

TESIS

**PENGARUH BERBAGAI BAHAN PENGECER TERHADAP
MOTILITAS, VIABILITAS DAN MEMBRAN PLASMA
UTUH SPERMATOZOA SAPI *FRIESIAN HOLSTEIN*
POST-THAWING**



Oleh :

DIAN AYU KARTIKA SARI, drh
060941005

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2012

**PENGARUH BERBAGAI BAHAN PENGECER TERHADAP
MOTILITAS, VIABILITAS DAN MEMBRAN PLASMA
UTUH SPERMATOZOA SAPI *FRIESIAN HOLSTEIN*
*POST-THAWING***

TESIS

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Veteriner dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
pada
Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

oleh

DIAN AYU KARTIKA SARI, drh
060941005

Menyetujui
Komisi Pembimbing,



(Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes)
Pembimbing Ketua



(Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS)
Pembimbing Kedua

ABSTRACT

THE EFFECT OF VARIOUS DILUTER TOWARD POST-THAWING SPERMATOOZA FRIESIAN HOLSTEIN'S MOTILITY, VIABILITY AND MEMBRANE INTEGRITY

Dian Ayu Kartika Sari

This research was aimed to discover the effect and corelation of various diluter between skim milk and egg yolk, tris egg yolk, and Andromed® to increase frozen semen quality by motility, viability and spermatozoa membran integrity percentages. This study was a laboratory experimental with Complete Random Design, consisted of three treatment groups, a) frozen semen with skim milk and egg yolk diluter gorup, b) frozen semen with tris egg yolk group, and c) frozen semen with Andromed® diluter group. Each treatment was repeated 6 times. Observed dependent variables were sperm motility, viability and membrane integrity (Hypo-Osmotic Swelling Test and Scanning Electron Microscope). Population in this research was FH fresh semen collected using artificial vagina from 3-4 years old FH (Friesian Holstein) bull. The result data were analyzed by one way ANOVA with 95% significance and continued with Duncan multiple range test wether there was any difference between treatment. The result showed that reach diluters able to maintain sperm motility, viability and membrane integrity. Spermatozoa in andromed® diluter had highest sperm motility, viability and membrane integrity post thawing.

Keywords : Diluter, spermatozoa, motility, viability, membrane integrity

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul	i
Prasyarat.....	ii
Halaman Pernyataan	iii
Halaman Identitas.....	iv
Ucapan terima kasih	v
Ringkasan	viii
Summary	xi
Abstract	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xix
DAFTAR GRAFIK	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Sapi <i>Frisian Holdstein</i>	6
2.2. Anatomi dan Fisiologi Alat Reproduksi Jantan	8
2.3. Semen.....	11
2.3.1. Spermatozoa	12
2.3.2. Ultrastruktur Spermatozoa.....	12
2.3.2.1. Kepala Spermatozoa.....	14
2.3.2.2. Ekor Spermatozoa	16
2.3.3. Spermatogenesis	19
2.3.4. Membran Plasma Spermatozoa	23
2.4. Motilitas Spermatozoa	24
2.5. Bahan Pengencer	28
2.5.1. Pengencer Skim Kuning Telur.....	28
2.5.2. Pengencer Tris Kuning Telur	30
2.5.3. Pengencer AndroMed®	32
2.6. Semen Beku.....	33
2.7. <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	34
2.8. Mikroskop Elektron	35
2.8.1. <i>Scanning Electron Microscope</i>	36

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	39
3.1. Kerangka Konseptual.....	39
3.2. Bagan Kerangka Konseptual.....	44
3.3. Hipotesis Penelitian	45
 BAB 4 MATERI DAN METODE	46
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.1.1. Tempat Penelitian	46
4.1.2. Waktu Penelitian.....	46
4.2. Bahan dan Materi Penelitian	46
4.2.1. Hewan Percobaan.....	46
4.2.2. Bahan Penelitian	46
4.2.3. Alat Penelitian	48
4.2.4. Persiapan Alat dan Bahan.....	48
4.3. Metode Penelitian	48
4.3.1. Pembuatan Pengencer	48
4.3.1.1. Pengencer Skim Kuning Telur.....	48
4.3.1.2. Pengencer Tris Kuning Telur	49
4.3.1.3. Pengencer Andromed [®]	50
4.3.2. Penampungan Semen	51
4.3.3. Pemeriksaan Semen Segar.....	52
4.3.3.1. Pemeriksaan Makroskopis.....	52
4.3.4.2. Pemeriksaan Mikroskopis	53
4.3.4. Penambahan Pengencer.....	55
4.3.4.1. Gliserolisasi dan Equilibrasi	56
4.3.4.2. <i>Filling</i> dan <i>Sealing</i>	58
4.3.4.3. <i>Prefreezing</i> dan <i>Freezing</i>	58
4.3.5. Evaluasi	59
4.3.6. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa	60
4.3.7. <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	61
4.3.8. <i>Scanning Electron Microscope</i>	62
4.4. Variabel Penelitian.....	64
4.5. Rancangan Penelitian.....	65
4.6. Analisis Data	65
 KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN	66
 BAB 5 HASIL PENELITIAN	67
5.1 Hasil Motilitas	67
5.2. Hasil Viabilitas Spermatozoa	69
5.3. Hasil <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	71
5.4. Hasil <i>Scanning Electron Microscope</i>	73
5.5. Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa	77

BAB 6 PEMBAHASAN.....	79
6.1. Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post-thawing</i>	80
6.2. Persentase Viabilitas Spermatozoa <i>Post-thawing</i>	82
6.3. Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa <i>Post-thawing</i>	85
6.3.1. <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	85
6.3.2. <i>Scanning Electron Microscope</i>	90
6.4. Uji Korelasi Motilitas, Viabilitas dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa <i>Post-thawing</i>	94
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	96
7.1. Kesimpulan.....	96
7.2. Saran	96
 DAFTAR PUSTAKA	97
LAMPIRAN	103

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1. Data Biologis Sapi	7
5.1. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi FH ...	67
5.2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Semen Sapi FH	68
5.3. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Semen Sapi FH	69
5.4. Rerata dan simpangan baku keutuhan membran plasma spermatozoa <i>post thawing</i> menggunakan metode HOST	71
5.5. Tabel Hasil Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscope</i>	75

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Sapi Fresian Holstein	6
2.2. Anatomi Alat Kelamin Jantan	11
2.3. Morfologi Ultrastruktur Spermatozoa.....	14
2.4. Ultrastruktur ekor (<i>middle piece</i>) spermatozoa	17
2.5. Penampang melintang <i>middle piece</i>	18
2.6. Skema bagian-bagian penyusun aksonema ekor bagian <i>middle piece</i> spermatozoa.....	19
2.7. Bagan spermatogenesis	22
2.8. Skema <i>Scanning Electron Microscope</i>	38
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	44
4.1. Peralatan Pembuatan dan Pemeriksaan Semen Beku	47
4.2. Vagina Buatan	48
4.3. Bahan pengencer Skim kuning telur.....	49
4.4. Bahan Pengencer Tris Kuning Telur.....	50
4.5. Bahan Pengencer Andromed [®]	51
4.6. Proses penampungan semen.....	52
4.7. Pemeriksaan Mikroskopis.....	55
4.8. Proses pembuatan pengencer susu kuning telur.....	56
4.9. Peralatan penelitian : <i>filling and sealing machine</i> , spektrofotometer, mikroskop, <i>printing machine</i> , <i>water bath</i>	59
4.10. Spermatozoa yang tidak menggebung dan spermatozoa yang menggebung	62
4.11. Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscope</i>	64
5.1. Perbandingan spermatozoa antara membran plasma utuh dan membran plasma yang rusak dengan metode <i>Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)</i> dengan pembesaran 400 kali.....	73
5.2. Pemeriksaan semen segar tanpa diluter menggunakan <i>Scanning Electron Microscope</i> dengan pembesaran 3500x.....	74
5.3. Pemeriksaan semen dengan diluter Skim Kuning Telur menggunakan <i>Scanning Electron Microscope</i> dengan pembesaran 3500x.....	75
5.4. Pemeriksaan semen dengan diluter Tris Kuning Telur menggunakan <i>Scanning Electron Microscope</i> dengan pembesaran 3500x	76
5.5. Pemeriksaan semen dengan diluter AndroMed [®] menggunakan <i>Scanning Electron Microscope</i> dengan pembesaran 3500x.....	77
6.1. Struktur membran plasma.....	86

DAFTAR GRAFIK

	Halaman
5.1. Rerata Selisih Motilitas Spermatozoa <i>post thawing</i> Semen Sapi Friesian Holstein.	68
5.2. Rerata Selisih Viabilitas Spermatozoa <i>post thawing</i> Semen Sapi Friesian Holstein.	70
5.3. Rerata Selisih Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Semen Sapi Friesian Holstein.	72

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pembuatan Bahan Pengencer Susu Kuning Telur	103
Lampiran 2. Pembuatan Bahan Pengencer Tris Kuning Telur	105
Lampiran 3. Komposisi Pengencer Andromed	107
Lampiran 4. Komposisi pembuatan medium <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	108
Lampiran 5. Cara Membuat Preparat Ulas Spermatozoa	109
Lampiran 6. Pengolahan Data	110

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ATP	= <i>Adenosine Triphosphate</i>
BB	= Berat Badan
BIBB	= Balai Besar Inseminasi Buatan
CO ₂	= Carbon dyoxida
Cu	= <i>Cuprum</i> / tembaga
CPD	= <i>Critical Point Drying</i>
DNA	= <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HOST	= Hypo-Osmotic Swelling Test
IB	= Inseminasi Buatan
kg	= kilogram
MDA	= <i>Malondialdehyde</i>
ml	= mililiter
mm	= milimeter
N ₂	= Nitrogen
NaCl	= Natrium Chlorida
pH	= <i>power of Hydrogen</i>
RAL	= Rancangan Acak Lengkap
ROS	= <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
SEM	= <i>Scanning Electron Microscope</i>
SKT	= Susu Kuning Telur
TKT	= Tris Kuning Telur
TEM	= Transmisi Electron Microscope
WHO	= World Health Organization
%	= Persen
°C	= Derajat Celcius



BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengembangan dan perkembangbiakan ternak khususnya sapi di Indonesia semakin mendapat perhatian lebih. Populasi manusia yang semakin bertambah, pengertian tentang nilai gizi makanan hasil ternak yang kian meningkat dan daya beli rakyat yang semakin melonjak merupakan tantangan pemenuhan kebutuhan akan ternak dan hasil ternak sehingga meningkatkan jumlah ternak yang di potong (Toelihere, 2006).

Permintaan akan daging ternak dewasa ini sangat meningkat pesat, namun produktivitas ternak tidak mampu mengimbangi laju permintaan masyarakat akan produk peternakan yang semakin tinggi dari tahun ke tahun (Dirjennak, 1999). Salah satu penyebabnya adalah kesadaran masyarakat akan protein hewani yang cukup tinggi manfaatnya, akan tetapi di sisi lain masih sangat terbatasnya produksi ternak.

Faktor penghambat yang diduga sebagai penyebab penurunan produksi ternak di Indonesia adalah manajemen pemeliharaan yang belum optimal, yang ditandai dengan sistem pemeliharaan yang bersifat ekstensif (tradisional) dan tidak memperhatikan produksi. Selain itu pemuliaan dan seleksi yang tidak terarah sehingga menyebabkan produktivitas ternak sangat beragam (Tambing, 2001).

Berbagai usaha perlu dilakukan untuk menghadapi tantangan ini, salah satunya dengan meningkatkan jumlah dan mutu ternak. Teknik Inseminasi

Buatan (IB) adalah suatu teknologi mutakhir yang diciptakan manusia guna meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas ternak untuk mengatasi tuntutan masyarakat dunia yang terus meningkat jumlahnya dari tahun ke tahun (Hardijanto, dkk, 2010).

Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu semen yang berkualitas baik, waktu inseminasi yang tepat dan kondisi hewan betina memegang peranan yang sangat penting (Hafez, 2000). Kualitas semen segar lebih cepat menurun dibandingkan semen beku meskipun semen segar tersebut disimpan dalam medium pengencer (Suyadi, 2004).

Penyediaan semen yang berkualitas dengan jumlah yang cukup dalam bentuk semen segar ataupun beku sangat dibutuhkan untuk menunjang program IB. Semen yang disimpan dalam kondisi dingin (refrigerator) mempunyai daya tahan relatif pendek, sedangkan apabila semen disimpan dalam kondisi beku (dalam nitrogen cair) memungkinkan untuk penggunaan dalam waktu lebih lama (Suyadi, 2004).

Penurunan suhu yang cepat dalam proses pembekuan pada umumnya berpengaruh terhadap metabolisme dan daya hidup spermatozoa. Proses *thawing* semen juga dapat menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, viabilitas dan fertilitas (Salomon and Maxwell, 2000). Perbedaan kondisi temperatur pada saat proses pembekuan dan *post-thawing* akan meningkatkan permeabilitas membran spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Suprayogi, 1996).

Motilitas sangat penting untuk pembuahan karenanya harus menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat serta dapat membantu transportasi spermatozoa

dari luar untuk mencapai tempat pembuahan, motilitas dan daya hidup spermatozoa yang tinggi dapat meningkatkan *conception rate* (Hafez, 2000).

Beberapa parameter kualitas dan kuantitas semen yang digunakan sebagai indikator untuk menggambarkan karakter ejakulat adalah volume, konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa. Parameter kuantitas dan kualitas semen ini masing-masing saling berhubungan dan mempunyai pengaruh terhadap fertilitas spermatozoa (Riadi, 2004). Evan dan Graham (1989) melaporkan bahwa integritas membran spermatozoa berkorelasi positif dengan tingkat keberhasilan proses pembuahan pada oosit.

Inseminasi buatan akan berjalan baik jika menggunakan pengencer yang tepat. Penelitian ini menggunakan tiga macam pengencer, yaitu skim kuning telur, Tris kuning telur dan AndroMed[®]. Pengencer skim kuning telur terdiri dari satu bagian kuning telur segar yang dicampur dengan satu bagian susu skim. Pengencer Tris kuning telur berfungsi sebagai *buffer* yaitu penyanggah untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa serta berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Pengencer AndroMed[®] adalah pengencer semen komersial berisi bahan kimia yang komplis namun tidak mengandung kuning telur, sehingga diharapkan tidak ada kontaminasi mikroorganisme.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah terdapat pengaruh berbagai bahan pengencer terhadap motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing*?
2. Apakah terdapat korelasi antara motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing* dalam berbagai bahan pengencer?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. Pengaruh berbagai bahan pengencer terhadap motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing*.
2. Korelasi antara motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing* dalam berbagai bahan pengencer.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan pengencer yang tepat dalam upaya memperbaiki kualitas semen beku.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi *Friesian Holstein*

Sapi FH merupakan jenis sapi perah yang populasinya terbanyak dan telah tersebar luas di berbagai belahan dunia, baik di negara beriklim tropis maupun subtropis. Bangsa sapi FH ini dinilai mudah beradaptasi dengan keadaan iklim di lingkungan hidup yang baru. Ciri khas dari sapi jenis ini antara lain terlihat di bagian dahinya terdapat warna kulit dan bulu yang putih di antara kedua mata dengan ukuran yang berbeda untuk masing-masing individu, warna putih di bagian dada, perut bagian bawah, kaki dan ekor. Persentase warna antara putih dan hitam untuk setiap individu bervariasi, umumnya warna hitam lebih dominan (Lemboepasang Dairy Farm, 2010).



Gambar 2.1 Sapi *Fresian Holstein*
(Sumber: Koleksi Taman Ternak Pendidikan, 2010)

Klasifikasi sapi perah adalah sebagai berikut (Sigit, 2004) :

Kingdom	: Animalia
Fillum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Artiodactyla
Subordo	: Ruminansia
Familia	: Bovidae
Subfamilia	: Bovinae
Genus	: <i>Bos</i>
Spesies	: <i>Bos taurus</i>

Sapi FH dara dapat dikawinkan pertama kali pada umur 15 bulan, ketika berat badan mencapai 250 kg. Sapi FH dapat hidup lebih lama, namun umur produktif sapi ini hanya sampai 6 tahun (Ansi-Okstate, 2008). Berat badan betina dan jantan dewasa masing-masing berkisar antara 300-680 kg dan 300-1000 kg dengan konsumsi energi sebesar 15 kalori/kgBB/hari (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

Tabel 2.1. Data biologis sapi (Smith dan Mangkoewidjojo 1988)

Lama bunting	: 280 hari (275-283)
Berat dewasa	: 300-680 kg betina, 350-1000 kg jantan
Berat lahir	: 22-50 kg
Jumlah anak	: 1, kadang-kadang 2 ekor
Suhu (rektal)	: 38,0°C - 39,0°C (rata-rata 38,6°C)
Pernafasan	: 27 - 40/ menit
Denyut jantung	: 40 - 58/ menit
Tekanan darah	: 121 - 166 sistol, 18 - 120 diastol

Konsumsi energi	: kira-kira 15 kalori/ kg/ hari
Immunitas pasif	: hanya melalui usus, dari kolostrum

2.2 Anatomi dan Fisiologi Alat Reproduksi Jantan

Alat reproduksi sapi jantan terdiri dari sepasang testis sebagai alat reproduksi utama; saluran alat kelamin yang terdiri dari vas eferens, epididimis, vas deferens, ampula dan urethra; kelenjar aksesoris seperti kelenjar vesicular seminalis atau vesicularis, prostat dan bulbourethralis atau cowper; serta alat kelamin luar yaitu penis, preputium dan skrotum (Hardijanto dkk.,2009).

Testis terletak pada daerah prepubis, terbungkus dalam kantong scrotum, scrotum berisi dua lobi testis yang masing-masing lobi mengandung satu testes dan digantung oleh funiculus spermaticus. Testes pada sapi jantan berbentuk oval memanjang dan terletak dengan sumbu panjangnya vertical di dalam scrotum. Testis terbungkus oleh kapsul berwarna putih mengkilat yang disebut dengan tunika albugenia (Toelihere.,1985).

Panjang testis pada hewan dewasa 10-12,5 cm dan lebar 5-6,25 cm dengan berat 500 gram. Testis terdiri dari jaringan tubuli seminiferi, sel stroma, sel interstisial dan sel-sel Leydig. Tubuli seminiferi terdiri dari dua macam epitel yang berbeda yaitu : (1) sel germinatif adalah sel yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis, sebelum siap untuk mengadakan fertilisasi, (2) sel sertoli adalah sel yang berbentuk panjang dan seperti piramid, terletak dekat atau di antara sel-sel germinatif. Fungsi sel ini memberi makan kepada spermatozoa yang masih muda selain itu juga memfagosit sel-sel spermatozoa yang telah mati

atau telah mengalami degenerasi. Jaringan ini memiliki pembuluh darah, limfe serta saraf dan sel makrofag (Salisbury dan Van Demark.,1985).

Epididimis merupakan saluran eksternal pertama yang keluar dari testis dan dibatasi oleh tunica vaginalis dan testis. Epididimis dibagi menjadi tiga bagian, yaitu, caput (kepala), corpus (badan), dan cauda (ekor) epididimis. saluran kecil, vas efferentia yang menyatu menjadi satu saluran. Corpus epididimis memanjang dari apeks menurun sepanjang sumbu memanjang testis dan merupakan saluran tunggal yang bersambungan dengan cauda epididimis. Lumen cauda epididimis lebih lebar daripada lumen corpus epididimis (Keiko.,2009).

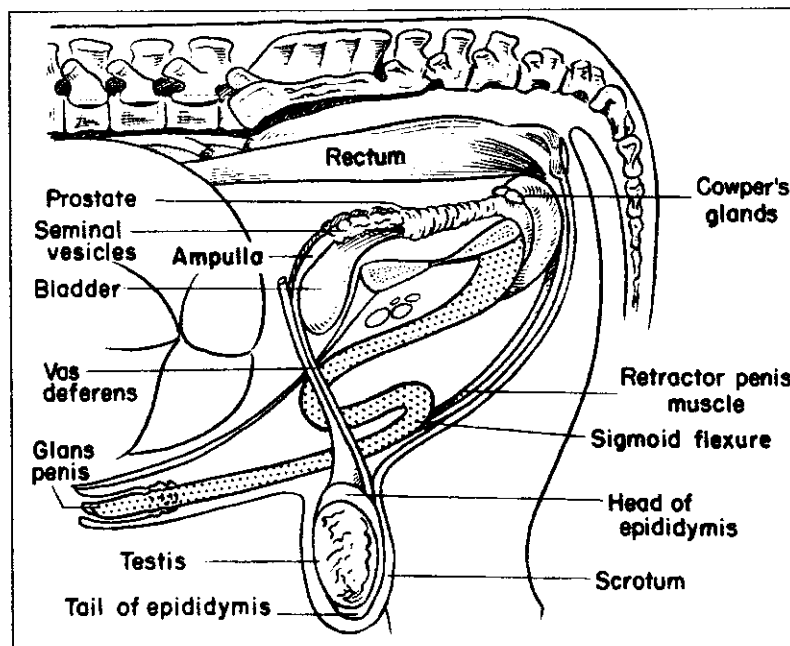
Duktus (vas) deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis dengan urethra. Dindingnya mengandung otot polos yang berperan dalam pengangkutan spermatozoa. Diameter vas deferens 2 mm dengan konsistensi seperti tali, berjalan sejajar dengan corpus epididimis. Dekat dengan kepala epididimis, vas deferens menjadi lurus dan bersama-sama dengan pembuluh darah, limfe dan saraf pembentuk funikulus spermatikus yang berjalan melalui kanalis inguinalis ke dalam cavum abdominal. Kedua vas deferens (kiri dan kanan) terletak di atas vesika urinaria yang menebal dan membesar membentuk ampula duktus deferens (Toelihere.,1985).

Urethra merupakan saluran tunggal yang membentang dari persambungan antara ampulla sampai ke pangkal penis. Fungsi urethra adalah sebagai saluran kencing dan semen. Selama ejakulasi pada sapi dan domba, terjadi pencampuran yang kompleks antara spermatozoa yang padat dari vas deferens dan epididymis

dengan cairan sekresi dari kelenjar-kelenjar tambahan dalam urethra yang berada di daerah pelvis menjadi semen (Keiko.,2009).

Kelenjar kelamin aksesoris pada hewan jantan terdiri dari ampula, duktus deferens, vesikula seminalis, kelenjar prostat dan bulbo urethralis. Ampula merupakan pembesaran kelenjar pada bagian ujung duktus deferens. Kelenjar ampula ini bermuara ke dalam duktus deferens dan memberikan cairan semen. Vesikula seminalis merupakan sepasang kelenjar yang biasanya bermuara dengan duktus deferens melalui bermacam-macam duktus ejakulatori ke dalam urethra pelvic kemudian ke kaudal leher kandung kemih. Kelenjar prostat merupakan kelenjar yang mengelilingi pelvis urethra. Kelenjar ini menghasilkan sekresi alkalin yang membantu memberikan bau khas pada semen. Kelenjar bulbourethralis merupakan sepasang kelenjar yang terletak pada tiap sisi pelvis urethra (Frandsen., 1992).

Penis hewan jantan dewasa berukuran panjang 91,4 cm dan bergaris tengah 2,5 cm. Bentuk penis ini silindris dan sedikit menipis dari pangkal penis ke ujung yang bebas. Bagian ujung penis memiliki sedikit sekali jaringan tegang, kecuali bagian pangkal. Penis membesar sedikit pada waktu ereksi dan menjadi lebih tegang. Waktu keadaan penis mengendor, penis sapi jantan padat dan keras (Salisbury dan Van Demark., 1985).



