

SKRIPSI

**KUALITAS SEMEN BEKU HASIL PEMISAHAN SPERMATOZOA SAPI
FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN MENGGUNAKAN PUTIH TELUR
PADA TEKNIK KOLOM ALBUMIN**



Oleh :

MARIA SARININGSIH
SAMARINDA-KALIMANTAN TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

LEMBAR PENGESAHAN

**KUALITAS SEMEN BEKU HASIL PEMISAHAN SPERMATOZOA SAPI
FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN MENGGUNAKAN PUTIH TELUR
PADA TEKNIK KOLOM ALBUMIN**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh :

Maria Sariningsih
NIM 060112896

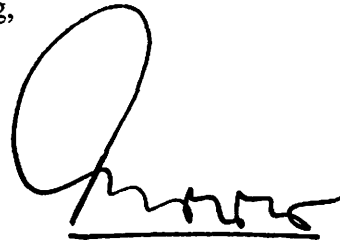
Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Nunuk Dyah Retno L.,M.S.,Drh.)

Pembimbing Pertama



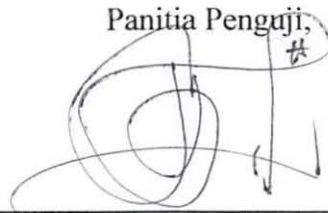
(Prof.Dr.Ismudiono,M.S.,Drh.)

Pembimbing Kedua

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

Menyetujui

Panitia Penguji,



(Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., Drh.)

Ketua



(Epy Muhammad Luqman, M.Si., Drh.)

Sekretaris



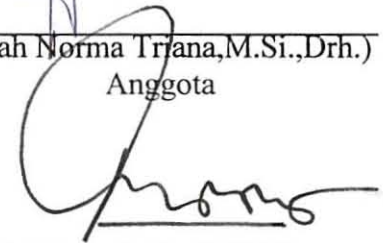
(Nunuk Dyah Retno L., M.S., Drh.)

Anggota



(Indah Norma Triana, M.Si., Drh.)

Anggota



(Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.)

Anggota

Surabaya, 9 Mei 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



(Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.)

NIP. 130 687 297

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT berkat rahmat dan hidayah-Nya, penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan .

Pada kesempatan ini , penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, atas bantuan moral dan material sejak penulis masuk ke FKH Unair.
2. Ibu Nunuk Dyah Retno L., M.S., Drh., selaku Dosen Pembimbing Pertama, atas bimbingan, saran, kritik dan nasihat yang sangat berguna dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Bapak Prof.Dr.Ismudiono, M.S., Drh., selaku Dosen pembimbing Kedua, atas bantuan, bimbingan, penjelasan dan informasi yang sangat berguna dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Arimbi, M.Kes., Drh., selaku Dosen Wali, atas nasihat, bimbingan dan dukungan yang telah diberikan.
5. Bapak Abdul Samik, M.Si., Drh., atas semua bantuan, bimbingan, dukungan dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti proyek Due-Like Batch III.
6. Bapak Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh. dan Bapak Trilas Sardjito, M.Si., Drh., atas semua bantuan yang telah diberikan selama penelitian di Teaching Farm (TF).
7. Ibu Erma Safitri, M.Si., Drh., Bapak Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh., Ibu Rr Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh., Bapak Husni Anwar, Drh., serta

semua dosen dan staf Bagian Fisiologi dan Teknologi Reproduksi yang belum dapat saya sebutkan satu per satu.

8. Mbak Yenny, Mas Erwin, Mbak Rosa, Mas Rivo, Mas Abe, Ulve dan Ardit, atas semua bantuan serta kejasama tim yang kompak.
9. Kiki, Dita dan Mbak Dian, atas bantuan transportasi ke TF.
10. Mas Azis dan Mas Danar serta semua staf TF yang telah banyak direpotkan.
11. Ibu, (Alm.) Bapak, Nenek dan anggota keluarga lain yang selalu mencintai dan mendukung penulis terutama dalam melalui hari-hari penelitian serta penyusunan skripsi yang berat dan melelahkan.
12. Dwi, Yulia, Anik, Londo, Yantic dan semua teman angkatan 2001 yang penulis cintai.
13. Semua pihak yang telah membantu penyusunan makalah ini baik langsung maupun tidak langsung.

Akhirnya, penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, semoga hasil-hasil yang dituangkan dalam skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan peternakan di Indonesia.

KUALITAS SEMEN BEKU HASIL PEMISAHAN SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN HOLSTEIN DENGAN MENGGUNAKAN PUTIH TELUR PADA TEKNIK KOLOM ALBUMIN

Maria Sariningsih

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh penambahan putih telur dalam diluter pada proses pemisahan spermatozoa sapi Friesian Holstein (FH) dengan teknik kolom albumin terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa fraksi atas dan bawah setelah pencairan (*post thawing*) semen beku.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Semen Beku, Taman Ternak Pendidikan (TTP), Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga di Kedamean, Gresik. Bahan penelitian ini adalah semen segar sapi perah FH milik TTP, diluter, putih telur, nitrogen cair dan ministraw kosong. Semen sapi FH diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Penelitian ini menggunakan empat perlakuan yaitu diluter Susu Skim Kuning Telur (SSKT) yang tidak mengandung putih telur sebagai kontrol (P0), 20 % putih telur (P1), 30 % putih telur (P2) dan 40 % putih telur (P3). Kemudian semen dicampur dengan diluter tersebut dan dilakukan pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin. Semen sapi hasil pemisahan tersebut lalu dibekukan dalam bentuk ministraw. Kualitas semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan teknik ini diketahui dengan menghitung spermatozoa motil, hidup dan abnormal setelah pencairan semen beku. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian dianalisis dengan uji F dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji F dengan taraf signifikan 5 % apabila terdapat perbedaan nyata antara perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan motilitas dan daya hidup spermatozoa fraksi atas dan bawah tertinggi dan berbeda nyata didapat pada perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur ($p \leq 0,05$) serta abnormalitas tertinggi tetapi tidak berbeda nyata didapat pada perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa putih telur dengan konsentrasi 30 % dapat digunakan untuk proses pemisahan spermatozoa sebelum pembekuan semen dan memberikan kualitas semen beku yang baik setelah dicairkan.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Landasan Teori.....	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
1.6 Hipotesis Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Sapi Friesian Holstein.....	8
2.2 Anatomi dan Fisiologi Alat Reproduksi Jantan.....	9
2.3 Fisiologi dan Morfologi Spermatozoa.....	14
2.4 Spermatozoa X dan Y serta Teknik Pemisahannya	18
2.5 Pemisahan Spermatozoa dengan Menggunakan Putih Telur pada Teknik Kolom Albumin	22
2.6 Semen Beku dan Pemeriksaan <i>Post Thawing</i>	24

BAB III. MATERI DAN METODE.....	29
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	29
3.2.1 Bahan Penelitian.....	29
3.2.2 Alat Penelitian.....	29
3.3 Metode penelitian.....	30
3.3.1 Pembuatan Diluter.....	30
3.3.2 Penampungan Semen.....	30
3.3.3 Pemeriksaan Semen secara Makroskopis dan Mikroskopis	30
3.3.4 Pemisahan Spermatozoa dengan Menggunakan Putih Telur pada Teknik Kolom Albumin	31
3.3.5 Pembekuan Semen Hasil Pemisahan Spermatozoa.....	32
3.3.6 Pemeriksaan <i>Post Thawing</i> Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa.....	33
3.4 Rancangan Penelitian.....	34
3.5 Peubah yang Diamati.....	34
3.6 Analisis Data.....	34
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	35
4.1 Pemeriksaan Semen Segar.....	35
4.2 Pemeriksaan Mikroskopis <i>Post Thawing</i> Semen Beku.....	37
4.2.1 Motilitas Spermatozoa.....	37
4.2.2 Daya Hidup Spermatozoa	39
4.2.3 Abnormalitas Spermatozoa.....	42

BAB V. PEMBAHASAN.....	46
5.1 Pemeriksaan Semen Segar.....	46
5.2 Pemeriksaan Mikroskopis <i>Post Thawing</i> Semen Beku.....	52
5.2.1 Motilitas Spermatozoa.....	52
5.2.2 Daya Hidup Spermatozoa.....	56
5.2.3 Abnormalitas Spermatozoa.....	60
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
6.1 Kesimpulan.....	64
6.2 Saran.....	64
RINGKASAN	66
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Perbedaan Spermatozoa X dan Y Ditinjau dari Beberapa Aspek...	19
4.1 Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar.....	35
4.2 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar.....	35
4.3 Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas.....	37
4.4 Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah.....	38
4.5 Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas.....	39
4.6 Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah.....	40
4.7 Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas.....	43
4.8 Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Alat Reproduksi Sapi Jantan Dewasa	10
2.2 Spermatozoa dengan Bagian-Bagiannya Dilihat dengan Mikroskop Elektron.....	18
2.3 Kemungkinan-Kemungkinan yang Dapat Ditemui dalam Memeriksa Spermatozoa yang Telah Diwarnai.....	28
4.1 Spermatozoa Hidup dan Mati.....	36
4.2 Spermatozoa Normal dan Abnormal.....	36
4.3 Grafik Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas.....	37
4.4 Grafik Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah.....	38
4.5 Grafik Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas.....	40
4.6 Grafik Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah.....	41
4.7 Spermatozoa Hidup dan Mati <i>Post Thawing</i> Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa.....	42
4.8 Grafik Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas.....	43
4.9 Grafik Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah.....	44
4.10 Spermatozoa Normal dan Abnormal <i>Post Thawing</i> Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Kimiawi Semen Sapi	75
2. Diagram Alur Pelaksanaan Penelitian.....	76
3. Data Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar.....	78
4. Data Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar.....	79
5. Data Hasil Pengamatan Kualitas Semen Setelah Pencairan Semen Beku (<i>Post Thawing</i>) Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X)	80
6. Data Hasil Pengamatan Kualitas Semen Setelah Pencairan Semen Beku (<i>Post Thawing</i>) Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y)	81
7. Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X).....	82
8. Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y).....	84
9. Analisis Statistik Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X).....	86
10. Analisis Statistik Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y).....	88
11. Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X).....	90
12. Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y).....	92

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Upaya untuk mengimbangi kebutuhan protein hewani asal ternak oleh masyarakat sangat membutuhkan peningkatan populasi dan produksi ternak. Menurut Paskalis (1999) upaya peningkatan populasi dan produksi ternak ini juga sangat bermanfaat untuk mengantisipasi era globalisasi ekonomi agar seluruh aspek ekonomi terutama sub sektor peternakan mampu bersaing dengan negara-negara lain.

Salah satu usaha nyata yang dilakukan pemerintah adalah program Inseminasi Buatan (IB) yang pelaksanaannya sudah dikenal luas oleh masyarakat terutama masyarakat pedesaan. Program ini telah terbukti bermanfaat untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak lokal melalui persilangan dengan bibit unggul dari luar negeri sehingga mendapat keturunan unggul (Paskalis, 1999). IB dapat meningkatkan populasi ternak dengan cepat bila didukung pengembangan bioteknologi di bidang reproduksi (Anwar dkk., 2005). Tetapi program IB ini belum mampu memenuhi keinginan peternak yang menginginkan ternak dengan jenis kelamin tertentu seperti peternak sapi potong menginginkan anak sapi jantan sedangkan peternak sapi perah seperti sapi Friesian Holstein (FH) menginginkan anak sapi betina (Paskalis, 1999).

Teknologi pemisahan spermatozoa berguna untuk mendapatkan keturunan atau anak sapi sesuai jenis kelamin yang diinginkan. Anak sapi betina dapat

dipelihara sebagai bakal induk yang mampu meningkatkan populasi sedangkan anak sapi jantan dapat digunakan sebagai hewan potong guna memenuhi kebutuhan protein hewani (Gordon, 2001).

Menurut Anwar dkk. (2005) jenis kelamin ditentukan oleh spermatozoa X dan Y yang dihasilkan pejantan. Melalui bioteknologi reproduksi maka spermatozoa X dan Y tersebut dapat dipisahkan, sehingga bila spermatozoa X diinseminasikan ke betina, ovulasi dapat menghasilkan anak betina, sedangkan bila spermatozoa Y diinseminasikan ke betina, ovulasi dapat menghasilkan anak jantan.

Teknik-teknik pemisahan spermatozoa X dan Y dapat dilakukan dengan teknik kolom Percoll, filtrasi dengan kolom Sephadex, *swim-up*, *aside-migration*, *flow cytometry*, arus permukaan spermatozoa, antigen H-Y, sedimentasi, sentrifugasi gradien densitas, elektroforesis, sinar ultra violet, dan kolom albumin (Hafez and Hafez, 2000; Mulyati dkk., 2002; Srianto dkk., 2004 dan Anwar dkk., 2005).

Samik dkk. (1999) menyatakan bahwa studi tentang keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y untuk memperoleh sex ratio anak belum banyak diteliti. Beberapa penelitian pendahuluan membuktikan bahwa teknik pemisahan spermatozoa dengan penambahan beberapa bahan seperti Percoll, Ficoll dan albumin memberikan hasil yang berbeda.

Salah satu metode laboratorium untuk pemisahan spermatozoa X dan Y yang benar, dapat dikembangkan dan diterapkan secara klinik adalah pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin (Hafez and Hafez, 2000). Selain itu,

seleksi jenis kelamin dengan menggunakan kolom albumin juga memungkinkan untuk diaplikasikan di lapangan karena pelaksanaannya relatif mudah dan bahannya relatif murah (Anwar dkk., 2005).

Albumin yang digunakan dalam teknik ini berasal dari putih telur (*egg albumen*) atau Bovine Serum Albumin (BSA). Albumin berfungsi sebagai media pemisah spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) (Anwar dkk., 2005).

Komponen albumin yang berperan dalam proses pemisahan spermatozoa tersebut adalah ovalbumin (58 %) dan conalbumin (13 %). Ovalbumin merupakan komponen paling utama dalam pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin. Teknik kolom albumin memiliki prinsip kerja yang hampir sama seperti kolom Percoll dalam proses pemisahan spermatozoa yaitu menggunakan media putih telur sebagai pengganti Percoll sebagai filter atau penyaring spermatozoa. Proses filtrasi ini sangat dipengaruhi oleh gradien konsentrasi putih telur. Gradien konsentrasi ini mempengaruhi viskositas atau kepekatan ovalbumin. Bila konsentrasi putih telur meningkat maka kepekatannya juga meningkat (Susilawati dkk., 2002).

Putih telur dalam teknik kolom albumin ini merupakan media gradien densitas dengan sedimentasi ke tingkat gravitasi spermatozoa dan media yang sama atau sedimentasi ekuilibrium (Hafez and Hafez, 2000).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Susilawati dkk. (2002) menggunakan putih telur dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 %. Konsentrasi 30 % merupakan konsentrasi yang paling optimal dalam proses pemisahan spermatozoa

dengan teknik kolom albumin karena menghasilkan motilitas dan daya hidup tertinggi dibandingkan konsentrasi lainnya, sehingga dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 20, 30 dan 40 % untuk mengetahui pengaruh apabila konsentrasi diturunkan atau ditingkatkan dari konsentrasi optimal dalam proses pemisahan spermatozoa.

Usaha pemisahan spermatozoa X dan Y dengan teknik kolom albumin biasanya selalu diikuti usaha pembekuan semen hasil pemisahan tersebut dan selanjutnya dikemas dalam bentuk minisraw sehingga dapat digunakan dalam IB.

Menurut Samik dkk. (1999) pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin dilanjutkan dengan pembekuan semen hasil pemisahan tersebut dapat menurunkan daya hidup dan motilitas serta meningkatkan abnormalitas. Proses pembekuan semen hasil pemisahan dapat menyebabkan kematian spermatozoa antara 20-80 %. Persentase ini bervariasi antara pejantan satu dengan pejantan yang lain (Toelihere, 1979). Seidel (2002) dapat melakukan IB pada sapi dengan menggunakan semen beku hasil pemisahan dengan keberhasilan 90 %.

1.2 Perumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan dari penelitian ini adalah:

Apakah ada perbedaan pengaruh kadar putih telur dengan konsentrasi 20, 30 dan 40 % dalam diluter terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin?

1.3 Landasan teori

Menurut Margono dkk. (2004) putih telur (*egg albumen*) merupakan komponen penyusun telur utama selain kuning telur yaitu sekitar 60 % dari total komponen penyusun telur utuh (*whole egg*).

Air merupakan komponen utama penyusun putih telur dengan konsentrasi 87,9 % dan sisanya merupakan bahan padat atau solid. Komponen utama penyusun bahan padat (solid) adalah protein (10,6 %). Komponen utama penyusun protein telur adalah ovalbumin (58 %) dan conalbumin (13 %) (Sutriandhi, 2003).

Ovalbumin merupakan komponen utama yang berperan dalam proses pemisahan spermatozoa. Ovalbumin mengandung karbon, hidrogen, nitrogen, oksigen dan sulfur, dapat larut dalam air dan dapat digumpalkan oleh pemanasan. Ovalbumin merupakan suatu fosfolipoprotein yang mengandung empat gugus *sulfhydryl* (SH) yang terselubung dan tidak aktif. Setelah terjadi denaturasi, gugus SH tersebut menjadi reaktif, mudah terkoagulasi oleh pengocokan, tahan pemanasan hingga 62 °C dan pH \pm 9 selama \pm 3,5 menit dengan hanya terdenaturasi 3-5 %. Ovalbumin mempunyai titik isoelektris pada pH 4,6 (Susilawati dkk., 2002).

Menurut Powrie *et al.* (2005) kandungan air terikat pada ovalbumin adalah 25 %, terkoagulasi pada suhu 61 °C, densitas 1035 g/cm³, daya konduksi listrik 8,68 m μ v-cm-1x10⁻³, titik beku -0.424 °C, panas yang dihasilkan dari pembakaran 5,690 cal/g, pH 7,6, indeks refraktif 1,5652, koefisien kelarutan untuk CO₂ 0,71, panas spesifik 0,85-0,94 cal/gC, tahanan spesifik 0,12 ohm-cm, tegangan

permukaan 53 dyn/cm, tekanan uap air 0,756 % dari NaCl, viskositas 25,0 pada keadaan seimbang pada suhu 0 °C dan panas laten 127 But/lb. Putih telur akan terkoagulasi lebih cepat pada suasana asam.

Menurut Susilawati dkk. (2002) ovalbumin memiliki serat-serat pemisah sehingga dapat digunakan sebagai media pemisah untuk memisahkan spermatozoa X dan Y. Seperti Percoll, kemampuan untuk memisahkan ini ditentukan oleh gradien konsentrasi yang berperan dalam mempengaruhi viskositas atau kepekatan ovalbumin. Bila semen sapi dimasukkan dalam kolom albumin, maka ovalbumin dapat memisahkan spermatozoa X dan Y karena ukuran spermatozoa Y yang lebih kecil sehingga bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk menembus larutan ovalbumin ini (Hafez and Hafez, 2000).

