

DISERTASI

**ANALISA MEMBRAN SPERMATOCYTES SAPI HASIL
FILTRASI SEPHADEX G-200 DAN SENTRIFUGASI
GRADIEN DENSITAS PERCOLL PADA
PROSES SELEKSI JENIS KELAMIN**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



TRINIL SUSILAWATI

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**ANALISA MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI HASIL
FILTRASI SEPHADEX G-200 DAN SENTRIFUGASI
GRADIEN DENSITAS PERCOLL PADA PROSES SELEKSI
JENIS KELAMIN**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL

DISERTASI

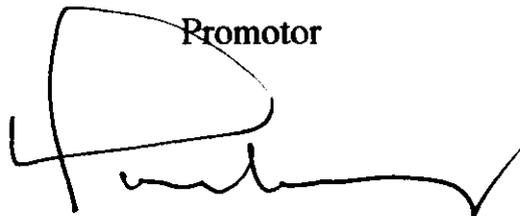
Untuk memperoleh gelar Doktor
dalam Program Pasca Sarjana
Universitas Airlangga dan telah dipertahankan dihadapan
dewan ujian Doktor Terbuka pada
hari senin
tanggal 12 Juni 2000
pukul 10.00 WIB

Oleh:
TRINIL SUSILAWATI
NIM: 099712414 D

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 6 JULI 2000**

Oleh

Promotor

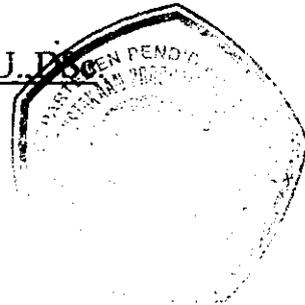


Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto, Drh., M.Sc.
NIP. 130 189 851

Kopromotor I

Sutiman B Sumitro

Prof. Sutiman B. Sumitro, Drs., S.U., Ph.D.
NIP. 130 809 123



Kopromotor II



Aucky Hinting, dr., Ph.D
NIP. 130 873 509

Promotor : Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto, Drh, M.Sc

Ko-Promotor : Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Drs, SU, D.Sc

Aucky Hinting, dr, Ph.D

Telah diuji pada ujian tertutup

Tanggal 27 April 2000

Panitia Penguji Disertasi

Ketua : Prof. Purnomo suryohudoyo, dr

Anggota :1. Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto, Drh, M.Sc.

2. Prof. Sutiman Bambang Sumitro,Drs, SU, D.Sc

3. Aucky Hinting , dr, Ph.D

4. Prof. I.G.B Amitaba, Drh.

5. Prof. Dr. Loekito Adi Soehono, Ir, M. Agr

6. Mas'ud Hariadi, Drh, M.Phil, Ph.D



**Ditetapkan dengan surat keputusan
Rektor Universitas Airlangga Surabaya**

No : 3805/j03/PP/2000

Tanggal : 2 Mei 2000

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian dan penulisan disertasi ini dapat berjalan dengan baik.

Ucapan terimakasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. Soehartojo Hardjopranjoto Drh, MSc selaku Pro-motor dengan penuh perhatian memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang sangat berharga bagi penulis sejak awal memasuki program pasca sarjana sampai saat-saat terakhir penulisan disertasi ini. Nasehat dan bimbingan beliau merupakan suriteladan bagi penulis.

Kepada Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Drs, SU, DSc selaku Ko-promotor yang selalu dengan kesabaran membuka cakrawala agar berfikir bijak, memberikan bimbingan, nasehat dan dorongan dengan penuh perhatian yang sangat berharga, sehingga penulis mempunyai kepercayaan diri didalam melakukan penelitian-penelitian dan forum ilmiah yang lain mulai tahun 1992 sampai saat-saat terakhir penulisan disertasi. Kerjakeras, nasehat, bimbingan, ketelatenan dan kesabaran beliau merupakan suriteladan bagi penulis.