Gambar 2.2 Anatomi alat kelamin jantan
(Sumber : Perry, 1973)

2.3 Semen

Semen adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran betina pada waktu perkawinan atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan (IB) (Hardijanto, 2008). Semen yang dimaksud dalam ilmu reproduksi itu terdiri dari bagian yang berupa sel dan bagian yang tidak bersel. Sel-sel itu hidup dan bergerak disebut spermatozoa dan zat cair sebagai media sel-sel itu berenang disebut seminal plasma. Sel sperma dihasilkan di dalam testis, sedangkan plasma semen adalah campuran sekresi yang berasal dari epididymis dan kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap seperti vesikularis dan prostata (Partodihardjo, 1992; Ismudiono dkk., 2007).

2.3.1 Spermatozoa

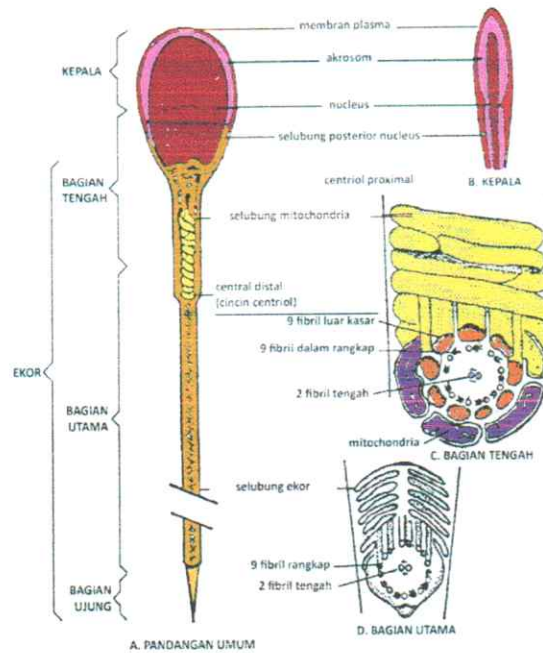
Spermatozoa merupakan sel kecil, kompak, sangat khas, tidak tumbuh dan membagi diri. Spermatozoa sapi memiliki morfologi seperti spermatozoa hewan lain tetapi ukuran dan bentuknya berbeda (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994). Berat spermatozoa $\pm 2-2,5 \times 10^{-8}$ mg berat kering atau $\pm 11-13 \times 10^{-8}$ mg berat basah, berat kepala $\pm 50 \%$, badan $\pm 15 \%$ dan ekor 35% berat total spermatozoa. Volume spermatozoa tunggal yang dibebaskan dari seminal plasma $\pm 8 \times 10^{-9} \text{ m}^3$ yang menggambarkan bahwa 1 ml berisi $12,500 \times 10^6$ spermatozoa (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Spermatozoa dihasilkan di dalam tubuli seminiferus atas pengaruh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) sedangkan testosteron diproduksi oleh sel-sel interstitial (sel leydig) oleh pengaruh *Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH) atau *Leutinizing Hormone* (LH) (Ismudiono dkk, 2007). Spermatozoa diproduksi melalui pembuluh-pembuluh testis. Sesudah melewati tubulus seminiferus testis, spermatozoa yang terbentuk akan melewati rete testis, vas eferent, epididimis, vas deferens dan urethra. (Hardijanto dkk., 2008).

2.3.2 Ultrastruktur Spermatozoa

Pengamatan spermatozoa secara ultrastruktur berguna untuk mengetahui komponen-komponen penyusun spermatozoa secara detail. Melalui pengamatan ini dapat diketahui terjadinya penyimpangan atau struktur yang tidak normal dari organel-organel sel. Ultrastruktur spermatozoa diamati dengan mikroskop elektron transmisi (TEM) dengan cara sebagai berikut. Suspensi spermatozoa

disentrifus (sodium fosfat 0,2 M, pH : 7,4) dengan tujuan untuk menjaga kestabilan struktur sel. Proses fiksasi kedua dengan menggunakan buffer osmium tetroksida 1%. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi dan pencucian. Osmium tetraoksida dihilangkan dengan menggunakan larutan etanol. Dilakukan infiltrasi berikutnya dengan propilen oksida, selanjutnya dalam propilen oksida dan epon miks. Perlakuan ini bertujuan untuk memasukkan bahan plastik epon ke dalam jaringan yang sudah dehidrasi untuk memperkuat jaringan. *Embeding* blok dilakukan dengan Spurr's resin, untuk mengeraskan jaringan digunakan polimerasi bertingkat 450, 550 dan 650 C. Blok dipotong setelah padat menggunakan ultramikrotom dengan ketebalan sekitar 1 μ m. Irisan diwarnai dengan *toluidine blue*, untuk memastikan keberadaan sampel dan diamati dengan mikroskop cahaya sampai ditemukan sampel yang akan dipilih. Sampel yang dipilih dipotong lagi dengan ketebalan 60 sampai 90 nm dan diwarnai dengan uranil asetat dan lead sitrat, selanjutnya sampel ditempelkan pada grid tembaga, dan diamati dengan mikroskop elektron transmisi (Hayati, 2011).



Gambar 2.3 Morfologi Ultrasuktur Spermatozoa
(Sumber :Wu, 1966 disitir Toelihere 1993)

2.3.2.1 Kepala Spermatozoa

Bagian kepala spermatozoa didominasi oleh inti sel yang mengandung materi genetik (DNA dan RNA). Bentuk kepala spermatozoa bermacam-macam, pada spermatozoa sapi bulat memanjang (oval) seperti manusia, ayam seperti gelombang, tikus dan mencit seperti “sabit” (*sickle*) dengan ujung kepala bagian posterior tumpul dan bagian anterior meruncing, sedangkan leher sangat pendek yang berfungsi sebagai penghubung bagian kepala dengan ekor. Dua pertiga bagian depan inti semua spermatozoa ditutup oleh akrosom. Akrosom terletak di bagian ujung kepala di antara membran inti dan membran sel. Membran luar akrosom berhadapan dengan membran sel dan membran dalam akrosom melapisi

membran inti sel. Di antara kedua membran ini terdapat matriks akrosom. Matriks tersebut mengandung berbagai enzim hidrolitik antara lain hialuronidase dan akrosin. Enzim tersebut dikeluarkan dalam rangkaian reaksi akrosom (Hayati, 2011).

Terbentuknya kompleks akrosom, berasal dari vesikel yang ada di sitoplasma yang dibentuk oleh kompleks golgi, terakumulasi di tepi inti dan bergabung membentuk vesikel pro-akrosom. Bentuk awal vesikel adalah pipih, berkembang menjadi vesikel pro-akrosom berbentuk granula di bagian luar inti. Antara inti dan vesikel terdapat lapisan padat elektron, antara lapisan tersebut, terbentuk lapisan inti dan membentuk kompleks akrosom dan perforatorium. Di akrosom, terdapat dua komponen yang dapat diidentifikasi, yaitu vesikel akrosom eksternal dan matriks elektronik. Mangkok sub-akrosomal kemudian berkembang, melingkar dan merata. Di bagian atas inti dan mangkok sub-akrosomal terdapat daerah epinuklear. Perforatorium adalah bagian kecil yang terdapat antara akrosom dan inti yang dikelilingi oleh mangkok sub-akrosomal. Sebagian dari perforatorium dan vesikel akrosom diidentifikasi sebagai daerah sub-akrosomal. Bagian leher spermatozoa (*connecting piece*) merupakan bagian yang menghubungkan kepala dengan ekor spermatozoa. Bagian ekor spermatozoa berasal dari bagian sentriol dan struktur tambahan yang terletak pada selaput inti spermatid (Hayati, 2011).

2.3.2.2 Ekor Spermatozoa

Ekor spermatozoa terdiri atas bagian tengah (*middle piece*), bagian utama (*principle piece*) dan bagian akhir (*end piece*). Pembagian tersebut berdasar letak, struktur dan fungsinya. Organel sel yang ada di ekor spermatozoa, selain mitokondria, serabut (mikrofibril) juga sitoplasma tetapi jumlahnya sangat sedikit. Sebagian besar sitoplasma penyusun spermatozoa telah diabsorpsi oleh sel sertoli di tubulus seminiferus saat spermiogenesis. Ekor atau flagella spermatozoa bagian *middle piece* tersusun oleh membran sel, mitokondria dan serabut tebal penyusun aksonema (9 + 2 mikrotubulus). Makna aksonema 9 + 2 adalah jumlah serabut penyusunnya, yaitu 9 pasang mikrotubulus yang terletak di bagian tepi (perifer) dan 2 mikrotubulus yang terletak di bagian sentral (Hayati, 2011).

Mitokondria terletak pada bagian ini tersusun secara spiral dan dilindungi dari lingkungan luar oleh membran sel. Mitokondria merupakan tempat untuk sintesis energi (*adenosin triphosphate*, ATP) yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa. Pergerakan terjadi dengan mengubah energi kimia menjadi energi kinetik (Alberts *et al.*, 1994).

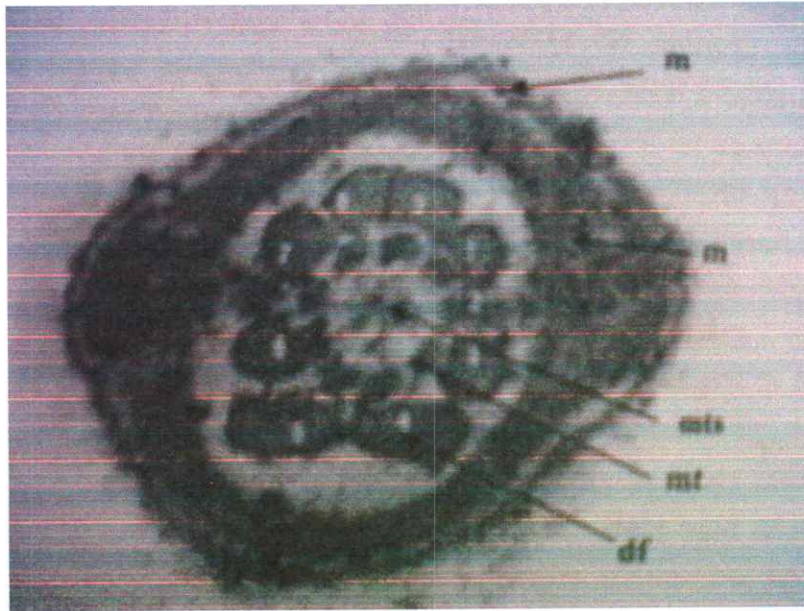
Bentuk ultrastruktur *middle piece* pada penampang membujur dapat dilihat dilihat di gambar 2.4. Dari gambar tampak struktur spermatozoa berturut-turut dari luar adalah membran sel, mitokondria, serabut tebal dan serabut halus (mikrotubulus). Setiap organel tersebut mempunyai peran dalam menjalankan fungsi spermatozoa. Serabut tebal dan serabut halus merupakan organel penyusun

aksonema yang berperan sebagai motor penggerak terjadinya motilitas spermatozoa (Hayati, 2011).

Struktur *middle piece* dapat dilihat lebih jelas melalui potongan membujurnya. Dari potongan tersebut tampak bahwa susunan mitokondria melingkari serabut tebal yang ada di dalamnya. Di antara mitokondria dan serabut tebal terdapat ruang atau rongga yang berisi matriks sel. Bagian yang paling dalam tampak susunan serabut halus (mikrotubulus) (Hayati, 2011).

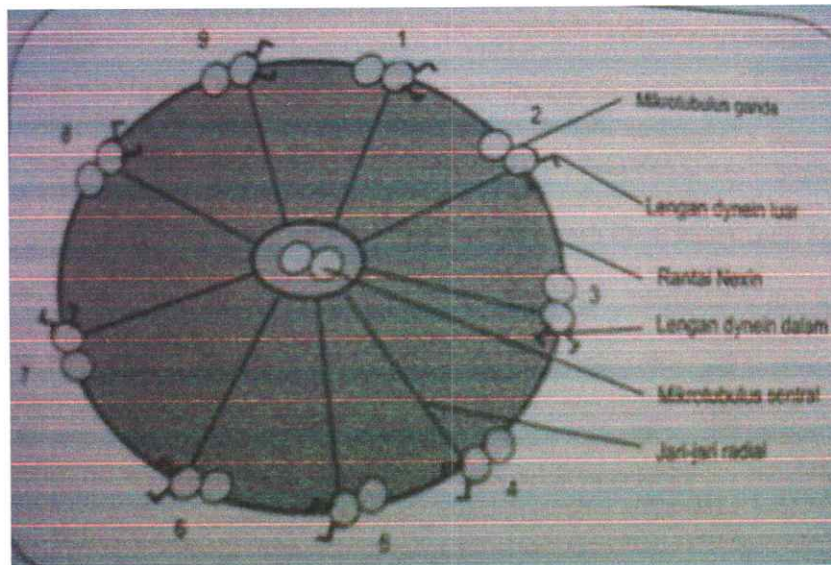


Gambar 2.4 Ultrastruktur ekor (*middle piece*) spermatozoa. Penampang membujur *middle piece* spermatozoa. m = mitokondria; mt = mikrotubulus; df = serabut tebal; mp = membran sel. (Hayati, 2011)



Gambar 2.5 Penampang melintang *middle piece*, tampak mitokondria (m) yang mengelilingi serabut tebal (df) dalam aksonema yang tersusun oleh mikrotubulus 9 pasang (mt) yang mengelilingi mikrotubulus 2 sentral (mts) (Hayati, 2011).

Aksonema (*axonema*) yang terdapat di sepanjang ekor spermatozoa membantu penggerak ekornya. Bagian ini terdiri atas 9 pasang mikrotubulus bagian perifer serabut tebal (*peripheral dense fibers*). Antara mikrotubulus satu dengan lainnya dihubungkan oleh bagian yang disebut *dynein arm* dan *radial spokes*, serta satu pasang mikrotubulus (2 mikrotubulus) terletak di bagian tengah atau sentral. Pada bagian *principle piece* juga tersusun oleh aksonema (9 + 2 mikrotubulus) (Gambar 2.6), sedangkan bagian *end piece* terdapat mikrotubulus dan aksonema yang berfungsi dalam pergerakan spermatozoa (Hayati, 2011).



Gambar 2.6 Skema bagian-bagian penyusun aksonema ekor bagian *middle piece* spermatozoa (Hayati, 2011)

Pergerakan ekor spermatozoa terjadi karena adanya gerakan sinergis antara penyusun aksonema spermatozoa. Sinkronisasi antara gerakan bagian penyusun aksonema, yaitu jari-jari radial (*radial spoke*), rantai Nexin dan lengan Dynein membuat gelombang gerakan ekor spermatozoa sehingga spermatozoa dapat bergerak ke depan atau ke arah lainnya (Hayati, 2011).

2.3.3 Spermatogenesis

Proses pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis, yaitu proses perkembangan dan pertumbuhan spermatogonia (sel germinal) menjadi spermatozoa dewasa yang terjadi secara terus menerus selama individu tersebut masih dapat bereproduksi (Hayati, 2011). Spermatozoa berkembang dari spermatogonia yaitu sel epitel germinatif yang tersusun di permukaan dalam

dinding tubulus seminiferus yang berkembang dengan jalan pembelahan (Hardijanto dkk., 2008).

Spermatogenesis merupakan peralihan dari bakal sel kelamin yang aktif membelah ke sperma yang masak serta menyangkut berbagai macam perubahan struktur yang berlangsung secara berurutan. Spermatogenesis berlangsung pada tubulus seminiferus dan diatur oleh hormon gonadotropin dan testosterone (Iqbal Ali.,2008).

Pembentukan spermatozoa dibagi atas tiga tahap yaitu :

1.Spermatocytogenesis

Spermatocytogenesis merupakan spermatogonia yang mengalami mitosis menjadi spermatosit primer. Spermatogonia merupakan struktur primitif dan dapat melakukan reproduksi (membelah) dengan cara mitosis. Spermatogonia ini mendapatkan nutrisi dari sel-sel sertoli dan berkembang menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer mengandung kromosom diploid ($2n$) pada inti selnya dan mengalami meiosis. Satu spermatosit akan menghasilkan dua sel anak, yaitu spermatosit sekunder.

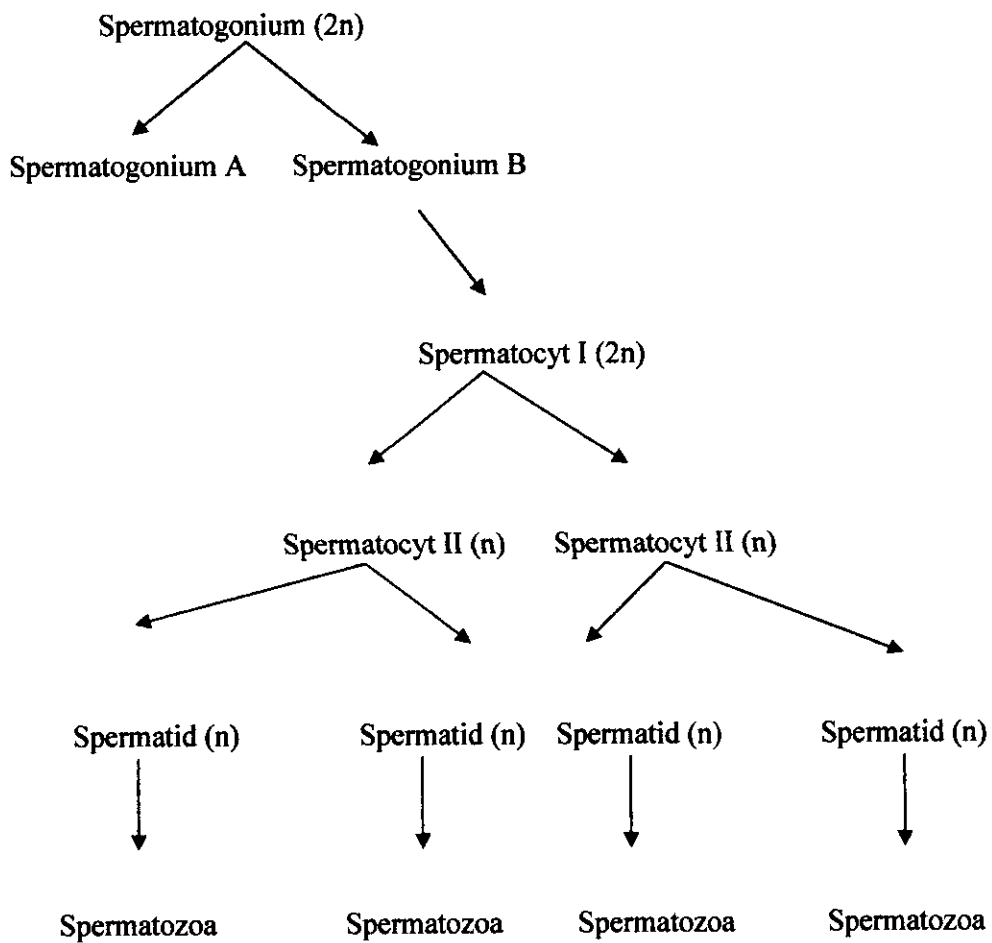
2. Tahapan Meiosis

Spermatosit I (primer) menjauh dari lamina basalis, sitoplasma semakin banyak dan mengalami meiosis I kemudian diikuti dengan meiosis II. Sitokenesis pada meiosis I dan II tidak membagi sel benih yang lengkap terpisah, tapi masih berhubungan melalui suatu jembatan. Spermatosit II memiliki inti yang gelap daripada spermatosit I.

3. Tahapan Spermiogenesis

Spermiogenesis merupakan transformasi spermatid menjadi spermatozoa yang meliputi 4 fase yaitu fase golgi, fase tutup, fase akrosom dan fase pematangan. Hasil akhir berupa empat spermatozoa masak. Dua spermatozoa akan membawa kromosom penentu jenis kelamin betina "X". Spermatozoa masak terdiri dari :

1. Kepala, tidak hanya mengandung inti (nukleus) dengan kromosom dan bahan genetiknya, tetapi juga ditutup oleh akrosom yang mengandung enzim hialuronidase yang mempermudah fertilisasi ovum.
2. Leher, menghubungkan kepala dengan badan.
3. Badan, bertanggung jawab memproduksi tenaga yang dibutuhkan untuk motilitas.
4. Ekor, berfungsi untuk mendorong spermatozoa masak ke dalam vas deferens dan ductus ejakulatorius.



Gambar 2.7 Bagan spermatogenesis
(Sumber : Hardijanto dkk., 2010)

Menurut Frandson (1992) spermatozoa normal terdiri dari kepala, leher, bagian tengah (*midpiece*) dan ekor. Komponen bagian kepala spermatozoa adalah nucleus yang panjangnya kira-kira sepertiga panjang kepala mengandung bahan genetik yang dibutuhkan untuk pembuahan ovum. Bagian leher juga mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak.

Bagian badan banyak mengandung enzim dan bahan lipid. Bagian ini berakhir pada cincin sentriol yang kemudian berfungsi mengkoordinir rentetan kontraksi-kontraksi dari serabut-serabut fibril itu. Ekornya yang berkurang garis tengahnya secara bertahap dari sambungan dengan bagian badan di cincin sentriol ke ujungnya, kira-kira panjangnya 40-44 μ (Hardijanto dkk., 2008). Bagian ekor juga terdapat plasmanogen yang merupakan senyawa lemak terbanyak dalam spermatozoa, digunakan sebagai sumber energi endogen untuk aktivitas spermatozoa (Hardjopranjoto, 1995).

2.3.4 Membran Plasma Spermatozoa

Membran plasma yang menyelubungi sebuah sel selain membatasi keberadaan sebuah sel, juga memelihara perbedaan pokok antara isi sel dengan lingkungan, namun membran tersebut tidak sekedar merupakan sebuah penyekat pasif, melainkan juga merupakan sebuah filter yang memiliki kemampuan memilih bahan-bahan yang melintasinya dengan tetap memelihara perbedaan kadar ion di dalam dan di luar sel. Bahan-bahan yang diperlukan oleh sel dapat masuk sedang bahan-bahan yang merupakan limbah sel dapat melintas ke luar sel (Nawang S., 2005).

Menurut model mozaik cairan, membran plasma terdiri atas tiga lapisan, seperti yang tampak pada mikrograf elektron. Kedua lapisan yaitu lapisan terluar dan lapisan terdalam disusun oleh protein, sedangkan lapisan tengah seperti halnya "sandwich", disusun oleh dua lapis molekul fosfolipid dan lapisan tipis mukopolisakarida (Frandsen., 1992).