Spermatozoa X dan Y yang telah terpisah selanjutnya dapat diproses untuk pembuatan semen beku dalam ministraw untuk memperoleh jenis kelamin anak sapi sesuai dengan keinginan peternak (Susilawati dkk., 2002).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

Mengetahui adanya perbedaan pengaruh kadar putih telur dengan konsentrasi 20, 30 dan 40 % dalam diluter terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi:

1. Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji teknologi pembekuan semen hasil pemisahan spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin.
2. Peternak sapi, sebagai sarana pengembangan peternakan sapi dengan menggunakan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi dengan teknik kolom albumin agar mendapatkan jenis kelamin anak sapi sesuai dengan keinginan.
3. Pemerintah, sebagai bahan pertimbangan dalam pengambilan kebijakan yang menyangkut pengembangan peternakan sapi khususnya sapi FH di Indonesia.

1.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah dan landasan teori maka dapat disusun landasan penelitian ini yaitu:

Terdapat perbedaan pengaruh kadar putih telur dengan konsentrasi 20, 30 dan 40 % dalam diluter terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Friesian Holstein

Menurut Williamson and Payne (1993) serta Scavone *et al.* (2001) sapi Friesian-Holstein atau disebut juga sapi Fries-Holland (FH) termasuk dalam family *Bovidae*, sub family *Bovinae*, genus *Bos*, sub genus *Bos*, spesies *Bos taurus* dan sub spesies *Bos taurus-taurus*. Sapi ini merupakan bangsa sapi perah yang paling sering ditemukan di Amerika Serikat, jumlahnya cukup banyak, meliputi 80-90 % dari seluruh populasi sapi perah dan tersebar di seluruh dunia. Sapi ini berasal dari propinsi West Friesland dan North Holland, dua daerah yang memiliki padang rumput bagus di negeri Belanda. Sapi FH juga mempunyai kemampuan merumput tinggi, produksi susu tinggi dan dapat dimanfaatkan untuk pembuatan keju (Blakely and Bade, 1991). Produksi susu sapi FH dapat mencapai 5982 liter per laktasi dengan kadar lemak 3,6–3,7 % (Syarif dan Sumoprastowo, 1985 serta Siregar, 1995).

Ciri-cira fisik sapi FH berwarna hitam berbelang putih, ekor putih (hitam tidak diperkenankan), tidak boleh ada warna hitam di daerah bawah persendian siku dan lutut tetapi warna hitam pada kaki mulai dari bahu atau paha sampai ke kuku diperbolehkan; kepala berbentuk panjang, lebar dan lurus; tanduk relatif pendek, melengkung ke depan dan membengkok ke belakang; tubuh besar dan menyerupai baji; dada dalam sekali; punggung dan pinggang panjang; otot kaki cukup kuat; berat badan betina dewasa mencapai 570 – 730 kg sedangkan jantan

dewasa 700 – 1000 kg (Syarif dan Sumoprastowo, 1983; Blakely and Bade, 1991; Suharno dan Nazaruddin, 1994 serta Siregar, 1995).

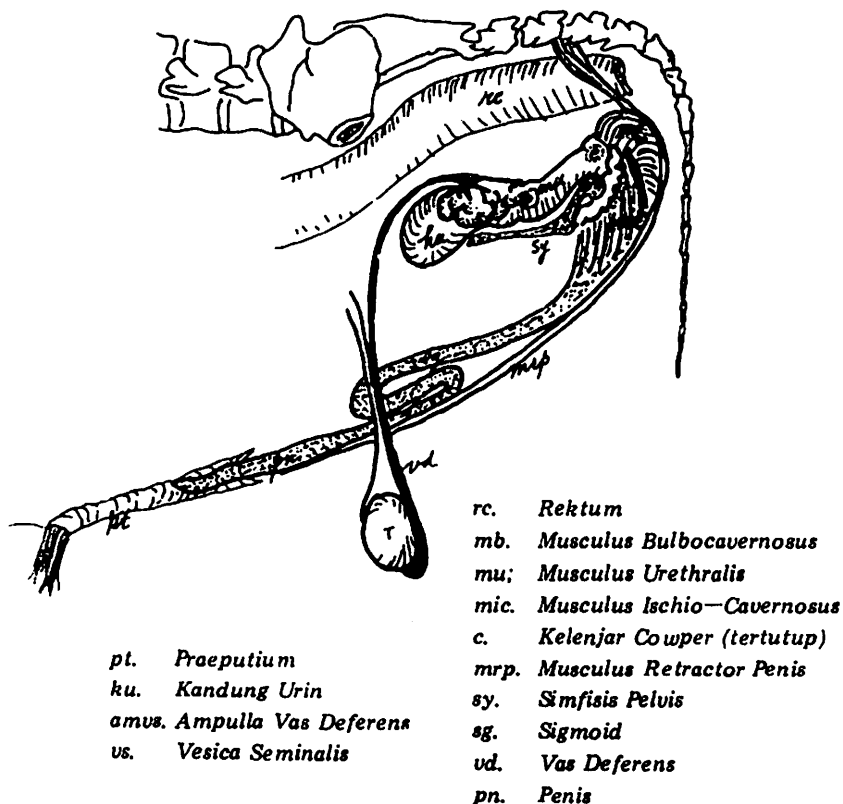
Menurut Syarif dan Sumoprastowo (1985) serta Siregar (1995) sapi FH betina memiliki temperamen yang jinak dan tenang sedangkan sapi jantan memiliki temperamen yang agak galak dan ganas. Sapi FH termasuk sapi yang lambat dewasa, dapat dikawinkan pertama kali umur 18 bulan, beranak pertama kali umur 28–30 bulan dengan lama kebuntingan 279 hari (Syarif dan Sumoprastowo, 1985 serta Suharno dan Nazaruddin, 1994).

Menurut Suharno dan Nazaruddin (1994) sapi FH pertama kali masuk ke Indonesia pada tahun 1981. Sekarang sapi FH telah banyak disilangkan dengan sapi lokal. Salah satu contoh sapi hasil persilangan tersebut adalah sapi Grati dari Pasuruan (Syarif dan Sumoprastowo, 1985 serta Suharno dan Nazaruddin, 1994).

2.2 Anatomi dan Fisiologi Alat Reproduksi Jantan

Alat reproduksi sapi jantan terdiri sepasang testis sebagai alat reproduksi utama; saluran alat kelamin yang terdiri dari vas eferens, epididimis, vas deferens, ampula dan urethra; kelenjar aksesoris seperti kelenjar vesicula seminalis atau vesikularis, prostata dan bulbourethralis atau cowpers; serta alat kelamin luar yaitu penis, preputium dan skrotum (Ismudiono, 1999 dan Poernomo dkk., 2002). Alat Reproduksi sapi jantan dewasa dapat dilihat pada gambar 2.1. Hardijanto dan Hardjopranjoto (1994) serta Hardjopranjoto (1995) membagi alat reproduksi menjadi dua berdasarkan fungsinya yaitu alat kelamin primer berupa testis sebagai penghasil spermatozoa dan hormon reproduksi jantan (androgen)

serta alat kelamin sekunder sebagai penghubung testes dengan dunia luar seperti saluran alat kelamin, kelenjar aksesoris dan alat kelamin luar yang berfungsi untuk menyalurkan spermatozoa dan cairan seminal keluar pada waktu ejakulasi. Toelihere (1979) membagi organ reproduksi menjadi tiga bagian yaitu organ kelamin primer, kelenjar kelamin pelengkap dan alat kelamin luar atau organ kopulatoris.



Gambar 2.1. Alat Reproduksi Sapi Jantan Dewasa
 Sumber : Partodihardjo (1992)

Menurut Poernomo dkk. (2002) testis sapi berbentuk oval memanjang, sumbu memanjang vertikal di dalam skrotum, kedua testis berukuran sama besar, konsistensi ketat tetapi tidak keras serta dapat bergerak bebas ke atas dan bawah

di dalam skrotum. Pada sapi, panjang testis 12-18 cm, diameter 6-8 cm dan berat 300-500 g tergantung umur, berat badan dan bangsa sapi (Toelihere, 1979; Partodihardjo, 1992). Testis sebagai organ kelamin mempunyai dua fungsi yaitu fungsi reproduktif untuk menghasilkan spermatozoa dan fungsi untuk menghasilkan hormon jantan atau androgen yang mempunyai pengaruh pada sifat jantan (Toelihere, 1979; Partodihardjo, 1992; Hardijanto dan Hardjopranto, 1994; Hardjopranto, 1995 serta Poernomo dkk., 2002). Ismudiono (1999) menjelaskan bahwa ada empat macam hormon androgen yaitu testosteron, aetiocholanolon, androsteron dan dehydro-epi-androsteron. Fungsi androgen adalah merangsang spermatogenesis pada tahap akhir dan memperpanjang umur hidup spermatozoa di dalam epididimis; merangsang pertumbuhan, perkembangan dan aktivitas sekresi kelenjar aksesoris, vas deferens, penis dan skrotum; serta memelihara sifat seks sekunder tingkah laku kelamin atau libido dari pejantan. Hormon ini juga mempunyai aktivitas protein anabolik (retensi nitrogen) dan merangsang feed perkembangan kelenjar keringat. Androgen juga mempunyai efek *negative feed back* terhadap aktivitas hipotalamus – hipofisis dalam pelepasan FSH dan LH.

Epididimis merupakan saluran reproduksi jantan yang terdiri dari tiga bagian yaitu caput, corpus dan cauda epididimis. Epididimis mencapai panjang >40 cm dan berat 36 g pada sapi dewasa. Epididimis mempunyai empat fungsi utama yaitu pengangkutan atau transportasi, penyerapan air atau konsentrasi, pendewasaan atau maturasi dan penyimpanan spermatozoa. Fungsi epitel

epididimis adalah absorpsi dan sekretoris. Sekresi sel-sel epitel dapat menyebabkan pematangan spermatozoa (Toelihere,1979).

Duktus atau vas deferens merupakan saluran berdiameter 2 mm yang menghubungkan cauda epididimis dengan urethra. Vas deferens berfungsi mengangkut spermatozoa dari cauda epididimis ke urethra. Kedua vas deferens membesar membentuk ampula duktus deferens. Pada sapi ampula mempunyai panjang 10-14 cm dan diameter 1-1,5 cm. Kelenjar-kelenjar ampula mensekresikan fruktosa dan asam sitrat (Toelihere,1979 dan Ismudiono,1999).

Kelenjar vesikula seminalis berjumlah sepasang, berlobus jelas, berada di dalam lipatan urogenital lateral dari ampula. Pada sapi kelenjar ini berukuran 10 – 15 cm dan berdiameter 2 – 4 cm, serta berlobi dengan septa muskuler yang kuat di antara ampula. Lumen kelenjar ini bermuara ke dalam urethra. Sekresi kelenjar ini berupa cairan keruh dan lengket; mengandung protein, kalium, asam sitrat, fruktosa, dan beberapa enzim dalam konsentrasi tinggi; pH 5,7 – 6,2 serta membentuk 50 % volume ejakulat pada sapi. Kelenjar prostata kurang berkembang pada sapi, terletak mengelilingi urethra dan terdiri dari dua bagian yaitu corpus dan pars disseminata prostatae. Corpus prostatae berukuran 2,5 – 4 cm dan tebal 1–1,5 cm. Pars disseminata mengelilingi urethra pelvis, panjang 10 –12 cm dan tertutup otot urethra. Sekresi kelenjar prostata melalui beberapa muara kecil masuk ke dalam urethra. Kelenjar cowper terdapat sepasang, berbentuk bulat, kompak, berselubung tebal, dan pada sapi berukuran 2,5–3 cm. Pada sapi letaknya lebih ke caudal yaitu pada belokan di mana urethra menikung ke bawah keluar dari ruang pelvis. Sekresi kelenjar cowper berupa cairan jernih

dan bebas sperma dengan pH 7,5–8,2 dan ditumpahkan sebelum ejakulasi untuk membersihkan dan menetralkan urethra dari bekas urin dan kotoran lain (Toelihere, 1979; Partodihardjo, 1992; Ismudiono, 1999 dan Poernomo dkk., 2002).

Ismudiono (1999) mengemukakan bahwa urethra adalah saluran ekskretoris bersama untuk urine dan semen yang terdiri dari tiga bagian yaitu bagian pelvis, bulbus urethra dan bagian penis.

Penis pada sapi termasuk jenis fibro elastis dengan panjang 102 cm, agak kaku tetap kenyal walau dalam keadaan tidak aktif atau non-ereksi; perbedaan panjang ereksi dan tidak ereksi 3 : 2 akibat struktur S pada penis; serta bagian berongga pada saat aktif kelamin berisi darah dan menjadi tegang tanpa memperbesar volume penis. Penis terdiri dari bagian akar, badan dan ujung yang berakhir pada glans penis. Bagian penis terdiri-dari corpus cavernosum penis yang diselubungi tunika albuginea dan corpus cavernosum urethra. Kedua bagian ini akan bersatu pada glans penis membentuk corpus fibrosum. Penis berfungsi dalam pengeluaran urine dan peletakan semen ke dalam saluran reproduksi betina (Partodihardjo, 1992; Ismudiono, 1999 dan Poernomo dkk., 2002).

Preputium atau selubung bagian ujung anterior penis mempunyai panjang 35-40 cm dan diameter 4 cm pada sapi, terdiri atas orificium dan fornix praeputii serta menghasilkan smegma praeputii yaitu sekresi kental berlemak bercampur dengan reruntuhan epitel dan bakteri pembusuk (Toelihere, 1979).

Ismudiono (1999) dan Poernomo dkk. (2002) sama-sama berpendapat bahwa skrotum atau kantung testis berfungsi sebagai termoregulator yaitu

mengatur perubahan temperatur skrotum sehingga proses spermatogenesis berlangsung normal dan sebagai pelindung dari gangguan luar seperti benturan fisik dan gangguan mekanis.

2.3 Fisiologi dan Morfologi Spermatozoa

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

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

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

¹ $2n$ =diploid; pada sapi jumlah kromosom diploid adalah 60

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

Spermatogenesis dapat dibagi menjadi dua fase yaitu spermatositogenesis adalah proses pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonia tipe A yang dikendalikan oleh FSH dari hipofisis anterior dan spermiogenesis adalah proses pembentukan spermatozoa dari spermatid yang dikendalikan oleh testosteron. Pada sapi spermatogonia tipe A berkembang menjadi 16 spermatosit primer dan 64 spermatozoa. Spermatogenesis pada sapi berlangsung 50-62 hari sehingga waktu yang dibutuhkan spermatogonia tipe A menjadi spermatozoa yang diejakulasikan kira-kira 60-70 hari. Pada sapi satu gram tunasan testikular menghasilkan rata-rata 9×10^6 spermatozoa per hari (Ismudiono, 1999).

Menurut Partodihardjo (1992) spermatozoa sebagian besar tersusun atas bahan kimia sebagai berikut:

1. Deoxyribonucleoprotein, terdapat di dalam nukleus yang merupakan kepala spermatozoa.
2. Mucopolysaccharide, terdapat di akrosom yaitu bagian pembungkus kepala, mengandung empat macam gula yaitu fructose, galactose, mannose, dan hexosamine.
3. Plasmalogen atau lemak aldehidrogen yang terdapat di bagian leher, kepala dan ekor spermatozoa, merupakan bahan yang dipergunakan spermatozoa untuk respirasi endogen.

4. Protein yang menyerupai keratin, merupakan selubung tipis yang meliputi seluruh badan, kepala dan ekor spermatozoa. Protein ini memiliki ikatan dengan unsur zat tanduk yaitu sulfur dan banyak terdapat pada membran sel-sel dan fibril-fibrilnya.
5. Enzim dan coenzim yang digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi.

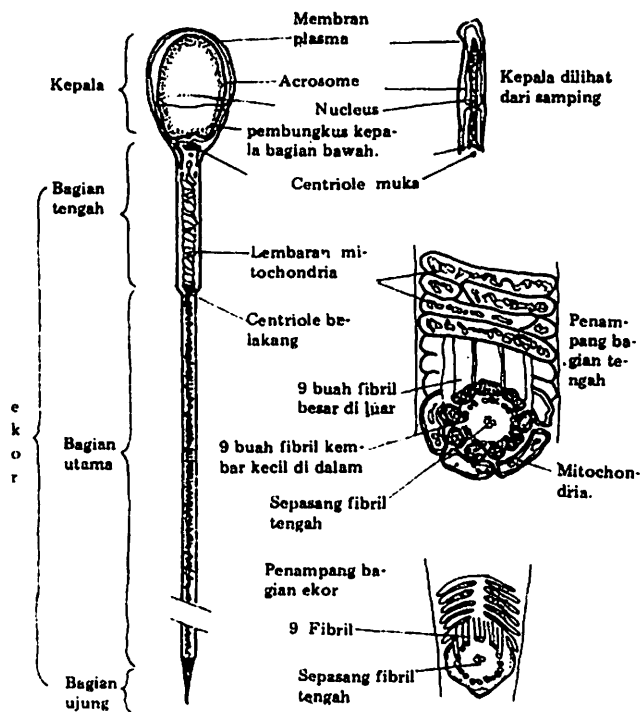
Spermatozoa merupakan sel kecil, kompak, sangat khas, tidak tumbuh dan membagi diri. Spermatozoa sapi memiliki morfologi seperti spermatozoa hewan lain tapi ukuran dan bentuknya berbeda (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994). Berat satu spermatozoa $\pm 2-2,5 \times 10^{-8}$ mg berat kering atau $\pm 11-13 \times 10^{-8}$ mg berat basah, berat kepala ± 50 %, badan ± 15 % dan ekor ± 35 % berat total sebuah spermatozoa. Volume spermatozoa tunggal yang dibebaskan dari seminal plasma $\pm 8 \times 10^{-9}$ m³ yang menggambarkan bahwa 1 ml berisi 12.500×10^6 spermatozoa (Salisbury and Van Demark, 1985).

Kepala spermatozoa umumnya berbentuk oval memanjang dengan nukleus tersusun rapat oleh kromatin. Jumlah kromosom dan DNA dalam nukleus beberapa spermatozoa adalah haploid atau setengah jumlah sel somatik akibat pembelahan meiosis selama pembentukan spermatozoa (Garner and Hafez, 2000). Hampir setengah bagian anterior kepala spermatozoa dibungkus akrosom yang mengandung enzim acrosin, hyaluronidase, esterase dan asam hidrolase yang berperan untuk menembus dinding sel telur dalam proses fertilisasi (Toelihere, 1979 serta Garner and Hafez, 2000). Setengah bagian posterior kepala spermatozoa dibungkus selubung inti posterior. Perbedaan struktur selubung

akrosom dan selubung inti posterior menyebabkan perbedaan afinitas terhadap zat warna (Lindsay *et al.*, 1982).

Bagian tengah spermatozoa adalah pusat tenaga sebab mitokondria terpusat di daerah ini dalam bentuk heliks. Mitokondria mengandung sistem yang menggerakkan siklus asam trikarboksilat (siklus Krebs), transport elektron dan fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk ATP untuk gerakan spermatozoa. Selain itu bagian ini tersusun berkas fibril filamen ekor dan dibungkus kelopak halus yang mengandung bahan lipoid. Ujungnya berakhir di cincin centrio yang merupakan tempat tumbuhnya ekor. Untuk menghubungkan kepala dengan badan terdapat bagian leher dengan panjang $\pm 1\mu\text{m}$. Pada bagian leher terdapat berkas fibril yang terbentuk dari dua cincin yang masing-masing terdiri dari sembilan fibril (Salisbury and Van Demark, 1985).

