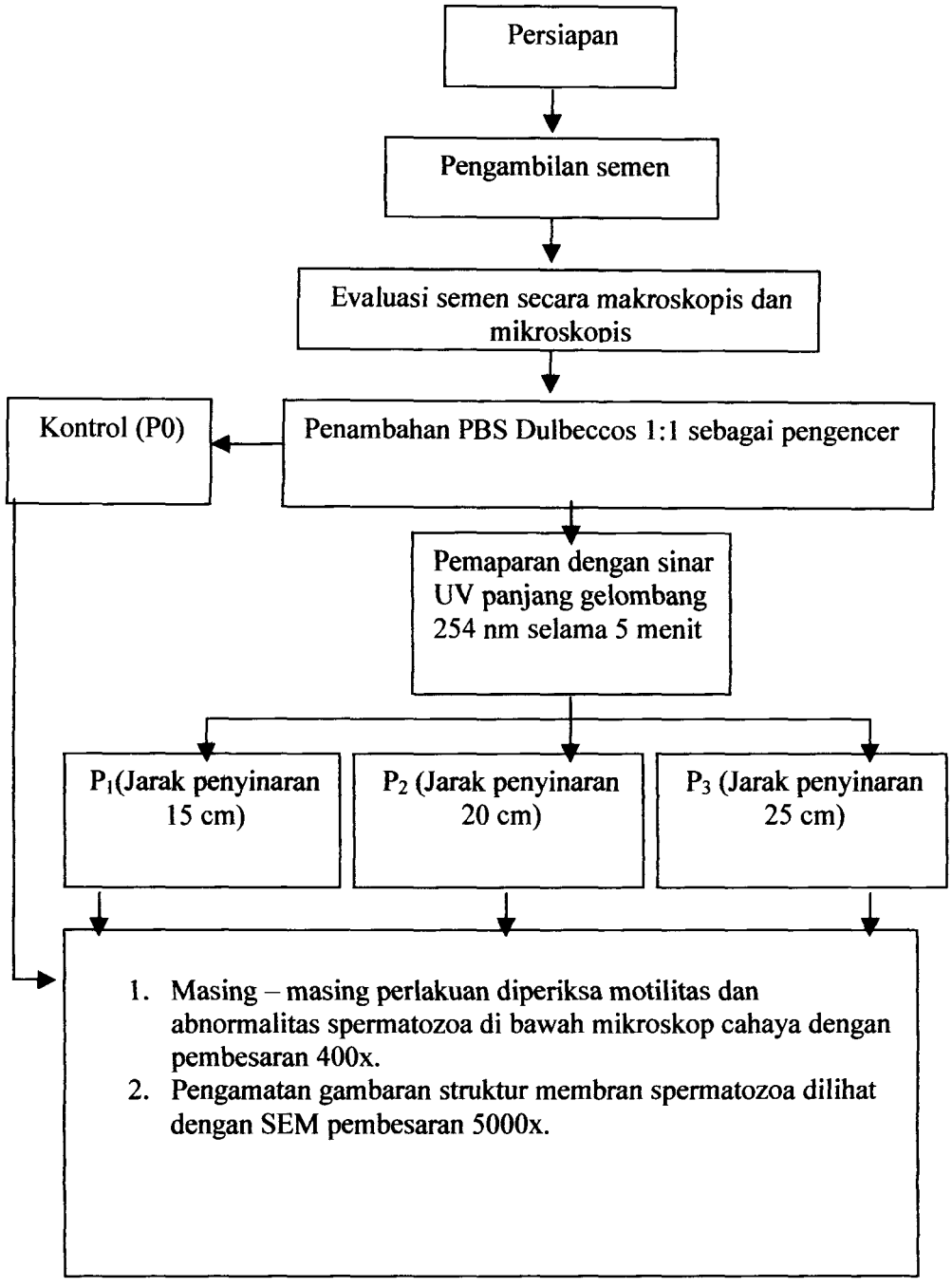
Lampiran 1. Data Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Perah FH Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

Ulangan	P_0 (kontrol)	P_1 (15 cm)	P_2 (20 cm)	P_3 (25 cm)
1	75	30	40	60
2	70	40	50	55
3	70	40	40	60
4	70	35	50	60
5	70	45	60	65
6	70	50	60	70

Lampiran 2. Data Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi Perah FH Hasil Pemaparan Sinar UV Panjang Gelombang 254 nm.