Adanya protein dan mukopolisakarida pada permukaan membuat membran hidrofili, yang berarti bahwa air melekat dengan mudah pada membran tersebut. Lipid terletak di tengah membran dan tidak dapat ditembus oleh zat yang tidak larut dalam lipid, bagian lemak molekul fosfolipid melekat pada fase lipid yang terletak di tengah membran sel, dan bagian polar (terionisasi) molekul menonjol ke permukaan yang terikat secara elektrokimia dengan lapisan dalam dan lapisan luar protein. Lapisan mukopolisakarida yang tipis pada permukaan membran sel membantu membuat permukaan membran luar berbeda dengan permukaan dalam, jadi mempolarisasi membran sehingga reaktivitas kimia permukaan dalam sel berbeda dengan permukaan luar. Interpretasi membran sel lain dan salah satu yang mempunyai banyak bukti mutakhir yang menyokong adalah bahwa struktur dasar membran hampir seluruhnya lipid dengan sedikit protein pada kedua permukaan. Protein ini tampak tersebar di seluruh lipid dan mempunyai banyak fungsi yaitu 1) memberi kekuatan struktural pada membran; 2) bekerja sebagai enzim untuk mempermudah reaksi-reaksi kimia; 3) bekerja sebagai protein pengemban (carrier) untuk transport zat-zat melalui membran; 4) menguraikan zat lipid dan oleh karena itu memberi porsi pada membran (Guyton dan Hall., 1997).

2.4 Motilitas Spermatozoa

Keberhasilan fungsi spermatozoa dalam fertilisasi dipengaruhi oleh kualitasnya. Spermatozoa yang normal mempunyai kualitas baik sehingga mampu melakukan kapasitasi, reaksi akrosom dan menerobos dinding zona

pelusida telur pada saat fertilisasi. Menurut WHO (1999) kualitas mikroskopik spermatozoa dibedakan menjadi motilitas, morfologi, integritas membran, jumlah spermatozoa dan leukosit dalam saluran reproduksi dan aglutinasi spermatozoa.

Fertilisasi terjadi karena adanya pertemuan antara spermatozoa dan oosit. Spermatozoa dalam menjalankan fungsinya untuk fertilisasi dilengkapi dengan kemampuan untuk bergerak (motil). Kemampuan ini datangnya tidak begitu saja melainkan melalui banyak proses. Ketika spermatozoa dilepas oleh testis menuju epididimis, di tempat inilah kemampuan gerak spermatozoa mulai meningkat. Kemampuan motilitas ini terus meningkat sehingga spermatozoa berada dalam saluran reproduksi betina. Motilitas spermatozoa dalam saluran reproduksi jantan terjadi secara pasif. Sifat motilitas spermatozoa akan tampak setelah bercampur dengan sekresi dari kelenjar kelamin aksesoris pada saat ejakulasi. Pendewasaan spermatozoa terjadi pada kauda epididimis, spermatozoa dapat bergerak atau motilitasnya aktif dan tidak ada sisa sitoplasma yang menempel pada kepala atau leher spermatozoa serta puncak aktivasi motilitas tampak pada ejakulat (Hayati, 2011).

Spermatozoa dapat bergerak aktif setelah mengalami maturasi di epididimis, yaitu kelenjar reproduksi di luar testis. Pada proses maturasi terjadi perubahan-perubahan meliputi ukuran, bentuk, struktur organisasi mitokondria, fungsi imunitas, sifat dan permeabilitas membran plasma, daya tahan terhadap perubahan fisikokimia, dan ultrastruktur akrosom. Perubahan-perubahan ini bertujuan untuk meningkatkan daya motilitas dan kapasitas fertilisasi spermatozoa (Hayati, 2011).

Bagian ekor spermatozoa sangat menunjang pergerakan spermatozoa. Pada bagian ini dijumpai banyak mitokondria sebagai sumber energi untuk pergerakan. Energi yang diperlukan dalam bentuk ATP. Energi yang dikeluarkan menyebabkan terjadinya dua macam pergerakan. Pertama, gerakan bergelombang ke ujung ekor (makin ke ekor semakin lemah). Kedua, gerakan yang bersifat sirkuler tetapi arahnya melingkari batang tubuh bagian tengah ke ujung ekor. Resultan dari dua gerakan ini menyebabkan spermatozoa motil (Hayati, 2011).

Bagian spermatozoa yang berperan dalam motilitas adalah ekor. Ekor spermatozoa terbentuk dari suatu aksonema yang terdiri atas mikrotubulus dan serabut tebal memanjang yang saling berhubungan. Mikrotubulus ini tersusun dengan pola dasar 9+2, yaitu 2 mikrotubulus berada di tengah (*central microtubules*) dan dikelilingi oleh 9 mikrotubulus ganda yang terdiri atas 2 *sub-fiber A* dan *sub-fiber B*. *Sub-fiber A* merupakan suatu mikrotubulus yang lengkap dengan 1 mikrofilamen. *Sub-fiber B* lebih pendek terdiri atas 10 dan 11 mikrofilamen. Molekul *dynein* terletak di sepanjang *sub-fiber A*. Molekul ini membentuk 2 lengan, yaitu *inner dynein arm* dan *outer dynein arm* yang mengarah ke *sub-fiber B*. Di antara mikrotubulus ganda dan mikrotubulus bagian tengah terdapat *radial spoke*. Keadaan ini menyebabkan ekor spermatozoa bagian *mid-piece* bergerak membelok, lurus, menyamping dan diikuti oleh bagian ekor lainnya sehingga menimbulkan gerakan gelombang dan menghasilkan gerakan yang bisa mendorong kepala maju ke depan (Hayati, 2011).

Motilitas adalah unsur yang sangat penting dalam fertilisasi karena merupakan salah satu faktor yang menentukan gambaran spermatozoa yang sehat.

Motilitas membantu transpor spermatozoa untuk mencapai tempat terjadinya fertilisasi, di samping itu juga dibantu oleh mekanisme yang lain, yaitu kontraksi otot polos dan pergerakan silia dari alat reproduksi betina (Hayati, 2011).

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain sebagai berikut.

1. Faktor endogen, yaitu faktor yang mempengaruhi motilitas dari dalam spermatozoa. Hal ini dapat terjadi pada saat spermatozoa berada di dalam epididimis, waktu antara ejakulasi dan pemeriksaan, maturasi spermatozoid (morfologi, fisiologi dan biokimia), simpanan energi ATP, transpor membran spermatozoa, antibodi, faktor aglutinasi, reseptor permukaan spermatozoa, integritas spermatozoa. Pada saat spermatozoa berada di lingkungan yang berbeda tempat dapat mempengaruhi influks-efluks molekul-molekul dari eksternal-internal. Keberadaan molekul (protein, enzim, ROS dan lain-lain) di dalam spermatozoa inilah yang mempengaruhi terjadinya peningkatan atau penurunan motilitas.
2. Faktor eksogen, yaitu faktor yang berasal dari luar spermatozoa. Faktor tersebut berupa biofisik meliputi pH, suhu, komposisi ion, cairan yang mempengaruhi motilitas meliputi cairan epididimis, plasma semen, getah serviks, cairan prostat dan faktor-faktor yang merangsang dan menghambat motilitas meliputi ion-ion organik Cu, Zn, Cd, Mn, Hg dan juga obat-obatan, hormon, dan faktor imun (Hayati, 2011).

2.5 Bahan Pengencer

Semen beku yang berkualitas tinggi membutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat *thawing*, karena itu, bahan pengencer semen beku harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik, dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing*.

Sumber nutrisi yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat terutama fruktosa yang paling mudah dimetabolisasi oleh spermatozoa (Toelihere, 1993). *Buffer* berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dan juga berfungsi menetralkan asam laktat yang dihasilkan dari sisa metabolisme spermatozoa. Bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan adalah kuning telur atau kacang kedelai yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibriasi (5°C).

2.5.1 Pengencer Skim Kuning Telur

Air susu baik susu segar (susu mentah) maupun susu hasil olahan (susu skim sebagai bahan pengencer semen berbagai ternak telah lama dimanfaatkan dan memberikan hasil yang baik di beberapa BIB. Susu dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengencer semen karena di dalamnya terkandung berbagai jenis senyawa kimia yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menunjang kehidupan spermatozoa. Air susu mentah mengandung bahan toksik berupa laktenin yang terdapat di dalam fraksi protein susu dan mengandung albumin. Menurut Salisbury dan Van demark (1995), sakarida yang dihasilkan dari pemanasan air

susu dapat digunakan sebagai sumber energi oleh sel spermatozoa sehingga umumnya digunakan sebagai pengencer, air susu sapi dipanaskan lebih dahulu pada suhu sekitar 92-95°C atau rata – rata 95°C selama sepuluh menit.

Semen yang disimpan dalam pengencer kuning telur umumnya lebih tahan lama terhadap *cold shock*. Kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang dapat bekerja sebagai lapisan pelindung bagi spermatozoa. Kuning telur juga sebagai sumber makanan karena mengandung banyak protein yang larut dalam air atau minyak serta asam amino esensial. Karbohidrat dari kuning telur berupa glukosa dan gabungan karbohidrat yaitu galaktosa dan manosa yang menghasilkan energi dan dalam proses metabolisme sehingga dapat di dayagunakan oleh spermatozoa. Penggunaan kuning telur 12,5% sampai 20% dapat melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin dan dapat mencapai daya hidup optimal pada suhu 5°C (Rizal, 2008).

Komposisi pengencer skim kuning telur adalah susu skim, kuning telur, antibiotika, fruktosa, glukosa, vitamin C, glycerol. Susu mengandung substansi pelindung lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap suhu dingin selama proses pembekuan (Toelihere,1985). Penggunaan susu skim lebih disukai karena terdapat sedikit butir-butir lemak yang dapat menghambat pemeriksaan dengan mikroskop (Feradis,2010).

Kuning telur sebagai sumber makanan karena mengandung banyak protein yang larut dalam air atau minyak serta asam amino esensial. Karbohidrat dari kuning telur berupa glukosa dan gabungan karbohidrat yaitu galaktosa dan manosa yang menghasilkan energi dan dalam proses metabolisme sehingga dapat

didayagunakan oleh spermatozoa. Untuk mencegah cold shock, digunakan kuning telur yang mengandung lipoprotein berupa lesitin (fosfatidil kolin) (Rizal dan Herdis, 2008). Penggunaan kuning telur 12,5% sampai 20% dapat melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin dan dapat mencapai daya hidup optimal pada suhu 5°C (Rizal dan Herdis, 2006).

Penambahan gliserol ke dalam semen dan cairan pengencer dapat memperendah titik beku cairan. Hal ini berfungsi untuk mencegah terjadinya kristal-kristal es dan menghindari tertimbunnya elektrolit intra-selular di dalam spermatozoa. Daya membuah yang optimum dapat dipertahankan dengan menghambat baik secara fisis atau kimiawi dari semua aktivitas hidup kecuali yang minimal dibutuhkan oleh sel, dalam hal ini proses-proses metabolisme spermatozoa dapat ditekan dengan penurunan suhu dan proses tersebut mudah dipulihkan kembali dengan mengembalikannya pada suhu yang normal. Karena sifat-sifat tersebut maka pengendalian suhu merupakan perlakuan yang sering digunakan untuk mengawetkan spermatozoa pada saat sekarang ini (Hardijanto dkk., 2010).

Antibiotik berfungsi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan gliserol untuk melindungi sperma terhadap efek *lethal* pada saat pembekuan (Dirjennak, 2000).

2.5.2 Pengencer Tris Kuning Telur

Pengencer Tris telah sangat umum digunakan dalam proses preservasi dan kriopreservasi semen berbagai jenis hewan dan ternak. Bahan pengencer tris kuning telur terdiri dari tris amino methan, asam sitrat, laktosa, fruktosa, raffinosa,

kuning telur, penicillin, streptomycin dan aquadest (Rizal, *et. al.*, 2002). Pengencer tris (*hidroxymethyl aminomethan*) berfungsi sebagai buffer yang bersifat basa yang mampu menyanggah pH larutan agar tetap stabil, karena pH merupakan faktor yang mempengaruhi kualitas semen. Tris merupakan buffer yang kuat karena mengandung garam yang mampu menyanggah pH larutan dengan sangat baik (Hafez, 2000).

Tris amino methan berfungsi sebagai buffer dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Asam sitrat selain sebagai buffer, mengikat butir lemak di dalam kuning telur, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Fruktose menyediakan zat – zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Sedangkan kuning telur berfungsi melindungi spermatozoa terhadap shock dingin dan sebagai sumber energi (Herliantin, 1992).

Kuning telur mampu mempertahankan motilitas dan integritas akrosom dan membran plasma mitokondria spermatozoa. Kuning telur juga mempunyai sifat *osmotic buffer* sehingga spermatozoa lebih toleran baik terhadap pengencer hipotonik maupun hipertonik. Kuning telur mengandung *low – density lipoprotein* (LDL) khususnya fosfolipid yang telah diidentifikasi sebagai komponen efektif dalam melindungi spermatozoa terhadap pengaruh pendinginan yang cepat (Parks dan Graham, 1992) dan mencegah peningkatan aliran ion kalsium yang berlebihan ke dalam sel yang dapat merusak spermatozoa (White, 1993).

Fruktosa berfungsi menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Antibiotik berfungsi untuk mencegah pertumbuhan

mikroorganisme, sedangkan gliserol untuk melindungi sperma terhadap efek *lethal* pada saat pembekuan (Departemen Pertanian Direktorat Jendral Produksi Peternakan.,2000).

2.5.3 Pengencer Andromed®

Salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur adalah AndroMed® produksi Minitube Jerman. Komposisi pengencer AndroMed® adalah *phospholipid*, Tris, *citric acid*, gula, antioksidan, buffer, *glycerol*, antibiotik dan air.

Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Pengencer AndroMed® juga telah mengandung gliserol sehingga dalam proses kriopreservasi semen, pemanfaatan pengencer tersebut tidak perlu lagi ditambahkan senyawa krioprotektan. Dengan demikian, diharapkan bahwa penggunaan pengencer semen komersial seperti AndroMed® dalam proses kriopreservasi semen selain dapat meningkatkan kualitas semen beku, juga dapat mencegah terjadinya penularan bibit penyakit yang mungkin terdapat di dalam kuning telur (Surachman,2009). Andromed® merupakan bahan pengencer semen dengan sumber lesitin kacang kedelai produksi minitub Germany (Aires *et al.*, 2003).

2.6 Semen Beku

Orang yang pertama kali mengadakan percobaan tentang pembekuan spermatozoa adalah Devenport pada tahun 1897 bahwa spermatozoa manusia tetap hidup pada pendinginan -17°C . Penemuan ini hanya sedikit mendapat perhatian dari para peneliti terhadap pembekuan sebagian suatu kemungkinan untuk pengawetan (Hardijanto dkk,2009).

Pada tahun 1938, F.Jahnel berhasil menghidupkan kembali spermatozoa manusia yang telah didinginkan selama 40 hari pada suhu -79°C dan penyimpanan pada waktu yang lebih pendek pada suhu -196°C sampai -269°C .

Smith dan Polge (1950) menyelidiki tentang penyimpanan semen pada sapi, kambing, dan domba pada suhu rendah di dalam pengencer kuning telur sitrat dengan penambahan 10% dan 15% gliserol kemudian didinginkan perlahan-lahan dari 2°C sampai -79°C dan kemudian diencerkan kembali (*thawing*). Hasilnya menunjukkan 50-90% spermatozoa yang hidup setelah dicairkan kembali diperoleh dari semen yang disimpan dari bahan pengencer yang ditambahkan 15% gliserol.

Semen beku mempunyai pengertian sebagai semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku antara -79°C sampai -196°C . Semen yang telah diencerkan, bila dibekukan maka akan terbentuk kristal-kristal es atau terjadi penumpukan elektrolit dan zat-zat lain di dalam sel spermatozoa yang berbahaya atau dapat mematikan (Hardijanto dkk,2009).

Menurut Smith, kematian ini terjadi pada suhu kritis antara $-1,5^{\circ}\text{C}$, sedangkan semen baru akan membeku pada suhu $-0,53^{\circ}\text{C}$ atau sedikit lebih

rendah. Namun pada suhu ini kristal-kristal es belum terbentuk sempurna. Bila suhu diturunkan hingga mencapai $\pm 1,7^{\circ}\text{C}$ maka baru terbentuk kristal-kristal es yang sempurna. Jika kristal es telah terbentuk, maka suhu cairnya yang sedang membeku akan turun lagi sampai titik bekunya yang sejati tercapai. Suhu akan tetap berada pada titik bekunya yang sejati sampai proses pembekuan seluruhnya selesai, untuk menghindari terbentuknya kristal es dalam proses pembekuan semen, selain zat anti kristalisasi, maka penurunan suhunya sampai -79°C atau -196°C sebaiknya berjalan cepat, tergantung macamnya bahan pendingin.

2.7 Hypoosmotic Swelling Test

Hypoosmotic Swelling Test merupakan tes pemeriksaan sperma yang didesain untuk menilai integritas dan fungsi dari membran spermatozoa yang didasarkan pada semipermeabilitas membran sel, yang mengakibatkan spermatozoa mengembang pada kondisi hipo-osmotik. Air yang masuk akan mengakibatkan pembesaran volume sel. Membran spermatozoa yang normal akan mengalami suatu pengembangan dan tidak terjadi suatu pengembangan apabila membran spermatozoa mengalami kerusakan (Setiadi, 2007). Perkembangan membran plasma merupakan tahapan yang penting dalam perkembangan bentuk awal dari kehidupan, tanpa hal tersebut kehidupan seluler tidak mungkin terjadi. Menjaga integritas membran plasma spermatozoa sangat penting selama penyimpanan dari kekuatannya untuk membuahi, terutama setelah prosedur seperti *freezing* dan *storage*.

Hypoosmotic Swelling Test mulai dikenalkan oleh Drevious tahun 1963 yang menemukan bahwa spermatozoa yang terpapar pada medium *hypoosmotic* akan mengalami pembengkokan ekor sehingga berbentuk spiral. Pembengkokan ini adalah akibat gangguan kontraksi-relaksasi ekor oleh adanya aliran ion atau bahan yang berat molekulnya rendah dari ekor ke medium *hypoosmotic* tersebut.

Tes klinik ini diperkenalkan oleh Jayendran (1984). Tes ini memberikan informasi tambahan mengenai integritas dan kerusakan pada membran ekor spermatozoa. Membran spermatozoa yang normal apabila diberi larutan HOS akan mengalami suatu pengembangan dan tidak terjadi suatu pengembangan apabila membran sel mengalami kerusakan.

2.8 Mikroskop Elektron

Mikroskop elektron adalah jenis mikroskop yang menggunakan sinar partikel elektron untuk menerangi spesimen dan menghasilkan gambar yang diperbesar. Mikroskop elektron dapat menghasilkan gambar yang lebih besar dari pada mikroskop cahaya, karena memiliki panjang gelombang elektron sekitar 100.000 kali lebih pendek dari pada cahaya dan dapat mencapai resolusi 0,2 nm dan pembesaran hingga 2.000.000 kali, sedangkan pada mikroskop cahaya hanya mampu resolusi sekitar 200 nm dan pembesaran dibawah 2000 kali.

Mikroskop elektron menggunakan lensa elektrostatik dan elektromagnetik untuk mengontrol berkas elektron dan fokus untuk membentuk sebuah gambar. Dalam transmisi, sinar elektron pertama terdifraksi dengan spesimen kemudian lensa akan kembali fokus pada pola difraksi untuk area yang akan dilihat.

Sehingga terbentuk gambaran nyata yang merupakan perbesaran mulai dari beberapa ratus hingga beberapa ribu kali dan dapat dilihat pada layar untuk kemudian dapat direkam atau difoto. Elektron mikroskop digunakan untuk mengamati beberapa spesimen biologi dan anorganik termasuk mikroorganisme, sel, molekul yang besar, sampel biopsi, logam dan kristal industri. Mikroskop elektron terutama digunakan untuk pengendalian kualitas dan analisa kegagalan dalam pembuatan perangkat semikonduktor.

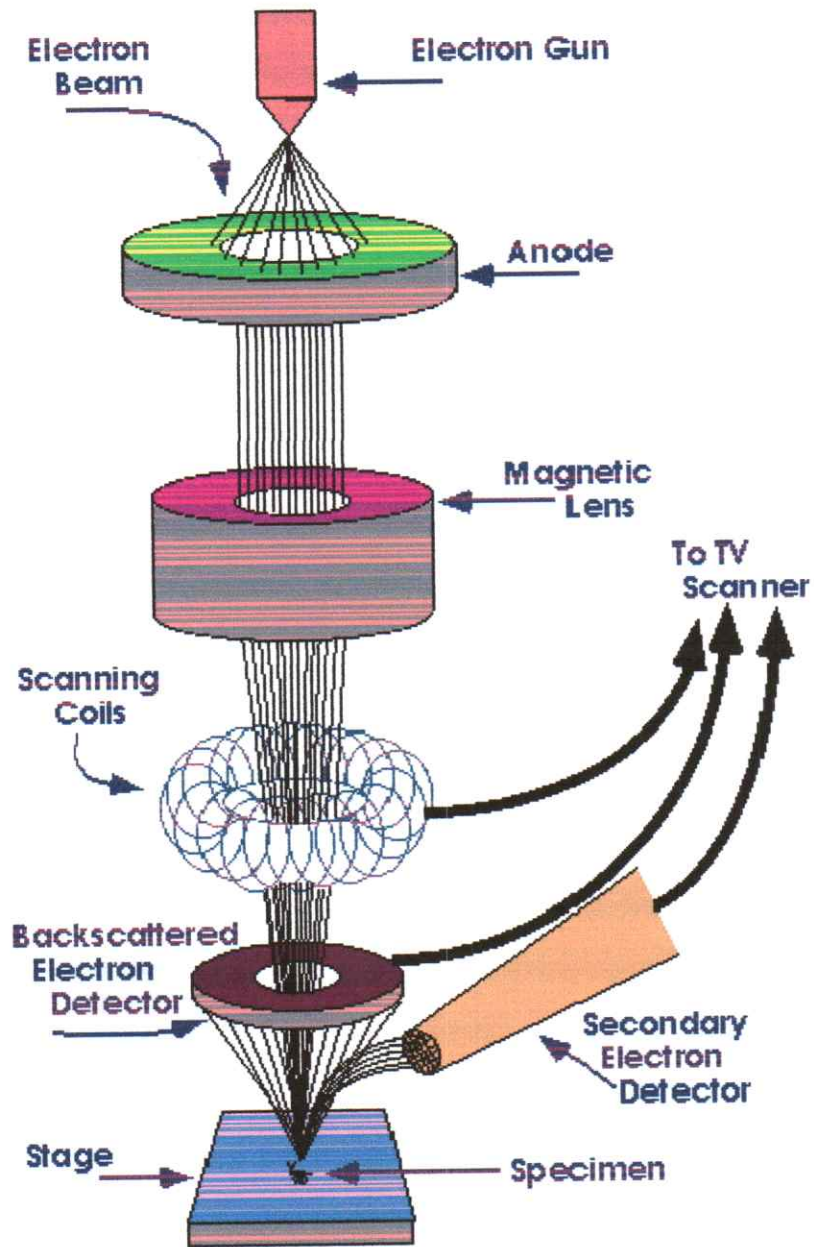
Mikroskop elektron terdiri dari beberapa tipe yaitu *Transmission Electron Microscope* (TEM), *Scanning Electron Microscope* (SEM), *Reflection Electron Microscope* (REM), *Scanning Transmission Electron Microscope* (STEM), *Low-Voltage Electron Microscope* (LVEM).

2.8.1 Scanning Electron Microscope (SEM)

SEM menghasilkan gambar dengan menyidik spesimen dengan berkas elektron yang terfokus pada area yang dipindai di area segiempat dari spesimen (*raster scanning*). Pada setiap titik dari spesimen berkas elektron kehilangan energi, energi yang hilang tersebut diubah menjadi bentuk lain seperti panas, emisi rendah energi elektron sekunder, emisi cahaya (*cathodoluminescence*) atau emisi *x-ray*. Tampilan intensitas SEM berbeda-beda dari setiap sinyal ke dalam gambar sesuai dengan posisi balok pada spesimen ketika sinyal tersebut dihasilkan.