Ekor spermatozoa menyerupai flagelum dengan dua sentriol di bagian tengah. Pada bagian ekor terdapat dua fibril sentral yang dikelilingi fibril perifer. Fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa (Frandsen, 1992). Pada bagian ekor kedua lingkaran yang terdiri atas sembilan cincin serabut fibril dari filamen ekor berkurang besarnya sehingga semua fibril memiliki besar yang sama. $\pm 3\mu\text{m}$ dari ujung ekor spermatozoa, kulit benang pilin, selaput pembungkus dan sembilan fibril luar tidak ada (Toelihere, 1979). Spermatozoa dan bagian-bagiannya dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Spermatozoa dan Bagian-Bagiannya Dilihat dengan Mikroskop Elektron

Sumber : Partodihardjo (1992)

2.4 Spermatozoa X dan Y serta Teknik Pemisahannya

Seekor sapi jantan memproduksi dua jenis spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y dengan rasio jumlah yang sama yaitu 1 : 1 (Gordon, 2001). Menurut Ismudiono dkk. (2001) dan Mulyati dkk. (2002) spermatozoa Y memiliki ukuran kepala lebih kecil, lebih ringan, lebih pendek dan mampu bergerak lebih cepat dibandingkan spermatozoa X. Ukuran spermatozoa X 2,8–7 % lebih besar dibandingkan spermatozoa Y karena struktur kromatin memadat yang menyusun bagian kepala dan merupakan bahan dasar pembentukan DNA lebih banyak 3–4 %. Hal ini diperkuat oleh Frandson *et al.* (2003) yang

menyatakan bahwa kromatin kelamin ditemukan pada 60–80 % nuklei somatik betina dan tidak lebih dari 10 % pada nuklei somatik jantan. Perbedaan spermatozoa X dan Y dapat ditinjau dari berbagai aspek seperti pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Perbedaan Spermatozoa X dan Y Ditinjau dari Beberapa Aspek

Parameter	Perbedaan
Kandungan DNA	Spermatozoa Y lebih sedikit
Ukuran	Spermatozoa X lebih besar
Identifikasi	Spermatozoa Y berfluoresensi
Motilitas	Spermatozoa Y lebih cepat
Tegangan permukaan	Spermatozoa X bergerak ke arah katoda
Kemotaksis	Spermatozoa X lebih tahan pada suasana asam
Ukuran kepala	Spermatozoa X lebih besar

Sumber: Irawan (2000) yang dikutip dari Ericsson and Glass (1982), Mahaputra (1983) dan Mahaputra dkk. (1989)

Menurut Kurnianingsih (2003) dari berbagai aspek yang membedakan kromosom seks X dan Y pada spermatozoa akan memunculkan berbagai macam teknik pemisahan spermatozoa antara lain:

1. Kolom Percoll

Prinsip kolom Percoll adalah sedimentasi ekuilibrium pada gradien densitas dengan menggunakan medium Percoll (Mulyati dkk., 2002). Teknik ini dapat memisahkan spermatozoa X dan Y sebesar 90,27 % (Syafei dkk., 1998) yang dikutip oleh Anwar dkk. (2004). Utama dkk.

(1999) berhasil mendapatkan 54,9 % spermatozoa X. Maylinda dkk. (1996) dalam Anwar dkk. (2005) memperoleh angka keberhasilan 86 % untuk spermatozoa X.

2. Kolom Sephadex

Prinsip kolom Sephadex adalah sedimentasi non ekuilibrium (didasarkan pada laju endap) berupa filtrasi spermatozoa melalui kolom Sephadex yang berisi butiran gel Sephadex (Mulyati dkk., 2002). Hasil penelitian Mahaputra dkk. (1989) yang dikutip oleh Anwar dkk. (2005) dapat memisahkan spermatozoa X dan Y sebesar 81,3 % dan 18,7 % dengan Sephadex kolom G-200. Susilawati dkk. (1997) mendapatkan 83 % spermatozoa X hasil penyaringan dengan Sephadex G-200. Sedangkan Utama dkk. (1999) memperoleh 52,3 % spermatozoa X. Filtrasi dengan sephadex dihasilkan 70 % spermatozoa X pada filtrat (Hafez and Hafez, 2000).

3. Teknik *Swim-Up*

Prinsip teknik ini adalah pemisahan berdasarkan perbedaan karakter pergerakan spermatozoa. Spermatozoa Y akan bergerak lebih cepat ke permukaan media segar dibandingkan spermatozoa X (Mulyati dkk., 2002). Utama dkk. (1999) berhasil mendapatkan 50 % spermatozoa Y dengan teknik ini.

4. Teknik *Aside Migration*

Prinsip teknik ini adalah pemisahan berdasarkan perbedaan karakter pergerakan spermatozoa. Spermatozoa Y bergerak lebih cepat dalam

media dari pusat ke tepi roset (Mulyati dkk., 2002). Utama dkk. (1999) berhasil mendapatkan 51,8 % spermatozoa Y dengan teknik ini.

5. *Flow Cytometry*

Prinsip teknik ini adalah pengukuran intensitas fluoresensi dengan *flow cytometer* setelah pewarnaan dengan fluorokom khusus DNA seperti Hoechst 33342. Pada ternak hasil konfirmasi jenis kelamin mencapai 90 % (Mulyati dkk., 2002).

6. Teknik Arus Permukaan Spermatozoa

Prinsip teknik ini adalah spermatozoa X berarus positif dan spermatozoa Y berarus negatif atau seluruh spermatozoa berarus negatif tetapi spermatozoa X mempunyai arus negatif yang lebih kuat (Mulyati dkk., 2002).

7. Teknik Antigen H-Y

Prinsip teknik ini adalah pemisahan spermatozoa melalui identifikasi spermatozoa Y yang mengandung antigen H-Y, digunakan antibodi Y yang dikompetisikan dengan antibodi berlabel fluoresen (Mulyati dkk., 2002).

8. Elektroforesis

Prinsip teknik ini adalah penggunaan aliran listrik searah 1,5 Volt melalui dua elektroda berbeda muatan yaitu katoda dan anoda (Hafez dan Boyd, 1986) yang dikutip oleh Hermadi dkk. (1998). Berdasarkan teknik ini diperoleh spermatozoa Y dengan berat molekul 24,8–135,48 x 10000 Dalton lebih kecil daripada spermatozoa X (Anwar dkk., 2005).

9. Penyinaran dengan sinar ultra violet

Prinsip teknik ini adalah memisahkan kromosom spermatozoa sapi perah dengan sinar ultra violet. Melalui teknik ini didapatkan bahwa rasio kromosom seks X lebih besar dibandingkan Y berdasarkan diameter ukuran kepala spermatozoa (Srianto dkk., 2004).

Selain teknik-teknik di atas, pemisahan spermatozoa dapat dilakukan dengan teknik sedimentasi, sentrifugasi gradien densitas dan kolom albumin.

2.5 Pemisahan Spermatozoa dengan Menggunakan Putih Telur pada Teknik Kolom Albumin

Menurut Anwar dkk. (2005) seleksi jenis kelamin dengan menggunakan albumin merupakan metode yang memungkinkan diaplikasikan di lapangan karena pelaksanaannya relatif mudah dan bahannya dapat diperoleh dengan harga murah. Metode ini merupakan metode pemisahan spermatozoa X dan Y yang benar, dapat dikembangkan dan diterapkan secara klinik karena dapat menghasilkan spermatozoa Y sampai 75 -- 80 % (Hafez and Hafez, 2000).

Metode ini didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y akibat perbedaan massa dan ukuran. Ukuran spermatozoa Y lebih kecil sehingga bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan (Jaswandi, 1992) yang dikutip oleh Anwar dkk. (2005). Hal senada juga diungkapkan oleh Hafez and Hafez (2000) bahwa pemisahan spermatozoa X dan Y didasarkan atas perbedaan berat, berat jenis atau ukuran kromosom X dan Y akibat perbedaan ukuran komponen spermatozoa serta didasarkan ekspresi haploid kromosom X dan Y akibat perbedaan sifat komponen

spermatozoa. Semen yang diletakkan di atas kolom albumin mengalami kenaikan jumlah spermatozoa Y dari lapisan albumin akibat pergerakan spermatozoa Y ke bawah dan X tetap di lapisan atas. Samik dkk. (1999) mengungkapkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin mengakibatkan penurunan persentase spermatozoa hidup dari 82,75 % menjadi 76,50 % dan meningkatkan persentase spermatozoa abnormal dari 9,75 % menjadi 20,75 %.

Jaswandi (1992) yang dikutip oleh Anwar dkk. (2005) melakukan inseminasi pada sapi dengan menggunakan lapisan bawah menghasilkan rasio anak jantan 62,5 % dan betina 37,5 % sedangkan inseminasi dengan lapisan atas diperoleh anak jantan 22,2 % dan anak betina 77,8 %. Teknik kolom albumin ini dapat mengakibatkan penurunan persentase kebuntingan dari 80 % menjadi 66 % dan meningkatkan persentase anak jantan yang dilahirkan dari 44 % menjadi 71 % (Samik dkk., 1999).

Menurut Sutriandhi (2003) putih telur (*egg albumen*) menyusun 60 % dari komponen penyusun telur utuh (*whole egg*). Putih telur yang digunakan dalam metode ini terdiri dari dua komponen yaitu air (87,9 %) dan bahan solid (12,1%). Bahan solid terdiri dari bahan organik yang meliputi protein (10,6 %), lemak (0,05 %) dan karbohidrat (0,9 %) serta bahan anorganik (0,6 %). Protein putih telur terdiri dari ovalbumin (58 %), conalbumin (13 %), ovomucoid (11 %), lisozim (3,5 %), ovoglobulin G1 (4 %), ovoglobulin G2 (4 %), ovomucin (1,5 %), flavoprotein (0,8 %), ovoglikoprotein (0,5 %), ovomakroglobulin (0,5 %), ovoinhibitor (0,1 %) dan avidin (0,05 %) yang merupakan zat anti gizi. Karbohidrat pada putih telur terdiri dari karbohidrat bebas yaitu glukosa (0,4 %)

dan terikat yaitu glikoprotein mannanosa dan galaktosa (0,5 %). Bahan organik sebagian besar terdiri dari mineral yang meliputi sulfur (0,195 %), kalium (0,167 %), natrium (0,161 %), klorida (0,155 %), fosfor (0,018 %), kalsium (0,012 %), magnesium (0,009 %) dan besi (0,0009 %).

Komponen protein utama dalam putih telur yang berperan dalam proses pemisahan spermatozoa adalah ovalbumin. Penggunaan putih telur dalam gradien konsentrasi yang berbeda digunakan untuk memisahkan spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) serta mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup setelah pembekuan. Persentase motilitas mencapai 38 % pada lapisan atas dan 40 % pada lapisan bawah dengan persentase kebuntingan 80 % (Susilawati dkk., 2002).

2.6 Semen Beku dan Pemeriksaan *Post Thawing*

Menurut Ismudiono (1999) semen terdiri dari dua bagian yaitu spermatozoa dan plasma semen yang berasal dari epididimis dan kelenjar aksesoris. Volume ejakulasi 5-8 ml, konsentrasi spermatozoa 800-2000 juta/ml, spermatozoa 5-15 milyar/ejakulasi, spermatozoa motil 40-75 % dan spermatozoa normal secara morfologis 65-95 % (Ax *et al.*, 2000^a). Komposisi kimiawi semen dapat dilihat pada lampiran 1.

Menurut Partodihardjo (1992), Toelihere (1993) serta Hardijanto dan Hardjopranojoto (1994) penggunaan semen beku memiliki beberapa keuntungan dan kerugian. Keuntungan penggunaan semen beku antara lain dapat disimpan lebih lama, pengiriman lebih luas, perkawinan selektif, tidak ada yang terbuang

walaupun sudah lama, biaya transportasi murah, mencegah penyakit kelamin menular, penggunaan efisien dari pejantan unggul atau lumpuh dan jumlah pejantan yang diperlukan sedikit. Kerugian penggunaan semen beku antara lain dapat merusak secara luas bila pejantan tidak unggul, penyebaran penyakit luas bila pemeriksaan awal kurang baik, peralatan mahal, 20-80 % spermatozoa mati dalam proses pembekuan dan 10-20 % spermatozoa pejantan tertentu tidak tahan pembekuan.

Orang yang pertama kali mengadakan percobaan tentang pembekuan spermatozoa adalah Davenport (1897) yang menemukan bahwa spermatozoa manusia tetap hidup pada pendinginan -17°C . Setelah itu berturut-turut Jahnel (1938) pada semen manusia dengan temperatur -79°C selama 40 hari; -169 sampai -269°C ; Shettler (1940) dengan semen sesegar mungkin; Shaffner dkk. (1941) pada semen ayam dengan temperatur -70°C ; serta Parkes (1945) pada semen manusia dengan temperatur -79°C selama 2-8 hari. Pada tahun 1950 Polge, Smith and Parkes menemukan bahwa penambahan gliserol pada bahan pengencer dapat mencegah terbentuknya kristal es pada semen tersebut. Smith and Polge (1950) berhasil membuktikan bahwa penambahan pengencer kuning telur sitrat dan 10-15 % gliserol lalu didinginkan perlahan-lahan dari 2 sampai -79°C dan dicairkan kembali (*thawing*) dapat menghasilkan 50-90 % spermatozoa hidup. Pada tahun 1951, Stewart melaporkan kelahiran anak sapi pertama lahir dari semen beku (Partodihardjo, 1992 serta Hardijanto dan Hardjopranto, 1994).

Dalam pembuatan semen beku diperlukan pengencer kuning telur sitrat (KTS), air susu masak, susu skim kuning telur, tris aminomethane, tris kuning telur, Biociphos plus (mengandung ekstrak kacang kedelai untuk mengurangi

kontaminasi ternak), kuning telur laktosa kuning telur raffinosa, Minnesota GD (mengandung KTS dan beberapa karbohidrat) dan bahan pengencer yang lain (Foote, 1969; Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994 serta Thun *et al.* (2002).

Pembekuan dapat berakibat terbentuknya kristal es, perubahan daya tembus dinding sel akibat pelarutan lipoprotein serta adanya spermatozoa yang tidak membeku dengan baik sehingga berakibat pada kematian spermatozoa (Salisbury and Van Demark, 1985).

Menurut Salisbury and Van Demark (1985), Toelihere (1993) serta Hardijanto dan Hardjopranjoto (1994) penambahan gliserol dalam pembuatan semen beku berfungsi untuk mencegah *cold* atau *osmotic shock*, terbentuknya kristal es, akumulasi elektrolit dan memperendah titik beku cairan. Untuk pembuatan semen beku diperlukan *cold top* dan kontainer berisi nitrogen cair. Faktor-faktor yang menunjang keberhasilan pembuatan semen beku adalah banyaknya gliserol yang ditambahkan cara penambahan gliserol, waktu ekuilibrase, lama pengenceran dan kecepatan pendinginan (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Ada tiga macam tipe semen beku yaitu tipe straw, pelet dan ampul. Tipe straw memiliki kelebihan lebih murah, tahan terhadap perubahan fisik dan kimia, dapat dilengkapi dengan berbagai warna dan data, penutupan dengan polivinil alkohol sangat rapat, kecepatan pendinginan merata, mudah diadaptasikan dengan luar negeri dan *conception rate* (CR) \pm 68 %; sedangkan kekurangannya adalah modal awal relatif besar dan mudah pecah. Tipe pelet memiliki kelebihan lebih ringkas, menghemat ruang penyimpanan dan CR \pm 70 %; sedangkan

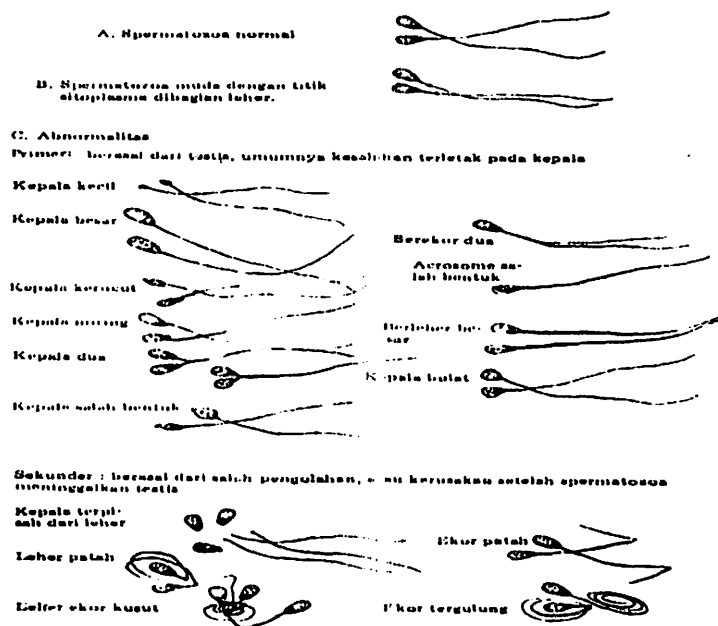
kekurangannya adalah pengenceran rendah dan pelabelan sulit. Tipe ampul memiliki kelebihan CR > 60 % dan mudah dilabel; sedangkan kekurangannya adalah cara penyimpanan relatif lebih mahal, volume lebih besar dan jumlah ampul per ejakulasi sedikit (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Menurut Toelihere (1993) pada waktu tertentu perlu diperiksa kualitas semen *post thawing* dengan mengevaluasinya pada suhu tubuh. Hal senada juga diungkapkan oleh Hafez (2000) bahwa kualitas *post thawing* semen beku dilihat dari motilitas spermatozoa setelah pembekuan dan dibandingkan dengan sebelum pembekuan untuk mengetahui efek bahan pembeku terhadap kehidupan spermatozoa.

Proses pembekuan umumnya menyebabkan penurunan motilitas dan jumlah sperma hidup serta peningkatan abnormalitas terutama abnormalitas sekunder atau abnormalitas akibat salah pengolahan atau kerusakan setelah spermatozoa meninggalkan testis seperti kepala terpisah dari leher, leher patah, leher dan ekor kusut, ekor patah dan tergulung (Hardini, 1990; Partodihardjo, 1992; dan Suhartono, 1993).