Ulangan	P_0 (kontrol)	P_1 (15 cm)	P_2 (20 cm)	P_3 (25 cm)
1	2	3	3	3
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
4	2	3	2	2
5	2	3	3	3
6	1	2	2	1

Lampiran 3 : Bagan Alur Penelitian Pengaruh Jarak Paparan Sinar Ultra Violet (UV) Terhadap Motilitas, Abnormalitas Spermatozoa Serta Gambaran Membran Spermatozoa Sapi Perah.



Lampiran 4. Analisis Statistik Hasil Pengamatan Motilitas Spermatozoa

ANOVA

Motilitas Spermatozoa (%)

	Jumlah Kuadrat	Df	Kuadrat Tengah	F	Sig
Perlakuan	3261,458	3	1087,153	27,038	,000
Sisa	804,167	20	40,208		
Total	4065,625	23	1127,361		

Keterangan : Sig. 0,000 menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata.

UJI BNT 5%

Antara perlakuan : motilitas spermatozoa (%)

(I)Perlakuan	(J)Perlakuan	Perbedaan rata-rata (I-J)	Std.Error	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas Atas	Batas Bawah
P0	P1	9,17*	3,66	,021	1,53	16,80
	P2	20,83*	3,66	,000	13,20	28,47
	P3	30,83*	3,66	,000	23,20	38,47
P1	P0	-30,83*	3,66	,000	-38,47	-23,20
	P1	-21,67*	3,66	,000	-29,30	-14,03
	P2	-10,00*	3,66	,013	-17,64	-2,36
P2	P0	-20,83*	3,66	,000	-28,47	-13,20
	P1	-11,67*	3,66	,005	-19,30	-4,03
	P3	10,00*	3,66	,013	2,36	17,64
P3	P0	-9,17*	3,66	,021	-16,80	-1,53
	P2	11,67*	3,66	,005	4,03	19,30
	P3	21,67*	3,66	,000	14,03	29,30

Keterangan : *. menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

Lampiran 5. Analisis Statistik Hasil Pengamatan Abnormalitas Spermatozoa

ANOVA

Abnormalitas Spermatozoa (%)

	Jumlah Kuadrat	df	Kuadrat Tengah	F	Sig
Perlakuan	1.458	3	.486	1.190	,339
Sisa	8.167	20	.408		
Total	9.625	23			

UJI BNT 5%

Antara perlakuan : abnormalitas spermatozoa (%)

(I)Perlakuan	(J)Perlakuan	Perbedaan rata-rata (I-J)	Std.Error	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas Atas	Batas Bawah
P0	P1	-.33	.369	,397	-1.10	.44
	P2	-.50	.369	,190	-1.27	.27
	P3	-.67	.369	,086	-1.44	.10
P1	P0	.67	.369	,086	-.10	1.44
	P1	.33	.369	,377	-.44	1.10
	P2	.17	.369	,656	-.60	.94
P2	P0	.50	.369	,190	-.27	1.27
	P1	.17	.369	,656	-.60	.94
	P3	-.17	.369	,656	-.94	.60
P3	P0	.33	.369	,377	-.44	1.10
	P2	-.17	.369	,656	-.94	.60
	P3	-.33	.369	,377	-1.10	.44

Lampiran 6. PREPARASI *ELECTRON MICROSCOPY*

TAHAP – TAHAP :

1. **FIKSASI**

Ada 2 : - Perfusi : Perfusi khusus

Perfusi total

- Imersi

Persiapan Alat :

- Dissecting bed
- Stoples
- Gelas ukur 100 cc
- Vervan
- Meja secting
- Ligature (tali)
- Hand scone
- Standard
- Exicator
- Injectie spuit 1 cc
- Kertas manila
- Jarum kanul (plastik)
- Jarum biasa

Persiapan Reagensia :

- Wash buffer
- Diethyl eter
- Hewan percobaan / sample
- Larutan fiksasi
- Larutan Pentobarbital 6%

Cara Pembuatan Reagensia :

- Sebelum kita membuat larutan pencuci maupun larutan fiksasi, terlebih dahulu kita buat Buffer Fosfat Stock.
- Caranya :

  Menimbang Stock I Solution 0,2 M $NaH_2PO_4.H_2O$.....acid salt 37,6 g/l

Menimbang Stock II Solution 0,2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$.....basa salt 35,6 g/l

Larutan dalam becker glass atau Erlenmeyer 25,6 gram + aqua add 500 cc (aquabidestilata).