Umumnya resolusi gambar dari SEM lebih rendah dibandingkan dengan TEM. Namun karena citra SEM adalah pada permukaan bukan transmisi, maka

SEM mampu menunjukkan gambar sampel sampai berukuran sentimeter dan (tergantung pada desain instrumen dan pengaturan) memiliki kedalaman besar lapangan dan sehingga dapat menghasilkan gambar yang representasi baik bentuk tiga dimensi dari sampel (Hafner, 2007).



Gambar 2.9 Skema *Scanning Electron Microscope*
(Sumber : Purdue University, 2010)



BAB 3

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN**

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

Pembekuan adalah fenomena fisis yang mengerikan. Jika suatu larutan di dalam air dibekukan, maka pelarutnya (air) akan membeku dan membentuk kristal-kristal es yang tajam. Semen yang telah diencerkan juga demikian, bila dibekukan maka akan terbentuk kristal-kristal es atau terjadi penumpukan elektrolit dan zat-zat lain di dalam spermatozoa yang berbahaya atau dapat mematikan (Hardijanto dkk, 2010).

Kematian spermatozoa terjadi pada suhu kritis antara $-1,5^{\circ}\text{C}$, sedangkan semen baru akan membeku pada suhu $-0,53^{\circ}\text{C}$ atau sedikit lebih rendah. Pada suhu ini kristal-kristal es belum terbentuk sempurna. Bila suhu diturunkan hingga mencapai $\pm -1,7^{\circ}\text{C}$ maka baru akan terbentuk kristal-kristal es yang sempurna. Jika kristal es sudah terbentuk, maka suhu cairnya yang sedang membeku akan turun lagi sampai titik beku sejati tercapai. Untuk menghindari terbentuknya kristal es dalam proses pembekuan, selain krioprotektan, maka penurunan suhunya sampai -79°C atau -196°C sebaiknya berlangsung cepat, tergantung macamnya bahan pendingin (Hardijanto dkk, 2010)

. Pengeluaran molekul air secara besar besaran dari dalam spermatozoa yang terjadi pada saat pembekuan mengakibatkan meningkatnya konsentrasi elektrolit intraseluler dan terbentuknya kristal-kristal es. Saat *thawing*, semen mengalami tekanan yang berat akibat peningkatan suhu yang drastis dan kontak dengan oksigen. Dampak negatif ini akan mengakibatkan kerusakan pada organel

dan membran spermatozoa yang menyebabkan rendahnya kualitas semen beku. Kontak antara semen dengan oksigen terjadi pada saat *thawing* semen beku yang memungkinkan terbentuknya senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil dan oksigen. Peningkatan suhu semen yang drastis pada saat yang bersamaan sehingga memacu tingkat metabolisme spermatozoa yang juga berarti meningkatkan konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme. Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Radikal bebas memiliki sifat yang sangat reaktif untuk memperoleh elektron. Radikal bebas akan menyerang dan mengambil elektron asam lemak tak jenuh yang banyak menyusun fosfolipid membran sel, kalau tidak dicegah akan terjadi reaksi otokatalitik (reaksi rantai) dan pada akhirnya merusak seluruh fosfolipid membran sel spermatozoa. (Rizal, 2005)

Menurut Suryohudoyo (2000), akibat yang ditimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipid membran sel adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa yang terbentuk dan toksik tersebut adalah antara lain berbagai macam aldehida seperti *malondialdehyde* (MDA).

Proses pengenceran semen, suhu dan lama penyimpanan berperan penting terhadap daya tahan spermatozoa. Pengaruh dingin yang mendadak dapat menimbulkan *cold shock*. Hal tersebut karena cepatnya proses pemecahan Adenosine Tri-Phosphate (ATP) sebagai akibat kebutuhan energi yang mendadak. Akibatnya spermatozoa kehabisan energi, dindingnya bersifat permeabel terhadap beberapa elektrolit atau mineral dan terjadi kerusakan protein intra-seluler. Hal ini

dapat dicegah dengan melakukan pendinginan bertahap. Bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan adalah kuning telur atau kacang kedelai yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibrase (5°C) (Arifiantini dan Yusuf , 2004).

Proses pembekuan semen dan proses *thawing* mengakibatkan kerusakan akrosom spermatozoa, kerusakan membran sel dan penurunan sumber energi yang pada akhirnya menyebabkan penurunan metabolisme dan motilitas spermatozoa. Kerusakan membran plasma spermatozoa sangat terkait dengan kondisi integritas membran, motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Kondisi di atas sangat menentukan angka fertilitas dan produksi embrio (Madyawati, 2007).

Pommer *et al.* (2003) mengatakan bahwa spermatozoa yang dibekukan akan menyebabkan perubahan beberapa karakteristik pada membran plasma, antara lain terjadi reorganisasi membran, kadar kalsium meningkat, *Reactive Oxygen Species (ROS)* meningkat dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi menurun.

Penurunan persentase motilitas dan spermatozoa yang hidup *pasca thawing* biasa terjadi dalam proses pembekuan karena pada saat spermatozoa berada pada kondisi temperatur yang menurun secara drastis dari keadaan semula dapat mengakibatkan kerusakan spermatozoa sebesar 20% dari keseluruhan. Perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Suprayogi, 1996). Hal ini sesuai dengan pernyataan

Park and Graham (1992) bahwa kerusakan membran plasma spermatozoa terjadi selama proses pembekuan dan *thawing*.

Bahan diluter yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat *thawing* dibutuhkan untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi (Aboagla and Terada, 2004). Bahan diluter atau pengencer semen beku harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik, dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing*. Sumber nutrisi yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat terutama fruktosa yang paling mudah mengalami metabolisme di dalam sel spermatozoa (Toelihere, 1993).

Sebagai bahan diluter, tris *hidroxymethyl aminomethan* ($C_4H_{11}NO_3$) telah banyak digunakan sebagai komponen dasar diluter semen beku sapi, babi, dan domba (Maxwell and Salamon, 1993). Tris sebagai diluter dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa pada temperatur $-5^{\circ}C$ dan $-196^{\circ}C$ (Bearden and Fuquay, 1997).

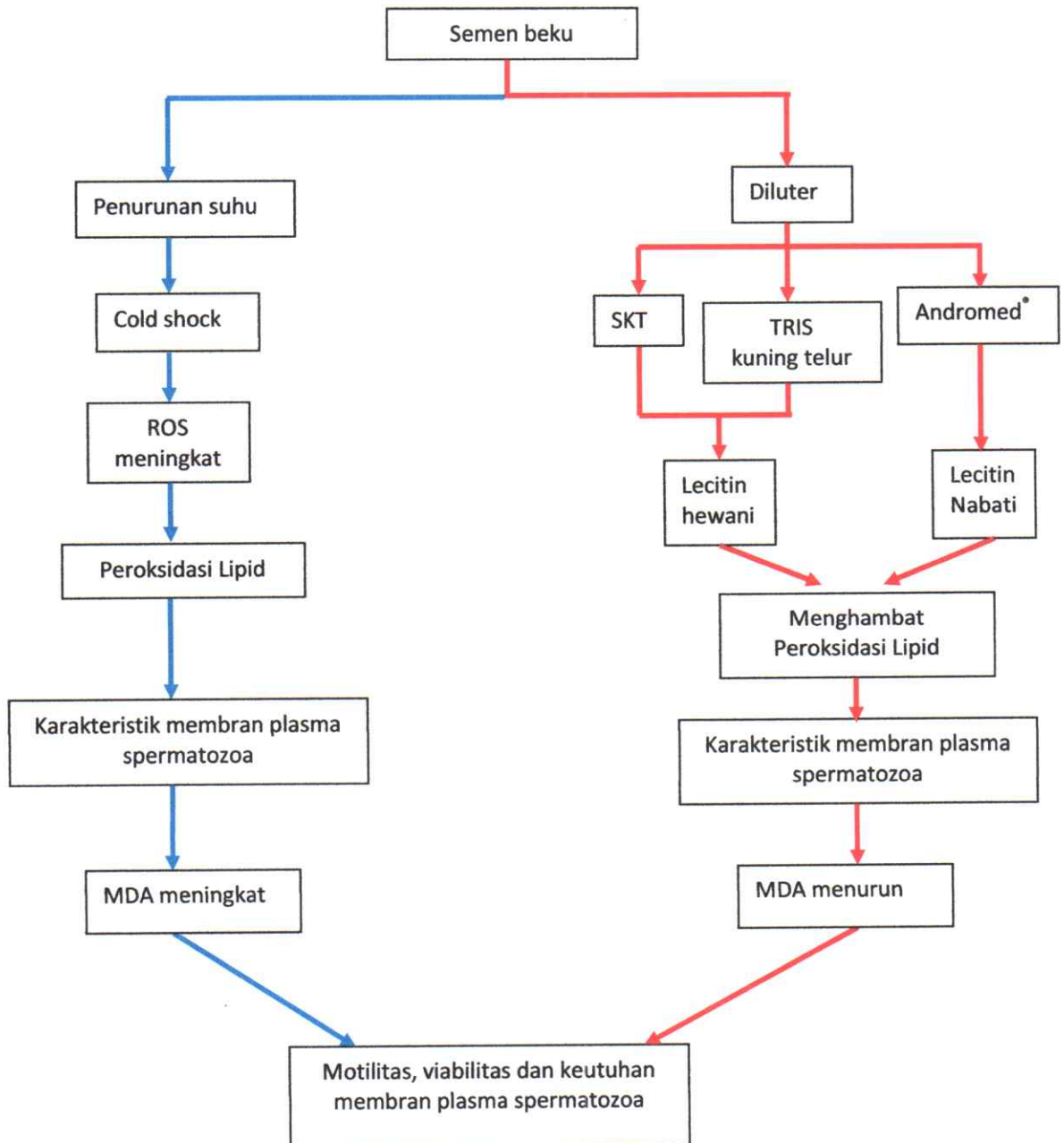
Susu merupakan medium isotonik yang mengandung beberapa komponen yang menguntungkan untuk memelihara kelangsungan hidup spermatozoa dan digunakan secara intensif untuk pengenceran semen. Komponen dengan berat molekul tinggi seperti kuning telur dan susu dapat berperan dalam melindungi spermatozoa terhadap kerusakan karena *cold shock*. (Maxwell and Salamon, 1993)

Selain diluter yang dapat dibuat berdasarkan resep, terdapat berbagai diluter kemasan yang telah beredar dan dapat diperoleh seperti diluter Andromed[®] (Minitub Jerman) yang menggunakan lesitin dari kacang kedelai

sebagai pengganti kuning telur, pada diluter Andromed[®] digunakan ekstrak kedelai (dengan target utama adalah lesitin yang terkandung didalamnya). Diluter Andromed[®] (Minitub Jerman) menggunakan lesitin dari kacang kedelai (KK). Diluter Andromed[®] juga telah mengandung gliserol sehingga tidak perlu lagi ditambahkan senyawa krioprotektan. (Arifiantini dan Yusuf, 2004).

3.2. Bagan Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual secara skematis dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Keterangan: → dengan diluter (yang dilakukan), → tanpa diluter

Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

3.3. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terdapat pengaruh berbagai bahan pengencer terhadap motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing*.
2. Terdapat korelasi antara motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi *Friesian Holstein post-thawing* dalam berbagai bahan pengencer.



BAB 4

MATERI DAN METODE

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

4.1.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Semen Beku Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga, Gresik. Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dilaksanakan di Laboratorium *In Vitro*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pemeriksaan preparat mikroskop elektron dilaksanakan di *Unit Electron Microscope*, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan, yaitu bulan Agustus sampai Desember 2010.

4.2 Bahan dan Materi Penelitian

4.2.1 Hewan Penelitian

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sapi pejantan *Friesian Holstein* yang telah dewasa kelamin di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian meliputi : semen sapi *Friesian Holstein*, pengencer skim kuning telur, pengencer Tris kuning telur, pengencer AndroMed[®], NaCl fisiologis, pewarna eosin negrosin, alkohol 70%, larutan *Hypo-Osmotic Swelling*.

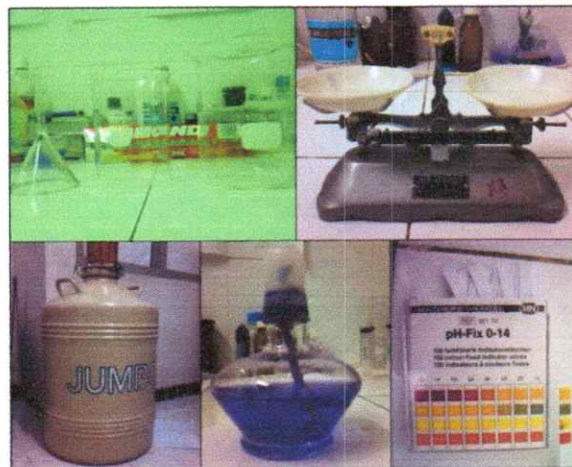
4.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat penelitian untuk mengambil semen meliputi : kandang penjepit, seperangkat vagina buatan, tabung penampung semen, *thermometer*, dan tali *handling*.

Alat-alat untuk pemeriksaan makroskopi dan mikroskopi semen meliputi : kertas lakmus, mikroskop, spektrofotometer, tabung berskala, gelas objek, gelas penutup, mikropipet, pipet tetes, batang pengaduk gelas, bunsen.

Alat-alat untuk mengencerkan semen dan pengemasan meliputi : mikroskop, tabung berskala, gelas objek, *cover glass*, timbangan analitik kapasitas 100 gram, batang pengaduk gelas, pipet tetes, labu erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, pipet ukur, *thermometer*, scalpel, lemari es, *cool top*, aluminium foil, rak besi, container gas nitrogen cair, mini straw, *filling* dan *sealing machine*.

Alat-alat untuk uji *Hypo-Osmotic Swelling* meliputi : inkubator CO₂, tissue culture dish, pipet tetes, gelas objek, *cover glass*, eosin negrosin, bunsen, mikroskop. Pemeriksaan dilanjutkan menggunakan *Scanning electron microscope*.



Gambar 4.1. Peralatan Pembuatan dan Semen Beku

4.2.4 Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan yang digunakan sebelum penelitian ini adalah penyediaan alat dan bahan, persiapan seperangkat vagina buatan lengkap dengan tabung penampung semen berskala, dan larutan pengencer skim kuning telur, pengencer tris kuning telur, dan pengencer Andromed[®].

Pengambilan semen dilakukan dengan menggunakan vagina buatan dan alat – alat pemeriksaan semen disiapkan dalam kondisi bersih dan siap untuk digunakan.



Gambar 4.2. Vagina buatan

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Pembuatan Bahan Pengencer Untuk Proses Pembekuan

4.3.1.1 Pengencer Skim Kuning Telur

Bahan yang digunakan dalam pembuatan pengencer skim kuning telur adalah susu skim, aquabides, antibiotik, kuning telur, dan gliserol. Pengencer ini dibagi dalam dua bagian : pengencer A dan pengencer B. Pengencer A terdiri dari pengencer A1 dan pengencer A2. Pengencer B terdiri dari *buffer* antibiotik, gliserol 13%, kuning telur, dan glukosa.

Pengencer A1 dicampurkan dengan semen perbandingan 1 : 1 segera setelah semen diperiksa secara makros misalnya volume semen ejakulat 1,5 ml ditambahkan pengencer A1 sebanyak 1,5 ml, hal ini bertujuan agar memberikan perlindungan pada semen.

Sebelum melakukan pengenceran perlu diketahui besar konsentrasi dan motilitas spermatozoa. Besarnya pengenceran dilihat dengan menggunakan spektrofotometer. Setelah diketahui besarnya pengenceran maka pengencer A2 dicampur ke pengencer A1 pada suhu yang sama sehingga disebut pengencer A. Pengencer A ini terdiri dari *buffer* antibiotik dan kuning telur.



Gambar 4.3. Bahan pengencer Skim kuning telur

4.3.1.2 Pengencer Tris Kuning Telur

Bahan yang digunakan untuk pengencer tris kuning telur terdiri dari tris amino methane, asam sitrat, laktosa, *raffinose*. *Aquadest*, kuning telur, dan antibiotik. Pengencer ini dibagi dalam dua bagian : pengencer A dan pengencer B. Pengencer A terdiri dari pengencer A1 dan pengencer A2. Pengencer B terdiri dari gliserol 12% dari larutan A. Pengencer A1 dicampurkan dengan semen perbandingan 1 : 1 segera setelah semen diperiksa secara mikroskopis misalnya

volume semen ejakulat 1,5 ml ditambahkan pengencer A1 sebanyak 1,5 ml, hal ini bertujuan agar memberikan perlindungan pada semen.

Sebelum melakukan pengenceran perlu diketahui besar konsentrasi dan motilitas spermatozoa. Besarnya pengenceran dilihat dengan menggunakan spektrofotometer. Setelah diketahui besarnya pengenceran maka pengencer A2 dicampur ke pengencer A1 pada suhu yang sama sehingga disebut pengencer A. Selanjutnya pemberian larutan B dalam beberapa tahap.



Gambar 4.4 Bahan Pengencer Tris Kuning Telur

4.3.1.3 Pengencer Andromed[®]

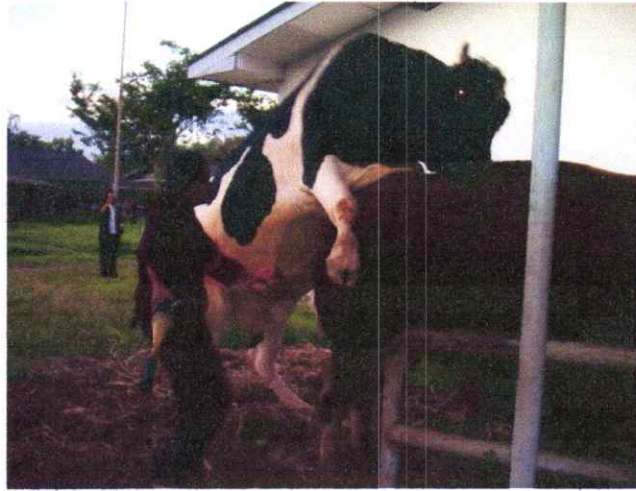
Pengencer Andromed[®] dapat langsung digunakan karena sudah tersedia di pasaran dengan penggunaan 20% misalnya 20 ml Andromed[®] ditambahkan dengan 80 ml aquabides (untuk pembuatan pengencer 100ml). Semen yang sudah diketahui konsentrasi dan jumlah pengencernya dari spektrofotometer langsung dicampur pengencer Andromed secara perlahan – lahan melalui dinding kaca. Setelah itu dimasukkan ke dalam cool top sampai suhu 3-5 ° C.



Gambar 4.5. Bahan Pengencer Andromed®

4.3.2 Penampungan Semen

Pengambilan semen dilakukan pada sore hari. Pejantan dimandikan dan diberi pakan terlebih dahulu, kemudian dibawa ke kandang jepit dan dipertemukan dengan pejantan atau betina pemancing untuk memberi rangsangan libido kepada pejantan yang akan ditampung semennya. Vagina buatan yang telah disiapkan diberi pelicin, apabila terdapat tanda-tanda pejantan akan menaiki pejantan atau betina pemancing, maka vagina buatan dipasang pada penis untuk menampung semen.



Gambar 4.6 Proses penampungan semen

4.3.3 Pemeriksaan Semen Segar

Setelah semen ditampung maka semen segera diperiksa baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Pemeriksaan tersebut bertujuan untuk mengetahui apakah semen masih layak digunakan untuk menjadi semen beku.

4.3.3.1 Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopis meliputi : volume, warna, bau, konsistensi, dan derajat keasaman atau pH. Pemeriksaan volume spermatozoa menggunakan tabung berskala. Besarnya volume semen yang diperoleh dari setiap ejakulasi pada sapi rata-rata 4 ml (3-7 ml) (Hardijanto dkk., 2010).

Pemeriksaan konsistensi (kekentalan) semen memerlukan suasana terang sehingga dapat melihat kebeningan dinding tabung penampung semen dengan jelas. dengan tabung dimiringkan dan ditegakkan kembali maka ada cairan yang menempel pada dinding tabung.

Pemeriksaan warna semen, perlu diketahui warna-warna normal dari semen pada setiap spesies hewan. Sedangkan untuk pemeriksaan bau setiap hewan juga memiliki karakteristik bau tertentu. Pemeriksaan derajat keasaman digunakan pH meter atau kertas lakmus. Ujung dari kertas lakmus yang ada indikatornya dicelupkan ke dalam semen yang ada di tabung penampungan berskala beberapa saat, kemudian diangkat dan dicocokkan dengan skala warna.

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dengan menggunakan spektrofotometer. NaCl 3 ml dimasukkan ke dalam kuvet lalu ditera dalam spektrofotometer, selanjutnya ditambahkan semen sebanyak 30 μ ml dan diaduk secara perlahan-lahan hingga homogen dan dimasukkan lagi ke dalam spektrofotometer untuk ditera dan dilihat hasilnya di dalam kertas printing.

4.3.3.2 Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis meliputi : gerakan massa, gerakan individu, motilitas, dan konsentrasi spermatozoa.

1. Gerak massa

Menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10x10. Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan massa minimal 2+.

0 : Tidak ada gerak spermatozoa maupun gerak massa sperma

1+ : Gerakan massa spermatozoa lemah

2+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tipis, jarang, dan sedang.

3+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tebal, gelap, cepat, dan berpindah-pindah.

4+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tebal, gelap, dan sangat cepat.

2. Gerak individu

Menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x10. Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan individu minimal 70% sel spermatozoa bergerak aktif ke depan (progresif).

0 : Tidak ada gerakan individu spermatozoa

1 : Gerakan individu spermatozoa lamban

2 : Gerakan individu spermatozoa sedang

3 : Gerakan individu spermatozoa cepat

4 : Gerakan individu spermatozoa sangat cepat

3. Konsentrasi semen

Pemeriksaan konsentrasi semen digunakan sampel sebanyak 30 μ l dan diperiksa menggunakan spektrofotometer. Hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometer berupa *print out* yang berisi data mengenai kondisi spermatozoa.

Menurut Dirjennak tahun 2000, semen segar yang layak digunakan sebagai semen beku adalah semen yang mempunyai kriteria gerakan massa minimal +2, gerakan individu aktif maju ke depan (progresif), dengan motilitas 70% dan kecepatan 3.