Motilitas spermatozoa dapat dilihat dari gerakan individu spermatozoa setelah pencairan semen beku untuk mengetahui persentase spermatozoa yang bergerak secara progresif. Persentase hidup dapat diperiksa dan dihitung jumlahnya dengan membuat preparat ulas dengan menggunakan eosin negrosin untuk membedakan spermatozoa mati dan tidak motil dengan spermatozoa hidup dan motil. Spermatozoa mati dan tidak motil berwarna merah eosin dengan latar belakang gelap negrosin. Hal ini disebabkan karena spermatozoa hidup tidak

dapat menghisap zat warna karena membran plasmanya utuh, sedangkan spermatozoa mati dapat menghisap zat warna karena permeabilitas dinding spermatozoa meningkat. Selain itu, dengan pembuatan preparat ulas juga dapat dihitung jumlah spermatozoa yang abnormal bentuknya (Bearden and Fuquay, 1992; Hunter, 1995; Hafez, 2000 dan Hardijanto dkk., 2003). Kemungkinan-kemungkinan yang dapat ditemui dalam pemeriksaan spermatozoa yang telah diwarnai dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3. Kemungkinan-Kemungkinan yang Dapat Ditemui dalam Pemeriksaan Spermatozoa yang Telah Diwarnai
 Sumber : Partodihardjo (1992)

BAB III
MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Semen Beku, Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga di Desa Tanjung, Kecamatan Kedamean, Kabupaten Gresik mulai tanggal 2 September sampai dengan 16 Desember 2004.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan semen sapi perah FH jantan milik Taman Ternak Pendidikan. Sampel semen diambil pukul 7.30 pagi. Bahan penelitian yang digunakan adalah diluter A yang terbuat dari ²susu skim, air Aqua, kuning telur, antibiotika *Penicillin* dan *Streptomycin*; diluter B yang terbuat dari diluter A yang ditambah dengan glukosa dan gliserol; *chicken egg albumen* atau putih telur ayam; nitrogen cair; eosin negrosin; serta ministraw kosong.

3.2.1 Alat Penelitian

Penelitian ini memerlukan alat vagina buatan, tabung penampung semen, tabung reaksi, aluminium foil, termometer, pengaduk kaca, *beaker glass*, tabung erlenmeyer, pipet Pasteur, pipet Ependorf, gelas ukur, *colony counter*, gelas obyek dan penutup, mikroskop binokuler, *disposable syringe*, *cold top*, kontainer

² Merek dagang Tropicana Slim

nitrogen cair, lemari ultra violet, pembakar bunsen, inkubator, pinset anatomis, gunting, kertas pH, *water bath*, timbangan, kertas saring, pemisah putih dan kuning telur, kanister, goblet, spidol OHP, spidol marker, kertas label dan tissue.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan Diluter

Susu skim ditimbang sebanyak 40 gram lalu ditambah dengan air ad 400 cc. Susu skim yang sudah ditambah dengan air diletakkan dalam *water bath* suhu 92 °C selama \pm 12 menit. Setelah itu, didinginkan sampai mencapai suhu \pm 16 °C. Kemudian ditambah dengan 20 cc kuning telur, 400 mg *Streptomycin* (dosis 1 mg/cc diluter) dan 3 gram *Penicillin* (dosis 1000 IU/cc diluter). Diluter dibagi menjadi 2 bagian yaitu diluter A dan diluter B. Diluter B ditambah dengan 4 gram glukosa dan 32 cc gliserol. Diluter selanjutnya disimpan dalam lemari es.

3.3.2 Penampungan Semen

Semen sapi diambil dengan menggunakan vagina buatan dan ditampung di tabung penampung semen. Setelah semen tertampung semua, tabung penampung semen dilepaskan dari corong karet vagina buatan serta segera diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis (Hardijanto dkk., 2003).

3.3.3 Pemeriksaan Semen secara Makroskopis dan Mikroskopis

Semen segar hasil penampungan tersebut diperiksa secara makroskopis yang meliputi: (1). Volume semen, diperiksa dengan melihat skala tabung yang digunakan untuk menampung semen; (2). Konsistensi semen, diperiksa dengan memiringkan dan menegakkan tabung kembali untuk melihat bekas spermatozoa

pada dinding tabung dan diletakkan di tempat terang dengan sinar tidak langsung; (3). Bau semen, diperiksa dengan mencium bau spesifik semen; (4). Warna semen, diperiksa dengan melihat warna semen; serta (5). Derajat Keasaman, diperiksa dengan menggunakan kertas pH (Hardijanto dkk., 2003).

Semen segar hasil penampungan tersebut selanjutnya diperiksa secara mikroskopis yang meliputi: (1). Gerakan massa, diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen diatas gelas obyek lalu ditutup dengan gelas penutup dan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali untuk mengamati gerakan massa; (2). Gerakan individu, diperiksa dengan memindahkan lensa mikroskop ke pembesaran 400 kali untuk melihat gerakan individu; (3). Konsentrasi semen, diperiksa pada pembesaran yang sama dengan gerakan individu untuk mengamati jarak antar kepala spermatozoa; (4). Daya hidup spermatozoa, diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen dan satu tetes eosin negrosin pada gelas obyek yang baru dan bersih lalu dicampurkan secepat mungkin kedua larutan tersebut sampai homogen, dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan di atas nyala api bunsen lalu dilakukan pemeriksaan dan penghitungan memakai mikroskop pembesaran 400 kali; serta (5). Abnormalitas spermatozoa, diperiksa pada pembesaran yang sama dengan daya hidup spermatozoa untuk menghitung spermatozoa yang abnormal bentuknya (Hardijanto dkk., 2003).

3.3.4 Pemisahan Spermatozoa dengan Menggunakan Putih Telur pada Teknik Kolom Albumin

Diluter A dipanaskan dalam *water bath* suhu 37 °C. Putih telur yang sudah dipisahkan dengan kuning telur juga dipanaskan dalam *water bath* suhu 37 °C. Setelah itu, empat tabung reaksi yang akan digunakan untuk masing-

masing perlakuan dilabel dengan kertas label atau dengan spidol OHP. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan satu perlakuan dengan perincian sebagai berikut:

1. Kontrol (P0: 0 % putih telur)

Berisi 1 ml diluter ditambah dengan 0,5 ml semen.

2. Perlakuan pertama (P1: 20 % putih telur)

Berisi 0,8 ml diluter dan 0,2 ml putih telur ditambah dengan 0,5 ml semen.

3. Perlakuan kedua (P2: 30 % putih telur)

Berisi 0,7 ml diluter dan 0,3 ml putih telur ditambah dengan 0,5 ml semen.

4. Perlakuan ketiga (P3: 40 % putih telur)

Berisi 0,6 ml diluter dan 0,4 ml putih telur ditambah dengan 0,5 ml semen.

Lalu semua sampel diinkubasikan dalam *cold top* dengan suhu 5 °C selama 20 menit untuk memisahkan fraksi atas dan fraksi bawah. Setelah diinkubasi, 0,5 ml fraksi atas pada tabung kontrol diambil dengan menggunakan pipet Ependorf, 0,5 ml fraksi tengah dibuang, dan 0,5 ml fraksi bawah diambil dengan menggunakan pipet Ependorf dan dimasukkan ke dalam tabung yang lain. Setelah itu, pemisahan dengan cara yang sama juga dilakukan untuk perlakuan pertama, kedua dan ketiga (Anwar dkk., 2005).

3.3.5 Pembekuan Semen Hasil Pemisahan Spermatozoa

Semen hasil pemisahan tersebut selanjutnya didinginkan dalam *cold top* dengan suhu 5 °C selama 1 jam (proses pendinginan). Setelah itu ditambah diluter B yang mengandung gliserol sehingga volume semen menjadi dua kali lipat volume semula. Penambahan diluter B dilakukan dalam empat tahap dengan

interval waktu antar tahap adalah $\frac{1}{4}$ jam. Semen yang sudah ditambah dengan diluter B didiamkan selama $\frac{1}{2}$ jam (proses gliserolisasi). Lalu semen dari setiap tabung diambil dari setiap tabung untuk diperiksa pergerakannya sebelum pembekuan. Semen yang sudah diperiksa, dikemas dalam ministraw dengan volume 0,25 ml. Pengemasan ini dilakukan dalam *cold top* suhu 5 °C (proses pencetakan). Ministraw didiamkan selama 1 – 3 jam dalam *cold top* untuk proses adaptasi spermatozoa terhadap pengencer (proses equilibrasi). Straw yang telah dikemas diatur di atas rak, kemudian dimasukkan ke dalam uap nitrogen cair (2 – 4 cm di atas nitrogen cair) selama 9 menit pada suhu –140 °C (proses *pre freezing*). Setelah itu, straw dimasukkan atau direndam dalam nitrogen cair selama 2 menit pada suhu –196 °C (proses *freezing*) dan disimpan dalam kontainer selama 2 X 24 jam (proses *storage*) (Anwar dkk., 2005).

3.3.6 Pemeriksaan *Post Thawing* Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa

Semen beku yang disimpan dalam kemasan ministraw dengan volume 0,25 ml diangkat dengan pinset dari kaniister dalam kontainer. Setelah itu, straw tersebut dicelupkan dalam water bath suhu 37 °C selama $\pm 7-15$ detik (Noakes, 1988 dan Partodihardjo, 1992). Kemudian salah satu ujung straw dipotong dan straw digunting pada bagian tengahnya. Lalu ditetaskan semen di atas gelas obyek dan ditutup dengan gelas penutup untuk diperiksa persentase motilitas dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400 kali (Ax *et al.*, 2000^b). Bersamaan dengan pembuatan preparat natif untuk penghitungan persentase motilitas, ditetaskan satu tetes semen lagi di atas gelas obyek yang bersih dan satu tetes eosin negrosin lalu dicampurkan secepat mungkin kedua larutan tersebut

sampai homogen dan dibuat preparat ulas setipis mungkin. Setelah itu preparat ulas tersebut dipanaskan di atas nyala api bunsen lalu dilakukan pemeriksaan dan penghitungan persentase spermatozoa hidup dan abnormal dengan pembesaran 400 kali (Hardijanto dkk., 2003).

Diagram alur pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada lampiran 2.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan dan enam ulangan.

3.5 Peubah yang Diamati

Peubah yang akan diamati dan diukur dalam penelitian ini antara lain:

1. Persentase motilitas spermatozoa fraksi atas dan bawah setelah pencairan semen beku
2. Persentase hidup spermatozoa fraksi atas dan bawah setelah pencairan semen beku
3. Persentase abnormalitas spermatozoa fraksi atas dan bawah setelah pencairan semen beku.

3.6 Analisis Data

Data penelitian dianalisis dengan menggunakan uji F dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Bila terjadi perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil / BNT (*Least Significant Difference / LSD*) dengan taraf signifikan 5 % untuk mengetahui perlakuan yang memberi hasil terbaik dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain (Kusriningrum, 1989).

BAB IV
HASIL PENELITIAN

BAB IV**HASIL PENELITIAN****4.1 Pemeriksaan Semen Segar**

Pemeriksaan semen segar meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Hasil pemeriksaan makroskopis ditunjukkan pada tabel 4.1 dan lampiran 3 sedangkan hasil pemeriksaan mikroskopis ditunjukkan pada tabel 4.2 dan lampiran 4.

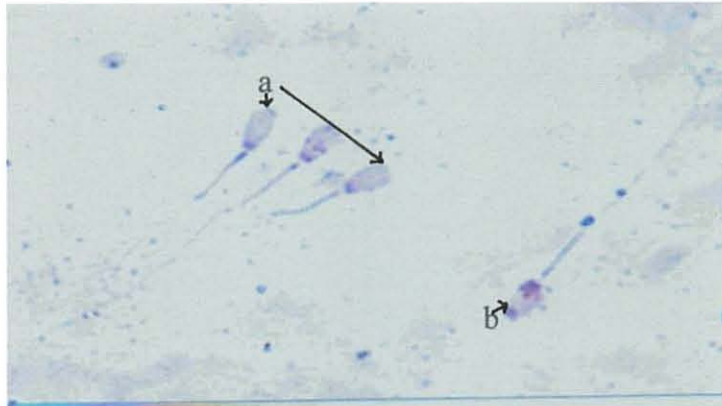
Tabel 4.1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar

Pemeriksaan	n	Hasil
Volume semen	6	6-7 ml
Konsistensi semen	6	sedang-kental
Bau semen	6	khas
Warna semen	6	putih-putih kekuningan
Derajat keasaman (pH)	6	6-7

Tabel 4.2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar

Pemeriksaan	n	Hasil
Gerakan massa	6	++ (baik) - +++ (baik sekali)
Gerakan individu	6	Progresif (P) 70-80 %
Konsentrasi	6	Densum (D)
Daya hidup spermatozoa	6	90-100 %
Abnormalitas spermatozoa	6	1-5 %

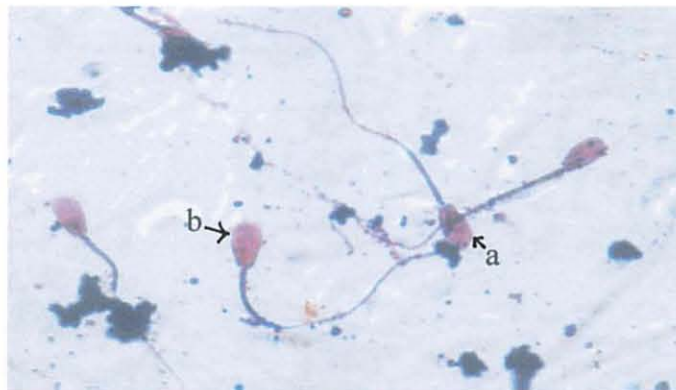
Spermatozoa hidup dan mati serta spermatozoa normal dan abnormal dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.



Gambar 4.1 Spermatozoa Hidup dan Mati
Pembesaran: 400x

Keterangan:

- a Spermatozoa hidup (kepala spermatozoa tetap jernih dengan latar belakang biru gelap)
- b Spermatozoa mati (kepala spermatozoa merah dengan latar belakang biru gelap)



Gambar 4.2. Spermatozoa Normal dan Abnormal
Pembesaran: 400x

Keterangan:

- a Spermatozoa normal (tanpa abnormalitas primer ataupun sekunder)
- b Spermatozoa abnormal (abnormalitas primer yaitu ekor melingkar)

4.2 Pemeriksaan Mikroskopis *Post Thawing* Semen Beku

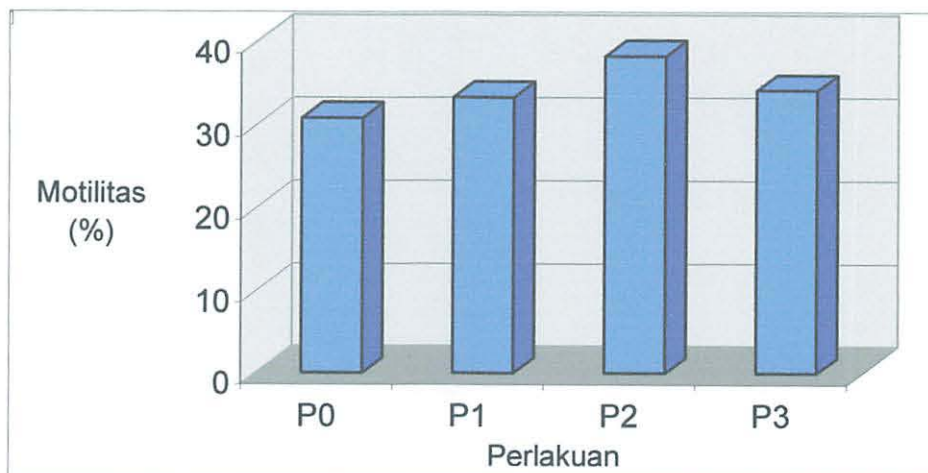
4.2.1 Motilitas Spermatozoa

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, motilitas spermatozoa fraksi atas menunjukkan perbedaan yang nyata di antara perlakuan seperti pada tabel 4.3, gambar 4.3, lampiran 5 dan 7.

Tabel 4.3. Rata-rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas

No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	30,83 ^a \pm 2,041
2	P1 (20 % putih telur)	6	33,83 ^{ab} \pm 2,582
3	P2 (30 % putih telur)	6	38,33 ^c \pm 2,582
4	P3 (40 % putih telur)	6	34,17 ^b \pm 2,041

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



Gambar 4.3. Grafik Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas

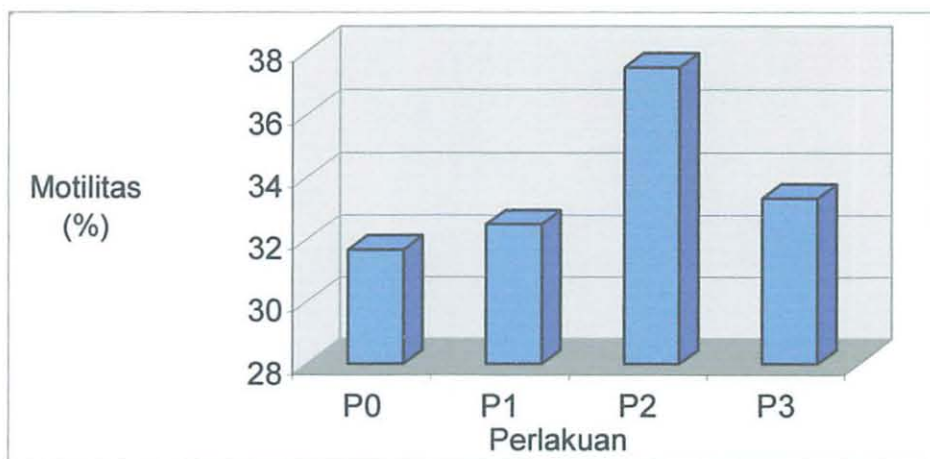
Berdasarkan uji LSD dengan taraf signifikan 5 % menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) menghasilkan motilitas spermatozoa fraksi atas tertinggi dan berbeda nyata dengan kontrol (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P3).

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, motilitas spermatozoa fraksi bawah menunjukkan perbedaan yang nyata di antara perlakuan seperti pada tabel 4.4, gambar 4.4, lampiran 6 dan 8.

Tabel 4.4. Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah

No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	31,67 ^a \pm 2,582
2	P1 (20 % putih telur)	6	32,50 ^a \pm 2,739
3	P2 (30 % putih telur)	6	37,50 ^b \pm 2,739
4	P3 (40 % putih telur)	6	33,33 ^a \pm 2,582

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



Gambar 4.4. Grafik Rata-Rata Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah

Berdasarkan uji LSD dengan taraf signifikan 5 % menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) menghasilkan motilitas spermatozoa fraksi bawah tertinggi dan berbeda nyata dengan kontrol (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P3).

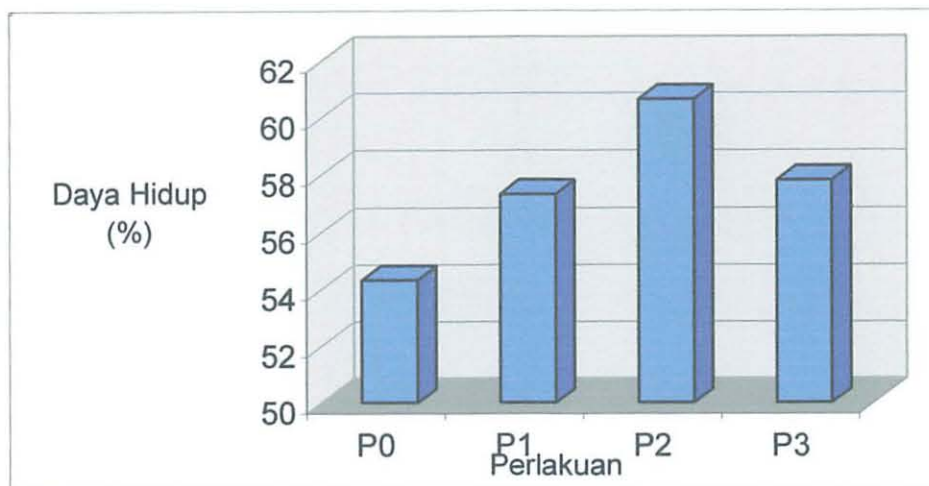
4.2.2 Daya Hidup Spermatozoa

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, daya hidup spermatozoa fraksi atas menunjukkan perbedaan yang nyata di antara perlakuan seperti pada tabel 4.5, gambar 4.5, lampiran 5 dan 9.

