

SKRIPSI

PERAN CRUDE PROTEIN PLASMA SEMINALIS KAMBING TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA



Oleh :

HENDRAWAN PUTRA SATYA PAMUNGKAS

NIM 060213086

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2006

**PERAN CRUDE PROTEIN PLASMA SEMINALIS KAMBING
TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA**

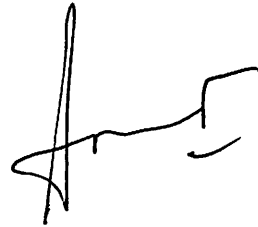
Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh :
HENDRAWAN PUTRA SATYA PAMUNGKAS
NIM. 060213086

Menyetujui,
Komisi Pembimbing



(Lianny Nangoi, M.Kes., drh)
Pembimbing Pertama



(Indah Norma Triana, M.Si., drh.)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

PERAN CRUDE PROTEIN PLASMA SEMINALIS KAMBING TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA

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, 20 Oktober 2006

Hendrawan Putra Satya Pamungkas
NIM. 060213086

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 15 Desember 2006

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Erma Safitri, M.Si., drh.
Sekretaris : Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., drh.
Anggota : Dr. Hardijanto, M.S., drh.
Pembimbing I : Lianny Nangoi, M. Kes., drh.
Pembimbing II : Indah Norma Triana, M.Si., drh.

Telah diuji pada

Tanggal : 29 Desember 2006

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Erma Safitri, M.Si., drh.

Anggota : Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., drh.

Dr. Hardijanto, M.S., drh.

Lianny Nangoi, M.Kes., drh.

Indah Norma Triana, M.Si., drh.

Surabaya, 10 Januari 2007

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, drh., M.S.

NIP. 130687297

ROLE OF GOAT SEMINAL PLASMA CRUDE PROTEIN TO QUALITY OF SPERMATOZOA

Hendrawan Putra Satya Pamungkas

ABSTRACT

The aim of this research was to know the role of goat seminal plasma crude protein to quality of spermatozoa with parameter of motility, viability and membrane integrity of spermatozoa. This research needs fresh semen from PE goats aged 2 – 3 year old, goat seminal plasma crude protein, condensation of HOS (hypo osmotic swelling), Physiology NaCl, medium of BO (Brackett And Oliphant's), eosin and eosin-negrosin colorants. This research use three treatment, which is condensation of NaCl physiological as control (P0), rate protein crude 2,5 mg (P1) and rate protein crude 3,5 mg (P2). Goat semen is checked by macroscopic and microscopic. Later; Then semen to be given treatment and checked motility, viability and membrane integrity of spermatozoa at minute to 30, 45 and 60. The result of this research show goat seminal plasma crude protein can maintain motility, viability and membrane integrity of spermatozoa if compared with control group (P0). Degradation on the quality of spermatozoa at minute to 30 significant difference ($p < 0,05$) with minute at 45 and 60

Keyword: Crude protein, motility, viability, membrane integrity of spermatozoa

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT. Berkat hidayah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul : **Peran Crude Protein Plasma Seminalis Kambing Terhadap Kualitas Spermatozoa.**

Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. beserta keluarga, para sahabat dan seluruh pengikutnya yang setia sampai akhir zaman.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Lianny Nangoi, M.Kes., drh. selaku dosen pembimbing I, ibu Indah Norma Triana, M.Si., drh. selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan ilmu pengetahuan dengan penuh kesabaran.

Terima kasih kepada Ibu Suherni Susilowati M.Kes., drh. yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan ilmu pengetahuan dengan penuh kesabaran serta atas kesempatan yang telah diberikan kepada penulis untuk turut serta dalam penelitian yang dilakukan.

Seluruh dosen dan staf Laboratorium Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesediannya membantu dengan penuh keikhlasan.

Rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda, Ibu (alm) serta Mbak Lies, Mbak Rini, Adikku Friska dan seluruh keluarga di rumah atas semua doa, kasih sayang dan perhatian yang diberikan kepada penulis.

Terima kasih kepada teman teman sepenelitian, teman-teman KH angkatan 2002, serta teman-teman penghuni kos Mulyorejo 118B Surabaya atas semua bantuan, doa dan perhatian yang diberikan kepada penulis.

Terima kasih kepada seluruh civitas akademika FKH Unair dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu atas segala bantuannya.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, karena itu penulis sangat mengharap segala kritik dan saran dari semua pihak. Semoga hasil yang dituangkan dalam makalah ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan khususnya dunia Kedokteran Hewan di Indonesia.

Surabaya, 20 Oktober 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
ABSTRACT	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan masalah.....	3
1.3. Landasan atau dasar teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.4.1. Tujuan umum.....	5
1.4.2. Tujuan khusus.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
1.6. Hipotesis Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Tinjauan kambing.....	7
2.2. Reproduksi kambing jantan.....	7
2.3. Semen kambing	8
2.4. Spermatozoa.....	9
2.5. Plasma semen	11
2.6. Metabolisme spermatozoa	12
2.7. Membran spermatozoa.....	13
BAB 3 MATERI DAN METODE	16
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2. Materi Penelitian.....	16
3.2.1 Peralatan.....	16
3.2.2 Bahan Penelitian.....	16
3.3. Prosedur penelitian.....	17
3.3.1. Koleksi semen kambing.....	17
3.3.2. Pemeriksaan dan evaluasi semen kambing.....	18
3.3.2.1. Motilitas spermatozoa	19
3.3.2.2. Daya tahan hidup spermatozoa.....	19
3.3.2.3. Integritas membran sel spermatozoa	20
3.3.3. Isolasi dan purifikasi crude protein plasma seminalis semen kambing.....	21
3.3.4. Swim up.....	21

3.3.5. Perlakuan terhadap semen kambing	22
3.4. Rancangan Penelitian.....	22
3.5. Peubah yang diamati.....	23
3.5.1. Variabel Bebas.....	23
3.5.2. Variabel Terantung.....	23
3.6. Analisis data	24
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	26
4.1. Pemeriksaan semen kambing sebelum perlakuan	26
4.2. Pemeriksaan semen kambing setelah swim up.....	27
4.3. Pemeriksaan mikroskopis semen kambing setelah perlakuan..	28
4.3.1. Motilitas spermatozoa	28
4.3.2. Daya tahan hidup spermatozoa.....	29
4.3.3. Integritas membran spermatozoa.....	31
BAB 5 PEMBAHASAN	33
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1. Kesimpulan.....	37
6.2. Saran	37
RINGKASAN.....	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen kambing sebelum perlakuan.....	26
4.2. Hasil pemeriksaan mikroskopis semen kambing setelah swim up	27
4.3. Rata-rata motilitas spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu.....	28
4.4. Rata-rata motilitas spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda	29
4.5. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu	29
4.6. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda.....	30
4.7. Rata-rata integritas membran spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu.....	31
4.8. Rata-rata integritas membran spermatozoa setelah diberi crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Spermatozoa.....	10
3.1. Proses pengambilan semen kambing	18
3.2. Perubahan bentuk ekor spermatozoa setelah HOS test.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa.....	43
2. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa sesudah transformasi ...	44
3. Descriptive statistics motilitas spermatozoa	45
4. Pengolahan data motilitas spermatozoa dengan SPSS.....	46
5. Hasil pemeriksaan daya tahan hidup spermatozoa.....	48
6. Hasil pemeriksaan daya tahan hidup spermatozoa sesudah transformasi.....	49
7. Descriptive statistics daya tahan hidup spermatozoa	50
8. Pengolahan data daya tahan hidup spermatozoa dengan SPSS	51
9. Hasil pemeriksaan integritas membran spermatozoa.....	53
10. Hasil pemeriksaan integritas membran spermatozoa sesudah transformasi.....	54
11. Descriptive statistics integritas membran spermatozoa	55
12. Pengolahan data integritas membran spermatozoa dengan SPSS..	56
13. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen kambing yang digunakan sebagai crude protein plasma seminalis.....	58
14. Hasil peneraan kadar crude protein plasma seminalis kambing dengan spektrofotometer.....	59
15. Komposisi medium BO (Brackett and Oliphant's).....	60
16. Komposisi larutan HOS (<i>Hypo Osmotic Swelling</i>)	61
17. Gambar hasil penelitian.....	62
18. Gambar alat-alat penelitian	63

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kambing mempunyai peran yang sangat strategis bagi kehidupan masyarakat Indonesia. Pemasaran kambing sebagian besar digunakan untuk memenuhi permintaan rumah makan dan sebagian kecil untuk keperluan rumah tangga. Selain itu, kambing bagi masyarakat Indonesia dibutuhkan dalam bidang sosial budaya, seperti qurban dan aqiqah. Diperkirakan dalam 10 tahun ke depan permintaan terhadap kambing mencapai 5 juta ekor untuk berbagai keperluan (Diwyanto, 2005). Kondisi ini harus diantisipasi dengan mendorong usaha peternakan kambing untuk lebih produktif, efektif dan efisien sehingga populasi kambing akan meningkat dan dapat memenuhi kebutuhan pasar domestik.

Upaya untuk meningkatkan populasi kambing di Indonesia dilakukan dengan memperbaiki mutu genetik kambing lokal melalui persilangan dengan kambing bergenetik unggul melalui teknologi Inseminasi Buatan (IB), Fertilisasi in-Vitro (IVF), dan Transfer Embrio (TE) (Pasaribu dan Imam, 1992).

Teknologi IB memungkinkan kesempatan reproduksi sebanyak-banyaknya dari seekor pejantan setiap ejakulasi dalam setiap satuan waktu untuk mengawini beberapa betina. Keuntungan dan kerugian IB pada kambing hampir sama dengan sapi atau ternak pada umumnya. Kualitas semen beku merupakan salah satu faktor pembatas terhadap keberhasilan program IB pada kambing. Semen kambing mudah mengalami kerusakan selama proses pembekuan karena terjadinya

pembentukan kristal-kristal es yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. Selama proses pembekuan semen, kristal-kristal es yang terbentuk akan menyebabkan konsentrasi elektrolit meningkat di dalam sel yang akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa, dan pada waktu *thawing* akan mengubah permeabilitas membran plasma sehingga spermatozoa akan mati (Toelihere, 1985).