Gambar 4.7 Pemeriksaan Mikroskopis

4.3.4 Penambahan Pengencer

Pengencer B dimasukkan ke dalam *cooltop* yang suhunya 3-5 ° C, sedangkan pengencer A disiapkan dalam penangas air yang suhunya 37 ° C. Semen yang tertampung selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250cc dan dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi air berfungsi sebagai *waterjacket* dan tambahkan pengencer A1 yang jumlahnya sama dengan volume semen, juga siapkan kebutuhan pengencer A2 yang sudah dihitung volumenya pada gelas ukur yang lain berikut termometernya. Kesemuanya ini dimasukkan gelas beker 1000cc yang telah diisi air dengan suhu 37 ° C dan letakkan dalam *cooltop* yang bersuhu 3-5 ° C. Air dalam beker gelas suhunya turun menjadi 12 ° C maka pengencer A2 dimasukkan dalam gelas ukur 100 cc yang telah berisi semen dan pengencer A1. Tujuan *water jacket* untuk melindungi spermatozoa dari perbedaan suhu atau yang disebut dengan *thermo shock*, pemeriksaan lebih lanjut

semen akan dikembalikan pada suhu 5°C. Air dipilih sebagai media *water jacket* karena massa jenisnya besar sehingga tidak mudah menjadi panas atau dingin. Kenaikan suhu atau penurunan suhu pada air terjadi secara perlahan, selanjutnya dilakukan proses gliserolisasi dan equilibrasi dengan menggunakan *cool top* yang terdiri dari dua ruang dan empat pintu yang masing-masing digunakan untuk adaptasi suhu, proses gliserolisasi, tahap equilibrasi, dan proses *filling* dan *thawing*.



Gambar 4.8 Proses pembuatan pengencer susu kuning telur

4.3.4.1 Gliserolisasi dan Equilibrasi

Spermatozoa yang masing-masing telah dicampur dengan pengencer Skim kuning telur, Tris, dan AndroMed® dimasukkan ke dalam *cool top* hingga suhu spermatozoa menjadi 5°C, suhu ini dapat dicapai selama ± 1 jam. Prosedur pelaksanaan gliserolisasi dan tahap equilibrasi meliputi :

- Penambahan pengencer yang mengandung gliserol (pengencer B) secara perlahan tetes demi tetes atau dibagi menjadi empat bagian, penambahan dilakukan secara perlahan dan bertahap dengan interval 15 menit hingga

selesai dalam waktu 1 jam melalui dinding erlenmeyer, keseluruhan proses ini dilakukan dalam ruangan bersuhu 3-5°C. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari *osmotic shock* dan toksisitas terhadap spermatozoa secara langsung.

- Tahap equilibrasi yakni proses adaptasi spermatozoa dengan pengencer yang mengandung gliserol dalam waktu 2-6 jam (setiap 30 menit diaduk secara perlahan) pada suhu 3-5°C untuk menuju suhu *pre freezing* (-140°C) dan suhu *freezing* (-196°C).
- Pemeriksaan motilitas spermatozoa (pemeriksaan *before freezing*), syarat untuk dilakukan proses selanjutnya adalah jika pemeriksaan motilitas menunjukkan persentase 60-70%.

Proses pengenceran selesai bila total volume sudah terpenuhi. Banyaknya pengenceran semen dapat ditentukan dengan perhitungan Dirjennak (1999) yaitu sebagai berikut :

$$\text{Jumlah straw} = \frac{\text{volume semen} \times \text{konsentrasi semen} \times \% \text{ motilitas}}{\text{Konsentrasi semen dalam straw}}$$

Konsentrasi semen dalam straw

$$\text{Volume Akhir} = \text{Jumlah Straw} \times \text{volume dalam 1 straw} (0,25)$$

$$\text{Pengencer A1} = \frac{\text{volume semen} + \text{pengencer semen sebanyak volume Semen}}{\text{Semen}}$$

$$\text{Pengencer B} = \text{Volume akhir} : 2$$

$$\text{Pengencer A 2} = \text{Pengencer B} - (\text{volume semen} + \text{pengencer A1})$$

4.3.4.2 Filling dan Sealing

Filling adalah memasukkan spermatozoa yang sudah dicampur pengencer ke dalam straw. Straw yang digunakan adalah mini straw dengan ukuran 0,25 mililiter, menggunakan *ultrasonic filling and sealing machines* dan dilakukan di dalam cool top dengan suhu 3-5 °C. Spermatozoa pada mini straw minimal berjumlah 25 juta spermatozoa. Straw tersebut didinginkan terlebih dahulu dalam *cool top* agar suhunya menjadi sama dengan suhu spermatozoa dan pengencer kemudian disegel menggunakan *sealing machine*.

4.3.4.3 Pre freezing dan Freezing

Straw yang telah dikemas atau diatur di atas rak straw, kemudian diletakkan di atas Nitrogen cair ± 1 cm di atas permukaan Nitrogen cair, processing dalam container sampai suhunya mencapai -140°C (membutuhkan waktu 9 menit).

Freezing dilanjutkan setelah *pre freezing* yaitu straw direndam dalam Nitrogen cair yang suhunya -196°C .



Gambar 4.9 Peralatan penelitian : *filling and sealing machine*, spektrofotometer, mikroskop, *printing machine*, *water bath*

4.3.5 Evaluasi

Proses evaluasi dilakukan sebanyak tiga kali yaitu sebelum pengenceran, sebelum *freezing*, dan setelah *freezing*. Evaluasi ini dilakukan dengan mengamati gerakan individu dari spermatozoa yang telah mengalami serangkaian perlakuan dalam tahapan pengolahan semen metode straw.

Evaluasi sebelum *freezing* dilakukan setelah spermatozoa melalui tahap gliserolisasi. Caranya dengan meletakkan setetes semen yang sudah dicampur pengencer pada gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup, selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Evaluasi ini dimaksudkan untuk mengetahui gerakan individu setelah gliserolisasi dan menjadi pertimbangan dilakukan proses selanjutnya. Syarat kualitas spermatozoa untuk dapat dilakukan proses *pre-freezing* minimal 55%/3. Gerakan individu dalam spermatozoa tersebut cepat dengan persentase 55% menunjukkan individu sperma menunjukkan daya hidup dan bergerak aktif (motil). Spermatozoa yang

mengalami gliserolisasi biasanya mengalami penurunan kualitas yang ditandai dengan banyaknya spermatozoa yang mati akibat penurunan suhu yang terjadi selama penambahan gliserol.

Evaluasi yang dilakukan setelah *freezing* bertujuan untuk mengetahui kualitas spermatozoa apakah sudah sesuai dengan standar minimal yaitu 40%/3. Straw yang telah melalui fase *freezing* dikeluarkan dari *container* dan *thawing* ± 10 detik di dalam *water bath* dengan suhu 37°C, selanjutnya dipotong bagian tengah dan 1/3 distal dari straw untuk mengeluarkan spermatozoa tepat di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup, selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa. Pemeriksaan viabilitas dapat dilakukan dengan pewarnaan menggunakan eosin negrosin kemudian dikeringkan di atas api bunsen dan dilihat jumlah yang hidup dan yang mati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

4.3.6 Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

Pemeriksaan kualitas semen beku *post-thawing* terdiri dari pemeriksaan *post-thawing* motility dan persentase hidup spermatozoa. Persentase spermatozoa yang hidup merupakan indikator kualitas semen yang penting untuk meningkatkan fertilisasi. Untuk mengetahui spermatozoa dalam keadaan hidup atau mati digunakan pewarnaan eosin negrosin. Prinsip pewarnaan spermatozoa adalah perbedaan afinitas menghisap warna antara sel spermatozoa yang hidup dan yang mati. Spermatozoa yang hidup tidak menghisap warna atau pada bagian kepala spermatozoa yang hidup tidak menghisap warna atau pada bagian kepala

spermatozoa akan berwarna jernih, hal ini dikarenakan permeabilitas membran spermatozoa masih normal, sedangkan spermatozoa yang mati akan menghisap warna dengan bagian kepala berwarna merah sebab kondisi membran telah rusak sehingga tidak mampu mencegah masuknya zat warna (Partodihardjo, 1992). Standar minimal *post-thawing* untuk sapi persentase hidup 40 % dengan gerakan sperma 3 ditulis 40/3 dapat dipertimbangkan bila 40/2 (Dirjennak, 2000). Pemeriksaan persentase hidup *post-thawing* spermatozoa menggunakan metode preparat ulas dengan pewarnaan eosin-negrosin (terlampir).

Salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa adalah motilitas. Pengertian motilitas adalah kemampuan gerak maju (progresif) dari spermatozoa (Hafez, 1993). Cara pemeriksaan *post-thawing motility* dapat dilihat di lampiran.

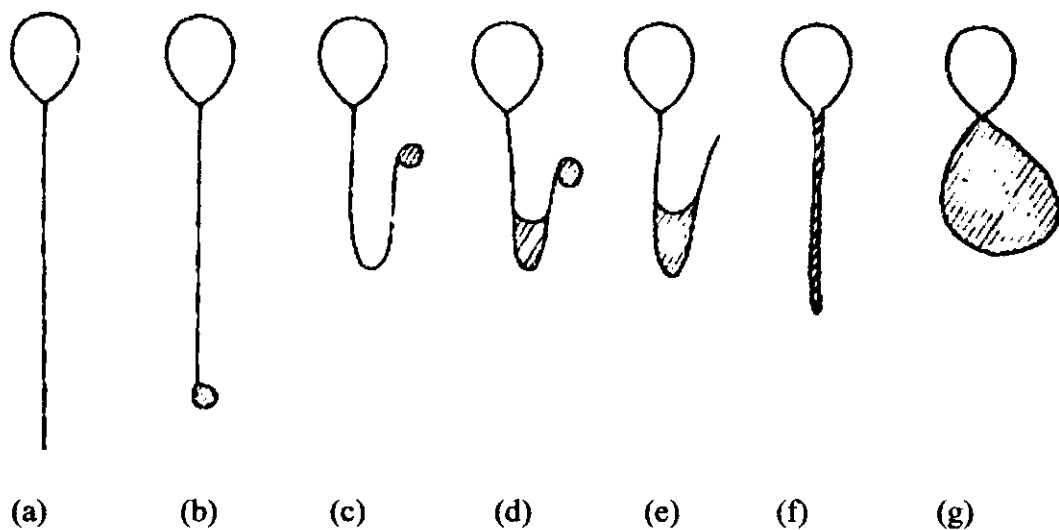
4.3.7 Hypoosmotic Swelling Test (HOST)

Pemeriksaan keutuhan membran menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Prosedur pemeriksaan menggunakan medium HOST berupa NaCl hipotonik (komposisi terdapat di lampiran 1). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 0,9 ml medium HOST, selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x. Jumlah spermatozoa yang dihitung dengan skala 0% sampai 100%. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologik bila diinkubasi pada medium hipotonik. Perubahan yang terjadi antara lain pembengkakan pada ujung

ekor, ekor yang pendek dan tebal atau pembengkakan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang dibentuk oleh ekor spermatozoa.

Hasil uji Hypoosmotic Swelling pada membran plasma spermatozoa sapi *Friesian Holstein* dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Spermatozoa normal} = \frac{\text{Spermatozoa yang menggebung}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100 \%$$



Gambar 4.10 Spermatozoa yang tidak menggebung dan spermatozoa yang menggebung (WHO,1999)

- Keterangan 1. spermatozoa yang tidak menggebung/ekor lurus (a)
2. spermatozoa yang menggebung atau ekor melingkar (b-g)

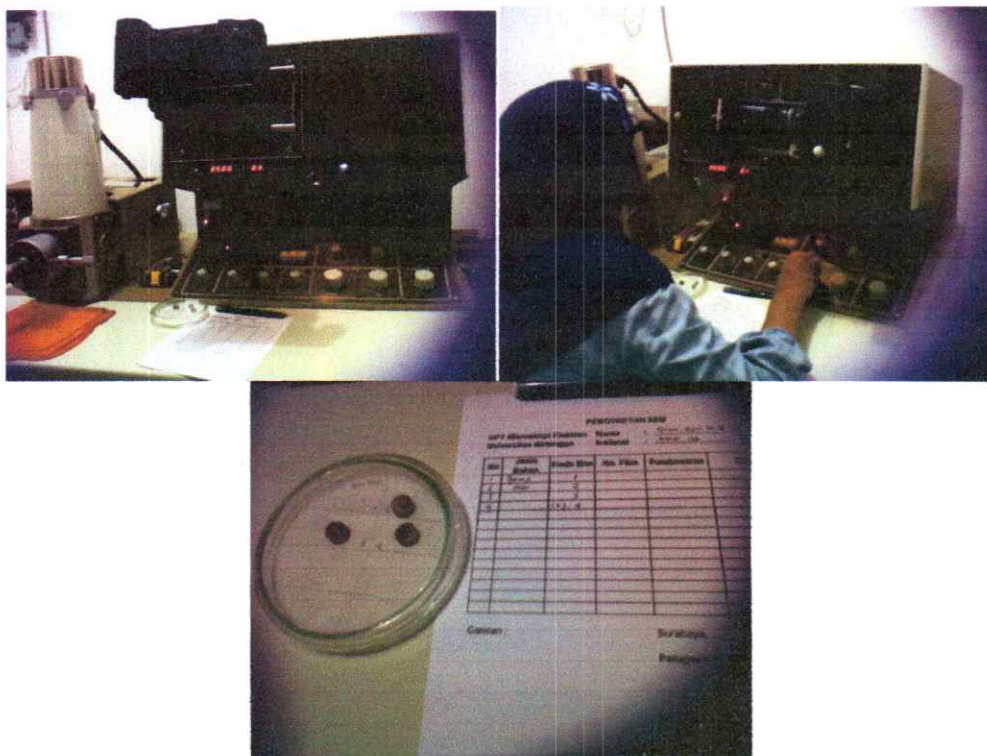
4.3.8 Proses Scanning Electron Microscope (SEM)

Sperma dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *Glutaraldehyde* 2% selama 2-3 jam pada suhu 4°C, lalu sentrifus dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Cuci dengan larutan *buffer phosphate* pH 7,4 sebanyak tiga kali pada suhu 4°C masing-masing selama lima menit, lalu sentrifus dengan kecepatan rendah 15

menit. Post-fiksasi dengan larutan osmic acid 1% selama 1-2 jam pada suhu 4°C, sentrifus dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Cuci kembali dengan larutan *buffer phosphate* pH 7,4 sebanyak tiga kali pada suhu 4°C masing-masing selama lima menit, lalu sentrifus dengan kecepatan rendah 15 menit.

Dehidrasi dengan alkohol bertingkat : 30%, 50%, 70% masing-masing selama 15-20 menit pada suhu 4°C, sentrifus dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Dilanjutkan dehidrasi 80%, 90%, absolute dua kali, masing-masing selama 15-20 menit pada suhu ruang, sentrifus dengan kecepatan rendah selama 15 menit. Ganti dengan *Amyl Acetate* absolute, tujuannya sebagai pengawet sampai menunggu waktu pengeringan. Sperma yang akan dikeringkan dipipet dengan pipet pasteur dan diteteskan pada object glass dengan luas 16 mm² yang sudah dibersihkan dengan alkohol.

Pengeringan dengan alat *Critical Point Drying* (CPD). Penempelan pada stub (holder) dengan menggunakan lem khusus. Pelapisan dengan menggunakan alat *Vacum Evaporator* dan bahan pelapisnya adalah emas murni atau carbon. Siap diamati dan dipotret pada SEM dengan pembesaran yang dipilih.



Gambar 4.11 Pemeriksaan *Scanning Electron Microscope*

4.4 Variabel Penelitian

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa *post-thawing* semen beku dari pejantan *Friesian Holstein* dalam tiga pengencer yang berbeda yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga.

Variabel bebas : Pengencer skim kuning telur, Tris, dan AndroMed®.

Variabel tergantung : Persentase motilitas progresif, viabilitas spermatozoa *post-thawing* dan membran plasma utuh spermatozoa.

Variabel terkontrol : Semen sapi *Friesian Holstein*.

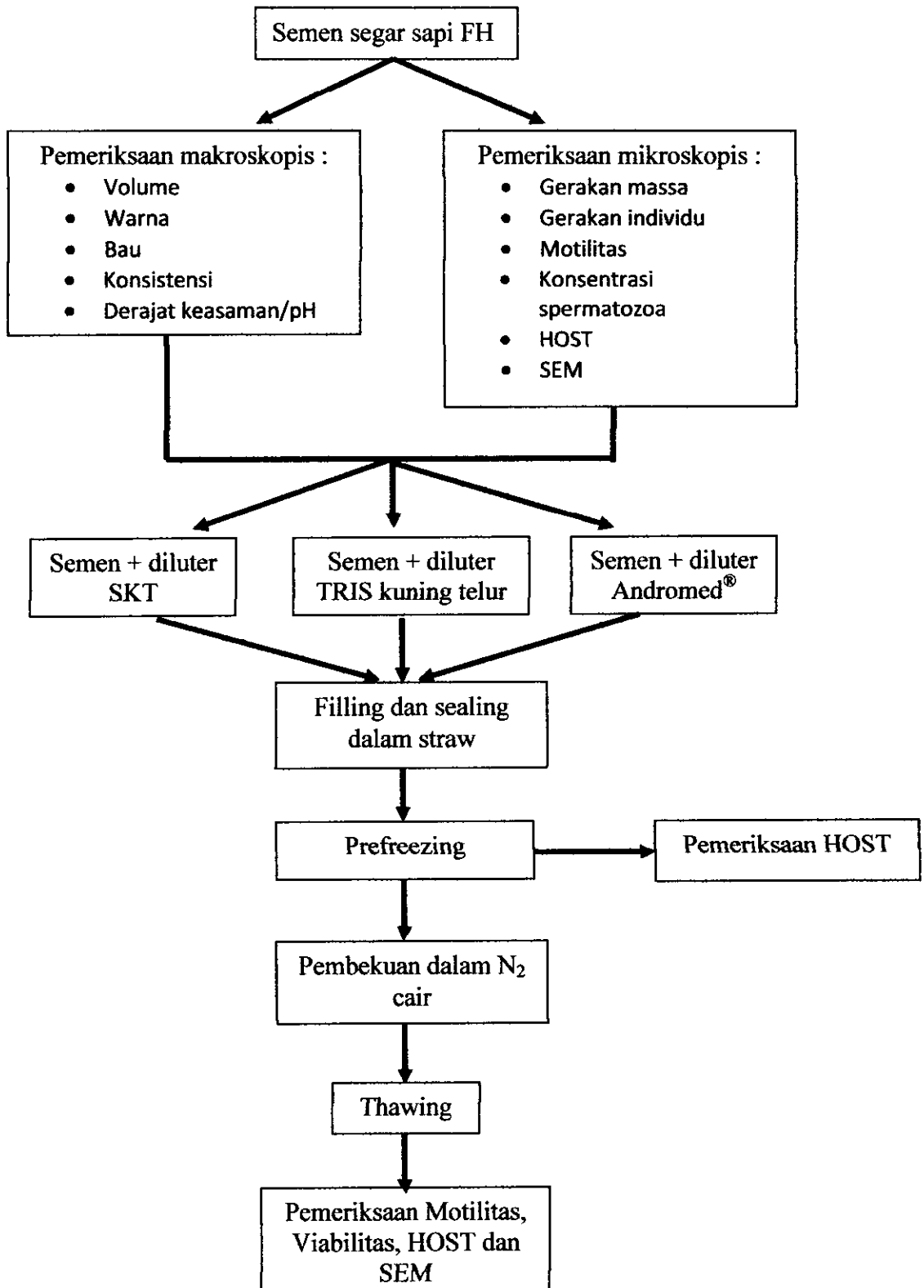
4.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ulangan yang sama. Rancangan ini hanya ada satu sumber keragaman yaitu perlakuan disamping pengaruh acak, sehingga hasil perbedaan antar perlakuan hanya disebabkan oleh pengaruh perlakuan dan pengaruh acak saja (Kusriningrum, 2008).

4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya perbedaan keutuhan membran spermatozoa dilakukan uji ANOVA, bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ). Seluruh data yang diperoleh juga dilakukan uji korelasi untuk mengetahui apakah terdapat korelasi antar parameter (Kusriningrum, 2008).

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN





BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 HASIL PENELITIAN

Proses pembuatan semen beku diawali dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna, kekentalan, pH, dan bau. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerak massa, gerak individu, viabilitas, konsentrasi, dan keutuhan membran plasma.

Tabel 5.1. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi FH

PEMERIKSAAN MAKROSKOPIS		PEMERIKSAAN MIKROSKOPIS	
Volume	9 ml	Gerakan massa	+++
Konsistensi	Sedang	Gerakan individu	3
Warna	Kuning	Motilitas	80 %
Bau	Normal	Konsentrasi	685×10^6 spz/ml
pH	6,5	Viabilitas	85 %

5.1 Hasil Motilitas

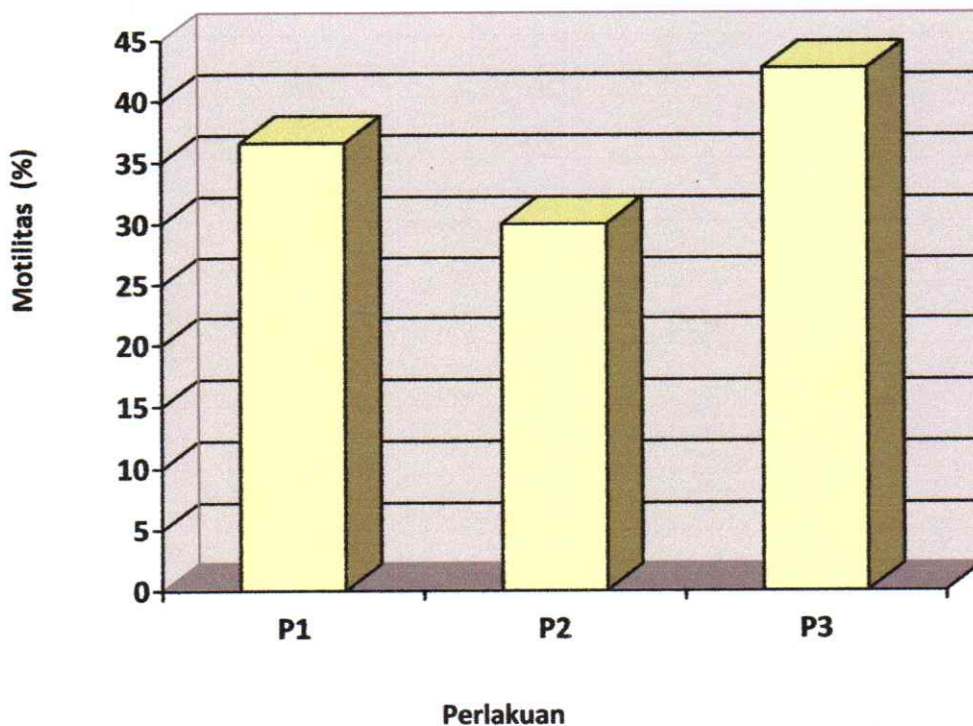
Data tentang persentase motilitas progresif spermatozoa *post-thawing* setelah diberi perlakuan berbagai macam pengencer dengan tiga perlakuan : pengencer Skim Kuning Telur (P1), pengencer Tris Kuning Telur (P2) dan pengencer AndroMed® (P3) tercantum dalam tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Spermatozoa *Post-thawing* Semen Sapi FH

Perlakuan	Ulangan (n)	Motilitas Spermatozoa (%) (rerata \pm standar deviasi)
(P1)	6	36,5667 ^b \pm 1,12251
(P2)	6	29,9933 ^c \pm 0,93765
(P3)	6	42,7067 ^a \pm 0,51430

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rerata persentase motilitas spermatozoa *post-thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Grafik 5.1 Rerata Selisih Motilitas Spermatozoa *post-thawing* Semen Sapi *Friesian Holstein*.

Tabel 5.2 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata $p < 0,05$ pada motilitas ketiga bahan pengencer. Grafik 5.1 menunjukkan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3 dan terendah pada P2.

Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata di antara tiga perlakuan. Uji BNJ dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perlakuan yang tertinggi dan terendah dalam menghasilkan motilitas spermatozoa *post-thawing* menggunakan metode HOST. Uji BNJ menunjukkan perlakuan P1 berbeda sangat nyata dengan P2 dan P3.

5.2 Hasil Viabilitas Spermatozoa

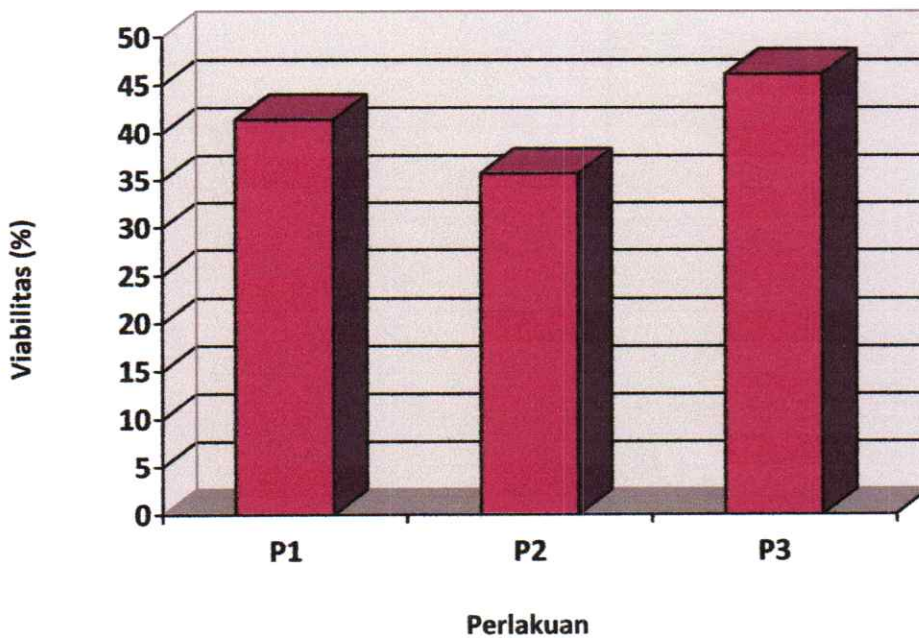
Data tentang persentase viabilitas spermatozoa *post-thawing* setelah diberi perlakuan berbagai macam pengencer dengan tiga perlakuan : pengencer Skim Kuning Telur (P1), pengencer Tris Kuning Telur (P2) dan pengencer AndroMed® (P3) tercantum dalam tabel 5.3.

Tabel 5.3. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing* Semen Sapi FH

Perlakuan	Ulangan (n)	Viabilitas Spermatozoa (%) (rerata \pm standar deviasi)
(P1)	6	41,4567 ^b \pm 1,12085
(P2)	6	35,7433 ^c \pm 2,27264
(P3)	6	46,1483 ^a \pm 1,08888

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rerata persentase viabilitas spermatozoa *post-thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Grafik 5.2 Rerata Selisih Viabilitas Spermatozoa *post-thawing* Semen Sapi *Friesian Holstein*.

Tabel 5.3 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata $p < 0,05$ pada motilitas ketiga bahan pengencer. Grafik 4.2 menunjukkan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3 dan terendah pada P2.

Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata di antara tiga perlakuan. Uji BNJ dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perlakuan yang tertinggi dan terendah dalam menghasilkan viabilitas spermatozoa *post-thawing* menggunakan metode HOST. Uji BNJ menunjukkan perlakuan P1 berbeda sangat nyata dengan P2 dan P3.

5.3 Hasil *Hypo-Osmotic Swelling Test*

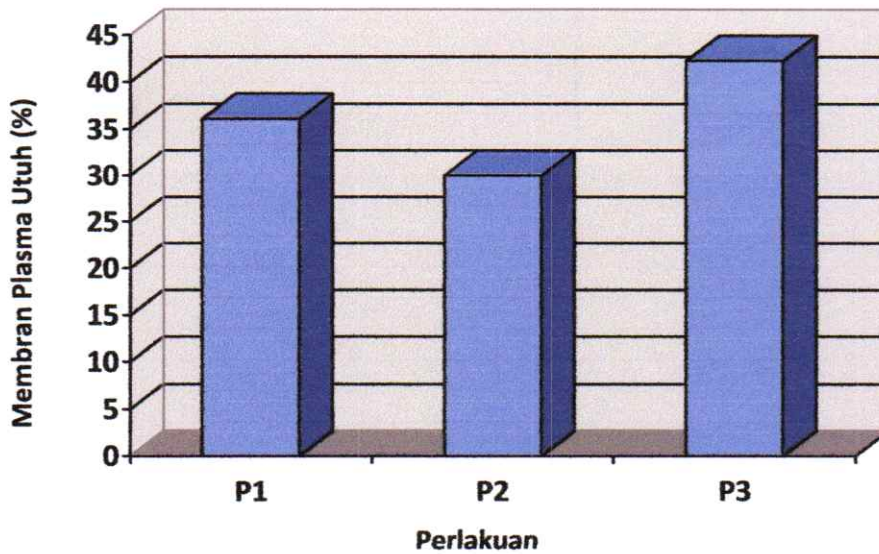
Uji *Hypo-Osmotic Swelling* merupakan uji laboratorium sederhana yang digunakan untuk mengetahui fungsi dan kerusakan pada membran, bila membran sel mengalami kerusakan maka ekor akan terlihat lurus atau tidak terjadi pengembungan tetapi apabila membran sel normal atau tetap utuh maka akan terjadi pengembungan atau melingkarnya ekor.

Tabel 5.4 Rerata dan simpangan baku keutuhan membran plasma spermatozoa *post-thawing* menggunakan metode HOST

Perlakuan	Ulangan (n)	Membran Plasma Utuh Spermatozoa (%) (rerata \pm standar deviasi)
(P1)	6	36,0633 ^b \pm 1,29956
(P2)	6	29,9933 ^c \pm 0,93765
(P3)	6	42,2267 ^a \pm 0,99319

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

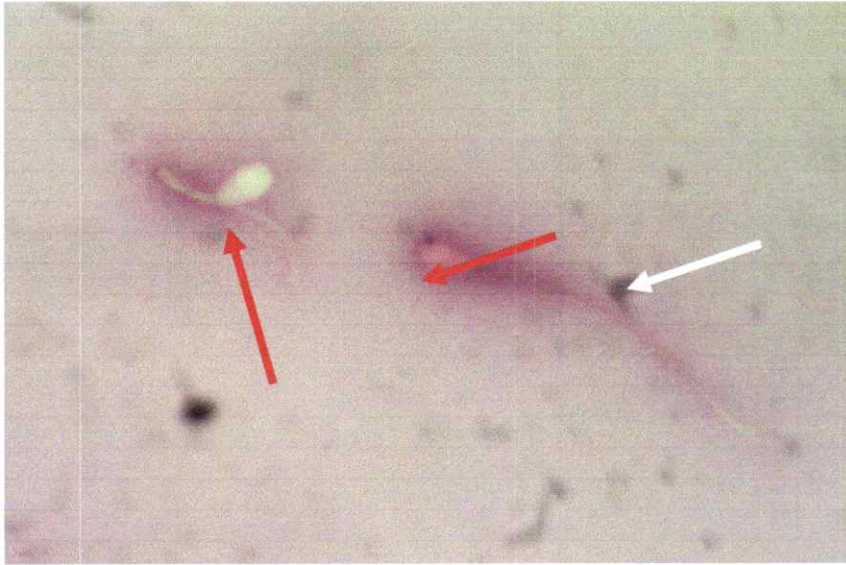
Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rerata persentase keutuhan membran plasma spermatozoa *post-thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Grafik 5.3 Rerata Selisih Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa *Post-Thawing* Semen Sapi Friesian Holstein.

Tabel 5.4 Menunjukkan adanya perbedaan yang nyata $p < 0,05$ terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa dalam ketiga bahan pengencer. Grafik 5.3 menunjukkan keutuhan membran plasma spermatozoa tertinggi didapatkan pada perlakuan P3 dan terendah pada P2.

Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata di antara tiga perlakuan. Uji BNJ dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perlakuan yang tertinggi dan terendah dalam menghasilkan keutuhan membran spermatozoa *post-thawing* menggunakan metode HOST. Uji BNJ menunjukkan perlakuan P1 berbeda sangat nyata dengan P2 dan P3.



Gambar 5.1. Perbandingan spermatozoa antara membran plasma utuh dan membran plasma yang rusak dengan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)* dengan pembesaran 400 kali.

Keterangan : Panah merah : spermatozoa dengan membran plasma utuh (ekor melengkung dan menggebu).

Panah putih : spermatozoa dengan membran plasma rusak (ekor lurus)

5.4 Hasil *Scanning Electron Microscope*

Pemeriksaan dengan *Scanning Electron Microscope* bertujuan untuk mendapatkan gambaran dengan jelas letak kerusakan membran plasma spermatozoa.

Pemeriksaan semen segar dengan SEM menunjukkan gambaran spermatozoa yang baik, sehingga dapat dijadikan perbandingan dengan semen beku yang menggunakan diluter Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur dan AndroMed[®].

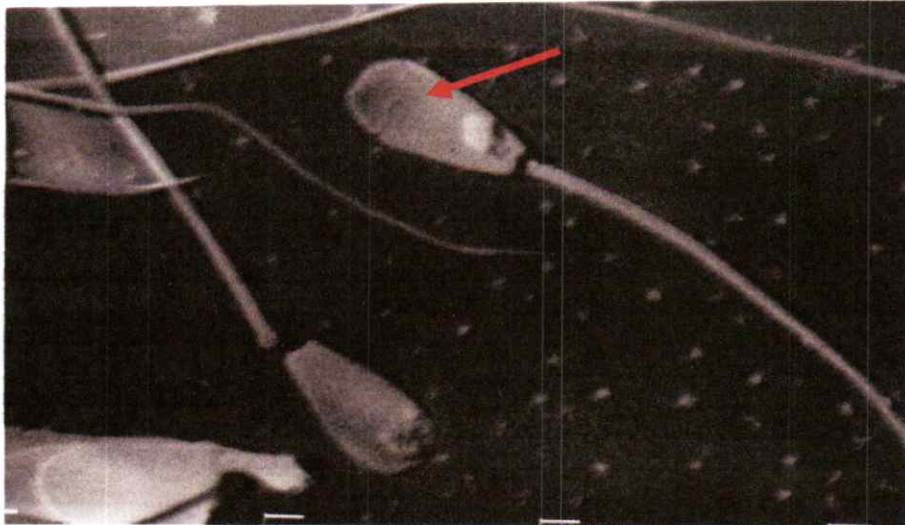


Gambar 5.2 Pemeriksaan semen segar tanpa diluter menggunakan *Scanning Electron Microscope* dengan pembesaran 3500x.

Tabel 5.5. Tabel Hasil Pemeriksaan *Scanning Electron Microscope*

	Semen segar	SKT	TRIS	Andromed®
Normal	85 %	40 %	35 %	45 %
Kerusakan kepala	5 %	10 %	15 %	40 %
Kerusakan <i>middle piece</i>	2 %	15 %	40 %	10 %
Kerusakan <i>end piece</i>	8 %	35 %	10 %	5 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %

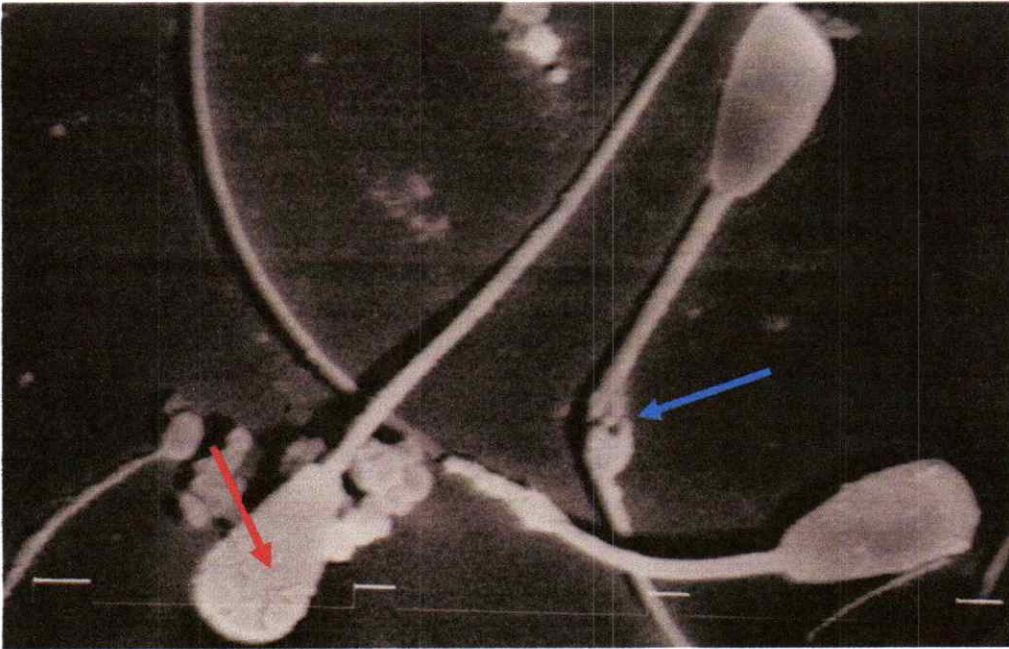
Pemeriksaan semen beku dengan diluter Skim kuning Telur menggunakan SEM menunjukkan bahwa 10% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 15% kerusakan terletak di bagian tengah spermatozoa dan 35% kerusakan terletak di bagian ekor spermatozoa.



Gambar 5.3 Pemeriksaan semen dengan diluter Skim Kuning Telur menggunakan *Scanning Electron Microscope* dengan pembesaran 3500x.

Keterangan :  : kerusakan membran di bagian kepala spermatozoa

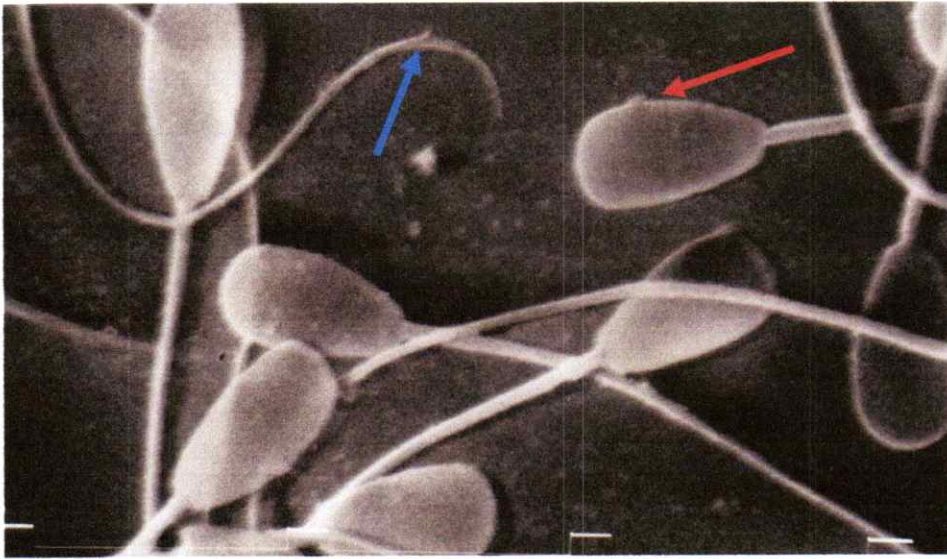
Pemeriksaan semen beku dengan diluter Tris kuning Telur menggunakan SEM menunjukkan bahwa 15% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 40% kerusakan terletak di bagian tengah spermatozoa dan 10% kerusakan terletak di bagian ekor spermatozoa.



Gambar 5.4 Pemeriksaan semen dengan diluter Tris Kuning Telur menggunakan *Scanning Electron Microscope* dengan pembesaran 3500x.

Keterangan : → : kerusakan membran di bagian kepala spermatozoa
→ : kerusakan membran di bagian *middle piece* spermatozoa

Pemeriksaan semen beku dengan diluter AndroMed[®] menggunakan SEM menunjukkan bahwa 40% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 10% kerusakan terletak di bagian tengah spermatozoa dan 5% kerusakan terletak di bagian ekor spermatozoa.



Gambar 5.5 Pemeriksaan semen dengan diluter AndroMed® menggunakan *Scanning Electron Microscope* dengan pembesaran 3500x.

Keterangan : → : kerusakan membran di bagian kepala spermatozoa
→ : kerusakan membran di bagian *end piece* spermatozoa

5.5 Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa

Korelasi antara motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa sapi FH *post-thawing* dapat diketahui dengan cara dilakukan uji korelasi.

Analisis data menggunakan uji korelasi, menunjukkan adanya korelasi positif antara motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa sapi FH *post-thawing*.

Motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa sapi FH *post-thawing* pada diluter skim kuning telur saling berkorelasi. Motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa sapi FH *post-thawing* pada diluter tris kuning telur juga saling berkorelasi. Motilitas, viabilitas dan keutuhan

membran plasma spermatozoa sapi FH *post-thawing* pada diluter andromed[®] juga saling berkorelasi. Hasil korelasi dapat dilihat pada tabel hasil uji korelasi (lampiran).



BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

Semen beku (*frozen semen*) memiliki pengertian sebagai semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku antara -79°C sampai -196°C . Seperti diketahui, jika suatu larutan di dalam air dibekukan, maka pelarutnya akan membeku dan membentuk kristal-kristal es yang tajam. Demikian pula pada semen yang diencerkan, bila dibekukan maka akan terbentuk kristal-kristal es atau terjadi penumpukan elektrolit dan zat-zat lain dalam spermatozoa yang berbahaya atau dapat mematikan. Menurut Smith, kematian spermatozoa terjadi pada suhu kritis antara $-1,5^{\circ}\text{C}$. Semen baru akan membeku pada suhu $-0,53^{\circ}\text{C}$ atau sedikit lebih rendah tetapi kristal-kristal es belum terbentuk sempurna. Kristal es akan terbentuk sempurna pada suhu $\pm -1,7^{\circ}\text{C}$. Demi menghindari terbentuknya kristal es dalam proses pembekuan semen, selain menggunakan zat anti kristalisasi maka sebaiknya penurunan suhunya sampai -79°C atau -196°C berlangsung cepat (Hardijanto dkk., 2010).

Pengencer semen banyak macamnya yang beredar di Indonesia, ada yang sering digunakan dalam Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) maupun pengencer komersial yang diperdagangkan. Antara lain pengencer skim kuning telur, Andromed[®], Natrium Sitrat, susu skim, susu segar, laktosa, Biladyl, Triladyl, Laiciphos dan Biociphos plus. Tujuan dari pengenceran adalah : 1) untuk meningkatkan volume semen, sehingga dari satu kali ejakulasi semen seekor pejantan memungkinkan untuk menginseminasi beberapa ratus ekor betina. 2) semen dapat disimpan lama, tanpa mengurangi kesuburannya. 3)

memungkinkan pengiriman semen yang tidak terbatas jaraknya (Hardijanto dkk., 2010).

6.1 Persentase motilitas spermatozoa *post-thawing*

Motilitas adalah gerak maju ke depan dari spermatozoa secara progresif. Oleh karena tujuan akhir dari pengencer adalah untuk kegiatan inseminasi buatan maka daya gerak spermatozoa secara progresif (maju kedepan) menjadi patokan yang mutlak diperhitungkan. Hal ini berarti sperma yang bergerak berputar-putar atau bergerak di tempat apalagi yang tidak bergerak tidak dijadikan tolok ukur penilaian kualitas semen beku atau semen cair. Artinya parameter motilitas disamping konsentrasi spermatozoa merupakan parameter utama dalam menilai kelayakan semen yang akan digunakan dalam kegiatan IB. Meskipun demikian penilaian terhadap motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara subyektif (visual) yakni dengan membandingkan jumlah spermatozoa yang bergerak progresif dengan yang tidak bergerak progresif secara gamblang oleh pemeriksaan melalui bantuan mikroskop dan dinyatakan dalam persen (Solihati dan Kune, 2004).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa sapi FH dalam berbagai bahan pengencer *post-thawing* terlihat persentase motilitas tertinggi pada kelompok P3 yaitu sebesar $42,7067^a \pm 0,51430$ dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Hal ini membuktikan bahwa diluter Andromed[®] mampu mempertahankan motilitas spermatozoa *post-thawing*.

Motilitas spermatozoa disebabkan karena pada fibril-fibril mikro bagian luar, pada ekor spermatozoa terdapat suatu protein yang disebut *dynein*. Protein

ini memiliki fungsi sebagai enzim ATP-ase, sehingga mampu merubah ATP hasil metabolisme menjadi AMP dan dua ion Pi anorganik. Ion Pi anorganik memiliki energi yang tinggi sehingga menimbulkan kontraksi pada fibril-fibril mikro dan menghasilkan gerakan berpilin (Lehninger, 1994 dalam Herdis, 2005).

Motilitas berkaitan dengan keutuhan membran plasma spermatozoa (Hashinuma and Sekine, 2003). Proses pembekuan dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pendapat Pommer *et al.* (2003) bahwa spermatozoa yang dibekukan akan mengalami perubahan karakteristik dari membran plasma spermatozoa antara lain terjadi reorganisasi dari membran, peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler, serta kemampuan spermatozoa untuk membuahi menurun. Dikatakan pula bahwa pada pembekuan spermatozoa, proses fosforilasi tirosin akan terhambat akibatnya hiperaktivasi dan motilitas spermatozoa akan menurun.

Seperti yang disebutkan Supriatna dan Pasaribu (1992), terjadinya *cold shock* dan terbentuknya kristal-kristal es intraseluler merupakan problem utama dalam proses pembekuan. Kristal-kristal es akan merusak organel spermatozoa seperti mitokondria dan memutuskan rantai oksidasi sehingga proses metabolisme tidak berlangsung, ATP sebagai sumber energi tidak terbentuk. Adanya gliserol dan bahan krioprotektan lain dalam diluter dapat berdifusi ke dalam spermatozoa, gliserol mampu mencegah pengumpulan molekul-molekul H₂O kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (Mazur, 1980).

Pada teknik pembekuan semen sapi, jumlah spermatozoa yang motil setelah pembekuan (*post-thawing motility*) sebesar 40%. Persentase motilitas spermatozoa setelah *thawing* sebesar 40% masih layak digunakan dalam program inseminasi buatan, hal ini sesuai dengan standar prosedur pembekuan semen di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. Dikatakan pula bahwa selama proses pembekuan semen, persentase motilitas spermatozoa menjadi 34-50% dan integritas membran menjadi 45%. Penurunan persentase motilitas dan spermatozoa yang hidup pasca *thawing* biasa terjadi dalam proses pembekuan karena pada saat spermatozoa berada pada kondisi temperatur yang menurun secara drastis dari keadaan semula dapat mengakibatkan kerusakan spermatozoa sebesar 20% dari keseluruhan.