Ambil Erlenmeyer lain 27,6 g/l + aquabidest add 500 cc kemudian larutkan sama sekali, setelah larut diukur dengan pH meter.

Masukkan elektroda ke dalam Stock II Solution (0,2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$) basa.

Kemudian sedikit demi sedikit Stock I Solution (0,2 M $NaH_2PO_4.H_2O$) asam, masukkan ke dalam Stock II Solution sambil digoyang – goyang sampai tercapai pH 7,4. Setelah tercapai pH 7,4 (pH 7,38) + aquabidest add 1000 cc, maka kita dapatkan 0,2 M Buffer fosfat stock pH 7,4.

Diberi label pada Erlenmeyer (nama, larutan, nama yang membuat, tanggal pembuatan). Larutan tahan satu sampai dua minggu.

Cara membuat buffer cuci untuk perfusi :

- 500 cc 0,2 M buffer fosfat pH 7,4 + 2% PVP (Poly Vinyl Pirilidon)
- Menimbang 20 gram PVP
- Menimbang 4 gram $NaNO_2$, kedua bahan dimasukkan ke Erlenmeyer 1000 cc yang telah berisi 500 cc 0,2 M buffer fosfat pH 7,4
- Larutkan hingga larut sama sekali
- Setelah larut tambahkan aquabidest add 1000 cc, maka kita dapatkan 0,1 M buffer fosfat + 2% PVP + 0,4% NaNO2
- Kemudian beri label

Cara Membuat Larutan Fiksasi Untuk Perfusi :

- Kita buat larutan 2% dari stock solution 25% Glutaraldehyde

$$X \times 25\% = 1000 \text{ cc} \times 2\%$$

$$25X = 2000 \text{ cc}$$

$$X = 2000/25$$

$$= 80 \text{ cc}$$

- Ambil dari botol 80 cc glutaraldehyde 25%, masukkan ke Erlenmeyer atau botol bersih dan masukkan 500 cc 0,2 M buffer fosfat.
- Erlenmeyer diisi dengan aquabidest sampai 1000 cc.
- Konsentrasi akhir = 0,1 M buffer fosfat dengan 2% Glutaraldehyde.
- Diberi label.

Cara Kerja Perfusi :

A. Perfusi Khusus (Kidney)

1. Alat – alat disiapkan semua
2. Siapkan larutan fiksasif dan wash buffer
3. Sampel dimasukkan ke dalam wash buffer selama satu menit
4. Sampel dimasukkan ke dalam larutan fiksasi selama lima menit

B. Perfusi Total

Perfusi total adalah perfusi ginjal, hati, dll.(seluruh organ). Prinsipnya lebih mudah tetapi hasilnya tidak 100%.

2. LARUTAN PENCUCI

Larutan pencuci adalah 0,1 M buffer fosfat dengan 6,8% Suchrose.

Persiapan Alat :

- Erlenmeyer 1000 cc
- Gelas ukur
- Balance

Persiapan Reagensia :

- Buffer fosfat stock pH 7,4
- Sacharose
- Aquabidest

Cara Kerja:

- Ambil 500 cc dan 0,2 M buffer solution pH 7,4.
- Timbang 0,8 gram sacharose dan masukkan dalam Erlenmeyer lalu dilarutkan.
- Tambahkan aquabidest sampai 1000 cc.
- Konsentrasi terakhir pastikan 0,1 M buffer fosfat larutan pencuci.
- Beri label.

Cara Pelaksanaan :

- Sampel yang ada dalam larutan fiksasi, diambil.
- Larutan fiksasi dibuang, diganti dengan larutan pencuci I, 3 x lima menit dalam temperatur kamar.