Menurut hasil penelitian Herdis dkk (2006) kerusakan membran plasma sel spermatozoa pada proses pendinginan, pembekuan, dan *thawing* semen beku dapat dicegah dengan penambahan plasma semen. Di dalam plasma semen sendiri terdapat berbagai macam makromolekul dan zat nutrien yang berfungsi menjaga integritas membran spermatozoa.

Riadi (2004) menjelaskan komposisi utama dari plasma semen adalah air ($\pm 75\%$), dan juga beberapa substansi organik dan anorganik (K, Ca dan bikarbonat) untuk melindungi dan menyediakan energi dari spermatozoa. Substansi organik dalam plasma semen terdiri dari fruktosa, sorbitol, inositol, asam sitrat, gliserilfosforilkolin, fosfolipid, prostaglandin dan protein. Menurut hasil penelitian Susilowati (2006) melalui prosedur SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyarylamide Gel Elektroforesis*) terdapat tujuh fraksi protein di dalam plasma seminalis kambing. Ketujuh fraksi protein tersebut memiliki berat molekul 150 kDa, 103 kDa, 73 kDa, 53 kDa, 35 kDa, 14 kDa dan 11 kDa.

Adanya perbaikan membran plasma spermatozoa akan berpengaruh positif terhadap proses biokimia di dalam sel, dan pada akhirnya dapat memperbaiki peubah kualitas spermatozoa yang lain, seperti motilitas dan daya tahan hidup

spermatozoa. Menurut Hafez (2000) motilitas sangat penting untuk pembuahan karenanya harus menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat serta dapat membantu transportasi spermatozoa dari luar untuk mencapai tempat pembuahan. Motilitas dan daya hidup spermatozoa yang tinggi dapat meningkatkan *conception rate* dari inseminasi (Hardijanto, dkk., 2004).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini akan mengetahui peran crude protein plasma seminalis kambing terhadap kualitas spermatozoa.

1.2. Perumusan Masalah

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

1. Apakah penambahan crude protein plasma seminalis kambing dapat mempertahankan persentase motilitas dari spermatozoa kambing hasil *swim up*?
2. Apakah penambahan crude protein plasma seminalis kambing dapat mempertahankan persentase daya tahan hidup dari spermatozoa kambing hasil *swim up*?
3. Apakah penambahan crude protein plasma seminalis kambing dapat mempertahankan persentase integritas membran dari spermatozoa kambing hasil *swim up*?

1.3. Landasan Teori

Kerusakan membran plasma sel spermatozoa pada proses pembekuan akan mempengaruhi motilitas dan daya hidup dari spermatozoa, sehingga kualitas dari spermatozoa sendiri akan menurun. Untuk mencegah hal tersebut dapat dilakukan dengan cara mengurangi kerusakan membran plasma spermatozoa melalui penambahan plasma semen. Di dalam plasma semen sendiri terdapat berbagai macam makromolekul seperti lipoprotein yang berfungsi melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan selama pendinginan, pembekuan, dan *thawing* semen beku (Herdis, dkk., 2006).

Menurut Riadi (2004) komposisi utama dari plasma semen adalah air ($\pm 75 \%$), dan juga beberapa substansi organik dan anorganik (K, Ca dan bikarbonat) untuk melindungi dan menyediakan energi dari spermatozoa. Substansi organik yang terdapat dalam plasma semen adalah fruktosa, sorbitol, inositol, asam sitrat, gliserilfosforilkolin, fosfolipid, prostaglandin dan protein. Menurut hasil penelitian Susilowati (2006) melalui prosedur SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektroforesis*) terdapat tujuh fraksi protein di dalam plasma seminalis semen. Ketujuh fraksi protein tersebut memiliki berat molekul 150 kDa, 103 kDa, 73 kDa, 53 kDa, 35 kDa, 14 kDa dan 11 kDa.

Penambahan plasma semen ke dalam semen sebagai upaya untuk meningkatkan kualitas spermatozoa dari berbagai hewan telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Kualitas dan fertilitas spermatozoa meningkat dengan penambahan plasma semen pada kuda (Aurich *et al.*, 1996), pada spermatozoa

domba (Maxwell *et al.*, 1999). Penambahan plasma semen meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis domba (Herdis, dkk., 2006).

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mempertahankan kualitas dari spermatozoa kambing baik untuk tujuan Inseminasi Buatan (IB) dan Fertilisasi In-Vitro (IVF).

1.4.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Untuk membuktikan bahwa crude protein plasma seminalis kambing berperan dalam mempertahankan motilitas spermatozoa kambing
2. Untuk membuktikan bahwa crude protein plasma seminalis kambing berperan dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa kambing.
3. Untuk membuktikan bahwa crude protein plasma seminalis kambing berperan dalam mempertahankan integritas membran plasma spermatozoa kambing.

1.5. Manfaat Penelitian

Memberikan informasi tentang peran crude protein plasma seminalis kambing terhadap kualitas dari spermatozoa kambing.

1.6. Hipotesis Penelitian

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

1. Penurunan persentase motilitas spermatozoa kambing hasil *swim up* dapat dipertahankan dengan penambahan crude protein plasma seminalis kambing
2. Penurunan persentase daya tahan hidup spermatozoa kambing hasil *swim up* dapat dipertahankan dengan penambahan crude protein plasma seminalis kambing
3. Penurunan persentase integritas membran spermatozoa kambing hasil *swim up* dapat dipertahankan dengan penambahan crude protein plasma seminalis kambing

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Kambing

Kambing merupakan ternak ruminansia kecil yang sejak berabad-abad lalu sudah memasyarakat. Saat ini kambing telah menjadi komoditas perdagangan yang melibatkan baik pengusaha kecil maupun konglomerat. Jenis kambing yang sering dipelihara oleh masyarakat Indonesia adalah kambing Jawa atau kambing Kacang, kambing Peranakan Ettawa (PE), dan kambing Bligon (Djarajah, 1996).

Beternak kambing memiliki banyak keuntungan bila dibandingkan dengan kerugian yang diderita karena beternak kambing tidak memerlukan banyak persyaratan khusus. Selain menghasilkan daging, kambing juga dapat menghasilkan produk lain seperti susu, kulit, dan juga pupuk yang dihasilkan dari kotorannya. Kambing jantan perlu mendapatkan perawatan untuk menjaga staminanya, lebih-lebih untuk pejantan pemacek yang tugasnya mengawini kambing-kambing betina. Pejantan dimandikan minimal seminggu sekali, pakan dan air minum harus diperhatikan, baik jumlah, gizi dan keseegarannya, agar tidak kurus tetapi juga tidak terlalu gemuk (Mulyana, 2003).

2.2. Reproduksi Kambing Jantan

Menurut Sarwono (2001) kambing jantan dapat dikawinkan pada usia 6 - 8 bulan, karena diperkirakan sudah mulai pubertas. Pubertas adalah masa dimana ternak jantan telah mampu menghasilkan spermatozoa aktif (hidup) di dalam semennya dan dapat mengawini betina (Wodzicka dan Tomaszewka, 1991).

Sistem reproduksi kambing jantan umumnya terdiri dari 3 (tiga) bagian besar yaitu: alat kelamin primer berupa gonad atau testis, alat kelamin sekunder yang terdiri dari saluran alat kelamin dan kelenjar asesoris, alat kelamin luar yaitu penis, preputium dan skrotum (Hardjopranjoto, 1995).

Ismudiono (1999) menerangkan bahwa testis dari beberapa spesies hewan berbeda dalam hal ukuran, bentuk dan lokasinya, walaupun struktur penyusun utamanya sama. Testis sebagai alat kelamin primer mempunyai 2 (dua) fungsi yaitu memproduksi spermatozoa (sel gamet jantan) dan memproduksi hormon kelamin jantan yaitu testosteron (Salisbury and Van Demark, 1985). Testis terbungkus dalam kantong skrotum yang berisi 2 (dua) lobi testis yang masing-masing lobi mengandung 1 testis.

Alat kelamin sekunder berupa saluran reproduksi yang menghubungkan testis dengan dunia luar yaitu : vas efferens, epididimis (caput, corpus, cauda), vas deferens dan penis yang didalamnya terdapat uretra untuk menyalurkan urine, air mani dan cairan asesoris (Hardjopranjoto, 1995).

2.3. Semen (Air Mani) Kambing

Hafez (2000) menyatakan semen kambing adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina sewaktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Semen kambing terdiri dari dua bagian yaitu spermatozoa dan plasma semen (Hardjopranjoto, 1987).

Sekurang-kurangnya ada empat bahan organik di dalam semen yang berfungsi sebagai bahan sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitas spermatozoa. Bahan tersebut adalah fruktosa, sorbitol, *Glyceryl Phosphoryl Cholin* (GPC) dan plasmalogen (Toelihere, 1981).