Kepada Aucky Hinting, dr, Ph.D selaku Ko-promotor yang selalu memberikan bimbingan, pelatihan dan memberikan pengalaman dalam berbagai aktifitas akademik yang sangat bermanfaat bagi penulis.

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Tim Manajemen Program Doktor (TMPD) dan Proyek Hibah Bersaing V, serta menteri riset dan teknologi melalui riset Unggulan Terpadu III, yang telah memberikan bantuan finansial yang dapat meringankan beban penulis dan menyelesaikan Program Doktor pada Universitas Airlangga.

Kepada Prof. H. Soedarto, dr, DTM, Ph.D sebagai Rektor Universitas Airlangga Surabaya dan segenap jajarannya, atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama mengikuti dan menyelesaikan pendidikan doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Direktur Program Pascasarjana Prof. Dr. H. Soedijono, dr. Sp. T. H. T. , Semua asisten direktur, dan seluruh staf administrasi yang telah memfasilitasi

selama saya menyelesaikan pendidikan doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Loekito Adi Soehono, Ir, MAggr selaku konsultan statistik dan penguji yang dengan ketelatenan dan kesabaran beliau pada proses pembimbingan. Triono Soendoro, dr. PhD selaku penguji luar yang disela-sela kesibukannya masih menyempatkan memberikan banyak masukan dan koreksi untuk perbaikan penulisan disertasi, serta membuka cakrawala berfikir ilmiah. Prof. IGB Amitaba, Drh, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr dan Mas'ud Hariadi, Drh. MPhil, Ph.D, DR. L. Dyson, Prof. Dr. Pitono, dr, Prof. Hanafi, dr, Dr. Endang, dr selaku penguji yang banyak memberikan kritik dan saran untuk perbaikan penulisan dan cara berfikir ilmiah.

Prof. H. Hasyim Baisoeni, Drs. selaku mantan Rektor Universitas Brawijaya yang selalu memberikan nasehat dan memberikan kepercayaan sehingga memberikan izin untuk mengikuti pendidikan program Doktor ini.

Djaman Hedah, Drs, MP selaku direktur Balai Inseminasi Buatan beserta staf yang telah memberikan kemudahan menggunakan fasilitas penelitian mulai jenjang pendidikan S2 tahun 1990 sampai dengan penelitian S3 sekarang ini , Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Drs, SU, DSc selaku Dekan Fakultas MIPA beserta staf di Laboratorium Biologi - Universitas Brawijaya yang memberikan fasilitas laboratorium dan suasana yang menyenangkan dalam bekerja, Prof. H. Santoso, dr. selaku kepala Lab. Mikroskopi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang memberikan fasilitas Laboratorium, sehingga peneliti dapat melakukan penelitian dengan baik.

Terimakasih disampaikan kepada Ketua program studi Ilmu Kedokteran Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr, SpPA, FIAC. Staf pengajar pada program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya Bidang studi Kedokteran atas bimbingan dan saran-sarannya sejak semester awal sampai semester akhir yaitu Dr. Suhartono Taat Putra, dr, Dr. Ami Soewandi, Apt, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr, Prof. Dr. H. R. Pitono, dr., Sp.A(K); Prof. IGB Amitaba, Drh, Prof. H. Bambang Rahino seto kusumo., dr.; Dr. Sarmanu, Drh; H. Kuntoro, dr., Ph.D, Siti Pariani, dr, MS., Ph.D, Prof. H. Eddy Pranowo Sudibyo, dr., M.P.H;

Prof. Dr. Josef Glinka SVD; Prof. Dr. Kunto Wibisono; Prof. Sutandyo W.,M.P.A; Widodo J.P., Dr. L. Dyson dan Dr. H. Fuad Amsari,dr. M.P.H.