3. FIKSASI LANJUTAN

Post fiksasi disini 1% Osmium (OSO_4) dalam 0,1 M buffer fosfat.

Caranya : Kita buat larutan Osmium stock 2% :

- Membuat ampul bersih dengan aquabidest atau chromic acid sebab bila ampul ada minyak, terjadi kontaminasi, karena Osmium justru

memfiksir lemak, sehingga warnanya akan hitam dan tidak bisa dipakai lagi.

- Botol coklat yang dipakai untuk osmic acid harus dibersihkan dengan chromic acid. Chromic acid gelap dibersihkan lalu dibilas dengan air kran dan kemudian tiga kali dengan aquabidest.
- Ampul tidak boleh dipegang dengan kertas biasa tetapi dengan kertas filter atau hand scone di dalam ruang asam, digergaji tidak sampai patah kemudian dipatahkan dan dimasukkan dalam botol larutan stock 2%.
- 2 gram dimasukkan 100 cc aquabidest, karena satu ampul Osmium isinya 1 gram maka diisi aquabidest 50 cc.

  2 gram.....100 cc

  1 gram.....50 cc

Cara Membuat :

- Kita ambil 5 cc 2% OSO_4, masukkan dalam gelas ukur 10 cc.
- Kemudian tambahkan 5 cc 0,2 M buffer fosfat stock ke dalamnya.
- Masukkan botol coklat, kemudian tutup botolnya dan tutup lagi dengan paraffin, beri label.

Cara Pelaksanaan :

- Sampel yang telah dicuci tiga kali dengan buffer stock masukkan dalam 6,8% Suchrose.
- Setelah pencucian terakhir dibuang, ganti dengan larutan 1% OSO_4 dalam 0,1 M buffer selama 2 jam pada suhu 4^0C (tidak terlalu lama).

4. LARUTAN PENCUCI II

Digunakan 0,1 M buffer fosfat dalam aquabidest.

Cara Membuat :

- Kita ambil 50 cc 0,2 M buffer fosfat stock, masukkan gelas ukur.
- Tambah aquabidest sampai 100 cc, masukkan botol dan beri label.

Cara Kerja :

- Setelah post fiksasi dua jam, kemudian larutan OSO_4 dibuang dalam tempatnya.
- Dicuci dengan 0,1 M buffer fosfat tiga kali 5 menit pada temperatur kamar.

5. DEHIDRASI

Menggunakan larutan Etanol 100% sebagai stock solution.

Alat-alat :

- Erlenmeyer bertutup
- Kaki tiga
- Bunzen (gas)
- Pinset botol bertutup empat buah
- Cawan porselen
- Kasa kawat
- Exicator dengan silica gel
- Gelas ukur

Reagensia :

- $MgSO_4$ padat
- Ethanol 100%
- Aquabidest

Cara Kerja :

- $MgSO_4$ padat dipanaskan di dalam ruang asam sampai merah.

- Setelah itu diangkat dan dimasukkan ke exicator selama setengah jam.
- Kemudian ethanol 96% diisi dengan $MgSO_4$ padat tadi sampai terlihat ada endapan.
- Maka H2O yang ada dalam ethanol 96% akan diikat oleh $MgSO_4$.
- Lalu didapat ethanol absolut, diberi label.

Cara Membuat Alkohol Bertingkat :

- Alkohol 30%.
- Ambil 30 cc absolut ethanol, tambah aquabidest sampai 100 cc.
- Demikian juga untuk alkohol 50% dan 70%.
- Beri label dan masukkan ke dalam botol.

Cara Kerja :

- Setelah sampel dicuci buffer tiga kali 5 menit, kemudian yang terakhir dibuang.
- Dehidrasi Alkohol 30% - 50% - 70% masing – masing 10 menit pada temperatur ruangan (rotasi).
- Untuk Alkohol 70% bias sampai semalam.
- Dehidrasi Alkohol 100% dua kali masing – masing 60 menit pada temperatur ruangan.

6. Masukkan Amyl Asetat

Diberi larutan amyl asetat pekat dengan urutan sebagai berikut :

25% Aseton – Amyl asetat 3 : 1 selama 15 menit

50% Aseton – Amyl asetat 1 : 1 selama 15 menit

75% Aseton – Amyl asetat 1 : 3 selama 15 menit

100% Aseton – Amyl asetat selama 15 menit.