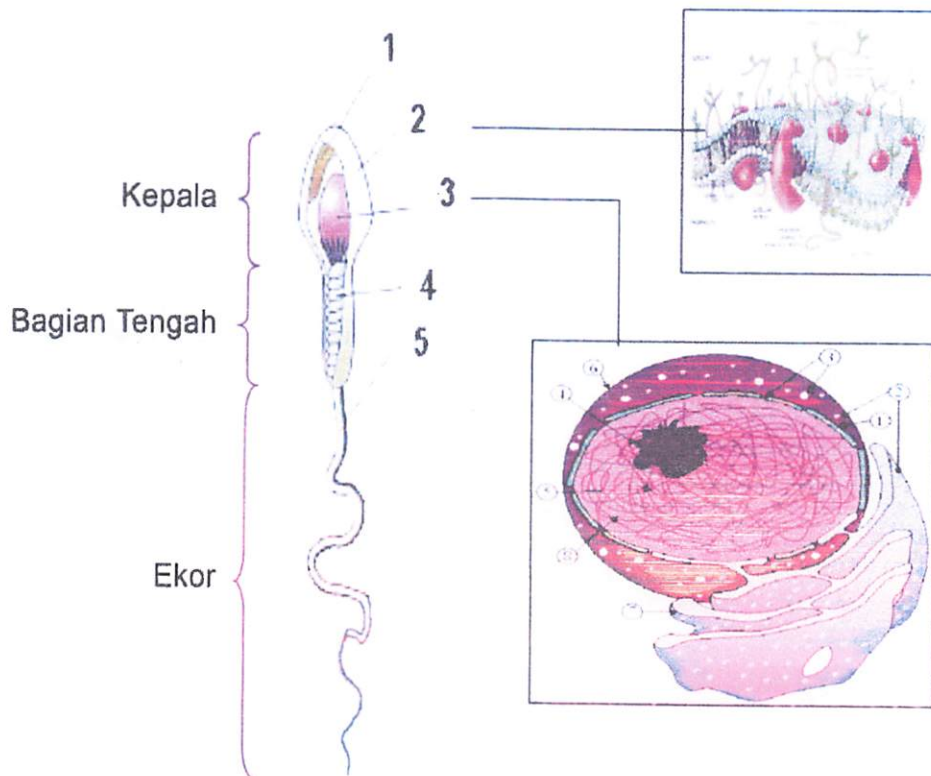
2.4. Spermatozoa

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

Sel spermatozoa terdiri dari bagian kepala, leher dan ekor yang berbeda susunan kimiawinya. Kepala terdiri dari asam deoksiribonukleat (DNA) yang sebagian besar terdapat di dalam inti, sedangkan akrosomnya mengandung banyak ikatan protein dan karbohidrat yang disebut akrosomal polisakarida. Bagian leher selain mengandung lipid yang pada umumnya lipoprotein, plasmalogen dan juga terdapat sitokrom yang berfungsi dalam reaksi pernafasan sel spermatozoa. Bagian ekor mengandung plasmalogen dan protein keratin yang berada di benang-benang fibril dan kulit spermatozoa yang bersifat kontraktif (Bearden dan Fuquay, 1992).

Bagian tengah spermatozoa terdapat mitokondria sebagai tempat berlangsungnya proses-proses metabolisme spermatozoa dalam menghasilkan energi bagi kehidupan dan pergerakan spermatozoa. Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus krebs dan transport elektron serta *fosforilasi oksidatif* yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphosphate* (ATP) untuk menggerakkan spermatozoa (Hinting, 1989).

Sel spermatozoa kambing memiliki panjang $\pm 62,3 - 71,5$ dengan rincian, kepala spermatozoa panjangnya $8 - 10\mu$, tebal $0,3 - 0,5\mu$ dan mengandung materi genetic. Bagian leher dengan panjang $1,3 - 1,5\mu$ menghubungkan dasar kepala dengan bagian tengah dan mengandung sentra proksimal. Bagian tengah panjangnya $8 - 10\mu$ dengan diameter $0,6 - 0,85\mu$. Bagian ekor panjangnya $45 - 50\mu$ dan semakin mengecil dengan diameter $0,5 - 0,25\mu$ (Salisbury and van Demark, 1985).



Gambar 2.1. Spermatozoa (Sari, 2005)

Keterangan : (1) *acrosome*, (2) *membran sel*, (3) 1. *Nuclear envelope*; 2. *Rhiosome*; 3. *Nuclear pore complexes*; 4. *Nucleolus*; 5. *Chromatin*; 6. *Nucleus*; 7. *Endoplasmic retikulum*; 8. *Nucleoplasm*; seluruh struktur diselubungi oleh sitoplasma, (4) *mitochondria*, (5) *Flagellum* (ekor).

2.5. Plasma Semen

Plasma semen adalah campuran cairan yang disekresikan terutama oleh kelenjar vesikula. Plasma semen mempunyai 3 (tiga) fungsi dasar yaitu sebagai cairan pembawa spermatozoa, mengangkut spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan sampai ejakulasi, sebagai media untuk mengaktivasi spermatozoa yang sebelumnya non-motil. Plasma semen kambing merupakan media yang bersifat buffer (pH 6,8 – 7,0), berwarna kuning, kaya akan zat gizi untuk menunjang daya tahan spermatozoa (Ismudiono, 1999).

Di dalam plasma semen sendiri terdapat berbagai macam makromolekul seperti lipoprotein yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama pendinginan, pembekuan, dan *thawing* semen beku (Herdis dkk, 2006).

Menurut Riadi (2004) komposisi utama dari plasma semen adalah air (\pm 75 %), dan juga beberapa substansi organik dan anorganik (K, Ca dan bikarbonat) untuk melindungi dan menyediakan energi dari spermatozoa. Substansi organik dalam plasma semen terdiri dari fruktosa, sorbitol, inositol, asam sitrat, gliserilfosforilkolin, fosfolipid, prostaglandin dan protein.

Fruktosa merupakan gula yang ditemukan di dalam semen sapi, kambing, domba dan babi yang berasal dari glukosa darah. Konsentrasi glukosa dalam semen sapi, kambing dan domba sangat tinggi dan merupakan makanan utama dari spermatozoa. Sorbitol juga terdapat dalam semen dan dapat dioksidasi menjadi fruktosa oleh sel-sel spermatozoa untuk dikonsumsi kemudian. Asam

sitrat tidak dipakai sebagai sumber energi oleh spermatozoa. Inositol dan asam sitrat tidak dimetabolisir oleh spermatozoa (Ismudiono, 1999).

Bahan-bahan antioksidan yang terdapat pada plasma semen antara lain vitamin C, Zn, transferin, laktoferin, albumin dan asam urat, dimana kadarnya bervariasi antar individu yang satu dengan yang lain (Subratha, 1998).

2.6. Metabolisme Spermatozoa

Membran plasma spermatozoa mengandung beberapa enzim yang berpengaruh terhadap metabolisme spermatozoa, diantaranya enzim *alkaline phosphatase*, ATP-ase dan AMP-ase. Menurut hasil penelitian Mafruchati, dkk (1997) semakin besar konsentrasi enzim maka kecepatan metabolisme akan semakin cepat.

Kehidupan sel spermatozoa di dalam semen sangat bergantung pada besarnya kadar fruktosa sebagai sumber energi yang utama. Dalam kondisi anaerob, spermatozoa mengandalkan karbohidrat sebagai sumber energi utamanya. Energi tambahan diperoleh dalam kondisi aerob, yaitu melalui oksidasi asam laktat menjadi karbondioksida dan air. Penghubung utama antara metabolisme karbohidrat dan motilitas adalah ATP (*Adenosin Triphosphate*). Pemecahan ATP memberikan energi untuk kontraksi fibril-fibril spermatozoa, sedangkan penyediaan kembali ATP tergantung pada metabolisme normal fruktosa. Kandungan ATP dalam spermatozoa berhubungan erat dengan motilitasnya. Jika sel spermatozoa disimpan dalam keadaan anaerob dan tidak ada persediaan gula maka pergerakan sel spermatozoa menjadi lambat. Pergerakan

tersebut kembali normal dengan penambahan fruktosa atau beberapa gula lain di dalam semen.

2.7. Membran Spermatozoa

Hafez (2000) menjelaskan lapisan yang menyelimuti keseluruhan spermatozoa dikenal dengan membran plasma. Keutuhan membran plasma sel spermatozoa harus tetap terjaga agar motilitas, daya hidup dan kualitas sel spermatozoa tersebut dapat dipertahankan. Membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai pelindung secara fisik organel-organel sel spermatozoa dari kerusakan mekanis dan sebagai penjaga keseimbangan elektrolit intra dan ekstra sel sehingga proses fertilisasi dapat berjalan dengan baik (Hunter, 1995). Membran ini terdiri dari dua lapis lipoprotein yang komposisinya terdiri dari 52 % protein, 40 % lipid dan 8 % karbohidrat.

Membran plasma spermatozoa masing-masing daerah mempunyai fungsi yang khusus. Membran pada kepala spermatozoa berperan pada proses kapasitasi, reaksi akrosom dan penembusan zona pelusida ovum pada proses fertilisasi. Membran pada belakang akrosom spermatozoa (*post acrosomal region*) berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan *oolema ovum* pada proses fertilisasi (*sperm egg recognition*). Membran pada bagian ekor spermatozoa berfungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi serta pengantar gerakan gelombang bagi spermatozoa (Subrata, 1998).

Kerusakan membran plasma spermatozoa dapat disebabkan adanya peroksida asam lemak tak jenuh atau PUFA (*poly unsaturated fatty acid*) oleh senyawa oksigen reaktif dan radikal bebas yang terdapat pada plasma

spermatozoa, sehingga fluiditas membran akan berkurang. Senyawa oksigen reaktif (SOR) merupakan oksidan yang sangat reaktif dan mempunyai aktifitas yang berbeda-beda. Dampak negatif senyawa tersebut timbul karena aktivitasnya, sehingga dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Setiap SOR yang terbentuk dapat memulai suatu reaksi berantai yang akan terus berlanjut sampai SOR itu dihilangkan oleh SOR yang lain atau sistem antioksidannya (Wijaya, 1996).

Menurut Siregar (1992) oksigen merupakan suatu unsur yang essential, tetapi kelebihan oksigen dapat menyebabkan kerusakan peroksidatif. Oksigen yang masuk kedalam tubuh sebagian besar menuju ke mitokondria. Pada proses respirasi, oksigen terlibat dalam pembentukan ATP. Saat proses respirasi, oksigen mengalami reduksi dalam rangkaian transpot elektron di dalam mitokondria. Proses reduksi oksigen tersebut menghasilkan anion superoksida dan hidrogen peroksida sebagai zat antara. Reaksi anion superoksida dengan oksidan lain di lingkungan membran menghasilkan kerusakan membran yang tidak dapat dipulihkan seperti semula (*irreversibel*). Hidrogen peroksida menjadi sangat bahaya bila terdapat bersama ion superoksida, karena akan membentuk senyawa radikal hidroksil melalui reaksi Haber Weiss dengan katalisator Fe^{3+} dan Cu^{2+} yang dapat menembus membran sehingga dampak pengaruhnya tersebar luas (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Lipid merupakan asam lemak tak jenuh yang banyak terdapat pada membran plasma spermatozoa. Asam lemak tak jenuh akan menghasilkan peroksida lipid bila bereaksi dengan SOR (senyawa oksigen reaktif). Peroksida

lipid yang berkepanjangan akan merusak stuktur matrik lipid yang menyebabkan instabilitas membran, karena terputusnya rantai asam lemak tak jenuh menjadi senyawa yang toksik terhadap sel (Siregar, 1992).