Tabel 4.5. Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas

No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	54,33 ^a \pm 1,211
2	P1 (20 % putih telur)	6	57,33 ^b \pm 2,733
3	P2 (30 % putih telur)	6	60,67 ^c \pm 2,251
4	P3 (40 % putih telur)	6	57,83 ^b \pm 2,137

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



Gambar 4.5. Grafik Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas

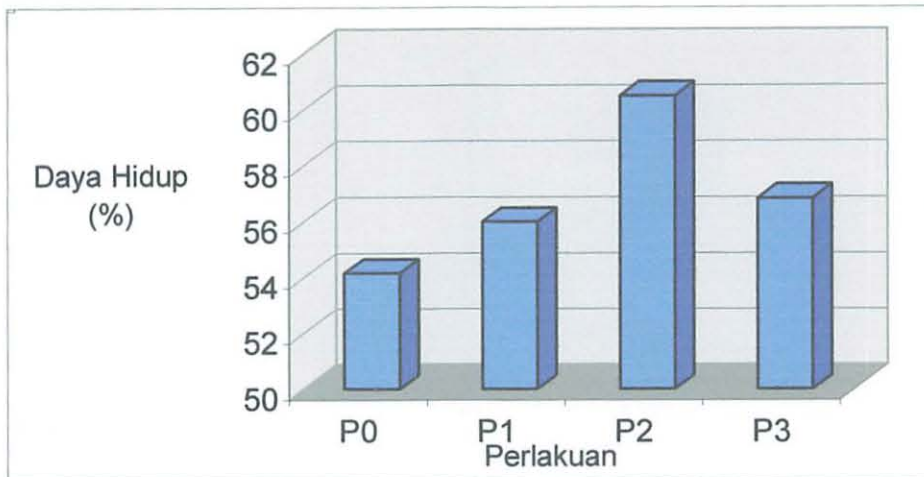
Berdasarkan uji LSD dengan taraf signifikan 5 % menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) menghasilkan daya hidup spermatozoa fraksi atas tertinggi dan berbeda nyata dengan kontrol (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P3).

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, daya hidup spermatozoa fraksi bawah menunjukkan perbedaan yang nyata di antara perlakuan seperti pada tabel 4.6, gambar 4.6, lampiran 6 dan 10.

Tabel 4.6. Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah

No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	54,17 ^a \pm 2,714
2	P1 (20 % putih telur)	6	56,00 ^b \pm 2,366
3	P2 (30 % putih telur)	6	60,50 ^c \pm 3,209
4	P3 (40 % putih telur)	6	56,83 ^b \pm 2,137

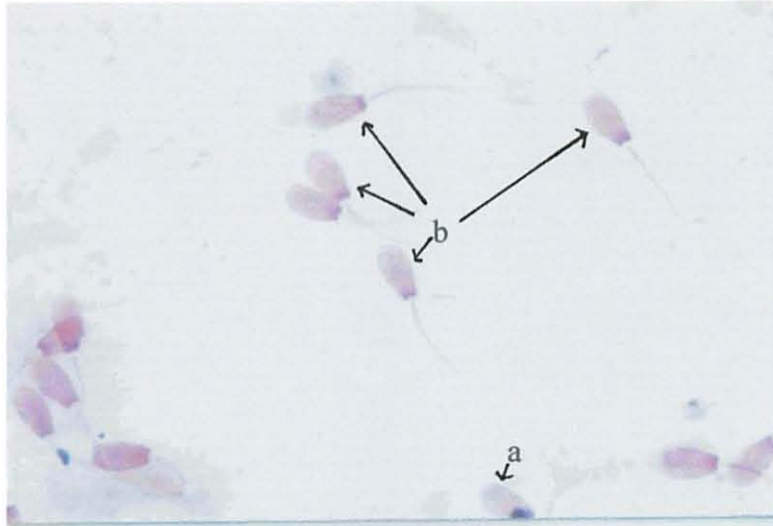
Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p \leq 0,05$)



Gambar 4.6. Grafik Rata-Rata Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah

Berdasarkan uji LSD dengan taraf signifikan 5 % menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) menghasilkan daya hidup spermatozoa fraksi bawah tertinggi dan berbeda yang nyata dengan kontrol (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P3).

Spermatozoa hidup dan mati *post thawing* semen beku hasil pemisahan spermatozoa dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7. Spermatozoa Hidup dan Mati *Post Thawing* Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa

Pembesaran: 400x

Keterangan:

- a Spermatozoa hidup (kepala spermatozoa tetap jernih dengan latar belakang biru gelap)
- b Spermatozoa mati (kepala spermatozoa merah dengan latar belakang biru gelap)

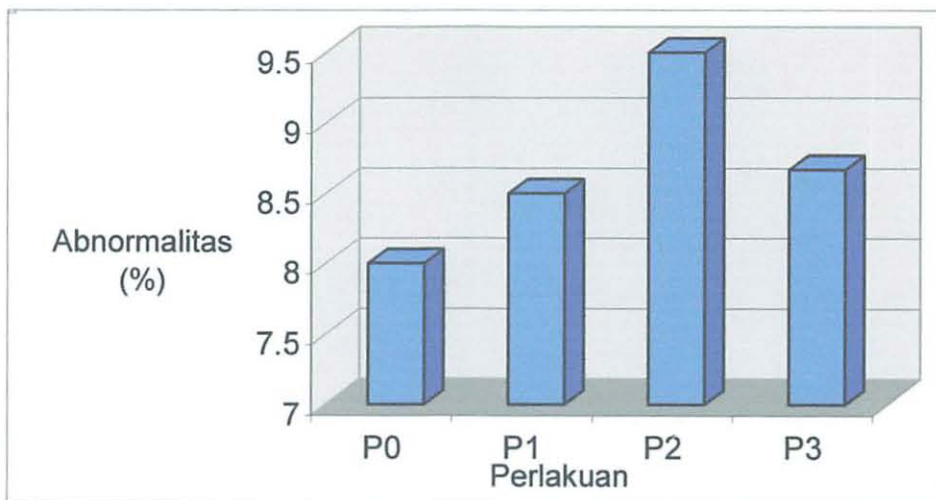
4.2.3 Abnormalitas Spermatozoa

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, abnormalitas spermatozoa fraksi atas menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata di antara perlakuan seperti pada tabel 4.7, gambar 4.8, lampiran 5 dan 11.

Tabel 4.7. Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas

No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	8,00 ^a \pm 1,265
2	P1 (20 % putih telur)	6	8,50 ^a \pm 2,168
3	P2 (30 % putih telur)	6	9,50 ^a \pm 1,643
4	P3 (40 % putih telur)	6	8,67 ^a \pm 1,751

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



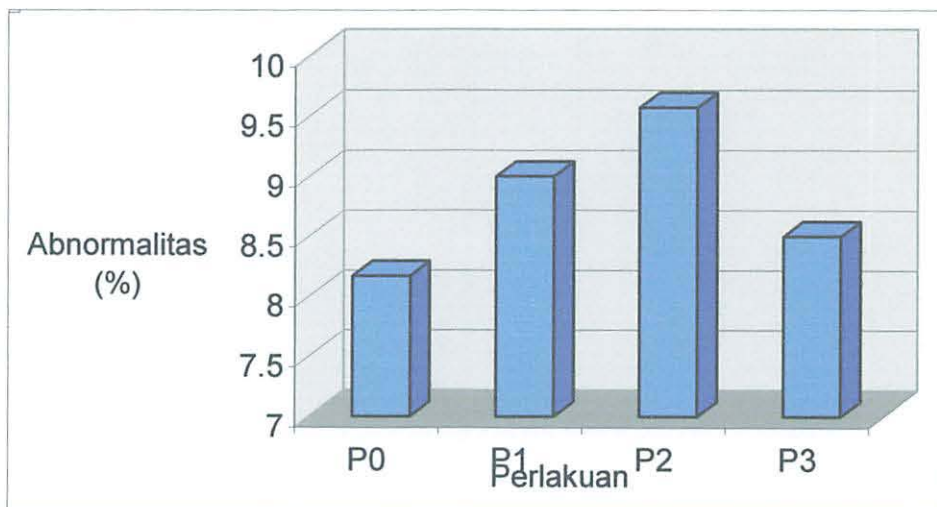
Gambar 4.8. Grafik Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas

Berdasarkan hasil uji F dengan menggunakan ANOVA, abnormalitas spermatozoa fraksi bawah di antara perlakuan menunjukkan tidak ada perbedaan yang di antara perlakuan seperti pada tabel 4.8, gambar 4.9, lampiran 6 dan 12.

Tabel 4.8. Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah

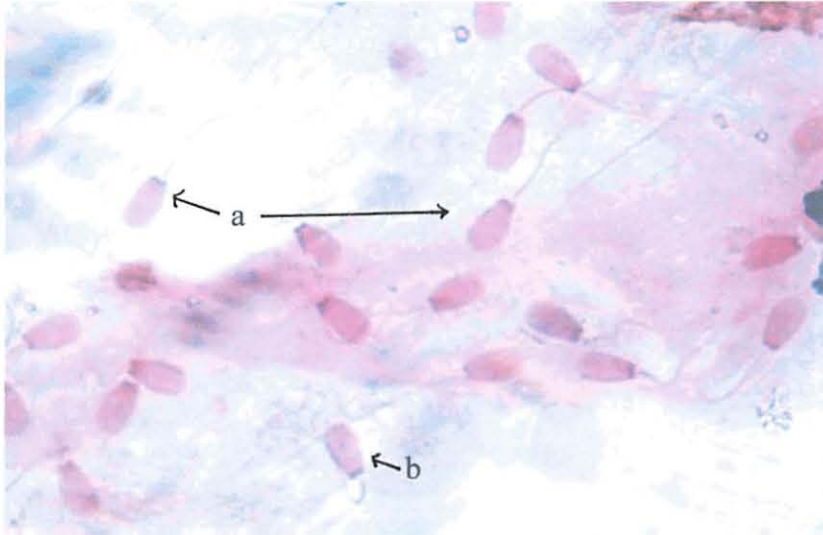
No.	Perlakuan	n	Rata-rata (%) \pm SD
1	P0 (kontrol)	6	8,17 ^a \pm 1,835
2	P1 (20 % putih telur)	6	9,00 ^a \pm 1,789
3	P2 (30 % putih telur)	6	9,67 ^a \pm 1,366
4	P3 (40 % putih telur)	6	8,50 ^a \pm 2,168

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



Gambar 4.9. Grafik Rata-Rata Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah

Spermatozoa normal dan abnormal *post thawing* semen beku hasil pemisahan spermatozoa dapat dilihat pada gambar 4.10.



Gambar 4.10. Spermatozoa Normal dan Abnormal *Post Thawing* Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa
Pembesaran: 400x

Keterangan:

- a Spermatozoa normal (tanpa abnormalitas primer ataupun sekunder)
- b Spermatozoa abnormal (abnormalitas sekunder yaitu ekor tergulung)

BAB V
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1 Pemeriksaan semen segar

Pemeriksaan semen segar meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis pada semen segar meliputi:

1. Volume semen

Menurut Partodihardjo (1992) dan Hardijanto dkk. (2003) semen yang dipancarkan pejantan dapat berbeda-beda menurut umur, ras, besar dan berat hewan, frekuensi penampungan, jumlah cairan yang dimakan dan musim. Volume semen dapat dilihat dari skala tabung yang digunakan untuk menampung semen (Partodihardjo, 1992). Pada penelitian ini diperoleh data bahwa volume semen sapi 6 – 7 ml. Hal ini menunjukkan bahwa bahwa volume semen sapi tersebut normal karena masih berada dalam kisaran 2 – 20 ml (Ax *et al.*, 2000^a).

2. Konsistensi semen

Menurut Partodihardjo (1992) konsistensi adalah derajat kekentalan. Untuk pemeriksaan konsistensi semen dilakukan di tempat terang dengan memiringkan dan menegakkan tabung untuk melihat cairan yang menempel pada dinding tabung. Hardijanto dkk. (2003) mengungkapkan bahwa bila terlihat bintik kecil yang banyak berdesakan turun ke bawah secara perlahan-lahan maka konsistensinya pekat yang berarti konsentrasi spermatozoa di dalam semen tersebut tinggi. Semen encer tidak meninggalkan bekas pada dinding tabung bila dimiringkan yang berarti konsentrasi spermatozoa rendah. Pada penelitian ini

semen terlihat turun ke bawah perlahan-lahan sampai dengan agak cepat dan meninggalkan bekas pada dinding tabung. Hal ini menunjukkan bahwa konsistensi spermatozoa pada sampel ini sedang sampai kental.

3. Bau semen

Hardijanto dkk. (2003) menyebutkan bahwa semen setiap hewan normal menunjukkan bau spesifik atau khas. Bau ini lebih banyak dipengaruhi oleh bau cairan kelenjar pelengkap. Bau semen sapi normal seperti susu. Bau semen sapi seperti busuk dan anyir (amis) mengindikasikan adanya radang dalam saluran kelamin hewan jantan tersebut. Bau seperti urine berarti semen tersebut terkontaminasi oleh urine. Pada penelitian ini bau semen khas seperti bau semen sapi normal pada umumnya.

4. Warna semen

Pada penelitian ini semen sapi menunjukkan warna semen normal yaitu berwarna putih sampai putih kekuningan (Toelihere, 1979). Menurut Partodihardjo (1992) derajat kekeruhan atau keputihan tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Semakin keruh biasanya jumlah spermatozoa per ml semen semakin banyak. Warna semen krem tua sampai kuning disebabkan jumlah pigmen riboflavin yang tidak berperan terhadap spermatozoa dan kesuburan semen (Partodihardjo, 1992). Warna semen yang tidak normal seperti merah muda berupa darah segar akibat luka atau inflamasi saluran genital bawah, coklat gelap berupa darah busuk akibat luka atau inflamasi saluran genital atas dan adanya material bergranulasi karena pus yang berwarna hijau kekuning-

kuningan akibat kuman *Pseudomonas auroginosa* (Lindsay *et al.*, 1982 dan Partodihardjo, 1992).

5. Derajat Keasaman (pH) semen

Menurut Lindsay *et al.* (1982) derajat keasaman semen dapat diperiksa menggunakan pH meter atau kertas lakmus. Makin rendah pH semen (asam) makin kurang baik kualitasnya. Makin tinggi pH semen (basa) menunjukkan tingkat kematian spermatozoa tinggi. PH semen sapi pada sampel penelitian ini berkisar antara 6–7 yang berarti pH semen sapi ini normal karena masih berkisar antara 6,4 – 7,8 (Ax *et al.*, 2000^a).

Pemeriksaan mikroskopis pada semen segar meliputi;

1. Gerakan massa

Menurut Hardijanto dkk. (2003) gerakan massa adalah gerakan spermatozoa secara bersama-sama membentuk gelombang yang mencerminkan daya gerak dan konsentrasi spermatozoa. Pemeriksaan dilakukan pada suhu 37 °C agar diperoleh gerakan spermatozoa optimal dengan cara meletakkan satu tetes semen di atas gelas obyek untuk mengamati gerakan massa di bawah mikroskop pembesaran 100 kali. Ada empat penilaian gerakan massa yaitu sangat baik (+++), baik (++), sedang (+) dan buruk (0/N).

Sampel semen pada penelitian ini gerakan massanya baik (++) sampai sangat baik (+++) sehingga dapat digunakan untuk proses selanjutnya (Hardijanto dan Hardjoprano, 1994).

2. Gerakan individu

Ax *et al.* (2003^a) menyebutkan bahwa pemeriksaan gerakan individu dilakukan pada suhu kamar agar spermatozoa memiliki pergerakan optimal sehingga dapat mencapai ovum dalam saluran oviduct dengan waktu relatif singkat dan terjadi pembuahan sempurna. Gerakan individu diperiksa dengan memindahkan lensa mikroskop ke pembesaran 400 kali.

Menurut Hardijanto dkk. (2003) ada lima tipe gerakan spermatozoa yaitu: Progresif (P), Oscillatoris (O) atau Vibratoris (V), Circular (C), Reverse (R) dan Necrospermia (N).

Menurut Hardijanto dan Hardjopranto (1994) cara penilaian gerakan spermatozoa ada enam yaitu 0, 1 (<25%), 2 (25-50%), 3(50-75%), 4(70-85%) dan 5 (>85%).

Pada penelitian ini, gerakan individunya progresif (P) 70 – 80 % yang berarti sampel semen ini bagus dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya (Lindsay *et al.*, 1982).

3. Konsentrasi semen

Menurut Hardijanto dan Hardjopranto (1994) konsentrasi semen adalah banyaknya spermatozoa dalam setiap mm³ atau cm³ (ml) semen. Penentuan konsentrasi semen dapat dilakukan dengan cara Rusia ataupun cara Thoma. Cara Rusia relatif praktis, mudah dan akurat sehingga digunakan dalam penelitian ini meletakkan satu tetes semen di atas gelas obyek lalu ditutup dengan gelas penutup dan dilihat jarak antar kepala spermatozoa dengan mikroskop pembesaran 400 kali. Partodihardjo (1992) membedakan konsentrasi spermatozoa menjadi

Densum (D), Semi Densum (SD), Rarum (R), Oligospermia (O) dan Aspermia (A).

Pada sampel penelitian ini konsentrasinya tergolong Densum (D) berarti ada lebih dari 1.000.000 spermatozoa / mm^3 semen.

4. Daya hidup spermatozoa

Pada penelitian ini diperoleh hasil persentase spermatozoa hidup 90–100 % melalui penghitungan pada preparat ulas dengan eosin negrosin di bawah mikroskop pembesaran 400 kali.

Prinsip dari penggunaan preparat ulas untuk membedakan spermatozoa hidup dan mati adalah permeabilitas membran lipoprotein pembungkus kepala spermatozoa. Pada spermatozoa mati permeabilitas membran meningkat terutama di daerah pangkal kepala sehingga akan menghisap zat warna dan menyebabkan warna kepala spermatozoa menjadi merah atau merah muda (Toelihere, 1993; Bearden and Fuquay, 1992). Pada spermatozoa hidup, eosin tidak dapat menyusup ke dalam spermatozoa akibat membran plasmanya masih utuh sehingga spermatozoa hidup tetap berwarna putih dengan latar belakang biru gelap (Bearden and Fuquay, 1992 dan Noakes, 1988).

Sampel semen dianggap baik jika jumlah spermatozoa yang mati kurang dari 25 % sehingga sampel semen dalam penelitian ini termasuk baik dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya (Arthur, 1975 dalam Listia, 2003).