6.2 Persentase viabilitas spermatozoa *post-thawing*

Persentasi hidup spermatozoa merupakan indikator kualitas semen yang penting untuk meningkatkan fertilisasi. Untuk mengetahui spermatozoa dalam keadaan hidup atau mati, digunakan pewarnaan eosin negrosin. Prinsip pewarnaan spermatozoa adalah perbedaan afinitas menghisap warna antara spermatozoa yang hidup dan yang mati. Spermatozoa yang hidup tidak menghisap warna atau pada bagian kepala spermatozoa akan berwarna jernih, hal ini dikarenakan permeabilitas membran spermatozoa masih normal, sedangkan spermatozoa yang mati akan menghisap warna dengan bagian kepala berwarna merah sebab kondisi membran telah rusak sehingga tidak mampu mencegah masuknya zat warna (Partodihardjo, 1992).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase viabilitas spermatozoa sapi FH dalam berbagai bahan pengencer *post-thawing* terlihat persentase viabilitas tertinggi pada kelompok P3 yaitu sebesar $46,1483^a \pm 1,08888$ dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Hal ini membuktikan bahwa diluter Andromed[®] mampu mempertahankan persentase hidup spermatozoa *post-thawing*.

Penurunan persentase hidup spermatozoa *post-thawing* disebabkan oleh perbedaan kondisi membran pada saat pembekuan dan proses pencairan kembali. Perubahan ini mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran sehingga terjadi lisis dan kematian (Suprayogi, 1996). Pendapat tersebut sesuai dengan Toelihere (1993), yang menyatakan pada proses pembekuan terbentuk kristal-kristal es dan terjadi penumpukan elektrolit dan bahan-bahan terlarut lainnya. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding spermatozoa dan waktu pencairan kembali permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein, apabila spermatozoa mati permeabilitas membran meningkat terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan spermatozoa hidup dan mati.

Sama halnya dengan membran plasma sel lainnya, membran plasma spermatozoa tersusun oleh protein dan fosfolipid, pada umumnya sel akan menggunakan mekanisme tertentu untuk mencegah kerusakan membran yang tidak terkontrol (Mackie *et al.*, 2001). Membran plasma sel memegang peranan penting karena berfungsi menjaga organel-organel sel secara fisik dan mengatur

lalu lintas keluar masuk sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses biokimia sel. Adanya penambahan zat krioprotektan ke dalam medium pengencer semen dapat melindungi kerusakan spermatozoa, baik yang dikarenakan efek larutan maupun pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler (Herdis, 2005).

Afinitas zat warna antara sel-sel spermatozoa yang mati dan yang hidup digunakan untuk menghitung jumlah spermatozoa hidup secara obyektif pada waktu semen segar dicampur dengan zat warna eosin negrosin. Pada waktu pencampuran sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap warna sedangkan sel-sel spermatozoa yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding sel meninggi waktu mati (Hafez, 1993). Hal ini sejalan dengan pendapat Bearden dan Fuquay (1997), bahwa zat warna eosin tidak dapat melewati membran sel hidup namun dapat melewati membran sel mati, sehingga sel yang hidup akan terlihat tidak berwarna sedangkan yang mati akan tampak berwarna kemerahan. Hal ini karena spermatozoa yang telah mati tidak terdapat perbedaan potensial ion natrium dan kalium antara di dalam dan di luar sel sehingga eosin negrosin yang berikatan dengan natrium akan mudah berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan menunjukkan penyerapan warna pada kepala saat diberi pewarnaan (Achmadi, 2001).

Menurut Anzar (2002) terdapat beberapa faktor yang menyebabkan kematian sel spermatozoa karena permeabilitas membran yang meningkat, yaitu :

1. Kerja ion Ca^{2+} yang menginisiasi melalui aktivasi enzim endonuclease (yang akan menghancurkan DNA dalam inti spermatozoa) dan transglutaminase yang berikatan kovalen dengan protein membran melalui pembentukan ikatan isopeptida yang menyebabkan kematian sel.
2. Adanya perubahan susunan membran terutama susunan fosfolipid penyusun membran karena terjadi translokasi fosfatidil serin dari lapisan dalam membran menuju ke lapisan luar membran, hal ini terjadi karena paparan suhu beku, juga akan menyebabkan kematian spermatozoa.

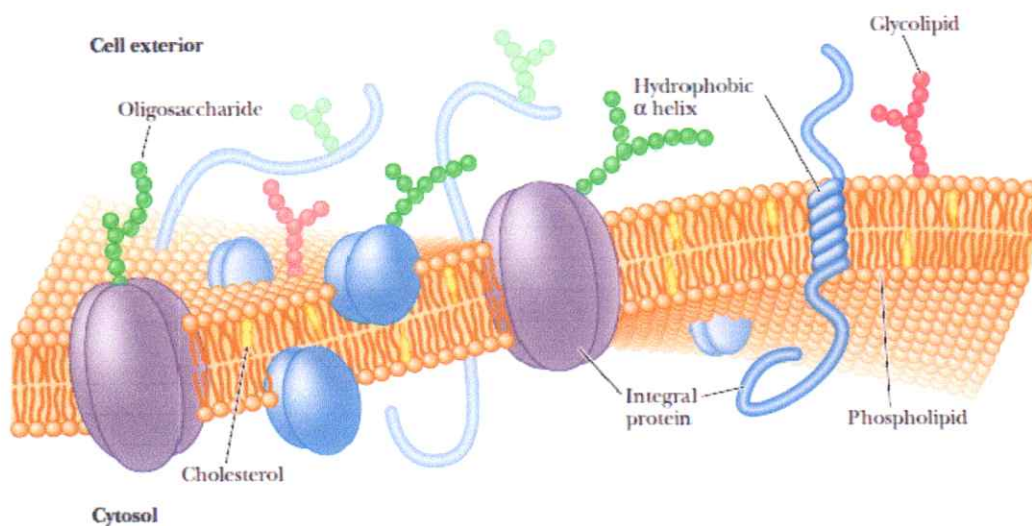
Selama pembekuan terjadi depolarisasi atom atau molekul penyusun membran yang mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran (Fuller and Shields, 1998). Dikatakan pula oleh Rubinsky (2000) bahwa pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen asam amino penyusun protein membran sehingga akan menyebabkan destabilisasi membran yang berpengaruh terhadap proses metabolisme spermatozoa.

6.3 Persentase membran plasma utuh spermatozoa *post-thawing*

6.3.1 *Hypo-Osmotic Swelling Test*

Membran plasma adalah selaput dinding sel yang berfungsi mengatur keluar masuknya beberapa zat yang diperlukan dalam proses metabolisme dan aktivitas hidup sel. Selain itu membran plasma yang dibentuk oleh protein, karbohidrat maupun lemak dapat bertindak sebagai reseptor untuk beberapa zat tertentu. Sinyal kimia ekstraseluler dapat diterima oleh reseptor pada membran

plasma dan dapat diteruskan ke dalam sel melalui beberapa cara, baik melalui difusi pasif atau aktif dari ion-ion ligand kimiawi ataupun melalui perubahan konformasi oleh sistem enzim dalam membran plasma (Yatim, 1992). Apabila terjadi kerusakan pada membran plasma spermatozoa maka proses metabolisme akan terganggu yang akan mengakibatkan penurunan motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur.



Gambar 6.1 Struktur membran plasma. Terlihat struktur *lipid bilayer* serta protein yang tertanam di dalamnya. (Sumber. Campbell and Farrell, 2006)

Hypo-Osmotic Swelling Test merupakan tes sederhana yang digunakan untuk mengukur fungsi apakah membran plasma masih aktif atau tidak dan integritas keutuhan membran plasma spermatozoa sebagai indikator fertilisasi (Sarmardzija et al.,2008). Metode HOST merupakan suatu metode yang baik untuk mengevaluasi integritas membran spermatozoa hewan domestic, hal tersebut dapat dilihat dengan mengamati terjadinya perubahan pada ekor spermatozoa. Spermatozoa yang hidup atau mempunyai membran plasma yang

baik, maka media HOST yang dipaparkan akan mengaktifkan biokimia aktif yang terdapat pada membran untuk menyeimbangkan cairan di dalam dan di luar sel spermatozoa sehingga larutan *hypo-osmotic* dapat masuk ke dalam spermatozoa. Media HOST menyebabkan perluasan membran ekor spermatozoa sehingga mengembung dan puncaknya membuat ekor melingkar (Fonseca, 2005). Membran plasma yang utuh ditandai dengan pematangan ekor, karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik, sebaliknya spermatozoa dengan membran plasma yang rusak atau permeabilitasnya menurun, larutan *hypo-osmotic* dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus (Mafruchati dkk, 1997).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil ketuhanan membran tertinggi didapatkan pada perlakuan P3 dengan pengencer AndroMed[®], urutan kedua pada perlakuan P1 dengan pengencer Skim Kuning Telur, dan yang terendah pada perlakuan P2 dengan pengencer Tris Kuning Telur. Hasil penelitian juga membuktikan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada ketuhanan membran spermatozoa dengan menggunakan tiga pengencer yang berbeda. AndroMed[®] dapat mempertahankan ketuhanan membran spermatozoa dengan baik, hal ini karena kandungan krioprotektan nabati dan *buffer* pada pengencer AndroMed[®] mempunyai jenis dan persentase lebih besar daripada yang terkandung di dalam pengencer Skim Kuning Telur dan Tris Kuning Telur.

Masing-masing komposisi penyusun bahan pengencer mempunyai fungsi yang berguna untuk kelangsungan hidup spermatozoa. Glukosa, laktosa, fruktosa

dan raffinosa yang merupakan karbohidrat berfungsi menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. *Buffer* yaitu sebagai penyanggah untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa, pada pengencer skim kuning telur *buffer* didapat dari susu skim dan *aquabides* sedangkan pengencer tris kuning telur dari *tris amino methan* yang umum digunakan sebagai *buffer*. *Tris amino methan* juga mempunyai kemampuan dapat mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Asam sitrat selain juga berfungsi sebagai *buffer* mempunyai fungsi untuk mendispersikan butir-butir lemak kuning telur. Kuning telur mempunyai fungsi selain sebagai *buffer* dan sumber energi juga sebagai krioprotektan. Antibiotik berfungsi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan gliserol berfungsi sebagai zat krioprotektan untuk melindungi sperma terhadap efek *lethal* pada saat pembekuan (Ditjennak, 2000).

Penurunan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa terjadi akibat kerusakan membran plasma spermatozoa oleh pengerasan lapisan phospholipid karena suhu yang rendah (Sankai et al.,2001). Kuning telur yang terkandung dalam medium Tris Kuning Telur dan Skim Kuning Telur memiliki kemampuan perlindungan terhadap membran plasma dan akrosom sehingga dapat menurunkan tingkat kejadian reaksi akrosom dini (Iguer-ouada dan Verstege,2001). Keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan viabilitas spermatozoa, apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian. Pengencer

AndroMed[®] menunjukkan kualitas membran plasma dapat dipertahankan karena komposisi bahan pengencer yang digunakan sangat berpengaruh dalam mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C. Krioprotektan nabati pada media AndroMed[®] ikut berperan dalam mempertahankan membran plasma spermatozoa melalui HOST yang ditandai dengan ekor spermatozoa yang melengkung atau pengembangan kepala spermatozoa, meskipun adanya krioprotektan tersebut meningkatkan osmolaritas larutan yang mengakibatkan penurunan motilitas.

Pengencer skim kuning telur dan tris kuning telur sama-sama memiliki kandungan kuning telur. Target utama yang diharapkan dari kuning telur tersebut adalah lesitin (fosfatidil kolin) yang terkandung di dalamnya. Lesitin kuning telur diharapkan akan melindungi lesitin membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama proses pengolahan semen, terutama saat pendinginan, pembekuan dan *thawing* semen beku. Lesitin merupakan asam lemak yang dominan untuk menyusun membran plasma sel spermatozoa. Kuning telur memberikan perlindungan terhadap spermatozoa pada suhu rendah tetapi menimbulkan efek toksik pada suhu tinggi. Menurut Glover dan Watson (1987) yang dikutip oleh Rizal dan Herdis (2010) dalam bukunya, efek toksisitas kuning telur ditandai dengan adanya akumulasi hidrogen peroksida yang merupakan sebuah produk spermasid, senyawa yang mampu membunuh spermatozoa, dari asam amino tertentu dan akan menyebabkan kematian spermatozoa.

Pengencer AndroMed[®] tidak menggunakan kuning telur ayam karena dikhawatirkan kuning telur ayam tersebut menjadi media penyebaran berbagai

macam kuman penyakit menular. Sebagai pengganti kuning telur pada pengencer AndroMed[®] digunakan ekstrak kedelai dengan target utama lesitin yang terkandung di dalamnya. Aku (2005) melaporkan bahwa AndroMed[®] mengandung lesitin nabati yang cukup tinggi yakni sebanyak 6,67%. Lesitin nabati sangat berpengaruh pada integritas membran plasma karena tidak ada kontaminasi kuman dari bahan hewani. Pengencer AndroMed[®] juga telah mengandung gliserol sehingga tidak perlu lagi ditambahkan senyawa krioprotektan dalam pemakaian untuk semen beku, hal ini pula yang membuat waktu equilibrasi pada pengencer AndroMed[®] hanya satu jam daripada pengencer skim kuning telur dan tris kuning telur yang membutuhkan waktu empat jam untuk waktu equilibrasi karena pada kedua pengencer tersebut masih perlu ditambahkan senyawa krioprotektan yang pada penelitian ini menggunakan gliserol.

Menurut Pommer *et al.* (2003) bahwa spermatozoa yang dibekukan akan menyebabkan perubahan beberapa karakteristik pada membran plasma, antara lain terjadi reorganisasi membrane, kadar kalsium meningkat, *Reactive oxygen spesies* (ROS) meningkat dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi menurun. Kerusakan integritas membran sel akan mempengaruhi fungsi komponen membran sel spermatozoa seperti lipid, protein dan karbohidrat.(Park and Graham,1992).

6.3.2 Scanning Electron Microscope

Pemeriksaan menggunakan *Scanning Electron Microscope* menunjukkan bahwa tempat kerusakan membran spermatozoa pada masing-masing diluter berbeda. Semen segar yang diperiksa menggunakan *Scanning Electron Microscope* menunjukkan gambaran struktur spermatozoa yang normal. Semen beku yang menggunakan diluter skim kuning telur menunjukkan 10% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 15% kerusakan terletak di bagian *middle piece* spermatozoa dan 35% kerusakan terletak di bagian *end piece* spermatozoa. Semen beku yang menggunakan diluter Tris kuning telur menunjukkan bahwa 15% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 40% kerusakan terletak di bagian *middle piece* spermatozoa dan 10% kerusakan terletak di bagian *end piece* spermatozoa. Semen beku dengan diluter AndroMed[®] menunjukkan bahwa 40% kerusakan terletak di bagian kepala spermatozoa, 10% kerusakan terletak di bagian *middle piece* spermatozoa dan 5% kerusakan terletak di bagian *end piece kor* spermatozoa.

Spermatozoa mamalia dilindungi oleh membran sel dari pengaruh lingkungan eksternal. Membran spermatozoa pada umumnya tersusun dari lipid, glikolipid (ikatan glikogen dan lipid) dan glikoprotein (ikatan glikogen dan protein). Lipid membran bersifat hidrofilik dan hidrofobik yang membentuk dua lapis lipid (*lipid bilayer*). Protein membran berfungsi sebagai pompa, penghubung (*channel*), reseptor dan transduser energi. Molekul ini terletak di permukaan membran bagian tepi (*peripheral membrane protein*) dan antara membran (*transmembrane protein*). Selain di membran spermatozoa, protein juga

terdapat pada komponen sitoplasma dan organel sel lainnya (inti, akrosom, mitokondria dan lain-lain) (Hayati, 2011).

Kerusakan membran spermatozoa bagian kepala mempengaruhi akrosom sehingga dapat mengganggu reaksi akrosom. Akrosom adalah bagian selubung yang berada di anterior separuh dari kepala spermatozoa. Reaksi akrosom adalah interaksi antara spermatozoa-ooosit. Spermatozoa yang tidak mempunyai akrosom tidak dapat melebur dalam zona pelusida sebelum bertemu ooosit sehingga tidak dapat melakukan fertilisasi. Integritas akrosom spermatozoa hasil ejakulasi merupakan salah satu parameter untuk analisis semen (Hayati, 2011).

Kerusakan membran plasma bagian *middle piece* spermatozoa dapat mempengaruhi mitokondria yang terdapat pada bagian ini. Mitokondria berfungsi sebagai tempat pembentukan ATP karena di sini terjadi proses respirasi sel. Apabila mitokondria rusak maka spermatozoa pasti akan mati. Kerusakan membran plasma bagian ekor spermatozoa mempengaruhi aksonema yang terdapat di sepanjang ekor sehingga akan mengganggu pergerakan spermatozoa. Pergerakan ekor spermatozoa terjadi karena adanya gerakan sinergis antara penyusun aksonema spermatozoa. Sinkronisasi antara gerakan bagian penyusun aksonema, yaitu jari-jari radial (*radial spoke*), rantai Nexin dan lengan Dynein membuat gelombang gerakan ekor spermatozoa sehingga spermatozoa dapat bergerak ke depan atau ke arah lainnya (Hayati, 2011). Fungsi membran spermatozoa untuk menyelubungi bagian luar sel mulai dari kepala sampai ekor. Membran sel bagian kepala bagian depan (anterior) adalah bagian yang stabil

untuk reaksi akrosom. Bagian ini mengandung *choline phospholipid* yang terdiri atas gliserol (gliserolipid) dan banyak rantai asam lemak tidak jenuh. Senyawa gliserolipid disebut juga plasmalogen yang berpotensi dalam peleburan (fusogenik) membran spermatozoa dan secara langsung menjaga membran sel dari stres oksidasi (Hayati, 2011).

Stres oksidasi dapat meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang juga dideskripsikan sebagai oksidan yaitu molekul yang bersifat labil dan sangat reaktif. Sumber ROS atau radikal bebas berasal dari faktor enzimatik (internal) dan faktor non enzimatik (eksternal). Radikal bebas ini dapat bereaksi dengan komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan diantaranya adalah molekul penyusun membran sel, enzim dan DNA. Kadar ROS yang rendah berperan untuk perangsangan kapasitas spermatozoa termasuk hiperaktivasi, reaksi akrosom dan penggabungan dengan oosit (Aitken, 1998; Agarwal dan Saleh, 2002). Pada kadar tinggi, ROS berpotensi menimbulkan toksik, sehingga dapat berpengaruh pada kualitas dan fungsi spermatozoa (Hayati, 2011).

Spermatozoa sangat peka terhadap kerusakan yang ditimbulkan ROS karena membran sel secara kuantitatif mengandung banyak asam lemak tidak jenuh, sitoplasmanya mengandung sedikit enzim peredam (*scavenging enzyme*), dan antioksidan intraseluler tidak cukup untuk melindungi membran sel. Kadar ROS yang tinggi tidak hanya mempengaruhi integritas DNA dalam inti

spermatozoa, tetapi juga kelenturan membran sel sehingga menurunkan kualitas spermatozoa (Hayati, 2011).

Komposisi bahan pengencer yang digunakan sangat berpengaruh dalam mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa. Dugaan kuat adanya cryoprotectan pada media AndroMed[®] ikut berperan dalam mempertahankan membran plasma spermatozoa (Setiadi, 2006). Lesitin dibutuhkan sel dalam tubuh dan merupakan komponen penting dalam membran sel, tanpa lesitin membran sel akan kaku. Lesitin melindungi sel dari oksidasi dan berkontribusi untuk integritas struktural sel dan menjaga mikroba berbahaya tidak masuk ke dalam sel (Rodbell and Hanahan, 1995).

6.4 Uji Korelasi Motilitas, Viabilitas Dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa *Post-thawing*

Hasil uji korelasi data menunjukkan terdapat korelasi positif antara motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh metode HOST dan SEM. Terdapat korelasi antara tingkat keutuhan membran dengan tingkat motilitas spermatozoa serta terdapat korelasi antara tingkat keutuhan membran dengan viabilitas spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995; Riadi, 2004).

Proses pembekuan dengan penurunan suhu yang cepat pada umumnya sangat berpengaruh terhadap metabolisme dan daya hidup dari spermatozoa. Pada proses *thawing* semen terjadi penurunan motilitas, viabilitas, dan fertilitas (Salomon and Maxwell, 2000). Perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan meningkatkan permeabilitas membran

spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Suprayogi, 1996). Menurut Hafez (2000) motilitas sangat penting untuk pembuahan karenanya harus menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat serta dapat membantu transportasi spermatozoa dari luar untuk mencapai tempat pembuahan. Motilitas dan daya hidup spermatozoa yang tinggi dapat meningkatkan *conception rate* dari inseminasi.

Perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Kerusakan membran plasma spermatozoa terjadi selama proses pembekuan dan *thawing* (Madyawati, 2007).

Keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan viabilitas spermatozoa, apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian. Pengencer AndroMed® menunjukkan kualitas membran plasma dapat dipertahankan karena komposisi bahan pengencer yang digunakan sangat berpengaruh dalam mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C. Krioprotektan pada media AndroMed® ikut berperan dalam mempertahankan membran plasma spermatozoa melalui HOST yang ditandai dengan ekor spermatozoa yang melengkung atau penggembungan kepala spermatozoa, meskipun adanya krioprotektan tersebut meningkatkan osmolaritas larutan yang mengakibatkan penurunan motilitas.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Berdasarkan ketiga bahan pengencer yang digunakan, bahan pengencer yang mengandung lesitin nabati mampu mempertahankan motilitas, viabilitas dan mengurangi kerusakan membran plasma spermatozoa *post-thawing*.
2. Terdapat korelasi positif antara motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa *post-thawing* dalam berbagai bahan pengencer.

7.2 Saran

1. Pengencer AndroMed[®] dapat digunakan sebagai pilihan untuk bahan pembuatan semen beku.
2. Perlu dilakukan penelitian pembuktian bahwa lesitin nabati merupakan faktor unggul dari bahan pengencer Andromed[®].



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, AS., 2001. Kaji banding kualitas dan keutuhan membran plasma semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Agarwal, A., R. A. Saleh and M. A. Bedaiwy. 2003. *Role Of Rective Oxygen Species In The Pathophysiology Of Human Reproduction. Fertil Steril.* 79: 829-843.
- Aires V.A., K.D. Hinsch, F.M. Schloesser, K. Bogner, S.M. Schloesser, and E. Hinsch. 2003. In vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-based and Soybean Lecithin based Extenders for cryopreservation of Bovine semen. *Therigenology* 60(2) : 269-279.
- Aitken, R. J., D. Harkiss, W. Knox, M. Peterson, and D. S. Irvine. 1998. *A Novel Tranduction Casacade In Capasiating Human Spermatozo Characterised By A Redox-Regulated, Camp-Mediated Induction Of Tyrosine Phosporylation.* MRC Reproductive Biology Unit. 27 chalmers steet. Edinburgh EH3 9EQ. Scotland. 645-654.
- Aku, A. S. 2005. Preservasi dan Kriopreservasi Semen Domba Garut (*Ovis aries*) dalam Berbagai Jenis Pengencer Berbasis Lesitin. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. [Tesis]
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. /D. Watson. 1994. *Molecular Biology of The cell.* Third edition. Garland Publishing Inc. New York. 507-521.
- Alvarez ,JG, Storey BT. 1995. *Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid from Phospholipid of Human Spermatozoa.* Mol Reprod Dee 42:334-345.
- Ansi-Okstate. 2008. Breeds of Livestock Holstein Cattle. <http://www.ansi.okstate.Edu/breeds/cattle/Holstein>. (1 Februari 2011)
- Campbell, M. K. and S.O. Farrell. 2006. *Biochemistry.* 5th Ed. Thomson Learning Inc. USA.
- Dirjennak, 1999. Laporan Statistika Peternakan Direktorat Jendral Peternakan. Departemen Peternakan Jkarta. 18-24.
- Direktorat Jendral Produksi Pertanian. 2000. *Prosedur Tetap (Protap) Produksi dan Distribusi Semen Beku.* Jakarta : Direktorat Perbibitan.