BAB 3

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Inseminasi Buatan, Laboratorium Fertilisasi In-Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Tropical Disease Research Center Universitas Airlangga Surabaya yang dimulai bulan Juli sampai September 2006.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Peralatan

Mikroskop, termos, seperangkap vagina buatan dengan tabung berskala, tabung reaksi, tabung sentrifuse, sentrifuse dingin, gelas obyek, gelas penutup, spuit 1cc, 2,5cc, 5cc, Incubator 5 % CO₂, mikropipet 100 μ , Eppendof dan pipet berskala. (Lampiran 18)

3.2.2. Bahan

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah semen dari 6 ekor kambing PE (Peranakan Etawa) jantan yang berumur 2-3 tahun dengan libido tinggi, Crude protein plasma seminalis kambing hasil isolasi dan purifikasi dari 10 ekor kambing PE (Peranakan Etawa) jantan yang berumur 1,5-3 tahun, Etanol absolut dingin, PBS (*poly buffer sulfat*) pH 7, Eosin 1%, pewarna Eosin-negrosin, larutan hypoosmotic (HOS), spiritus, NaCl fisiologis dan medium BO (Brackett and Oliphant's).

3.3. Prosedur Penelitian

Prosedur dari penelitian ini meliputi koleksi semen kambing, pemeriksaan dan evaluasi semen kambing, isolasi dan purifikasi crude protein plasma seminalis kambing, pemisahan sel spermatozoa motil dan non-motil dengan metode swim-up, evaluasi kualitas spermatozoa kambing setelah swim-up, suplementasi crude protein plasma seminalis kambing dan evaluasi kualitas sel spermatozoa kambing setelah suplementasi dengan crude protein plasma seminalis kambing.

3.3.1. Koleksi Semen Kambing

Koleksi semen kambing pada penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama semen kambing digunakan sebagai bahan untuk isolasi dan purifikasi crude protein (diambil dari 10 ekor kambing jantan). Tahap kedua semen kambing digunakan sebagai bahan untuk swim-up (diambil dari 6 ekor kambing jantan). Sebelum dilakukan pengambilan semen, kambing jantan diperiksa terlebih dahulu keadaan fisiknya, selanjutnya dilakukan pencukuran bulu dan pencucian disekitar preputium menggunakan sabun dan air hangat agar semen terhindar dari kontaminasi. Vagina buatan dipersiapkan untuk menampung semen kambing. Vagina buatan ini tersusun dari beberapa komponen yang masing-masing dapat dipisahkan untuk mempermudah dalam proses pembersihan dan penyimpanan. Komponen vagina buatan antara lain : selongsong karet tebal (Heavy Rubber Cylinder), selaput karet tipis (Inner Liner), lubang pengisi air bertutup pentil, gelas berskala penampung semen, corong karet (Rubber Funnel) berlubang, karet pengikat dan batang plastik (Plastic Rod) untuk memberi pelicin. Setelah semua komponen dipasang pada bagian dalamnya diisi air hangat bersuhu 41 - 43° C, dan

pada bagian luar dari corong diolesi dengan vaselin sebagai pelicin sejauh $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$ bagian. Untuk mendapatkan kualitas semen yang baik diusahakan merangsang libido pejantan dengan cara membiarkan pejantan menaiki betina tetapi dicegah jangan sampai terjadi ejakulasi. Rangsangan dilakukan 2 – 3 kali, selanjutnya penis yang terjulur karena ereksi diarahkan ke dalam vagina buatan untuk ditampung. Bagian ujung dari vagina buatan diberi plastik dan tabung berskala ditutup dengan kertas agar semen terlindung dari sinar matahari. Selanjutnya semen dibawa ke laboratorium dengan menggunakan termos es. Proses pengambilan semen kambing pada penelitian ini disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Proses pengambilan Semen Kambing

3.3.2. Pemeriksaan dan Evaluasi Semen Kambing

Pemeriksaan pada semen meliputi pemeriksaan makroskopis dan pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi : volume, konsistensi, bau, warna, dan pH. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi :

pemeriksaan gerakan massa, gerakan individu, persentase motilitas, daya tahan hidup dan integritas membran.

3.3.2.1. Motilitas Spermatozoa

Motilitas merupakan salah satu ciri utama spermatozoa yang dapat dijadikan patokan dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan. Penilaian motilitas didasarkan pada persentase gerakan sel spermatozoa yang bergerak aktif (progresif) dibanding seluruh sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Motilitas dapat membantu transportasi spermatozoa dari luar untuk mencapai tempat terjadinya fertilisasi (Hafez, 1987).

Motilitas spermatozoa di dalam suatu contoh semen ditentukan dengan gelas obyek cekung dan dihitung secara keseluruhan atau sebagai rata-rata dari populasi spermatozoa terhadap semen segar yang baru ditampung dan belum diencerkan.

3.3.2.2. Daya Tahan Hidup Spermatozoa

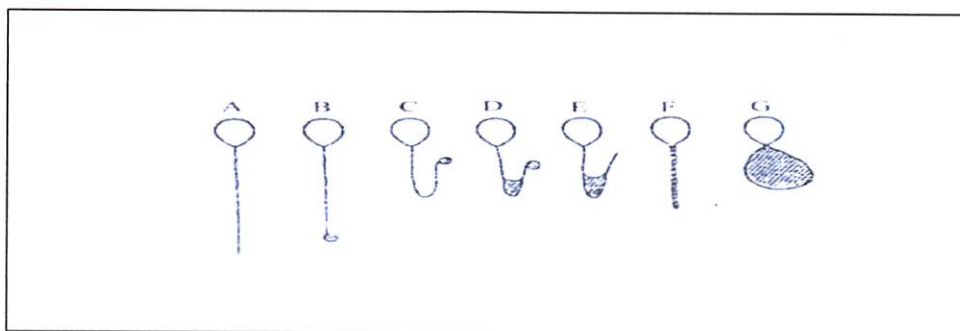
Kemampuan sel spermatozoa untuk aktif bergerak setelah inkubasi pada suhu yang tinggi dari suhu kamar normal setelah disimpan pada suhu yang rendah disebut ketahanan hidup.

Penentuan persentase spermatozoa hidup dapat dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes zat warna eosin-negrosin dan satu tetes semen diatas gelas obyek kemudian dicampur hingga homogen, kemudian dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan pada nyala api. Pengerjaan ini harus kurang dari 15 detik. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan penghitungan dibawah mikroskop

dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang hidup pada bagian kepalanya tidak menyerap warna dan sebaliknya pada spermatozoa yang mati pada bagian kepala akan menyerap warna.

3.3.2.3. Integritas Membran Sel Spermatozoa

Untuk mengamati integritas membran spermatozoa dapat dilakukan dengan HOS Test (Jayendra *et al*, 1984) dengan urutan kerja sebagai berikut : 1 ml larutan hiposmotik 150 M osmol (yang dibuat dari 7,35 gr natrium sitrat, 2H₂O, 13,52 gr fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquadest) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi dengan Incubator 5 % CO₂ pada suhu 37⁰C selama 30 menit, selanjutnya diamati dengan pembesaran 400x. Jika integritas membran bagus, adanya perubahan yang khas yaitu ekornya melingkar pada bagian ujungnya. Jika integritas membran rusak terjadi pembengkakan pada sel spermatozoa (ekor lurus). Macam-macam perubahan bentuk ekor spermatozoa setelah HOS Test dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Perubahan Bentuk Ekor Spermatozoa Setelah Hos Test
(World Health Organization, 1999).

Keterangan : (A) tidak ada perubahan bentuk ekor spermatozoa, (B – G) macam-macam perubahan bentuk ekor spermatozoa

3.3.3. Isolasi dan Purifikasi Crude Protein Plasma Seminalis Kambing

Semen kambing hasil koleksi dari 10 ekor kambing jantan yang telah diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis (Lampiran 13), selanjutnya disentrifuse menggunakan sentrifuse dingin suhu 0 °C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan ditambah Etanol Absolut dingin dengan perbandingan 1 : 1 lalu dihomogenkan, setelah homogen dimasukkan ke dalam almari es selama ± 24 jam. Disentrifuse kembali lalu supernatannya dibuang. Presipitat yang ada selanjutnya didialisis sehari semalam. Setelah proses dialisa selesai ditambahkan PBS dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya ditera kadar proteinnya dengan menggunakan Spektrofotometer (Lampiran 14), setelah itu disimpan pada suhu 5 °C.

3.3.4. *Swim up*

Metode *swim up* bertujuan untuk memisahkan spermatozoa yang motil dan yang tidak motil serta memisahkan komponen seminal plasma. *Swim up* menggunakan medium BO (Brackett and Oliphant's) yang ditambahkan ke dalam semen dengan perbandingan dua bagian medium BO dengan satu bagian semen, selanjutnya diinkubasi pada suhu 20 °C selama 30 menit. Spermatozoa yang motil akan berada di permukaan media. Komposisi dari medium BO disajikan pada Lampiran 15.

3.3.5. Perlakuan terhadap Semen Kambing

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah :

- Kontrol (P0) : Spermatozoa motil hasil *swim up* 3×10^6 (± 3 tetes) ditambah dengan larutan NaCl fisiologi 0,25ml.
- Perlakuan I : Spermatozoa motil hasil *swim up* 3×10^6 (± 3 tetes) ditambah dengan crude protein plasma seminalis kambing kadar 2,5 mg.
- Perlakuan II : Spermatozoa motil hasil *swim up* 3×10^6 (± 3 tetes) ditambah dengan crude protein plasma seminalis kambing kadar 3,5 mg.

Pada masing-masing perlakuan dan kontrol digunakan 6 ulangan, yaitu semen dari kambing Peranakan Etawa (PE). Pengamatan dilakukan pada 30 menit, 45 menit dan 60 menit setelah perlakuan.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Pola yang digunakan adalah 3×3 karena terdapat dua faktor (perlakuan dan waktu pengamatan) yang masing-masing mempunyai tiga taraf. Masing-masing perlakuan kombinasi diulang sebanyak 6 kali. Data disajikan dalam Lampiran 1, Lampiran 5 dan Lampiran 9.

3.5. Peubah yang Diamati

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penambahan crude protein plasma seminalis (kadar 2,5 mg dan 3,5 mg) dan waktu pengamatan (30 menit, 45 menit dan 60 menit).