Prof Dr. Afnan Eka Troena,Drs. selaku Rektor Universitas Brawijaya dan segenap jajarannya yang mendukung untuk menyelesaikan Program Doktor ini. Para pembantu Rektor, H Sarwiyono, Ir, M.Agr.St selaku Dekan Fakultas Peternakan dan Prof. Dr. Soebarinoto selaku mantan Dekan Fakultas Peternakan, Nurihsan, Ir, MS selaku ketua Jurusan Produksi Ternak Univeritas Brawijaya Malang, atas kepercayaannya untuk mengikuti program Doktor pada Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Enny Yuliani,Ir, MP; Dewi Lailatul Badriyah, Dra.MS, Nur Permata sari, Drg,MS, Rohmad Romdoni,dr, DSPD, Alm. Mudjito, dr, dan semua teman seangkatan S3 Ilmu kedokteran angkatan 1997/1998 atas bantuan dan kerjasamanya yang baik dalam suka maupun duka.

Dr. Siswanto,Ir,MS dan Dr. Pratiwi Trisunuwati, Drh, MS atas nasehat dan informasi-informasi yang bermanfaat dalam menempuh studi. Semua Staf pengajar Fakultas Peternakan Universitas, juga kelompok peneliti reproduksi antara lain: Dr. Nuryadi, Ir, MS, Gatot Ciptadi, Ir, Dess, Dr. Sasmitodjati, Ir, MS, Arief Boediono, Drh, Ph.D, Sri Rahayu, Dra, Mkes, Dr. Bambang Purnomo, Drh, MS, Aulani'am Drh, MSc, Drh. Pudji Srianto, M.Kes. Serta semua guru mulai sekolah Dasar sampai perguruan tinggi yang memberikan bekal pengetahuan kepada penulis.

Penghargaan dan terimakasih yang setulus tulusnya dengan teriring doa kepada almarhum Bapak dan Ibu. Ijin dan dorongan dengan penuh kasih sayang dari suami dan anak-anak tercinta, kemudian Ibu mertua dan kakak-kakak yang banyak memberikan doa, bantuan, motivasi dan semangat kepada penulis untuk melaksanakan dan menyelesaikan studi dengan cepat.

Semoga Allah SWT membalas kebaikan dari semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian studi ini dan dicatat sebagai amal ibadah disisiNya, amin.

RINGKASAN

Teknologi Inseminasi Buatan dan Transfer embrio dapat ditingkatkan nilainya dengan menggunakan program pedet yang dihasilkan mempunyai jenis kelamin sesuai harapan, karena sangat mendukung program pemuliaan dalam pemilihan bibit unggul, juga menunjang efisiensi pada peternakan sapi perah dan sapi potong. Seleksi jenis kelamin dengan menggunakan filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll memungkinkan untuk dikembangkan. Namun proses filtrasi maupun sentrifugasi tersebut menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa.

Penurunan motilitas spermatozoa berkaitan erat dengan fungsi membran spermatozoa antara lain kontrol transport ion kalsium. Penelitian yang cermat tentang fungsi membran spermatozoa diharapkan dapat memperoleh pemahaman yang baik pada fenomena penurunan motilitas dan pola kapasitas yang berhubungan dengan status membran spermatozoa. Dengan menitik beratkan pada gangguan fungsi transport ion kalsium.

Rumusan masalah adalah mengapa perlakuan filtrasi dan sentrifugasi menyebabkan perubahan motilitas, viabilitas dan peningkatan konsentrasi ion kalsium. Tujuan umum: Untuk mengetahui apakah filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll berpengaruh terhadap status membran spermatozoa, sedangkan tujuan khusus (1) Mengetahui pengaruh filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien percoll terhadap kualitas dan konsentrasi ion kalsium spermatozoa (2) Mengetahui kemungkinan adanya kerusakan membran spermatozoa yang terkait dengan perubahan transport ion kalsium dan penurunan motilitas spermatozoa. Manfaat dari penelitian ini adalah (1) Memperoleh pemahaman yang lebih baik terhadap fenomena penurunan motilitas spermatozoa dan pola kapasitas setelah filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll yang berhubungan dengan status membran spermatozoa (2) Merupakan dasar untuk mengembangkan teknologi yang berhubungan dengan spermatozoa, khususnya metode seleksi jenis kelamin dengan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll. Hipotesa :



Penurunan motilitas dan viabilitas, serta peningkatan konsentrasi ion kalsium spermatozoa pada proses filtrasi dan sentrifugasi adalah akibat dari kerusakan membran spermatozoa.