7. **CPD (Critical Point Drying)**

Untuk bahan – bahan yang keras dapat dikeringkan dengan meletakkan di ruang bebas, tetapi dijaga agar penguapan tidak terlalu cepat. Untuk bahan – bahan yang sangat lunak, perlu dilakukan pengeringan titik kritis atau biasa disebut *Critical Point Drying.*

8. **COATING (melapisi dengan logam)**

Bahan konduktif yang dapat dipakai bermacam – macam, yang paling baik dan mahal adalah emas murni, sedang yang paling murah adalah karbon.

Cara Melakukan :

Menguapkan karbon / emas di dalam ruangan hampa udara dan dipanaskan pada suhu yang sangat tinggi. Partikel – partikel bahan dalam bentuk uap tadi, akan mengalami kondensasi dalam ruangan hampa dan akan berjatuhan atas dasar gravitasi, seperti hujan, melapisi sediaan.

9. **Pemeriksaan Dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM)**

Sampel yang sudah siap dapat diperiksa dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) dengan perbesaran 5000 kali.

Lampiran 7. Komposisi Medium Phosphat Buffer Saline (PBS)

	Gram/200ml
1. PBS Powder	1,92
2. Glukosa	0,20
3. Na Piruvat	0,0072
4. Penicilin	0,012
5. Streptomicin	0,010
6. Bovine Serum Albumin	3,0%

Lampiran 8. Kriteria Penilaian Pemeriksaan Mikroskopis Semen

- **PENENTUAN KONSENTRASI SEMEN CARA RUSIA**

1. DENSUM (D) : yaitu bila jarak antara kepala sel spermatozoa yang satu dengan yang lain kurang dari panjang kepala satu sel spermatozoa. Berarti ada lebih dari satu juta sel spermatozoa dalam setiap mili-liter semen tersebut.
2. SEMI DENSUM (SD) : yaitu bila jarak antara kepala sel spermatozoa yang satu dengan yang lain lebih dari panjang kepala satu sel spermatozoa. Berarti bahwa setiap mili-liter semen mengandung antara 500.000 – 1.000.000 sel spermatozoa.
3. RARUM (R) : yaitu jarak antara kepala sel spermatozoa yang satu dengan yang lain hampir sama dengan panjang satu sel spermatozoa (kepala dan ekor). Berarti bahwa setiap satu mili-liter semen mengandung kurang dari 500.000 sel spermatozoa.
4. AZOOSPERMIA (A) : yaitu tidak diketemukan atau hanya sedikit sel spermatozoa di dalam semen.

- **GERAKAN MASSA**

1. Sangat Baik (+++) : merupakan gelombang kecil sampai besar yang tebal dan gelam dalam jumlah yang banyak dan bergerak cepat.
2. Baik (++) : merupakan gelombang tipis, jarang, dan gerakannya lamban.
3. Sedang (+) : tidak terlihat adanya gelombang gerakan spermatozoa sendiri–sendiri.
5. Buruk (O / N) : hanya sedikit atau tidak ada sama sekali gerakan individu.

- **GERAKAN INDIVIDU**

1. P = Gerakan progresif, merupakan gerakan aktif maju ke depan.
2. O (V) = Gerakan oscillatoris atau vibratoris, merupakan gerakan ayun, berputar, dan lamban.
3. C = Gerakan circular, merupakan gerak melingkar.
4. r = Gerakan reverse, merupakan gerak mundur.
5. m = Necrospermia, yaitu tidak ada gerakan.

Lampiran 9. Peralatan Penelitian

Mikroskop Elektron JSM – T 100 buatan JEOL Ltd / JEOL Technics Ltd Tokyo, Japan.

Alat untuk pengeringan titik kritis (*Sample Drying at the Critical Point*) SAMDRI – 780.

Alat untuk pelapisan bahan konduktif (*coating*) JEOL – Jee 4xVacuum evaporator.

Contoh sediaan yang telah dilapisi emas yang siap untuk diperiksa dengan menggunakan SEM.