3.5.2. Variabel Tergantung

Dalam penelitian ini variabel tergantung yang diamati adalah :

1. Motilitas spermatozoa kambing

Penilaian berdasarkan persentase gerakan sel spermatozoa yang bergerak aktif (progresif) dibanding seluruh sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Angka yang diberikan berkisar antara 0% sampai 100% dengan skala 5%.

2. Daya Tahan Hidup spermatozoa kambing

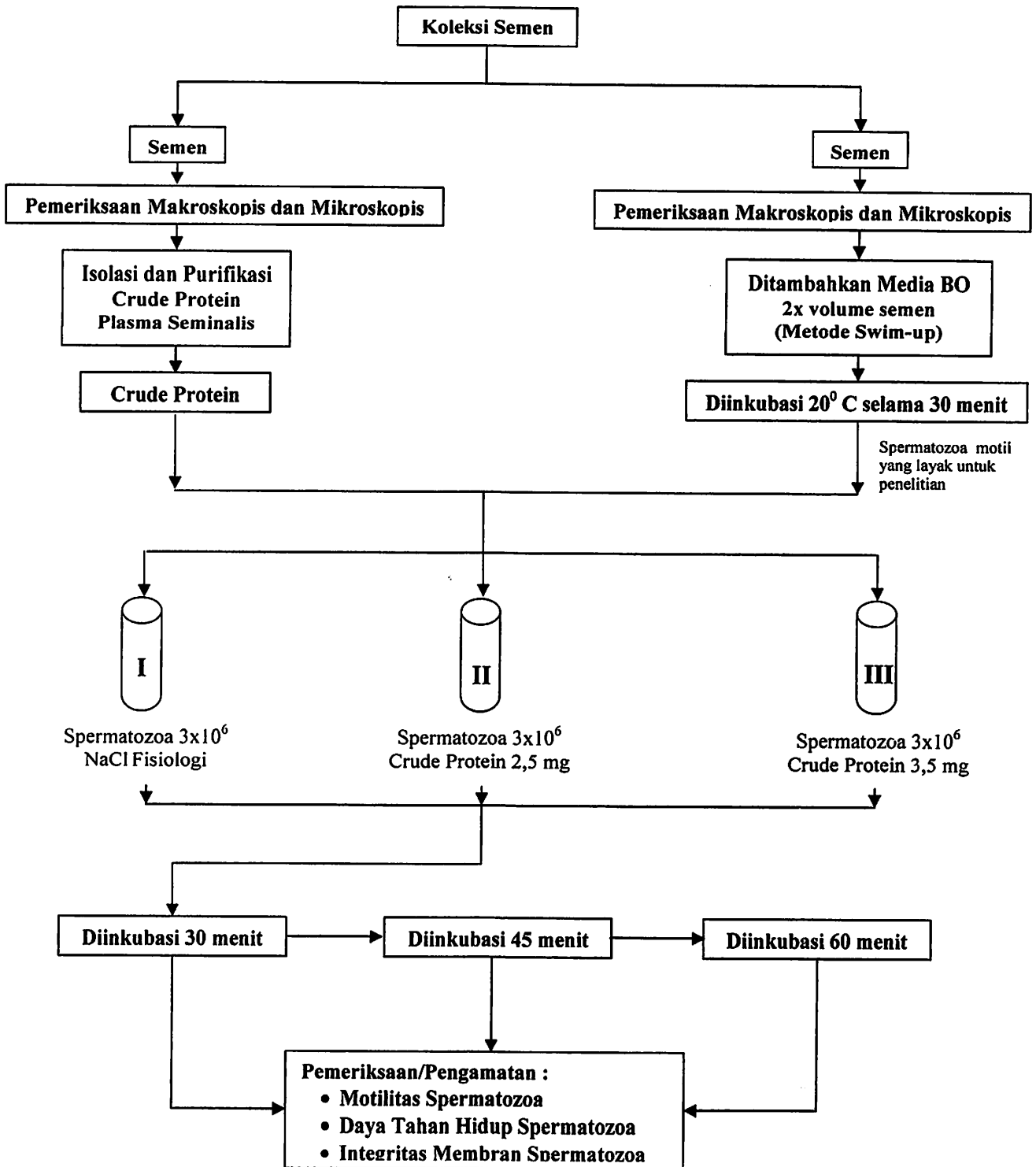
Penilaian berdasarkan persentase daya tahan hidup sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Angka yang diberikan berkisar antara 0% sampai 100% (Lampiran 17).

3. Integritas sel spermatozoa kambing

Penilaian berdasarkan persentase perubahan bentuk pada ekor. Membran yang utuh ditunjukkan dengan persentase sel spermatozoa yang ekornya melingkar dibanding seluruh sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang. Angka yang diberikan berkisar antara 0% sampai 100% (Lampiran17).

3.6. Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan SPSS *two way Anova* (*Analysis of Variant*) dan jika F hitung lebih besar dari F tabel maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, yaitu ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan dan waktu pengamatan. Jika ada beda yang bermakna, diteruskan dengan uji jarak berganda Duncan (Santoso, 2004).



Gambar 3.3. Skema Rancangan Penelitian

BAB 4**HASIL PENELITIAN****4.1. Pemeriksaan Semen Kambing Sebelum Perlakuan**

Semen kambing sebelum perlakuan terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, konsistensi, bau, warna dan pH sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, motilitas, hidup mati dan integritas membran. Hasil pemeriksaan semen kambing sebelum perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Kambing Sebelum Perlakuan

Data Pemetriksaan	Ulangan					
	1	2	3	4	5	6
Volume	0.8 ml	1 ml	0.8 ml	1 ml	1 ml	0.8 ml
Konsistensi	pekat	pekat	pekat	pekat	pekat	pekat
Bau	khas	khas	khas	khas	khas	khas
Warna	putih	putih	putih	putih	putih	putih
pH	7	7	7	7	6	7
Gerakan Massa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gerakan Individu	Progresif	Progresif	Progresif	Progresif	Progresif	Progresif
Motilitas (%)	90	90	90	90	90	85
HidupMati(%)	95	91	93	91	94	89
Integritas Membran (%)	80	84	92	90	93	88

4.2. Pemeriksaan Semen Kambing Setelah *Swim Up*

Setelah semen ditambahkan medium BO (Brackett and Oliphant's) dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit, spermatozoa yang motil akan bergerak ke atas permukaan medium, selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, daya tahan hidup dan integritas membran spermatozoa. Hasil pemeriksaan semen kambing setelah *swim up* dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Kambing Setelah Swim Up

Data Pemeriksaan	Ulangan						Total	Rata-rata (%)
	1	2	3	4	5	6		
Motilitas (%)	85	80	85	85	85	80	500	83.33
Hidup Mati(%)	89	81	90	88	86	81	515	85.83
Integritas Membran (%)	79	78	88	80	88	84	497	82.83

Semen kambing setelah *swim up* masih memenuhi kriteria normal, yaitu motilitas antara 80 % - 85 % dengan rata-rata 83,33 %, spermatozoa hidup antara 81 % - 90 % dengan rata-rata 85,83 % dan integritas membran antara 78 % - 88 % dengan rata-rata 82,83 %.

4.3. Pemeriksaan Mikroskopis Semen Kambing Setelah Perlakuan

4.3.1. Motilitas Spermatozoa

Setelah semen kambing diberi perlakuan, maka dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.3. dan 4.4.

Tabel 4.3. Rata-rata motilitas spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu

Waktu Pengamatan	N	Motilitas Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
T1 (menit ke 30)	18	56.94 ^a \pm 4.76
T2 (menit ke 45)	18	53.71 ^b \pm 5.39
T3 (menit ke 60)	18	49.21 ^c \pm 5.03

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

Berdasarkan hasil uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.01), sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata antara ketiga waktu pengamatan terhadap motilitas spermatozoa (Lampiran 4).

Penurunan motilitas spermatozoa pada menit ke 30 berbeda sangat nyata dengan menit ke 45 dan 60. Penurunan paling tinggi dari motilitas spermatozoa terjadi pada menit ke 60, sehingga makin lama waktu pengamatan, motilitas spermatozoa makin menurun.

Tabel 4.4. Rata-rata motilitas spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda

Perlakuan	N	Motilitas Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
P1 (CP 2,5 mg)	18	56.58 ^a \pm 4.44
P2 (CP 3,5 mg)	18	55.37 ^a \pm 4.55
P0 (kontrol)	18	47.90 ^b \pm 4.66

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

Berdasarkan uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel} (0.01)$, sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Motilitas spermatozoa pada P1 dan P2 berbeda sangat nyata dengan P0 (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan crude protein dapat mempertahankan motilitas spermatozoa. Sedangkan pada P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata sehingga dosis crude protein tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa.

4.3.2. Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Hasil pemeriksaan daya tahan hidup spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.5. dan Tabel 4.6.

Tabel 4.5. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu

Waktu Pengamatan	N	Daya Tahan Hidup Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
T1 (menit ke 30)	18	60.15 ^a \pm 5.53
T2 (menit ke 45)	18	55.82 ^b \pm 5.61
T3 (menit ke 60)	18	51.51 ^c \pm 5.26

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

Berdasarkan hasil uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.01), sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata antara ketiga waktu pengamatan terhadap daya tahan hidup spermatozoa (Lampiran 8).

Penurunan daya tahan hidup spermatozoa pada menit ke 30 berbeda sangat nyata dengan menit ke 45 dan 60. Penurunan paling tinggi dari daya tahan hidup spermatozoa terjadi pada menit ke 60, sehingga makin lama waktu pengamatan, daya tahan hidup spermatozoa makin menurun dan makin banyak pula spermatozoa yang mati.

Tabel 4.6. Rata-rata daya tahan hidup spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda

Perlakuan	N	Motilitas Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
P1 (CP 2,5 mg)	18	59.06 ^a \pm 5.01
P2 (CP 3,5 mg)	18	58.26 ^a \pm 5.31
P0 (kontrol)	18	50.15 ^b \pm 4.94

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

Berdasarkan uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.01), sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Daya tahan hidup spermatozoa pada P1 dan P2 berbeda sangat nyata dengan P0 (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan crude protein dapat mempertahankan daya tahan hidup dari spermatozoa. Sedangkan pada P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata sehingga dosis crude protein tidak berpengaruh terhadap daya tahan hidup spermatozoa.