5. Abnormalitas spermatozoa

Dengan menggunakan preparat ulas yang sama juga dapat dihitung jumlah spermatozoa abnormal. Abnormalitas terdiri dari abnormalitas primer dan

sekunder. Abnormalitas primer terjadi akibat kelainan spermatogenesis yang disebabkan radang seperti orchitis, epididimitis dan seminal vesikulitis (Moss *et al.*, 1979). Contoh abnormalitas primer adalah kepala terlampau besar, kecil, pendek, lebar, sempit, memanjang, piriformis, ganda; ekor ganda, melingkar; bagian tengah membengkak atau pertautan abaxial, dan lain-lain (Toelihere, 1993). Abnormalitas sekunder terjadi dalam perjalanan spermatozoa dari tubulus seminiferus dan epididimis selama ejakulasi atau akibat manipulasi ejakulat termasuk perlakuan kasar, pemanasan berlebihan, kontaminasi dengan urin, akibat gizi tidak seimbang, temperatur lingkungan, pengambilan semen terlalu sering, perlakuan kasar, pengocokan atau pengadukan berlebihan, pemanasan atau pendinginan berlebihan, kontaminasi dengan air, media pengencer dan media penyaringan (Toelihere, 1993, Moss *et al.*, 1979, Coulter *et al.*, 1997, Susilawati dkk., 1997 dan Hermadi dkk., 1998). Contoh abnormalitas sekunder adalah ekor putus, kepala tanpa ekor, bagian tengah melipat, butiran-butiran protoplasma proksimal dan distal, akrosom lepas, dan lain-lain (Toelihere, 1993).

Spermatozoa abnormal menunjukkan kesuburan semen yang rendah dan bila dapat membuahi ovum dapat menyebabkan kematian embrio dini, cacat sejak lahir, atau anak lahir lemah dan mati segera setelah dilahirkan (Hardijanto dkk., 2003 dan Kennedy *et al.*, 2002).

Pada semen segar yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh persentase abnormalitas sebesar 1–5 % yang kebanyakan disebabkan abnormalitas primer. Jumlah abnormalitas primer ini sangat sedikit dan kurang dari 20 % dari jumlah spermatozoa abnormal pada sapi umumnya dan kurang dari 29,41 % dari

jumlah spermatozoa abnormal pada sapi FH sehingga semen ini sangat layak untuk proses selanjutnya (Partodihardjo, 1992 dan Scavone *et al.*, 2001).

5.2 Pemeriksaan Mikroskopis *Post Thawing* Semen Beku

5.2.1 Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah dilakukan setelah proses pencairan kembali semen beku. Proses pencairan dilakukan pada suhu 37 °C selama 7 – 15 detik untuk mencapai tingkat motilitas yang optimal (Noakes, 1988 dan Partodihardjo, 1992).

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan pada suhu kamar agar spermatozoa memperoleh pergerakan yang optimal (Hardijanto dkk., 2003). Pernyataan ini didukung oleh Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa di Indonesia terutama di daerah panas, pergerakan spermatozoa dapat dinilai secara memuaskan pada suhu kamar.

Menurut Salisbury and Van Demark (1985) terdapat tiga macam gerakan normal spermatozoa yaitu gerakan maju, berputar dan bergetar. Pergerakan spermatozoa disebabkan oleh adanya aktivitas kontraktile dari ekor spermatozoa. Bagian tengah dari ekor spermatozoa terdapat substansi kontraktile filamen aksial yang merupakan tempat awal aktivitas gelombang terjadi lalu diteruskan ke seluruh ekor spermatozoa. Bila terjadi kelainan gerak ekor maka terjadi penyimpangan dari gerakan normal spermatozoa (Salisbury and Van Demark, 1985).

Metode yang dipergunakan untuk menilai motilitas spermatozoa biasanya dilakukan secara visual dan hasilnya dinyatakan secara perbandingan antara yang motil dan tidak motil (Salisbury and Van Demark, 1985). Dalam penghitungan persentase motilitas dilakukan pada tiap sepuluh spermatozoa dalam satu lapangan pandang kecil dan diulang pada lapangan pandang yang lain sebanyak 10 kali. Penilaian motilitas spermatozoa dinyatakan dalam kisaran nilai 0-100 %. Bila 80–100 % nilai motilitasnya baik sekali, 60–80 % nilai motilitasnya baik, 40–60 % nilai motilitasnya cukup baik, 20–40 % nilai motilitasnya jelek dan 0–20 % nilai motilitasnya sangat jelek. Umumnya motilitas setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa yang masih dapat digunakan untuk IB adalah 30–40 % (Susilawati dkk., 1999).

Pada penelitian ini motilitas spermatozoa fraksi atas berkisar antara 30-40 % dengan rata-rata $34,17 \pm 3,510$ %. Motilitas tertinggi diperoleh pada P2 (30 % putih telur) dengan rata-rata $38,33 \pm 2,582$ %. Motilitas ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $34,17 \pm 2,041$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $33,33 \pm 2,582$ %. Motilitas terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $30,83 \pm 2,041$ %. Motilitas spermatozoa fraksi bawah berkisar antara 30–40 % dengan rata-rata $33,75 \pm 3,378$ %. Motilitas tertinggi diperoleh pada P2 (30 % putih telur) dengan rata-rata $37,50 \pm 2,739$ %. Motilitas ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $33,33 \pm 2,582$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $32,50 \pm 2,739$ %. Motilitas terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $31,67 \pm 2,582$ %.

Setelah dianalisis dengan uji F dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang nyata di antara perlakuan tersebut. Untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil perbedaan yang nyata tersebut maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau *Least Significant Difference* (LSD) dengan taraf signifikan 5 % untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan yang nyata. Hasil analisis dengan uji BNT atau LSD ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) pada spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah menghasilkan motilitas setelah pembekuan tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.

Perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) memberikan motilitas tertinggi dan berbeda nyata dengan kontrol atau tanpa putih telur (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P2). Hal ini disebabkan perbedaan gradien konsentrasi putih telur dalam kolom albumin yang mempengaruhi viskositas atau kepekatan ovalbumin (Creighton, 1996; Rand *et al.*, 1999 dan Susilawati dkk., 2002).

Pada kontrol atau tanpa putih telur (P0), proses pemisahan spermatozoa tidak terjadi karena tidak adanya media pemisah sehingga spermatozoa X dan Y masih bercampur, dapat bergerak bebas dan cepat karena media masih dalam konsentrasi paling encer. Hal ini menyebabkan energi dalam spermatozoa cepat habis sehingga motilitasnya cepat menurun dan mencapai tingkat motilitas paling rendah dibanding perlakuan lain (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 20 % putih telur (P1), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin masih kurang pekat atau agak encer sehingga proses pemisahan spermatozoa belum berlangsung dengan baik. Hal ini menyebabkan proses pemisahan spermatozoa berlangsung terlalu cepat sehingga spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) kurang terpisah dengan baik. Ovalbumin belum cukup pekat sehingga spermatozoa bergerak cepat sehingga energi spermatozoa berkurang dan motilitasnya menurun (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 30 % putih telur (P2), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin cukup pekat sehingga proses pemisahan spermatozoa berlangsung dengan baik dan spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) terpisah dari spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y). Ovalbumin sudah cukup pekat sehingga gerakan spermatozoa terbatas pada gerakan pemisahan. Hal ini menyebabkan energi spermatozoa tidak cepat berkurang dan motilitasnya tetap baik (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 40 % putih telur (P3), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin menjadi terlalu pekat sehingga proses pemisahan spermatozoa berlangsung lambat. Hal ini menyebabkan spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) akan sulit terpisah karena spermatozoa Y sulit untuk berpenetrasi ke dalam ovalbumin sebagai media pemisah. Akibat proses pemisahan yang berlangsung lambat dan lama maka cadangan energi dalam spermatozoa akan cepat habis sehingga motilitasnya menurun (Susilawati dkk., 2002).

Rata-rata motilitas spermatozoa fraksi atas yaitu $34,17 \pm 3,510$ % tidak berbeda jauh dengan rata-rata motilitas fraksi bawah yaitu $33,75 \pm 3,378$ % sehingga kedua fraksi tersebut mempunyai kemampuan yang sama dalam proses fertilisasi untuk menghasilkan anak betina dengan fraksi atas yang merupakan spermatozoa X dan anak jantan dengan fraksi bawah yang merupakan spermatozoa Y (Jaswandi, 1992 yang dikutip oleh Anwar dkk., 2005).

Motilitas setelah pembekuan semen hasil pemisahan spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin ini masih berkisar antara 30–40 % sehingga dapat digunakan untuk IB. Rata-rata motilitas ini sedikit lebih baik daripada rata-rata motilitas setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan Sephadex G-200 yang dilakukan Susilawati dkk. (1999) yaitu berkisar antara $31,11 \pm 4,840$ % dengan media TCM 199 – kuning telur dan $32,22 \pm 5,070$ % dengan media Tris Aminomethan-kuning telur. Hal ini dapat menjadi dasar pertimbangan untuk menggunakan metode pemisahan spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin sebelum proses pembuatan semen beku.

5.2.2 Daya Hidup Spermatozoa

Kualitas semen beku ditentukan oleh faktor besar kecilnya jumlah spermatozoa hidup. Semakin besar daya hidup spermatozoa maka semakin baik pula kualitas semen beku tersebut (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994).

Prinsip penilaian daya hidup spermatozoa didasarkan pada adanya zat warna masuk ke dalam spermatozoa mati melalui bagian yang rusak atau bocor. Permukaan spermatozoa dilapisi oleh sejumlah besar zat warna, tetapi bila

spermatozoa mati maka zat warna akan masuk ke bagian tengah kepala spermatozoa (Lindsay *et al.*, 1982). Hal ini terjadi akibat permeabilitas membran sel meningkat terutama di daerah *post nuclear cups* sehingga akan menyerap warna menjadi merah keunguan, sedangkan spermatozoa hidup warnanya akan putih jernih sebab membran selnya masih utuh. Jumlah spermatozoa yang hidup dan mati dihitung dalam dua kali penghitungan 100 ekor (Hardijanto dkk., 2003). Umumnya daya hidup setelah pemisahan spermatozoa dan pembekuan semen yang masih dapat digunakan untuk IB adalah lebih dari 50 % atau ± 6 juta spermatozoa hidup dari sekitar 12-20 juta spermatozoa per dosis (Gordon, 2001).

Pada penelitian ini daya hidup spermatozoa fraksi atas berkisar antara 53–63 % dengan rata-rata $57,54 \pm 3,050$ %. Daya hidup tertinggi diperoleh pada P2 (30 % putih telur) dengan rata-rata $60,67 \pm 2,251$ %. Daya hidup ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $57,83 \pm 2,137$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $57,33 \pm 2,733$ %. Daya hidup terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $54,33 \pm 1,211$ %. Daya hidup spermatozoa fraksi bawah berkisar antara 51–65 % dengan rata-rata $56,88 \pm 3,405$ %. Daya hidup tertinggi diperoleh pada P2 (30 % putih telur) dengan rata-rata $60,50 \pm 3,209$ %. Daya hidup ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $56,83 \pm 2,137$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $56,00 \pm 2,366$ %. Daya hidup terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $54,17 \pm 2,714$ %.

Setelah dianalisis dengan uji F dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang nyata di antara

perlakuan tersebut. Untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil perbedaan yang nyata tersebut maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau *Least Significant Difference* (LSD) dengan taraf signifikan 5 % untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan yang nyata. Hasil analisis dengan uji BNT atau LSD ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) pada spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah menghasilkan daya hidup setelah pembekuan tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.

Perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) memberikan daya hidup tertinggi dan berbeda nyata dengan kontrol atau tanpa putih telur (P0), 20 % putih telur (P1) dan 40 % putih telur (P3). Hal ini disebabkan perbedaan gradien konsentrasi putih telur dalam kolom albumin yang mempengaruhi viskositas atau kepekatan ovalbumin (Creighton, 1996; Rand *et al.*, 1999 dan Susilawati dkk., 2002).

Pada kontrol atau tanpa putih telur (P0), proses pemisahan spermatozoa tidak terjadi karena tidak adanya media pemisah sehingga spermatozoa X dan Y masih bercampur, dapat bergerak bebas dan cepat karena media masih dalam konsentrasi paling encer. Hal ini menyebabkan energi dalam spermatozoa banyak terpakai untuk pergerakan sehingga jumlah spermatozoa mati paling banyak dibanding perlakuan lain (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 20 % putih telur (P1), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin masih kurang pekat atau agak encer sehingga proses pemisahan spermatozoa belum berlangsung dengan baik. Hal ini

menyebabkan proses pemisahan spermatozoa berlangsung terlalu cepat sehingga spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) kurang terpisah dengan baik. Ovalbumin belum cukup pekat sehingga spermatozoa bergerak cepat dan memakai lebih banyak energi. Hal ini menyebabkan jumlah spermatozoa mati meningkat (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 30 % putih telur (P2), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin cukup pekat sehingga proses pemisahan spermatozoa berlangsung dengan baik dan spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) terpisah dari spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y). Ovalbumin sudah cukup pekat sehingga gerakan spermatozoa terbatas pada gerakan pemisahan. Hal ini menyebabkan energi spermatozoa tidak cepat berkurang yang terlihat dari jumlah spermatozoa yang mati paling sedikit dibanding perlakuan lain (Susilawati dkk., 2002).

Pada konsentrasi 40 % putih telur (P3), viskositas atau kepekatan ovalbumin dalam kolom albumin menjadi terlalu pekat sehingga proses pemisahan spermatozoa berlangsung lambat. Hal ini menyebabkan spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) akan sulit terpisah karena spermatozoa Y sulit untuk berpenetrasi ke dalam ovalbumin sebagai media pemisah. Akibat proses pemisahan yang berlangsung lambat dan lama maka cadangan energi dalam spermatozoa akan cepat habis sehingga jumlah spermatozoa yang mati meningkat (Susilawati dkk., 2002).

Rata-rata daya hidup spermatozoa fraksi atas yaitu $57,54 \pm 3,050$ % lebih tinggi daripada rata-rata daya hidup fraksi bawah yaitu $56,88 \pm 3,405$ %. Hal ini disebabkan fraksi atas yang merupakan spermatozoa X memiliki daya hidup yang lebih besar daripada fraksi bawah yang merupakan spermatozoa Y (Hafez and Hafez, 2000). Perbedaan ini cukup kecil sehingga kedua fraksi tersebut masih mempunyai kemampuan yang sama dalam proses fertilisasi untuk menghasilkan anak betina dengan fraksi atas yang merupakan spermatozoa X dan anak jantan dengan fraksi bawah yang merupakan spermatozoa Y (Jaswandi, 1992 yang dikutip oleh Anwar dkk., 2005).

Daya hidup setelah pembekuan semen hasil pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin dengan menggunakan putih telur ini masih berkisar antara 50–65 % sehingga dapat digunakan untuk IB. Rata-rata motilitas ini lebih baik daripada rata-rata daya hidup setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan Sephadex G-200 yang dilakukan Susilawati dkk. (1999) yaitu berkisar antara $43,66 \pm 4,740$ % dengan media TCM 199 – kuning telur dan $45,44 \pm 3,930$ % dengan media Tris Aminomethan-kuning telur. Hal ini dapat menjadi dasar pertimbangan untuk menggunakan metode pemisahan spermatozoa spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin sebelum proses pembuatan semen beku.

5.2.3 Abnormalitas Spermatozoa

Kualitas semen beku ditentukan oleh faktor jumlah spermatozoa yang abnormal. Makin meningkat jumlah spermatozoa yang abnormal di dalam semen, semakin rendah kesuburan semen ternak tersebut. Spermatozoa cacat, walaupun

dapat membuahi ovum, tetapi biasanya berakhir dengan kematian embrio dini atau anak yang baru lahir dan dapat menyebabkan cacat bila anak tersebut dapat bertahan. Dalam semen yang kurang subur, biasanya didapatkan banyak spermatozoa yang bentuk dan strukturnya tidak normal. Spermatozoa abnormal sangat berpengaruh pada kualitas semen dan bila diinseminasikan cenderung menyebabkan betina gagal bunting (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Abnormalitas yang dihitung dalam preparat ulas meliputi abnormalitas primer dan sekunder (Partodihardjo, 1992). Abnormalitas spermatozoa yang terdapat pada semen hasil pembekuan umumnya merupakan abnormalitas sekunder seperti ekor patah dan bentuk ekor yang melingkar akibat *cold* atau *osmotic shock* (Susilawati dkk., 1999).

Jumlah spermatozoa yang abnormal dihitung dalam satu lapangan pandang untuk menghitung semua spermatozoa baik yang normal maupun abnormal. Setelah mendapatkan jumlah 100 sel maka dapat disimpulkan persentase spermatozoa yang abnormal. Pada umumnya bila terlihat sel dengan bentuk abnormal primer dan jumlahnya 20 % atau lebih maka kualitas semen dianggap jelek. Bila terlihat sel dengan bentuk abnormal sekunder dan jumlahnya 25 % atau lebih maka pembuatan sediaan lebih baik diulangi (Partodihardjo, 1992). Umumnya abnormalitas setelah pemisahan spermatozoa dan pembekuan semen hasil pemisahan tersebut yang masih dapat digunakan untuk IB adalah kurang dari 20 % (Bearden and Fuquay, 1992).

Pada penelitian ini abnormalitas spermatozoa fraksi atas berkisar antara 6-11 % dengan rata-rata $8,67 \pm 1,711$ %. Abnormalitas tertinggi diperoleh pada P2

(30 % putih telur) dengan rata-rata $9.50 \pm 1,643$ %. Abnormalitas ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $8,67 \pm 1,751$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $8,50 \pm 2,168$ %. Abnormalitas terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $8,00 \pm 1,265$ %. Abnormalitas spermatozoa fraksi bawah berkisar antara 6 - 11 % dengan rata-rata $8,83 \pm 1,786$ %. Abnormalitas tertinggi diperoleh pada P2 (30 % putih telur) dengan rata-rata $9,67 \pm 1,366$ %. Abnormalitas ini lebih tinggi daripada perlakuan yang lain yaitu P3 (40 % putih telur) dengan rata-rata $8,50 \pm 2,168$ % dan P2 (20 % putih telur) dengan rata-rata $9,00 \pm 1,789$ %. Abnormalitas terendah diperoleh pada P0 (kontrol) dengan rata-rata $8,17 \pm 1,835$ %.

Setelah dianalisis dengan uji F dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) diperoleh hasil bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata di antara perlakuan tersebut. Hasil analisis dengan uji F ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) pada spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah menghasilkan abnormalitas setelah pembekuan tertinggi dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Tidak adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan tersebut menunjukkan bahwa kadar putih telur tidak mempengaruhi abnormalitas terutama abnormalitas sekunder sehingga putih telur dapat digunakan dalam proses pemisahan spermatozoa dan pembekuan semen hasil pemisahan tersebut tanpa mempengaruhi kualitas semen.