Penelitian 3 jenis eksperimental dengan rancangan acak kelompok. Variabel penelitian diperiksa secara mikroskopis. Rancangan analisa data menggunakan anova. Tiga jenis penelitian meliputi (1) pengaruh filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap pola kapasitasi dan kualitas spermatozoa (2) Pembuktian perubahan fungsi membran spermatozoa (3) Ultra struktur membran spermatozoa hasil filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa motilitas, viabilitas dan integritas membran spermatozoa setelah perlakuan filtrasi, sentrifugasi dan ionophore mengalami penurunan, sedangkan kapasitasi mengalami peningkatan.

Spermatozoa kontrol lebih banyak yang mengalami kapasitasi, bila diinkubasi dalam medium EBSS yang mengandung ion kalsium lebih banyak, sedangkan pada spermatozoa hasil filtrasi, sentrifugasi dan ionophore tidak dijumpai spermatozoa dengan gambaran kapasitasi, akan tetapi terdapat spermatozoa dengan pendaran fluoresensi rendah, sedang dan tinggi.

Pendaran spermatozoa kontrol tidak dipengaruhi oleh konsentrasi ion kalsium dalam EBSS, sedangkan spermatozoa hasil filtrasi, sentrifugasi, ionophore, intensitas pendaran meningkat pada EBSS dengan kadar ion kalsium tinggi dan hilang pada EBSS tanpa ion kalsium.

Motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil filtrasi, sentrifugasi dan ionophore dalam EBSS lebih rendah dari kontrol. Pola perubahan pendaran normal berbeda dengan motilitas dan viabilitas.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah: (1) Spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-200 mengalami kerusakan fungsi membran, sedangkan spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll mengalami kerusakan struktur membran spermatozoa. (2) Peningkatan konsentrasi ion kalsium dalam spermatozoa setelah filtrasi dan sentrifugasi, karena tidak berfungsinya kontrol ion kalsium, hal ini berakibat terhadap penurunan motilitas spermatozoa. Saran :

(1). Penelitian ini merupakan titik awal yang memperjelas perubahan fungsi membran daerah akrosom yang berhubungan dengan peran ion kalsium. Hal ini diyakini merupakan suatu yang strategis untuk mengembangkan teori yang lebih baik tentang mekanisme kapasitas yang sampai saat ini masih belum jelas. (2). Hasil penelitian menunjukkan motilitas dan viabilitas berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa, sesuai dengan kenyataan bahwa penurunan fertilitas secara *in vivo* terkait erat dengan konsentrasi spermatozoa yang jumlahnya sedikit. Penelitian yang mengungkap sistem komunikasi diantara mereka barangkali juga merupakan hal yang strategis untuk menjawab permasalahan turunnya viabilitas dan motilitas pada spermatozoa hasil seleksi jenis kelamin. (3) Fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi gradien densitas percoll dianjurkan kurang dari 15 menit. Untuk pengembangan metode seleksi jenis kelamin lebih baik mencegah dekapasitasi untuk memperpanjang viabilitas dan motilitas.