- Evans, W. H. and J. M. Graham. 1989. *Membrane Structure and Function*. IRL Press. Oxford Univ Press. Oxford. 11-28.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung : Alfabeta.
- Fonseca. J. F, C.A.A. Torres., V.V. Maffili., A.M. Borges., A.D.F. Santos., M.T. Rodrigues., and R.F.M. Oliviera. 2005. Hypoosmotic Swelling Test in Fresh Goat Spermatozoa. *Anim.Reprod.V.2,n.2,p.139-144*.
- Fuller, G. M. And D. Shield. 1998. *Molecular Basic of Medical Cell Biology*. Prentice Hall International Inc. USA.
- Frandsen R. D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak Edisi Keempat*. Alih Bahasa : Ir. B. Srigandono, MSc., Drs. K. Praseno, S.U. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Gadjah Mada University Press.
- Guyton, A. C., J.E. Hall. 1997. *Textbook of Medical Physiology 9th Ed*. Dalam : *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Setiawan, I., (Ed). Alih Bahasa : Setiawan I., Tengadi, dan A. Santoso. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC (kelenjar pineal) hal 1267.
- Hafez, E.S.E., 1993. *Reproduction in Fann Animals*. 6^F ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th ed. Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA.
- Hafner, B. 2007. *Scanning Electron Microscopy Primer*. Characterization Facility. University of Minnesota-Twin Cities.
- Hardijanto dan S. Hadjopranjoto, 1994. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati., T.W. Suprayogi. 2008. *Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito., T.W. Suprayogi. 2009. *Buku Ajar Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito., T.W. Suprayogi. 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Hardjoprاندjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hashinuma, M., and J. Sekine. 2003. *Evaluation of Membrane Integrity of Canine Epididymal Spermatozoa by Short Hypoosmotic Swelling Test With Ultrapure Water*. J Vet Med Sci. 65(7): 817-820.
- Hayati, A. 2011. Spermatologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis Aries*). [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor.
- Herliantin, 1992. Petunjuk Penampungan – Prossessing – Distribusi dan Evaluasi Mani Beku di Balai Inseminasi Buatan Singosari. Balai Inseminasi Buatan Singosari Malang. Hal : 5-7.
- Iguer-ouada, M. and J.P. Verstegen. 2001. Long-Term Preservation Of Chilled Canine Semen : Effect Of Commercial And Laboratory Prepared Extenders. Theriogenology 55(2) : 671 -684.
- Ismudiono, H. Anwar, P. Srianto, S. P. Madyawati, A. Samik dan E. Safitri. 2007. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Bagian Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Iqbal Ali. 2008. Spermatogenesis vs Oogenesis.//<http://www.google.com>. [05 Desember 2010].
- Jayendran, R.S, H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo and L. J. Zaneveld. 1984. Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics. *J Reprod Fertil* 70, 219-28.
- Keiko. 2009. Anatomi Organ Reproduksi Jantan.//<http://www.google.com>. [05 Desember 2010].
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lemboepasang Dairy Farm. 2010. About Our Cattle. //<http://www.google.com>. [30 Mei 2010].
- Mackie, A.R.P., P. S. James, S. Ladha and R. Jones. 2001. Diffusion Barriers in Ram and Boar Sperm Plasma Membranes : Directionality of Lipid Diffusion Across The Posterior Ring. *Biology Reproduction*. Society for The Study of Reproduction, Inc.

- Madyawati, S. P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi Friesien Holstein (FH) Terhadap Kualitas Semen Beku [Desertasi]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mafruchati., M., M.E. Luqman., N. Harjani., Widjiati., dan B. Poernomo. 1997. Pemeriksaan Membran Spermatozoa pada Semen Beku Domba Setelah Diencerkan. Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Hal 1-6.
- Mazur, P. 1980. Fundamental Aspect of The Freezing of Cells with Emphasis on Mammalian Ova and Embryos. 9th International Congress on Animal Reproduction.
- Nawang, S. S. 2005. Integritas Membran Spermatozoa Mencit Pada Pemberian Per Oral Fasa Air Daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan Metode Hypo-Osmotic Swelling Test [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Park, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jurusan Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Pommer, A.C., J.Rutllant and S.A, Meyers., 2003. *Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa Under capacitating Condition*. *Biol. Of Reprod.*, 68,1208-1214.
- Purdue University. 2010. *Scanning Electron Microscope*. Radiological and Enviromental Management. West Lafayette.
- Riadi,S. 2004. Perubahan Karakter Ejakulat dan Aktivitas Antioksidan pada Masa Reproduksi Kambing Kacang dan Peranakan Etawah. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Hal 8-39.
- Rizal, M. 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi β Karoten Terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. *Animal Production*. 7(1):6-13.
- Rizal, M. dan Herdis. 2008. Inseminasi Buatan Pada Domba. Rineka Cipta. Jakarta.
- Rodbell, M. and Hanahan, D. J. 1995. *Some Aspect of The Metabolism of Lechitin and Its Derivates in Liver*. *J Biol Chem*. 214:595-606

- Rubinsky, B. 2000. *Cryosurgery. Annual Review in Biomedical Engineering. University of California at Berkeley. Berkeley.*
- 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. 200-221.
- Salomon, S., and W.M. Maxwell. 2000. Storage of Ram Semen. *Anim Reprod Sci.* 62:77-111.
- Samardzija M., D. Tomislav., K. Suzana., C. Marijan., K. Martina., P. Nikica., and G. Jurac. 2008. The Use of The Hypoosmotic Swelling Test and Supravital Staining In Evaluation of Sperm Quality In Boars. *Veterinarski Arhiv* 78 (4), 279-287, 2008.
- Sankai T, H., Tsuchiya and N. Ogonuki. 2001. Shortterm Nonfrozen Storage Of Mouse Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology* 55(8) : 1759-1768
- Saunders. 2007. *Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers. an imprint of Elsevier, Inc. medical dictionary.thefreedictionary.com/spermatozoon.*[13 Mei 2009]
- Setiadi, M. A., Yulnawati dan A. Suprayogi. 2007. Kualitas Spermatozoa Epididimis Anjing Selama Penyimpanana pada Suhu 4°C. *JITV* Vol.12 No.2 :134-138.
- Sigit K. 2004. *Bahan Kuliah Biologi Hewan Ana 111 : Klasifikasi dan Filogeni.* bagian Anatomi, Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Smith JB dan Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan, Dan Penggunaan Hewan Percobaan Di Daerah Tropis.* Jakarta: UI Press.
- Solihati, N dan P. Kune. 2010. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental. Universitas Padjajaran.
- Suprayogi, T.W. 1996. Pengaruh Waktu Penyimpanan Bahan Pengencer Kuning Telur Sitrat Terhadap Daya Fertilisasi Sel Mani Domba. Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Surachman. M., Herdis., Yulnawati., Rizal. M., Maheswari. H., 2009. Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang dalam Bahan Pengencer Andromed yang Mendapat penambahan Sukrosa. *Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Vol. 32 No.2.*

- Tambing, S. N. 2001. Peranan Bioteknologi Inseminasi Buatan dalam Pembinaan Produksi Peternakan. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Tanaka, H., Herliantien, E. Herwiyanti, O. P. Lubis, Buwono and J. Pujianto. 2000. The Affercare Technical Cooperation for the Strengthening of Artificial Insemination center Project. Japan International Cooperation Agency.
- Toelihere. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Bandung : Angkasa.
- Toelihare,. M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Toelihere, M. R. 2006. Ilmu Kebidanan pada Ternak Sapi dan Kerbau. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- White, I. G. 1993. Lipid and Calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:639-658.
- WHO. 1999. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*. 4th ed. USA Cambridge University Press. 68-78.
- Yatim, W. 1992. Biologi Sel Lanjut. Penerbit Tarsito Bandung. 19-57.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan bahan pengencer skim kuning telur

Bahan : susu skim, aquabides, antibiotik, kuning telur, dan gliserol.

Cara membuat :

1. Membuat *buffer* (untuk 1000 cc)
 - Menimbang susu skim 100 gr dan mempersiapkan 960cc aquabides dalam tabung. Masukkan susu skim ke dalam bowling glass 3000cc dan tambahkan 960cc aquabides.
 - Mencampur susu skim dan aquabides (*buffer*) sampai homogen
 - Masukkan bowling glass ke dalam pemanas elektrothermal sampai suhu 92-95°C. Setelah *buffer* suhunya mencapai suhu 92°C, bowling glass diangkat dan didinginkan sampai suhunya mencapai 37°C lalu disaring.
 - Masukkan *buffer* ke dalam tabung (*measuring cylinder*) 1000cc kemudian disimpan ke dalam lemari es.
 - Setelah dingin *buffer* ditambahkan antibiotik dengan perbandingan 100 : 1. Antibiotik yang dipergunakan adalah Pennicylin 3.000.000 IU dan streptomycin 3 gr, dicampur lalu ditambahkan aquabides sampai volumenya 30 cc.
2. Membuat bahan pengencer A (Untuk 1000cc)
 - Buffer antibiotik : 95°C
 - Kuning telur : 50 cc
3. Membuat bahan pengencer B (untuk 1000cc)
 - *Buffer* antibiotik : 800 cc

- Gliserol : 130 cc
- Kuning Telur : 50 cc
- Glukosa : 20 gram

Lampiran 2. Pembuatan bahan pengencer tris kuning telur

Bahan pengencer tris dalam 1000 ml terdiri dari:

1. Pengencer A

- Tris amino methan	:	13,63 gram
- Citric acid	:	7,62 gram
- Laktosa	:	15 gram
- Fruktosa/levinosa	:	3,75 gram
- Raffinosa	:	27 gram
- Kuning telur	:	200 cc
- Penicillin	:	1 juta IU
- Streptomycin	:	1 gram
- Aquabides	:	755 ml

2. Pengencer B

Pengencer A + Gliserol 14%

Cara pembuatan:

- Bahan *tris amino methan, citric acid, laktosa, fruktosa dan raffinosa* setelah ditimbang dimasukkan dalam gelas erlemeyer 1000 cc. Ditambahkan 755 cc aquadestilata/aquades dan dihomogenkan. Kemudian gelas erlemeyer dimasukan kedalam panic yang berisi air dimasak diatas nyala api.
- Setelah air dalam panic mendidih, gelas erlemeyer diangkat dan didinginkan. Bila bahan-bahan dalam gelas erlemeyer suhunya turun samapai 30 °C, dimasukan penstrep kemudian dihomogenkan.
- Masukkan kuning telur dan homogenkan selama 5 menit. Setelah itu gelas erlemeyer yang berisi larutan pengencer tersebut disimpam dalam lemari sedan tahan penyimpanan paling lama 1 minggu.

- Setelah penyimpanan 2-3 hari terdapat endapan dari larutan pengencer. Bila pengencer akan digunakan supernatant dipisahkan terlebih dahulu dengan menggunakan pipet.

Lampiran 3. Komposisi pengencer AndroMed®

1. Fosfolipid
2. Tris
3. Asam sitrat
4. Gula
5. Antioksidan
6. Buffers
7. Gliserol
8. Antibiotik
9. Aquabidest

100 cc dari kemasan siap pakai mengandung unit :

1. Tylosin 5,0 mili gram
2. Gentamicin 25,0 mili gram
3. Spectinomycin 30,0 mili gram
4. Lincomycin 15,0 mili gram

Tiap botol AndroMed® mengandung 200 cc konsentrat untuk memproduksi 1000 cc diluter siap pakai.

Persiapan pembuatan Pengencer

Hangatkan isi dari satu botol AndroMed® (200 cc) dalam waterbath dengan suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Hangatkan 800 cc air a steril pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dan masukkan ke dalam konsentrat. Amati rasio pengencer (1 bagian konsentrat + 4 bagian air), juga dapat disiapkan dalam skala kecil.

Lampiran 4. Komposisi pembuatan medium *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST).

Fruktosa	1,351 gram
Aquabidest ad.	100 mili liter.

Sumber : WHO Laboratory (1992)

Lampiran 5. Cara Membuat Preparat Ulas Spermatozoa

1. Ambil *obyek glass* bersih.
2. Pada *obyek glass* diberikan satu tetes kecil semen dan satu tetes besar larutan Eosin-negrosin di sampingnya.
3. Campurkanlah zat wara itu dengan semen sampai homogen.

Lampiran 6. Pengolahan Data

Case Processing Summary

perlakuan_HOST T	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
jumlah_spz	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
dimensio p1	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
n1 p2	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
p3	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%

Descriptives

perlakuan_HOST		Statistic	Std. Error
jumlah_spz p1	Mean	36,0633	,53054
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 34,6995 Upper Bound 37,4271	
	5% Trimmed Mean	36,0420	
	Median	35,9700	
	Variance	1,689	
	Std. Deviation	1,29956	
	Minimum	34,45	
	Maximum	38,06	
	Range	3,61	
	Interquartile Range	2,26	
	Skewness	,441	,845
	Kurtosis	-,328	1,741
	p2	Mean	29,9933
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound 29,0093 Upper Bound 30,9773	
5% Trimmed Mean		29,9943	
Median		30,0000	
Variance		,879	
Std. Deviation		,93765	

	Minimum		28,66	
	Maximum		31,31	
	Range		2,65	
	Interquartile Range		1,66	
	Skewness		-,030	,845
	Kurtosis		-,312	1,741
p3	Mean		42,2267	,40547
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	41,1844	
		Upper Bound	43,2690	
	5% Trimmed Mean		42,2696	
	Median		42,4200	
	Variance		,986	
	Std. Deviation		,99319	
	Minimum		40,40	
	Maximum		43,28	
	Range		2,88	
	Interquartile Range		1,15	
	Skewness		-1,440	,845
	Kurtosis		2,724	1,741

Tests of Normality

perlakuan_HOS T	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Significance	Statistic	df	Significance
jumlah_spz						
dimensio						
n1						
p1	,119	6	,200*	,984	6	,968
p2	,170	6	,200*	,982	6	,959
p3	,295	6	,113	,865	6	,208

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound ...

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Significanc e
jumlah_spz Based on Mean	,527	2	15	,601
Based on Median	,507	2	15	,612
Based on Median and with adjusted df	,507	2	14,683	,613
Based on trimmed mean	,526	2	15	,602

ONEWAY ANOVA

jumlah_spz

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Between Groups	448,972	2	224,486	189,467	,000
Within Groups	17,772	15	1,185		
Total	466,744	17			

Homogeneous Subsets

jumlah_spz

Tukey HSD^a

perlakuan_HOST	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
di p2	6	29,9933		
me p1	6		36,0633	
nsi p3	6			42,2267
on Significance		1,000	1,000	1,000

Means are displayed ...

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000

Correlations

		HOST	SEM	MOTILIT AS	VIABILIT AS
HOST	Pearson Correlation	1	1,000**	,999*	1,000*
	Significance(2-tailed)		,006	,027	,015
	N	3	3	3	3
SEM	Pearson Correlation	1,000**	1	,999*	1,000**
	Significance(2-tailed)	,006		,033	,009
	N	3	3	3	3
MOTILIT AS	Pearson Correlation	,999*	,999*	1	,998*
	Significance(2-tailed)	,027	,033		,042
	N	3	3	3	3
VIABILIT AS	Pearson Correlation	1,000*	1,000**	,998*	1
	Significance(2-tailed)	,015	,009	,042	
	N	3	3	3	3

** . Correlation at 0.01(2-tailed):...

* . Correlation at 0.05(2-tailed):...

Case Summaries^a

		HOST	SEM	VIABILIT AS	MOTILIT AS
perlakuan P1	1	36,09	39,23	41,44	36,57
	Total N	1	1	1	1
P2	1	30,00	36,27	37,58	30,00
	Total N	1	1	1	1
P3	1	42,25	42,13	45,97	42,71
	Total N	1	1	1	1
Total	N	3	3	3	3

a. Limited to first 100 cases.

Case Processing Summary

VIABILIT TAS	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah_Spermatozoa di P1 me P2 nsi P3 on 1	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%

Descriptives

VIABILITAS			Statistic	Std. Error
Jumlah_Spermatozo a	P1	Mean	41,4567	,45759
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 40,2804 Upper Bound 42,6329	
		5% Trimmed Mean	41,4780	
		Median	41,8400	
		Variance	1,256	
		Std. Deviation	1,12085	
		Minimum	39,82	
		Maximum	42,71	
		Range	2,89	
		Interquartile Range	2,02	
		Skewness	-,636	,845
		Kurtosis	-1,238	1,741
	P2	Mean	35,7433	,92780
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 33,3583 Upper Bound 38,1283	
	5% Trimmed Mean	35,6904		
	Median	36,2700		
	Variance	5,165		
	Std. Deviation	2,27264		
	Minimum	33,21		
	Maximum	39,23		
	Range	6,02		
	Interquartile Range	3,80		
	Skewness	,263	,845	
	Kurtosis	-,204	1,741	
P3	Mean	46,1483	,44453	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 45,0056 Upper Bound 47,2910		
	5% Trimmed Mean	46,1165		
	Median	46,1500		
	Variance	1,186		

Std. Deviation	1,08888	
Minimum	45,00	
Maximum	47,87	
Range	2,87	
Interquartile Range	2,01	
Skewness	,526	,845
Kurtosis	-,090	1,741

Tests of Normality

VIABILITAS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Significance	Statistic	df	Significance
jml_Spermatozoa	,226	6	,200*	,913	6	,458
me	,258	6	,200*	,866	6	,212
nsi	,188	6	,200*	,914	6	,465
on						
1						

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound ...

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Significance
Jumlah_Spermatozoa	Based on Mean	1,785	2	15	,202
	Based on Median	,788	2	15	,473
	Based on Median and with adjusted df	,788	2	8,773	,485
	Based on trimmed mean	1,897	2	15	,184

ONEWAY ANOVA

Jumlah_Spermatozoa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Between Groups	325,836	2	162,918	64,252	,000
Within Groups	38,034	15	2,536		
Total	363,870	17			

Jumlah_Spermatozoa

Tukey HSD^a

VIABILITAS	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	6	35,7433		
P1	6		41,4567	
P3	6			46,1483
Significance		1,000	1,000	1,000

Means are displayed ...

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah_Spermatozoa * VIABILITAS	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		motilitas	
VIABILIT P1 AS	1	39,82	
	2	42,13	
	3	42,71	
	4	42,13	
	5	40,40	
	6	41,55	
	Total	N	6
		Mean	41,4567
		Std. Deviation	1,12085
	P2	1	36,27
2		39,23	
3		36,27	
4		33,21	
5		36,27	
6		33,21	
Total		N	6
		Mean	35,7433
		Std. Deviation	2,27264
P3		1	45,00
	2	46,15	
	3	46,72	
	4	46,15	
	5	47,87	
	6	45,00	
	Total	N	6
		Mean	46,1483
		Std. Deviation	1,08888
	Total	N	18
	Mean	41,1161	
	Std. Deviation	4,62646	

a. Limited to first 100 cases.

Case Processing Summary

MOTILIT AS	Cases						
	Valid		Missing		Total		
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
jumlah_spermatozo	di P1	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
a	me P2	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
	nsi P3	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
	on						
	l						

Descriptives

MOTILITAS			Statistic	Std. Error	
jumlah_spermatozo a	P1	Mean	36,5667	,45826	
		95% Confidence	Lower Bound	35,3887	
		Interval for Mean	Upper Bound	37,7447	
		5% Trimmed Mean		36,5674	
		Median		36,5700	
		Variance		1,260	
		Std. Deviation		1,12251	
		Minimum		35,06	
		Maximum		38,06	
		Range		3,00	
		Interquartile Range		2,10	
		Skewness		-,015	,845
		Kurtosis		-1,200	1,741
		P2	Mean	29,9933	,38279
95% Confidence	Lower Bound		29,0093		
Interval for Mean	Upper Bound		30,9773		
5% Trimmed Mean			29,9943		
Median			30,0000		
Variance			,879		

	Std. Deviation		,93765	
	Minimum		28,66	
	Maximum		31,31	
	Range		2,65	
	Interquartile Range		1,66	
	Skewness		-,030	,845
	Kurtosis		-,312	1,741
P3	Mean		42,7067	,20996
	95% Confidence	Lower Bound	42,1669	
	Interval for Mean	Upper Bound	43,2464	
	5% Trimmed Mean		42,7069	
	Median		42,7100	
	Variance		,265	
	Std. Deviation		,51430	
	Minimum		42,13	
	Maximum		43,28	
	Range		1,15	
	Interquartile Range		1,15	
	Skewness		-,015	,845
	Kurtosis		-1,875	1,741

Tests of Normality

MOTILIT AS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Significance	Statistic	df	Significance
jumlah_spermatozo	,123	6	,200*	,982	6	,960
a	,170	6	,200*	,982	6	,959
nsi	,202	6	,200*	,853	6	,167
on						
1						

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound ...

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Significa nce
jumlah_spermatozo a	Based on Mean	1,659	2	15	,223
	Based on Median	1,655	2	15	,224
	Based on Median and with adjusted df	1,655	2	12,358	,231
	Based on trimmed mean	1,658	2	15	,224

ONEWAY ANOVA

jumlah spermatozoa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Between Groups	485,074	2	242,537	302,702	,000
Within Groups	12,019	15	,801		
Total	497,093	17			

Homogeneous Subsets

jumlah_spermatozoa

Tukey HSD^a

MOTILITAS	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P2	6	29,9933		
P1	6		36,5667	
P3	6			42,7067
Significance		1,000	1,000	1,000

Means are displayed ...

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
jumlah_spermatozoa * MOTILITAS	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		jumlah_spermatozoa	
MOTILIT P1	1		37,47
AS	2		36,87
	3		36,27
	4		35,06
	5		38,06
	6		35,67
	Total	N	6
		Mean	36,5667
		Std. Deviation	1,12251
P2	1		30,00
	2		30,66
	3		31,31
	4		29,33
	5		28,66
	6		30,00
	Total	N	6
		Mean	29,9933
		Std. Deviation	,93765
P3	1		42,13
	2		43,28
	3		42,13
	4		42,71
	5		43,28
	6		42,71

Total N	6
Mean	42,7067
Std. Deviation	,51430
Total N	18
Mean	36,4222
Std. Deviation	5,40747

a. Limited to first 100 cases.

Correlations

		HOST	SEM	MOTILITAS	VIABILITAS
HOST	Pearson Correlation	1	1,000**	,999*	1,000*
	Significance(2-tailed)		,006	,027	,015
	N	3	3	3	3
SEM	Pearson Correlation	1,000**	1	,999*	1,000**
	Significance(2-tailed)	,006		,033	,009
	N	3	3	3	3
MOTILITAS	Pearson Correlation	,999*	,999*	1	,998*
	Significance(2-tailed)	,027	,033		,042
	N	3	3	3	3
VIABILITAS	Pearson Correlation	1,000*	1,000**	,998*	1
	Significance(2-tailed)	,015	,009	,042	
	N	3	3	3	3

** . Correlation at 0.01(2-tailed):...

* . Correlation at 0.05(2-tailed):...