Rata-rata abnormalitas spermatozoa fraksi atas yaitu $8,67 \pm 1,711$ % tidak berbeda jauh dengan rata-rata abnormalitas fraksi bawah yaitu $8,83 \pm 1,786$ % sehingga kedua fraksi tersebut mempunyai kemampuan yang sama dalam proses

fertilisasi untuk menghasilkan anak betina dengan fraksi atas yang merupakan spermatozoa X dan anak jantan dengan fraksi bawah yang merupakan spermatozoa Y (Jaswandi, 1992 yang dikutip oleh Anwar dkk., 2005).

Abnormalitas setelah pembekuan semen hasil pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin dengan menggunakan putih telur ini masih berkisar antara 6-11 % sehingga dapat digunakan untuk IB. Rata-rata abnormalitas setelah ini lebih baik daripada rata-rata abnormalitas setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan Sephadex G-200 yang dilakukan Susilawati dkk. (1999) yaitu berkisar antara $19,88 \pm 1,760$ % dengan media Tris Aminomethan-kuning telur TCM 199 – kuning telur dan $21,33 \pm 1,820$ % dengan media TCM 199 – kuning telur. Hal ini dapat menjadi dasar pertimbangan untuk menggunakan metode pemisahan spermatozoa spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin sebelum proses pembuatan semen beku.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur memberikan hasil motilitas dan daya hidup spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) tertinggi dan berbeda nyata serta abnormalitas tertinggi tetapi tidak berbeda nyata dengan kontrol, 20 % putih telur dan 40 % putih telur setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin.

6.2 Saran

Saran yang dapat penulis berikan pada penelitian ini adalah:

1. Teknologi pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin sebaiknya menggunakan 30 % putih telur sebelum dilakukan proses pembekuan semen hasil pemisahan tersebut.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui media terbaik yang dapat digunakan dalam pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin dan pembekuan semen hasil pemisahan untuk meningkatkan motilitas, daya hidup dan mengurangi abnormalitas.
3. Perlu diterapkan teknologi pemisahan spermatozoa sapi FH dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin dan pembekuan

semen hasil pemisahan secara massal pada Balai-Balai Inseminasi Buatan untuk mendapatkan jenis kelamin ternak sesuai dengan harapan.

4. Perlu adanya kerja sama antara pemerintah, masyarakat dan pihak universitas dalam usaha memasyarakatkan penggunaan semen beku hasil pemisahan spermatozoa sapi FH dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin bagi peternak di seluruh Indonesia.

RINGKASAN

MARIA SARININGSIH. Upaya untuk mengimbangi kebutuhan protein hewani masyarakat sangat membutuhkan peningkatan populasi dan produksi ternak. Salah satu usaha untuk meningkatkan produksi dan populasi ternak adalah program Inseminasi Buatan (IB). Program IB ini perlu ditunjang dengan teknologi pemisahan spermatozoa seperti teknik kolom albumin dengan menggunakan putih telur dan dilanjutkan dengan pembekuan semen hasil pemisahan spermatozoa. Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah mengetahui adanya perbedaan pengaruh kadar putih telur dalam diluter terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa. Seleksi jenis kelamin dengan menggunakan albumin merupakan metode yang relatif mudah, murah dan dapat diaplikasikan di lapangan.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Semen Beku, Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga di Kedamean, Gresik. Bahan penelitian ini adalah semen sapi perah FH jantan milik Taman Ternak Pendidikan dan diluter. Bahan yang digunakan dalam pemisahan spermatozoa X dan Y adalah putih telur sedangkan bahan yang digunakan dalam pembuatan semen beku adalah nitrogen cair dan ministraw kosong. Semen sapi FH hasil penampungan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Kemudian semen tersebut dicampurkan dengan diluter susu skim kuning telur (SSKT) yang tidak mengandung putih telur sebagai kontrol (P0), 20 % putih telur

(P1), 30 % putih telur (P2) dan 40 % putih telur (P3). Selanjutnya dilakukan pemisahan spermatozoa sapi FH dengan teknik kolom albumin. Semen sapi hasil pemisahan tersebut lalu dibekukan dalam bentuk ministraw. Kualitas semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan teknik ini diketahui dengan menghitung spermatozoa motil, hidup dan abnormal setelah pencairan semen beku (*post thawing*). Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian dianalisis dengan uji F dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf signifikan 5 % apabila terdapat perbedaan nyata antara perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah tertinggi dan berbeda nyata didapat pada perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur dengan rata-rata $38,33 \pm 2,582$ % untuk fraksi atas dan $37,50 \pm 2,739$ % untuk fraksi bawah. Persentase hidup spermatozoa fraksi atas dan fraksi bawah tertinggi dan berbeda nyata didapat pada perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur dengan rata-rata $60,67 \pm 2,251$ % untuk fraksi atas dan $60,50 \pm 3,209$ % untuk fraksi bawah. Abnormalitas tertinggi tetapi tidak berbeda nyata didapatkan pada perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur dengan rata-rata $9,50 \pm 1,643$ % untuk fraksi atas dan $9,67 \pm 1,366$ % untuk fraksi bawah.

Perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur (P2) memberikan motilitas, daya hidup tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan lain disebabkan viskositas atau kepekatan ovalbumin pada konsentrasi ini merupakan konsentrasi terbaik yang dapat memisahkan spermatozoa X dan Y serta memiliki pengaruh yang baik terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa.

Semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan menggunakan putih telur pada teknik kolom albumin dengan memberikan hasil motilitas 30-40 %, daya hidup 53-63 % dan abnormalitas 6-11 % sehingga semen beku ini masih memenuhi syarat untuk digunakan dalam IB.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan dengan menggunakan 30 % putih telur memberikan hasil motilitas dan daya hidup spermatozoa fraksi atas (spermatozoa X) dan spermatozoa fraksi bawah (spermatozoa Y) tertinggi dan berbeda nyata serta abnormalitas tertinggi dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan lain setelah pencairan semen beku hasil pemisahan spermatozoa dengan teknik kolom albumin sehingga penulis menyarankan untuk menggunakan 30 % putih telur dalam teknik ini, penerapan teknik ini secara massal pada Balai-Balai Inseminasi Buatan serta kerja sama antara pemerintah, masyarakat dan pihak universitas.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, H., Rimayanti, T.W.Suprayogi. 2005. Separasi Spermatozoa Sapi dengan Metode Columns Albumin dan Sexing Berdasarkan Berat Molekul dengan menggunakan SDS-PAGE Suatu Upaya Produksi Semen Beku Sapi Sesuai dengan Jenis Kelamin yang Diinginkan. Laporan Penelitian Proyek Due-Like Batch III. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 8-14, 17, 34
- Ax, R.L., M.Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C.Love, D.D.Varner, B.Hafez and M.E.Bellin. 2000^a. Semen Evaluation. In: E.S.E.Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 365-374.
- Ax, R.L., M.Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C.Love, D.D.Varner, B.Hafez and M.E.Bellin. 2000^b. Artificial Insemination. In: E.S.E.Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 376-378.
- Bearden, H.J. and J.W.Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction. 3rd ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 163-175, 177-194.
- Blakely, J. and D.H.Bade. 1984. Ilmu Peternakan (The Science of Animal Husbandry). 4th ed. Diterjemahkan oleh Srigandono. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 282-284.
- Coulter, G.H., R.B.Cook and J.P.Kastelis. 1997. Effect of Dietary Energy on Scrotal Surfaces Temperature, Seminal Quality and Sperm Production in Young Beef Bulls. *J.Anim.Sci.* 75: 1048-1052.
- Creighton, T.E. 1996. Proteins: Structures and Molecular Properties. 2nd ed. W.H.Freeman and Company. New York. 66, 93, 125, 130, 218, 341-342, 437.
- Foote, R.H. 1969. Physiological Aspect of Artificial Insemination. In H.H. Cole and P.T.Cupps (Ed.). Reproduction in Domestic Animals. 2nd ed. Academic Press, Inc. New York. 328-329, 336-337.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Hewan Ternak (Anatomy and Physiology of Farm Animal). 4th ed. Diterjemahkan oleh B. Srigandono and K.Praseno. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 706, 753-792.
- Frandsen, R.D., W.L.Wilke and A.D.Fails. 2003. Anatomy and Physiology of Domestic Animals. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland and Philadelphia. 383-384.

- Garner, D.L. and E.S.E.Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: E.S.E. Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 96-109.
- Gordon, I. 2001. *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. Volume 1. CAB International. Willigford, Oxon and London. 44-48.
- Hafez, E.S.E. 2000. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryo. In: E.S.E. Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 437-441.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In: E.S.E. Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lea Febiger. Philadelphia. 390-393.
- Hardijanto dan S.Hardjopranto. 1994. Diktat Kuliah Ilmu Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 9-13, 18-44, 58-64, 70-86.
- Hardijanto, T.Sardjito, T.Hernawati, S.Susilowati dan T.W.Suprayogi. 2003. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 3, 7-14.
- Hardini, N. 1990. Pengaruh Waktu Pencairan Kembali Mani Beku Sapi Friesian Holstein (FH) terhadap Kualitasnya. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 10-12, 23.
- Hardjopranto, S. Ilmu Kemajiran pada Ternak. 1995. Airlangga University Press. Surabaya. 55-69.
- Hermadi, H.A., B.Utomo, T.I.Restiadi, I.N.Triana dan H.Ratnani. 1998. Pengaruh Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Aliran Listrik Searah terhadap Jenis Kelamin Anak Domba Setelah Dilakukan Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga. Surabaya. 8-11, 17.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik (Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animal). Diterjemahkan oleh D.K.Haryaputra. Edisi Pertama. Penerbit Institut Teknologi Bandung. 274.
- Irawan, D. 2000. . Pemisahan Sel Spermatozoa Sapi Madura Kromosom Seks X dan Y dengan Teknik Sentrifugasi Menggunakan Kolom Percoll. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 9-13, 16, 30-36.

- Ismudiono, P.Srianto dan S.P.Madyawati. 2001. Penyinaran dengan Sinar Ultra Violet pada Semen Beku Sapi Perah Setelah Thawing sebagai Upaya Pemisahan Kromosom Seks X dan Y. Laporan Penelitian Dik Suplemen Universitas Airlangga. Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga. Surabaya. 8-13.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Edisi Kedua. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 7-12, 21-29.
- Kennedy, S.P., J.C.Spitzer, F.M.Hopkins, H.L.Higdon and W.C.Jr.Bridges. 2002. Breeding Soundness Evaluation of 3,648 Yearling Beef Bulls Using the 1993 Society for Theriogenology Guidelines. *Theriogenology* 58 (5): 947-961.
- Kurnianingsih, F. 2003. Pengaruh Sentrifugasi dengan Teknik Kolom Percoll terhadap Motilitas, Daya Hidup dan Perbandingan Mikrobiometri Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 11.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga. Surabaya. 53-64, 91-97.
- Lindsay, D.R., K.W.Entwhistle and A.Winantea. 1982. Reproduction in Domestic Livestock in Indonesia. Australian Vice Chancellors Committee, Australian Universities International Development Program, University of Queensland Press, Hedges and Bell Pty Ltd. Melbourne. 63-72.
- Listia, J.A. 2003. Pengaruh Proses Swim-Up (Renang Atas) terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Perbandingan Mikrobiometri Spermatozoa Sapi Perah (Friesian Holstein). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 7-8.
- Margono, T., D.Suryati dan S.Hartinah. 2004. Teknologi Tepat Guna PengolahanPangan. Jakarta.
[Http://www.ipteknetid/ind/waristek/pengolahanpangan/](http://www.ipteknetid/ind/waristek/pengolahanpangan/)
- Moss, J.A., D.R.Melrose, H.C.B.Reed and M.Vandeplassche. 1979. Spermatozoa, Semen and Artificial Insemination. In: J.A.Laing (Ed.). *Fertility and Infertility in Domestic Animal*. 3rd ed. The English Language Book Society, Bailliere Tindall and Cassell Ltd. London. 59-68, 69-77.

- Mulyati,S., I.Mustofa dan S.Utama. 2002. Efektivitas Pemisahan Sel Mani Sapi Berkromosom X dan Y dengan Teknik Sephadex, Percoll, Swim Up dan Aside Migration. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lembaga Penelitian dan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 4-12.
- Noakes, D.E. 1988. Fertility and Obstetrics in Cattle. Low Priced ed. English Language Book Society and Blackwell Scientific Publications. 120-124.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. 519-571.
- Paskalis, E.H. 1999. Pemisahan Spermatozoa Berkromosom Seks X dan Y pada Sapi Madura dengan Sephadex G-200 dan Migrasi ke Atas. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 1-3, 7-8, 12-14.
- Poernomo, S., E.M.Luqman, M.Mafruchati, Widjiati dan E.D.Masithah. 2002. Diktat Ilmu Mudigah: Pengantar Ilmu Mudigah, Embriologi Alat Kelamin, Alat Reproduksi Ternak dan Fertilisasi. Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 23-27, 31-35.
- Powrie, W.D., H.Little and A.Lopez. 2000. Gelation of Egg Yolk. Oregon. [Http://www.foodoregonstateedu/learn/egg/](http://www.foodoregonstateedu/learn/egg/)
- Rand, M.L., E.J.Harferist and R.K.Murray. 1999. Protein Plasma, Immunoglobulin dan Pembekuan Darah (Plasma Protein, Immunoglobulin and Blood Coagulation). In R.K.Murray, D.K.Granner,P.A.Mayer and V.W. Rodwell (Ed.). Biokimia Harper (Harper's Biochemistry). 24th ed. Diterjemahkan oleh A.Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 731-732.
- Rizal, M., M.R.Toelihere, T.L.Yusuf, B.Purwantara dan P. Situmorang. 2003. Krioprotektan Semen Domba Garut dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang Berbeda. Majalah Kedokteran Hewan 19 (2): 81-82.
- Salisbury, G.W. and N.L.Van Demark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar. . Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 538-540.
- Samik, A., H.A.Hermadi dan E.Safitri. 1999. Hasil Pemisahan Spermatozoa Kambing dengan Teknik Columns Albumin (Y Spermatozoa) terhadap Kejadian Kebuntingan dan Sex Ratio Kelahiran. Laporan Penelitian Peneliti Muda. Lembaga Penelitian dan Fakultas kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 2, 7, 15-19.

- Scavone M.D., C.Oliveira, L.A.Trinca and F.Foresti. 2001. Synaptonemal Complex Analysis of the Holstein-Friesian, Piemontese and Simmental Breeds of *Bos taurus-taurus*. *Cytobios* 105 (408): 55-63.
- Seidel Jr., G.E. 2002. Sexing Sperm for Beef and Dairy Cattle Breeding. In: M.J.Field, R.S.Sand and J.V.Yelich (Ed.). *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. CRC Press LLC. London, New York, Washington DC and Florida. 281-282.
- Siregar,S. 1995. *Jenis, Teknik Pemeliharaan dan Analisa Usaha*. Penebar Swadaya. Jakarta. 4.
- Srianto, P., A.Samik dan S.P.Madyawati. 2004. Profil DNA Spermatozoa Sapi Perah yang Mendapat Paparan Radiasi Sinar Ultra Violet Sebagai Upaya Awal Pengembangan Sexing Kromosom untuk Memperoleh Keturunan Sesuai Harapan. Usul Penelitian Hibah Proyek Due-Like Tahun Anggaran 2004/2005. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 5-7.
- Suharno, B. dan Nazaruddin. 1994. *Ternak Komersial*. Penebar Swadaya. Jakarta. 135.
- Suhartono, N. 1993. Pengaruh Suhu dan Waktu Pencairan Kembali terhadap Daya Hidup Spermatozoa dari Air Mani Beku Sapi Peranakan Onggole dalam Straw. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya. 15, 27-28.
- Susilawati, T., S.B.Sumitro dan H.Sutanto. 1997. Upaya Pembekuan Semen Hasil Sexing serta Penerapannya dalam Inseminasi Buatan pada Sapi untuk Mendapatkan Pedet dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. Laporan Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu. Universitas Brawijaya. Malang. 17-21.
- Susilawati, T., S.B.Sumitro, S.Hardopranjoto, M.S.Djati dan G.Ciptadi. 1999. Kaji Banding antara Pengencer Tris dengan TCM-1999 dalam Upaya Pembekuan Semen Sapi Hasil Penyaringan Sephadex G-200. *Media Veteriner* 6 (4): 9-13.
- Susilawati, T., P.Srianto, Hermanto, E.Yuliani. 2002. Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Onggole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur. Laporan Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu. Universitas Brawijaya. Malang. 11-21.
- Sutriandhi, F. 2003. Bersama Kembali ke Alam Secarik Kertas dan Titi Mangsa. Surabaya. [Http://www.secarik.blogspot.com/](http://www.secarik.blogspot.com/)

- Syarief, M.Z. dan M.Sumoprastowo. 1985. Ternak Perah. CV Yasaguna. Jakarta. 16-18.
- Thun, R., M.Hurtado and F.Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and Tris-Egg Yolk Extender for Cryopreservation of Bull Semen. *Theriogenology* 57 (3): 1087-1094.
- Toelihere, M.R. 1979. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 48-58, 95-100.
- Toelihere, M.R. 1993. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 64-86.
- Utama, S., L.Mahaputra dan I.Mustofa. 1999. Efektivitas Pemisahan Sel Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y dengan Teknik Percoll, Sephadex, Swim Up dan Aside Migration Berdasarkan Analisis Sitogenik. Laporan Penelitian Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga. Surabaya. 5, 26-27.
- Williamson, G. and W.J.A.Payne. 1993. Pengantar Peternakan di Daerah Tropis. (An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics). 3rd ed. Diterjemahkan oleh S.G.N.D.Darmadja dan I.B.Djagra. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 246-247.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Kimiawi Semen Sapi

Komposisi	Nilai
PH	6,9 (6,4-7,8)
Air, g/100 ml	90 (87-95)
Natrium (Na)	230 (140-280)
Kalium (K)	140 (80-210)
Kalsium (Ca)	44 (35-60)
Magnesium (Mg)	9 (7-12)
Klorida (Cl)	180 (110-290)*
Fruktosa	530 (150-900)
Sorbitol	75 (10-140)
Asam sitrat	720 (340-1150)
Inositol	35 (25-46)*
Glycerylphosphorylcholine (GPC)	350 (100-600)
Ergothionine	0
Protein, g/100 ml	6,8
Plasmalogen	60 (30-90)

Keterangan:

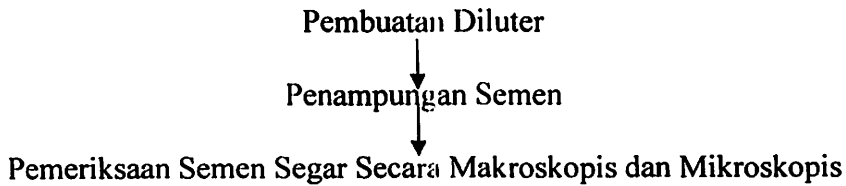
* Analisa plasma semen

Rata-Rata dalam mg/100 ml Semen

Sumber : Toelihere (1979) yang dikutip dari White (1958)