4.3.3. Integritas Membran Spermatozoa

Hasil pemeriksaan integritas membran dari spermatozoa dengan HOS Test (*hypo osmotic swelling test*) dapat dilihat pada Tabel 4.7. dan Tabel 4.8.

Tabel 4.7. Rata-rata integritas membran spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing pada selang waktu tertentu

Waktu Pengamatan	N	Integritas Membran Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
T1 (menit ke 30)	18	58.57 ^a \pm 4.57
T2 (menit ke 45)	18	54.93 ^b \pm 5.15
T3 (menit ke 60)	18	51.06 ^c \pm 5.16

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

Berdasarkan hasil uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.01), sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata antara ketiga waktu pengamatan terhadap integritas membran spermatozoa (Lampiran 12).

Penurunan integritas membran spermatozoa pada menit ke 30 berbeda sangat nyata dengan menit ke 45 dan 60. Penurunan paling tinggi dari integritas membran spermatozoa terjadi pada menit ke 60, sehingga makin lama waktu pengamatan, integritas membran spermatozoa makin menurun.

Tabel 4.8. Rata-rata integritas membran spermatozoa setelah ditambah crude protein plasma seminalis kambing dengan dosis berbeda

Perlakuan	N	Integritas Membran Spermatozoa Rataan \pm SD (%)
P1 (CP 2,5 mg)	18	57.6933 ^a \pm 2.93340
P2 (CP 3,5 mg)	18	57.3967 ^a \pm 5.03435
P0 (kontrol)	18	49.4900 ^b \pm 4.93116

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

Berdasarkan uji F didapatkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.01), sehingga terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Integritas membran spermatozoa pada P1 dan P2 berbeda sangat nyata dengan P0 (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan crude protein selain mempertahankan motilitas dan daya tahan hidup juga dapat mempertahankan integritas membran dari spermatozoa. Sedangkan pada P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata sehingga dosis crude protein tidak berpengaruh terhadap integritas membran spermatozoa.

BAB 5

PEMBAHASAN

Penyediaan semen segar untuk keperluan inseminasi buatan dan ferlilisasi in-vitro pada kambing harus memperhatikan kualitas dan kuantitas semen, agar menghasilkan angka konsepsi yang baik. Kualitas dan kuantitas semen pada kambing dipengaruhi oleh makanan (protein, mineral dan vitamin), suhu dan musim, frekuensi ejakulasi, libido, penyakit, transportasi, umur, herediter dan latihan (Toelihere, 1985).

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2, hasilnya menunjukkan bahwa semen kambing hasil pemeriksaa awal dan pemeriksaa setelah *swim-up* memenuhi syarat untuk digunakan dalam penelitian, yaitu motilitas dan spermatozoa hidup diatas 80 %, integritas membran diatas 78 %. Sedangkan hasil pemeriksaa makroskopis didapatkan volume antara 0,8 ml sampai dengan 1 ml, pH berkisar antara 6 – 7, warna putih, bau khas semen kambing dan konsistensi pekat.

Hasil uji dengan *Analisis of Variant (Anova)* menunjukkan bahwa rata-rata motilitas, daya tahan hidup dan integritas membran pada spermatozoa hasil *swim-up* yang telah ditambah dengan crude protein plasma seminalis berbeda sangat nyata dengan spermatozoa pada kelompok kontrol yang ditambah dengan larutan NaCl fisiologis. Hal ini disebabkan oleh crude protein plasma seminalis mengandung beberapa fraksi protein (tujuh) yang dapat mempertahankan dan

memberikan perlindungan yang optimal pada kualitas spermatozoa khususnya membran plasma spermatozoa selama proses pengamatan (Susilowati, 2006).

Adanya perlindungan terhadap membran plasma sel akan berpengaruh positif terhadap proses metabolisme di dalam sel yang akhirnya akan memperbaiki peubah kualitas spermatozoa yang lain, seperti motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Selain itu, keutuhan membran plasma mampu mengatur dengan baik lalu lintas masuk dan keluar sel dari semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan pada proses metabolisme (Herdis, 2006).

Penurunan tertinggi dari kualitas spermatozoa terjadi pada menit ke 60 bila dibandingkan dengan menit ke 30 dan 45. Penurunan kualitas ini terjadi akibat semakin banyaknya spermatozoa yang mati dan menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup. Selain itu juga diduga adanya stres berat yang dapat menyebabkan stres oksidatif (ketidakseimbangan antara jumlah SOR dengan sistem antioksidan). Pada stres oksidatif jumlah SOR (Senyawa Oksigen Reaktif) sangat meningkat atau kapasitas sistem antioksidan tubuh sangat menurun, yang mengakibatkan reaksi patologis antara SOR dengan molekul biologis sehingga struktur dan fungsinya dapat berubah (Halliwell, 1991).

Pada proses biologis alami, SOR tersebut terbentuk dari oksigen yang diperlukan spermatozoa untuk menghasilkan energi yang berupa ATP melalui proses *forforilasi oksidatif* di dalam mitokondria. Dalam keadaan normal SOR diperlukan untuk merangsang hiperaktivasi dan kapasitas spermatozoa, namun dalam konsentrasi tinggi dan tidak mampu diredam oleh antioksidan yang ada

dalam plasma semen akan merusak komponen-komponen penting sel sehingga tidak dapat mempertahankan integritas membran dan kehidupan spermatozoa.

Kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme spermatozoa dalam menghasilkan energi bagi kehidupan dan pergerakan spermatozoa yang berlangsung di dalam mitokondria, sehingga rata-rata persentase motilitas dan daya tahan hidup menjadi menurun. Mitokondria memiliki sistem enzim yang menggerakkan siklus Krebs dan transpot elektron serta *fosforilasi oksidatif* yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP (*Adenosin Triphosphate*) untuk menggerakkan spermatozoa (Hinting, 1989).

Penurunan kualitas spermatozoa pada kelompok P1 dan P2 masih dapat dipertahankan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (P0), hal ini diduga crude protein plasma seminalis mengandung sistem antioksidan yang mampu meredam pengaruh radikal bebas yang timbul karena stres oksidatif.

Wijaya (1996) menerangkan bahwa terdapat sistem antioksidan dalam tubuh yang mampu melindungi spermastozoa dari efek negatif SOR. Kelompok antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan SOR yang baru. Antioksidan dalam kelompok ini antara lain superoksida dismutase, katalase, glutation peroksidase dan protein. Kelompok antioksidan sekunder, bertindak mengikat SOR dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan yang termasuk kelompok ini adalah vitamin E dan C, asam urat, bilirubin dan albumin. Kelompok antioksidan tersier berfungsi memperbaiki kerusakan biomolekuler yang disebabkan oleh SOR, seperti enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfoksida reduktase.

Perlakuan P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata, hal ini menjadi indikasi bahwa kadar crude protein plasma seminalis (2,5 mg dan 3,5 mg) masih dalam rentan yang sama dalam mempengaruhi kualitas spermatozoa. Kadar crude protein plasma seminalis tersebut dapat meningkatkan kualitas dari spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (P0). Berdasarkan hasil penelitian Barrios *et al* (2000) 83 % dari 1×10^6 spermatozoa domba dapat dicegah kerusakan membran plasmanya dengan penambahan 1,4 mg protein plasma seminalis setelah diinkubasi selama 60 menit.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data terhadap variable penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Penambahan crude protein plasma seminalis kambing pada spermatozoa hasil *swim up* dapat mempertahankan motilitas spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Penambahan crude protein plasma seminalis kambing pada spermatozoa hasil *swim up* dapat mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.
3. Penambahan crude protein plasma seminalis kambing pada spermatozoa hasil *swim up* dapat mempertahankan integritas membran spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

6.2. Saran

Perlunya pengembangan dan penelitian lebih lanjut terhadap pengaruh penambahan crude protein plasma seminalis kambing pada proses pembekuan semen (*frozen semen*).

RINGKASAN

Semakin meningkatnya permintaan terhadap kambing untuk berbagai keperluan harus diantisipasi dengan mendorong usaha peternakan kambing untuk lebih produktif, efektif dan efisien sehingga populasi kambing akan meningkat dan dapat memenuhi kebutuhan pasar domestik. Upaya untuk meningkatkan populasi kambing di Indonesia dilakukan dengan memperbaiki mutu genetik kambing lokal dengan cara persilangan dengan kambing bergenetik unggul melalui teknologi Inseminasi Buatan (IB), fertilisasi in-vitro (IVF), dan transfer embrio (TE) (Pasaribu dan Imam, 1992).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran crude protein plasma seminalis semen kambing untuk meningkatkan kualitas dari spermatozoa kambing baik untuk tujuan Inseminasi Buatan (IB) dan Fertilisasi In-Vitro (IVF).

Kerusakan membran plasma sel spermatozoa pada proses pembekuan akan mempengaruhi motilitas dan daya hidup dari spermatozoa, sehingga kualitas dari spermatozoa sendiri akan menurun. Untuk mencegah hal tersebut dapat dilakukan dengan mengurangi kerusakan membran plasma sel spermatozoa dengan penambahan crude protein plasma seminalis semen kambing yang terdiri dari tujuh fraksi protein dengan berat molekul yang berbeda-beda.

Bahan penelitian adalah semen segar kambing PE (Peranakan Etawa) umur 2 – 3 tahun, crude protein plasma seminalis semen kambing, larutan HOS (*hypo osmotic swelling*), NaCl fisiologi, medium BO (*Brackett and Oliphant's*), pewarna eosin dan eosin-negrosin. Penelitian ini menggunakan tiga perlakuan,

yaitu larutan NaCl fisiologis sebagai kontrol (P0), crude protein kadar 2,5 mg (P1), crude protein kadar 3,5 mg (P2). Semen kambing diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Kemudian semen diberi perlakuan dan diperiksa motilitas, daya tahan hidup dan integritas membran spermatozoa pada menit ke 30, 45 dan 60.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P1 dan P2 berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (P0), Sedangkan pada P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Penurunan kualitas spermatozoa pada menit ke 30 berbeda nyata dengan menit ke 45 dan 60. Jadi dapat disimpulkan bahwa penambahan crude protein plasma seminalis semen kambing dapat memperbaiki kualitas spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selanjutnya, disarankan adanya pengembangan dan penelitian lebih lanjut terhadap pengaruh penambahan crude protein plasma seminalis semen kambing pada proses pembuatan semen beku (frozen semen).