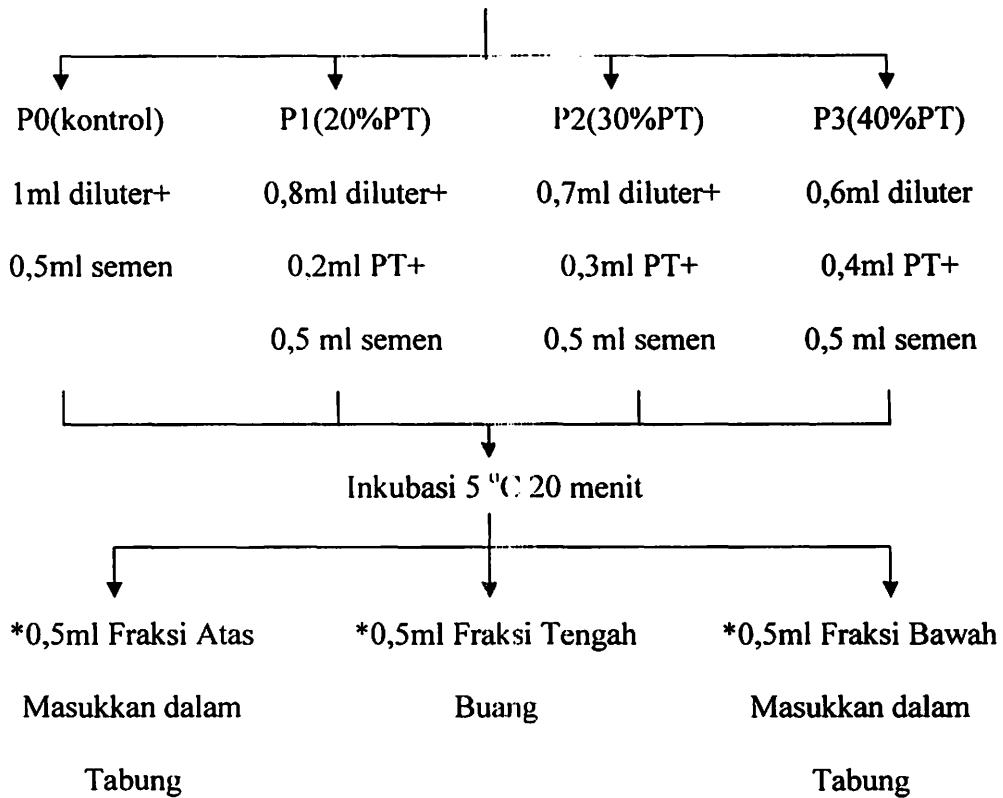
Lampiran 2. Diagram Alur Pelaksanaan Penelitian

a. Pemeriksaan Semen Segar

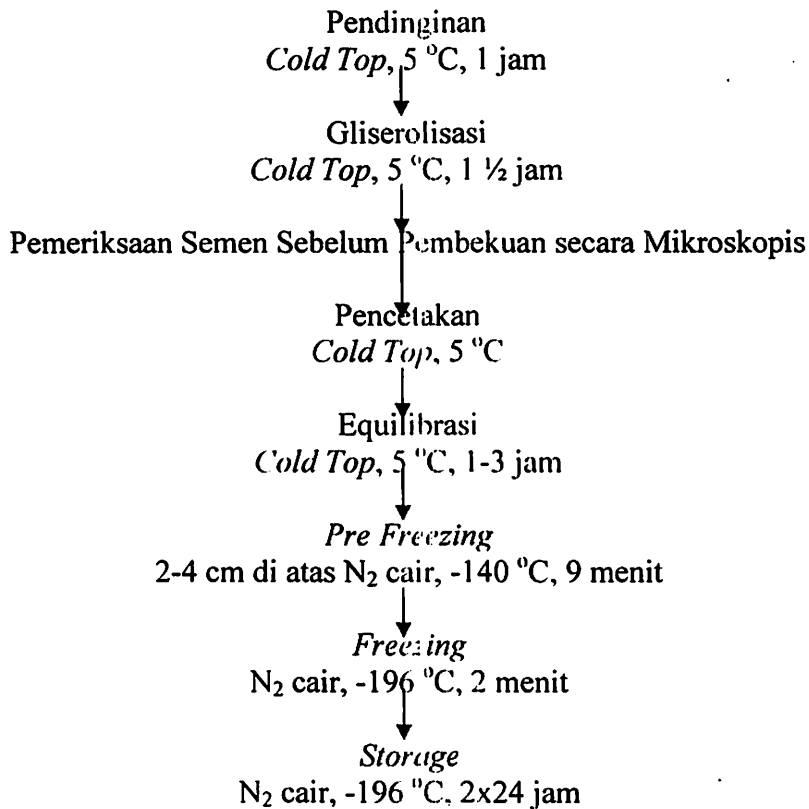


b. Pemisahan Spermatozoa

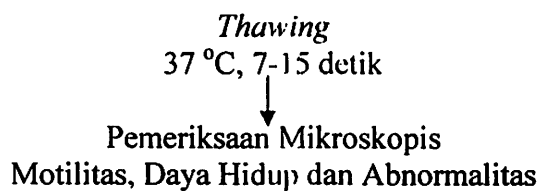
Pemisahan Spermatozoa dengan Menggunakan Putih Telur (PT) pada Teknik Kolom Albumin



c. Pembekuan Semen Hasil Pemisahan Spermatozoa



d. Pemeriksaan Semen Beku Hasil Pemisahan Spermatozoa



Keterangan:

* Untuk masing-masing perlakuan

Lampiran 3. Data Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar

Ulangan	Volume	Konsistensi	Bau	Warna	pH
1	6,7	sedang	khas	putih	7
2	7	sedang	khas	putih kekuningan	7
3	6,7	sedang	khas	putih kekuningan	7
4	6,7	sedang	khas	putih	7
5	6,7	kental	khas	putih kekuningan	7
6	6,7	kental	khas	putih kekuningan	6

Keterangan:

pH : Derajat Keasaman

Lampiran 4. Data Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar

Ulangan	Gerakan Massa	Gerakan Individu(%)	Konsentrasi	Daya Hidup(%)	Abnormalitas (%)
1	+++	P 70	D	90	5
2	+++	P 70	D	95	3
3	+++	P 70	D	95	5
4	++	P 70	D	95	2
5	+++	P 80	D	95	2
6	+++	P 80	D	95	3

Keterangan:

+++ : Baik Sekali
 ++ : Baik
 P 70 : Progresif 70 %
 P 80 : Progresif 80 %
 D : Densum

Lampiran 5. Data Hasil Pengamatan Kualitas Semen Setelah Pencairan Semen Beku (*Post Thawing*) Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X)

	Motilitas(%)				Daya Hidup(%)				Abnormalitas(%)			
U	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
1	30	30	40	35	53	54	62	60	8	11	7	6
2	30	35	40	35	53	60	62	60	9	7	10	11
3	35	35	40	35	56	58	63	57	7	11	11	8
4	30	35	35	30	54	58	59	55	9	6	10	10
5	30	35	35	35	55	60	57	56	9	7	11	8
6	30	30	40	35	55	54	61	59	6	9	8	9
X	30,83	33,33	38,33	34,17	54,33	57,33	60,67	57,83	8,00	8,50	9,50	8,67

Keterangan:

P :Perlakuan

U :Ulangan

X :Rata-rata

Lampiran 6. Data Hasil Pengamatan Kualitas Semen Setelah Pencairan Semen Beku (*Post Thawing*) Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y)

U	Motilitas(%)				Daya Hidup(%)				Abnormalitas(%)			
	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3	P0	P1	P2	P3
1	30	35	40	30	51	58	61	54	6	6	7	7
2	30	35	40	35	55	59	65	58	9	9	10	9
3	30	30	35	30	51	55	57	55	9	8	10	6
4	30	30	35	35	54	53	57	57	7	10	10	11
5	35	35	35	35	57	57	60	57	11	11	11	7
6	35	30	40	35	57	54	63	60	7	10	10	11
X	31,67	32,50	37,50	33,33	54,17	56,00	60,50	56,83	8,17	9,00	9,67	8,50

Keterangan:

P :Perlakuan

U :Ulangan

X :Rata-rata

Lampiran 7. Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded		Total	
	Included	Percent	N	Percent	N	Percent
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MFA * PTTELUR	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

				MFA
PTTELUR	1	1		30,00
		2		30,00
		3		35,00
		4		30,00
		5		30,00
		6		30,00
		Total	N	6
	2	1		30,00
		2		35,00
		3		35,00
		4		35,00
		5		35,00
		6		30,00
		Total	N	6
	3	1		40,00
		2		40,00
		3		40,00
		4		35,00
		5		35,00
		6		40,00
		Total	N	6
	4	1		35,00
		2		35,00
		3		35,00
		4		30,00
		5		35,00
		6		35,00
		Total	N	6
	Total	N		24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives
MFA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	30,8333	2,0412	,8333	28,6912	32,9755	30,00	35,00
2	6	33,3333	2,5820	1,0541	30,6237	36,0430	30,00	35,00
3	6	38,3333	2,5820	1,0541	35,6237	41,0430	35,00	40,00
4	6	34,1667	2,0412	,8333	32,0245	36,3088	30,00	35,00
Total	24	34,1667	3,5098	,7164	32,6846	35,6487	30,00	40,00

ANOVA
MFA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	175,000	3	58,333	*10,769	,000
Within Groups	108,333	20	5,417		
Total	283,333	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MFA
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
PTTELUR	PTTELUR				Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2,5000	1,3437	,078	-5,3029	,3029
	3	*-7,5000	1,3437	,000	-10,3029	-4,6971
	4	*-3,3333	1,3437	,022	-6,1363	-,5304
2	1	2,5000	1,3437	,078	-,3029	5,3029
	3	*-5,0000	1,3437	,001	-7,8029	-2,1971
	4	-,8333	1,3437	,542	-3,6363	1,9696
3	1	*7,5000	1,3437	,000	4,6971	10,3029
	2	*5,0000	1,3437	,001	2,1971	7,8029
	4	*4,1667	1,3437	,006	1,3637	6,9696
4	1	*3,3333	1,3437	,022	,5304	6,1363
	2	,8333	1,3437	,542	-1,9696	3,6363
	3	*-4,1667	1,3437	,006	-6,9696	-1,3637

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 8. Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded		Total	
	Included					
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MFB * PTTELUR	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

			MFB
PTTELUR	1	1	30,00
		2	30,00
		3	30,00
		4	30,00
		5	35,00
		6	35,00
		Total	N 6
	2	1	35,00
		2	35,00
		3	30,00
		4	30,00
		5	35,00
		6	30,00
		Total	N 6
	3	1	40,00
		2	40,00
		3	35,00
		4	35,00
		5	35,00
		6	40,00
		Total	N 6
	4	1	30,00
		2	35,00
		3	30,00
		4	35,00
		5	35,00
		6	35,00
		Total	N 6
	Total	N	24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

MFB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	31,6667	2,5820	1,0541	28,9570	34,3763	30,00	35,00
2	6	32,5000	2,7386	1,1180	29,6260	35,3740	30,00	35,00
3	6	37,5000	2,7386	1,1180	34,6260	40,3740	35,00	40,00
4	6	33,3333	2,5820	1,0541	30,6237	36,0430	30,00	35,00
Total	24	33,7500	3,3783	,6896	32,3235	35,1765	30,00	40,00

ANOVA

MFB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120,833	3	40,278	*5,686	,006
Within Groups	141,667	20	7,083		
Total	262,500	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MFB

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
PTTELUR	PTTELUR				Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,8333	1,5366	,594	-4,0386	2,3719
	3	*-5,8333	1,5366	,001	-9,0386	-2,6281
	4	-1,6667	1,5366	,291	-4,8719	1,5386
2	1	,8333	1,5366	,594	-2,3719	4,0386
	3	*-5,0000	1,5366	,004	-8,2053	-1,7947
	4	-,8333	1,5366	,594	-4,0386	2,3719
3	1	*5,8333	1,5366	,001	2,6281	9,0386
	2	*5,0000	1,5366	,004	1,7947	8,2053
	4	*4,1667	1,5366	,013	,9614	7,3719
4	1	1,6667	1,5366	,291	-1,5386	4,8719
	2	,8333	1,5366	,594	-2,3719	4,0386
	3	*-4,1667	1,5366	,013	-7,3719	-,9614

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 9. Analisis Statistik Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
HFA *	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%
PTTELUR						

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

			HFA
PTTELUR	1	1	53,00
		2	53,00
		3	56,00
		4	54,00
		5	55,00
		6	55,00
		Total	N 6
	2	1	54,00
		2	60,00
		3	58,00
		4	58,00
		5	60,00
		6	54,00
		Total	N 6
	3	1	62,00
		2	62,00
		3	63,00
		4	59,00
		5	57,00
		6	61,00
		Total	N 6
	4	1	60,00
		2	60,00
		3	57,00
		4	55,00
		5	56,00
		6	59,00
		Total	N 6
	Total	N	24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives
HFA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	54,3333	1,2111	,4944	53,0624	55,6043	53,00	56,00
2	6	57,3333	2,7325	1,1155	54,4657	60,2009	54,00	60,00
3	6	60,6667	2,2509	,9189	58,3045	63,0289	57,00	63,00
4	6	57,8333	2,1370	,8724	55,5907	60,0760	55,00	60,00
Total	24	57,5417	3,0500	,6226	56,2538	58,8296	53,00	63,00

ANOVA
HFA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	121,125	3	40,375	*8,698	,001
Within Groups	92,833	20	4,642		
Total	213,958	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Dependent Variable: HFA
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
PTTELUR	PTTELUR				Lower Bound	Upper Bound
1	2	*-3,0000	1,2439	,026	-5,5947	-,4053
	3	*-6,3333	1,2439	,000	-8,9280	-3,7387
	4	*-3,5000	1,2439	,011	-6,0947	-,9053
2	1	*3,0000	1,2439	,026	,4053	5,5947
	3	*-3,3333	1,2439	,014	-5,9280	-,7387
	4	-,5000	1,2439	,692	-3,0947	2,0947
3	1	*6,3333	1,2439	,000	3,7387	8,9280
	2	*3,3333	1,2439	,014	,7387	5,9280
	4	*2,8333	1,2439	,034	,2387	5,4280
4	1	*3,5000	1,2439	,011	,9053	6,0947
	2	,5000	1,2439	,692	-2,0947	3,0947
	3	*-2,8333	1,2439	,034	-5,4280	-,2387

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 10. Analisis Statistik Daya Hidup Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded	N	Percent	Total	
	Included					N	Percent
	N	Percent				N	Percent
HFB *	24	100,0%	0		,0%	24	100,0%
PTTELUR							

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

				HFB
PTTELUR	1	1		51,00
		2		55,00
		3		51,00
		4		54,00
		5		57,00
		6		57,00
		Total	N	6
	2	1		58,00
		2		59,00
		3		55,00
		4		53,00
		5		57,00
		6		54,00
		Total	N	6
	3	1		61,00
		2		65,00
		3		57,00
		4		57,00
		5		60,00
		6		63,00
		Total	N	6
	4	1		54,00
		2		58,00
		3		55,00
		4		57,00
		5		57,00
		6		60,00
		Total	N	6
	Total	N		24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives
HFB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	54,1667	2,7142	1,1081	51,3183	57,0150	51,00	57,00
2	6	56,0000	2,3664	,9661	53,5166	58,4834	53,00	59,00
3	6	60,5000	3,2094	1,3102	57,1320	63,8680	57,00	65,00
4	6	56,8333	2,1370	,8724	54,5907	59,0760	54,00	60,00
Total	24	56,8750	3,4048	,6950	55,4373	58,3127	51,00	65,00

ANOVA
HFB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	127,458	3	42,486	*6,106	,004
Within Groups	139,167	20	6,958		
Total	266,625	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Dependent Variable: HFB
LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
PTTELUR	PTTELUR				Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1,8333	1,5230	,243	-5,0102	1,3435
	3	*-6,3333	1,5230	,000	-9,5102	-3,1565
	4	-2,6667	1,5230	,095	-5,8435	,5102
2	1	1,8333	1,5230	,243	-1,3435	5,0102
	3	*-4,5000	1,5230	,008	-7,6769	-1,3231
	4	-,8333	1,5230	,590	-4,0102	2,3435
3	1	*6,3333	1,5230	,000	3,1565	9,5102
	2	*4,5000	1,5230	,008	1,3231	7,6769
	4	*3,6667	1,5230	,026	,4898	6,8435
4	1	2,6667	1,5230	,095	-,5102	5,8435
	2	,8333	1,5230	,590	-2,3435	4,0102
	3	*-3,6667	1,5230	,026	-6,8435	-,4898

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 11. Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Atas (Spermatozoa X)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded		Total	
	Included					
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
AFA * PTTELUR	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

				AFA
PTTELUR	1	1		8,00
		2		9,00
		3		7,00
		4		9,00
		5		9,00
		6		6,00
		Total	N	6
	2	1		11,00
		2		7,00
		3		11,00
		4		6,00
		5		7,00
		6		9,00
		Total	N	6
	3	1		7,00
		2		10,00
		3		11,00
		4		10,00
		5		11,00
		6		8,00
		Total	N	6
	4	1		6,00
		2		11,00
		3		8,00
		4		10,00
		5		8,00
		6		9,00
		Total	N	6
	Total	N		24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

AFA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	8,0000	1,2649	,5164	6,6726	9,3274	6,00	9,00
2	6	8,5000	2,1679	,8851	6,2249	10,7751	6,00	11,00
3	6	9,5000	1,6432	,6708	7,7756	11,2244	7,00	11,00
4	6	8,6667	1,7512	,7149	6,8289	10,5044	6,00	11,00
Total	24	8,6667	1,7110	,3493	7,9442	9,3892	6,00	11,00

ANOVA

AFA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,000	3	2,333	,773	,522
Within Groups	60,333	20	3,017		
Total	67,333	23			

Lampiran 12. Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Fraksi Bawah (Spermatozoa Y)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases		Excluded		Total	
	Included					
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
AFB *	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%
PTTELUR						

a Limited to first 100 cases.

Case Summaries

			AFB
PTTELUR	1	1	6,00
		2	9,00
		3	9,00
		4	7,00
		5	11,00
		6	7,00
		Total	N 6
	2	1	6,00
		2	9,00
		3	8,00
		4	10,00
		5	11,00
		6	10,00
		Total	N 6
	3	1	7,00
		2	10,00
		3	10,00
		4	10,00
		5	11,00
		6	10,00
		Total	N 6
	4	1	7,00
		2	9,00
		3	6,00
		4	11,00
		5	7,00
		6	11,00
		Total	N 6
	Total	N	24

a Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives AFB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	8,1667	1,8348	,7491	6,2411	10,0922	6,00	11,00
2	6	9,0000	1,7889	,7303	7,1227	10,8773	6,00	11,00
3	6	9,6667	1,3663	,5578	8,2329	11,1005	7,00	11,00
4	6	8,5000	2,1679	,8851	6,2249	10,7751	6,00	11,00
Total	24	8,8333	1,7856	,3645	8,0793	9,5873	6,00	11,00

ANOVA AFB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,667	3	2,556	,778	,520
Within Groups	65,667	20	3,283		
Total	73,333	23			