DAFTAR PUSTAKA

- Aurich, J.E., A. Kuhne, H. Hoppe, and C. Aurich. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46:791-797
- Barrios, B., G. Margarita., T. Agustin. 2000. Semminal Plasma Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Bio of Reproduction*. 63: 1531-1537
- Bearden, J.H. and J. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction* 3rd Edition. Prentice hall. Englewood Cliffs. New Jersey. 136-137, 141.
- Djarajah, A.S. 1996. *Usaha Ternak Kambing*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Diwyanto, K. 2005. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kambing dan Domba. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Hafez, E.S.E. 1987. *Reproduction in Farm Animal*. 5th Edition. Lea and Febringer. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Preservation and Cryopreservation of Gametee and Embryo*. In: E.S.E. (Ed) *Reproductions in farm Animals* 7th ed. Lea ang febringer. Philadelphia.
- Halliwell, B. 1991. *Reactive Oxygen Species in Living System ; Source, Biochemistry and Role in Human Desiase*. *Am. J. Med.* 91.
- Halliwell, B. And J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*. 3rd edition. Oxford Univ Press. New York.
- Hardjopranjoto, S. 1987. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Hardijanto., S. Trilas., H. Tatic., S. Suherni., S. Tri. 2004. *Diktat Praktikum Ilmu Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga*. Surabaya.
- Hardjoparnjoto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press. H: 55-69
- Herdis., S. Maman., R. Muhammad. 2006. Pengaruh Penambahan Plasma Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Epididimis Domba yang Telah Dibekukan. *J. Media Ked. Hewan*. 22: 42-46

- Hinting, A. 1989. Assessment of Human Sperm Fertilizing Ability. Tesis Submitted in fulfillment of requirements for the Degree of Special Doctor in Reproduction Medicine. Rijksuniversiteit. Gent. Belgium. P:166-170
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Institut Teknologi Bandung, Universitas Udayana. H:124-151
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi pada ternak. Edisi Kedua. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 7-12, 21-29.
- Jayendra, R.S., Van der Ven, H.H., Pelez-Pelaez. 1984. Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and its Relationship to Other Semen Characteristics. J. Reprod Fertil. 70. 219-228 [abstract]
- Mafruchati, M. E.M. Luqman, Widjianti, B. Poernomo dan N. Arijani. 1997. *Pemeriksaan Membran Spermatozoa pada Semen Beku Domba setelah Dicairkan*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Maxwell, W.M.C., G. Evans, S.T. Mortimer, L. Gillian, E.S. Gellaty, and C.A. McPhie. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. Reprod. Fertil. Dev. 11:123-126.
- Mulyana, W. 2003. Cara Beternak Kambing. Semarang: PT. Aneka Ilmu.
- Pasaribu, F.H. dan Imam, S. 1992. *Invitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Riadi, S. 2004. Perubahan Karakter Ejakulat dan Aktivitas Antioksidan pada Masa Reproduksi Kambing Kacang dan Kambing Peranakan Etawa. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Salisbury, G.W. and Van Demark, N. L. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Januar, R. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. H:270-336.
- Santoso, S. 2004. Mengatasi Berbagai Masalah dengan SPSS Versi 11.5. Cetakan kedua. PT Elex Media Komputindo. Jakarta. 305-313.
- Siregar, P. 1992. Metabolit Oksigen Radikal Bebas dan Kerusakan Jaringan. *Cermin Dunia Kedokteran*. 80: 112-115.

Lampiran 1. Hasil Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Perlakuan	Ulangan	Motilitas spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	50	45	40
	2	60	55	50
	3	65	60	55
	4	65	60	50
	5	65	60	45
	6	65	55	45
P1	1	80	80	70
	2	70	65	60
	3	80	75	70
	4	70	65	60
	5	75	70	60
	6	75	65	60
P2	1	80	80	60
	2	70	65	60
	3	75	70	70
	4	70	65	60
	5	75	70	60
	6	70	60	55

Lampiran 2. Hasil Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa Sesudah Transformasi

Perlakuan	Ulangan	Motilitas spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	45.00	42.13	39.23
	2	50.77	47.87	45.00
	3	53.73	50.77	47.87
	4	53.73	50.77	45.00
	5	53.73	50.77	42.13
	6	53.73	47.87	42.13
P1	1	63.44	63.44	56.79
	2	56.79	53.73	50.77
	3	63.44	60.00	56.79
	4	56.79	53.73	50.77
	5	60.00	56.79	50.77
	6	60.00	53.73	50.77
P2	1	63.44	63.44	50.77
	2	56.79	53.73	50.77
	3	60.00	56.79	56.79
	4	56.79	53.73	50.77
	5	60.00	56.79	50.77
	6	56.79	50.77	47.87

Lampiran 3. Descriptive Statistics Motilitas Spermatozoa**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Arc. Sin Vy1%

Waktu	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
30 menit	P0	51.7817	3.52700	6
	P1	60.0767	2.97456	6
	P3	58.9683	2.69666	6
	Total	170.8266 ~ 56.9422	4.76609	18
45 menit	P0	48.3633	3.36801	6
	P1	56.9033	4.06301	6
	P3	55.8750	4.33974	6
	Total	161.1417 ~ 53.7139	5.39200	18
60 menit	P0	43.5600	3.01868	6
	P1	52.7767	3.10871	6
	P3	51.2900	2.93353	6
	Total	147.6267 ~ 49.2089	5.03360	18
Total	P0	47.9017	4.66012	6
	P1	56.5856	4.44496	6
	P3	55.3778	4.55457	6
	Total	159.8649 ~ 53.2883	5.91493	18

Lampiran 4. Pengolahan Data Motilitas Spermatozoa dengan SPSS

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Arc. SinVy1%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1341.145 ^a	8	167.643	14.702	.000
Intercept	153340.909	1	153340.909	13447.459	.000
Waktu	543.130	2	271.565	23.815	.000
Perlakuan	796.565	2	398.283	34.928	.000
Waktu * Perlakuan	1.450	4	.363	.032	.998
Error	513.133	45	11.403		
Total	155195.188	54			
Corrected Total	1854.279	53			

a. R Squared = .723 (Adjusted R Squared = .674)

Post Hoc Tests

Waktu

Homogeneous Subsets

Arc. SinVy1%

Duncan ^{a,b}

Waktu	N	Subset		
		1	2	3
60 menit	18	49.2089		
45 menit	18		53.7139	
30 menit	18			56.9422
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 11.403.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 5. Hasil Pemeriksaan Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Perlakuan	Ulangan	Daya tahan hidup spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	55	48	43
	2	65	58	53
	3	72	65	60
	4	68	62	53
	5	70	64	50
	6	67	58	48
P1	1	87	82	73
	2	73	69	63
	3	84	78	74
	4	76	68	64
	5	80	72	62
	6	80	69	64
P2	1	88	83	66
	2	73	68	64
	3	81	78	73
	4	75	68	62
	5	78	74	70
	6	73	62	58

Lampiran 6. Hasil Pemeriksaan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sesudah Transformasi

Perlakuan	Ulangan	Daya tahan hidup spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	47.87	43.85	40.98
	2	53.73	49.60	46.72
	3	58.05	53.73	50.77
	4	55.55	51.94	46.72
	5	56.79	53.13	45.00
	6	54.94	49.60	43.85
P1	1	68.87	64.90	58.69
	2	58.69	56.17	52.53
	3	66.42	62.03	59.34
	4	60.67	55.55	53.13
	5	63.44	58.05	51.94
	6	63.44	56.17	53.13
P2	1	69.73	65.65	54.33
	2	58.69	55.55	53.13
	3	65.16	62.03	58.69
	4	60.00	55.55	51.94
	5	62.03	59.34	56.79
	6	58.69	51.94	49.60

Lampiran 7. Descriptive Statistics Daya Tahan Hidup Spermatozoa**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Arc. Sin Vy2%

Waktu	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
30 menit	P0	54.4883	3.56908	6
	P1	63.5883	3.70050	6
	P3	62.3833	4.35362	6
	Total	180.4599 ~ 60.1533	5.53128	18
45 menit	P0	50.3083	3.60681	6
	P1	58.8117	3.81053	6
	P3	58.3433	4.99160	6
	Total	167.4633 ~ 55.8211	5.61721	18
60 menit	P0	45.6733	3.28549	6
	P1	54.7933	3.30617	6
	P3	54.0800	3.29276	6
	Total	154.5468 ~ 51.5156	5.26670	18
Total	P0	50.1567	4.94695	6
	P1	59.0644	5.01969	6
	P3	58.2689	5.31317	6
	Total	167.4900 ~ 55.8300	6.44215	18

Lampiran 8. Pengolahan Data Daya Tahan Hidup Spermatozoa dengan SPSS**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Arc. Sin Vy2%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1547.574 ^a	8	193.447	13.352	.000
Intercept	168317.401	1	168317.401	11617.101	.000
Waktu	671.503	2	335.751	23.173	.000
Perlakuan	874.737	2	437.369	30.187	.000
Waktu * Perlakuan	1.334	4	.333	.023	.999
Error	651.994	45	14.489		
Total	170516.969	54			
Corrected Total	2199.568	53			

a. R Squared = .704 (Adjusted R Squared = .651)

Post Hoc Tests**Waktu****Homogeneous Subsets**

Arc. Sin Vy2%

Duncan ^{a,b}

Waktu	N	Subset		
		1	2	3
60 menit	18	51.5156		
45 menit	18		55.8211	
30 menit	18			60.1533
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 14.489.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

Post Hoc Tests**Perlakuan****Homogeneous Subsets**

Arc. Sin Vy2%

Duncan ^{a,b}

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
P0	18	50.1567	
P2	18		58.2689
P1	18		59.0644
Sig.		1.000	.534

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 14.489.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.
- b. Alpha = .05.

Lampiran 9. Hasil Pemeriksaan Integritas Membran Spermatozoa

Perlakuan	Ulangan	Integritas membran spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	56	44	40
	2	65	55	54
	3	68	64	60
	4	64	63	60
	5	68	63	46
	6	65	56	48
P1	1	78	74	72
	2	77	70	68
	3	74	70	67
	4	75	72	70
	5	78	71	62
	6	75	68	63
P2	1	76	77	65
	2	79	74	61
	3	85	77	68
	4	73	70	68
	5	80	72	60
	6	70	62	55

Lampiran 10. Hasil Pemeriksaan Integritas Membran Spermatozoa Sesudah Transformasi

Perlakuan	Ulangan	Integritas membran spermatozoa (%)		
		30 menit	45 menit	60 menit
P0	1	48.45	41.55	39.23
	2	53.73	47.87	47.29
	3	55.55	53.13	50.77
	4	53.13	52.53	50.77
	5	55.55	52.53	42.71
	6	53.73	48.45	43.85
P1	1	62.03	59.34	58.05
	2	61.34	56.79	55.55
	3	59.34	56.79	54.94
	4	60.00	58.05	56.79
	5	62.03	57.42	51.94
	6	60.00	55.55	52.53
P2	1	60.67	61.34	53.73
	2	62.72	59.34	51.35
	3	67.21	61.34	55.55
	4	58.69	56.79	55.55
	5	63.44	58.05	50.77
	6	56.79	51.94	47.87

Lampiran 11. Descriptive Statistics Integritas Membran Spermatozoa**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Arc. Sin Vy3%

Waktu	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
30 menit	P0	53.3567	2.60871	6
	P1	60.7900	1.16003	6
	P3	61.5867	3.70352	6
	Total	175.7334 ~ 58.5778	4.57988	18
45 menit	P0	49.3433	4.43516	6
	P1	57.3233	1.28980	6
	P3	58.1333	3.52676	6
	Total	164.7999 ~ 54.9333	5.15674	18
60 menit	P0	45.7700	4.65042	6
	P1	54.9667	2.37784	6
	P3	52.4700	3.02869	6
	Total	153.2067 ~ 51.0689	5.16590	18
Total	P0	49.4900	4.93116	6
	P1	57.6933	2.93340	6
	P3	57.3967	5.03435	6
	Total	164.5800 ~ 54.8600	5.77880	18

Lampiran 12. Pengolahan Data Integritas Membran Spermatozoa dengan SPSS**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Arc. Sin Vy3%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1309.445 ^a	8	163.681	15.996	.000
Intercept	162519.458	1	162519.458	15882.608	.000
Waktu	507.596	2	253.798	24.803	.000
Perlakuan	779.388	2	389.694	38.084	.000
Waktu * Perlakuan	22.461	4	5.615	.549	.701
Error	460.464	45	10.233		
Total	164289.368	54			
Corrected Total	1769.910	53			

a. R Squared = .740 (Adjusted R Squared = .694)

Post Hoc Tests**Waktu****Homogeneous Subsets**

Arc. Sin Vy3%

Duncan ^{a,b}

Waktu	N	Subset		
		1	2	3
60 menit	18	51.0689		
45 menit	18		54.9333	
30 menit	18			58.5778
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 10.233.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.
- Alpha = .05.

Post Hoc Tests**Perlakuan****Homogeneous Subsets**

Arc. Sin Vy3%

Duncan ^{a,b}

Perlakuan	N	Subset	
		1	2
P0	18	49.4900	
P2	18		57.3967
P1	18		57.6933
Sig.		1.000	.782

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 10.233.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.
- b. Alpha = .05.

Lampiran 13. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen kambing yang digunakan sebagai crude protein plasma seminalis

NK	Makroskopis					Mikroskopis			
	Vol	Konst	Bau	Warna	pH	GM	GI	M (%)	H (%)
1	0.6 ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	60	65
2	0.4 ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	60	65
3	0.6ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	70	74
4	1ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	70	71
5	0.8ml	pekat	khas	Putih pekat	6	+++	P	80	83
6	0.8ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	80	84
7	0.3ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	70	72
8	0.4ml	pekat	khas	Putih pekat	6	+++	P	80	82
9	0.8ml	pekat	khas	Putih pekat	6	++	P	60	78
10	0.5ml	pekat	khas	Putih pekat	6	+++	P	70	75

Keterangan :

- NK : nomor kambing
- Vol : volume smen
- Konst : konsentrasi semen
- GM : gerakan massa
- GI : gerakan individu
- H (%) : persentase hidup spermatozoa
- M (%) : persentase motilitas spermatozoa
- +++ : sangat baik
- ++ : baik
- P : progresif

Lampiran 14. Hasil Peneraan Kadar Crude Protein Plasma Seminalis Kambing dengan Spektrofotometer

NO.	Nama	Hasil
1	Kambing 1	3.192 gr/dl
2	Kambing 2	4.080 gr/dl
3	Kambing 3	4.124 gr/dl
4	Kambing 4	5.522 gr/dl
5	Kambing 5	3.614 gr/dl
6	Kambing 6	3.139 gr/dl
7	Kambing 7	0.844 gr/dl
8	Kambing 8	2.998 gr/dl
9	Kambing 9	5.742 gr/dl
10	Kambing 10	3.262 gr/dl

Lampiran 15. Komposisi Medium BO (Brackett and Oliphant's)

Komposisi medium BO	Jumlah
Medium A	76,0 ml
Medium B	24,0 ml
Glukosa	0,15 gr
Sod. Pyruvate	0,0137 gr
Gentamycin	

Keterangan :

Medium A (500 ml), terdiri dari :

- NaCl	4,3092	gr
- Kcl	0,1974	gr
- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2171	gr
- NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,0840	gr
- MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0697	gr
- Phenol Red 0,5 %	0,1	ml
- Distilled Water	600,0	ml

Medium B (200 ml), terdiri dari :

- NaHCO ₃	2,5873	gr
- Phenol Red 0,5 %	0,04	ml
- Distilled Water	200,0	ml

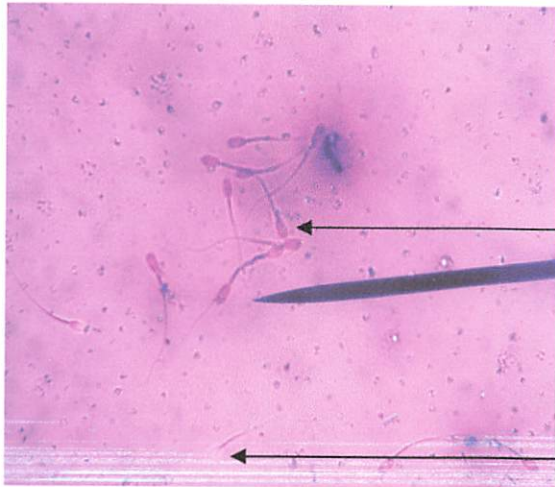
Lampiran 16. Komposisi larutan HOS (*Hypo Osmotic Swelling*)

Komposisi Larutan HOS 1000 ml	Jumlah
Natrium citrat 2H ₂ O	7.35 g
Fruktosa	13,52 g
Aquades ad	1000 ml

Pembuatan : 7.35 g Natrium citrat 2H₂O dan 13, 52 fruktosa dilarutkan dalam aquadest hingga mencapai 1000 ml, sehingga didapatkan larutan hipoosmotik 150 m osmol

Jayendra, R.S., Van dr Ven, H.H., Pelez-Pelaez. 1984.

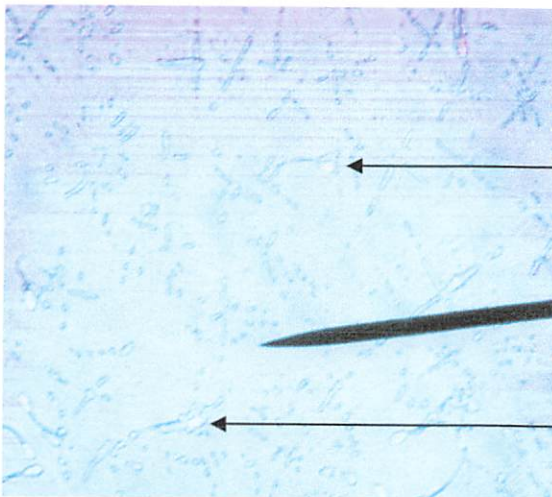
Lampiran 17. Gambar Hasil Penelitian



Spermatozoa mati (bagian kepala berwarna merah)

Spermatozoa hidup (tidak berwarna)

**Spermatozoa hidup dan mati
(Pewarnaan eosin-negrosin, perbesaran 400x)**

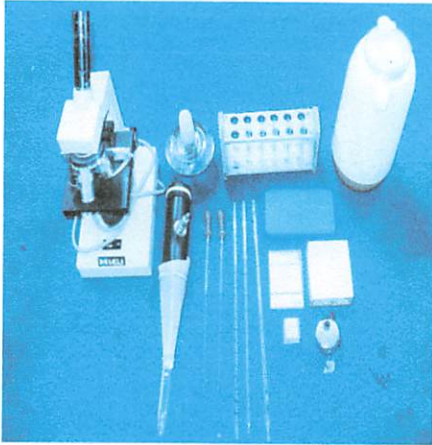


Spermatozoa yang membrannya utuh (ekor melengkung)

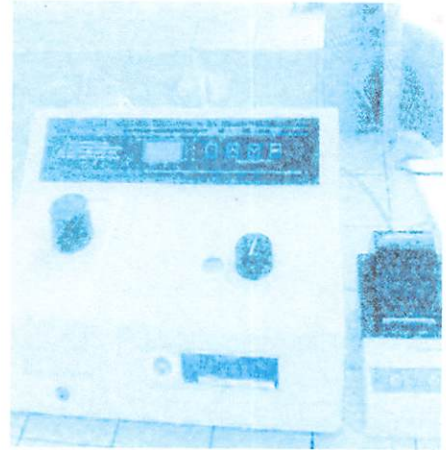
Spermatozoa yang membrannya rusak (ekor lurus)

**Spermatozoa yang mengalami swelling
(Pewarnaan eosin, perbesaran 400x)**

Lampiran 18. Gambar Alat-alat Penelitian



Alat-alat Penelitian



Spektrofotometer



Inkubator 5 % CO₂



Centrifuse Dingin