**MEMBRANE ANALYSIS OF BULL SPERM AFTER SEPHADEX
FILTRATION AND GRADIENT PERCOLL CENTRIFUGATION ON
SEX SELECTION PROCESS**

ABSTRACT

The decreasing sperm motility after sexing with sephadex filtration and gradient densitas centrifugation is thought to be closely related to sperm membrane disfunction especially on calcium transport system. Investigation of these hypothesis of spermatozoa after sexing procedures was intended to elucidate, the possible relation of membrane disfunction resulted from those sexing procedures to the decreasing sperm motility and abnormal sperm capacitation.

Three experimental researches using randomized block design were done to seek the following : (1) The effect of two sexing procedures (sephadex filtration and density gradient centrifugation) on capacitation pattern and sperm quality (2) The evidence of structural and functional damages of sperm membrane due to sexing procedures, which were responsible to the change of capacitation rate and decreasing sperm motility.

The results showed that the density gradient centrifugation had given both structural and functional damages of the membrane, but the sephadex filtration procedure did not show any evidence of structural membrane damages. However, the sephadex filtration procedure had led to the disfunction of calcium ion control mechanism. The increasing intracelluler Ca^{++} concentration of the sperms during sexing procedures were due to the lost of Ca^{++} transmembrane control function of sperms lead to the decreasing sperms quality.

Key word : Sexing, sperms, sperm capacitation

DAFTAR ISI

	Halaman
Ucapan terimakasih	i
Ringkasan	ii
Abstrak	iii
Daftar isi	iv
Daftar tabel	v
Daftar gambar	vi
Daftar lampiran	vii
Daftar singkatan	viii
Bab 1. Pendahuluan	1
1.1. Latar belakang masalah	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan penelitian	3
1.4. Manfaat penelitian	4
Bab 2. Tinjauan pustaka	5
2.1. Seleksi jenis kelamin	5
2.1.1. Seleksi jenis kelamin menggunakan filtrasi sephadex	6
2.1.2. Seleksi jenis kelamin menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll	9
2.2. Fungsi membran dan analisa integritas membran spermatozoa	12
2.3. Peran kalsium pada kapasitas dan fungsi membran	15
Bab 3. Kerangka konseptual dan hipotesis.....	21
3.1. Kerangka konseptual	21
3.2. Hipotesis penelitian	22
Bab 4. Metodologi penelitian	24
4.1. Lokasi penelitian	24
4.2. Alat dan bahan penelitian	25
4.3. Penelitian pengaruh filtrasi dan sentrifugasi	27
4.3.1. Rancangan percobaan 1.....	27
4.3.2. Pelaksanaan penelitian	27
4.4. Experimen pembuktian perubahan fungsi membran spermatozoa	34
4.4.1. Rancangan percobaan II	34
4.4.2. Pelaksanaan penelitian	35
4.5. Pengamatan ultra struktur membran spermatozoa hasil filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll	35
4.5.1. Rancangan percobaan III.....	36
4.5.2. Pelaksanaan penelitian	36
Bab 5. Analisis hasil penelitian	40
5.1. Kualitas semen yang digunakan sesuai standard yang ditetapkan	40

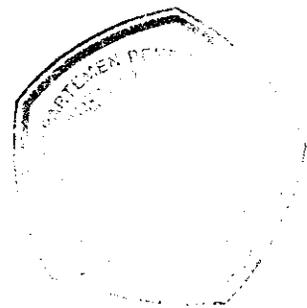
5.2. Peningkatan kapasitas spermatozoa setelah perlakuan yang diikuti dengan penurunan kualitas spermatozoa...	41
5.3. Pendaran fluorescensi dipengaruhi kadar ion kalsium medium	43
5.4. Struktur membran spermatozoa berubah setelah perlakuan .	48
Bab 6. PEMBAHASAN	54
6.1. Penentuan standard kualitas semen dan metode pewarnaan	54
6.2. Penurunan kualitas membran spermatozoa setelah perlakuan	62
6.3. Kerusakan sistim transport ion kalsium setelah filtrasi dan sentrifugasi	66
BAB 7. KESIMPULAN	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAPIRAN.....	78

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Karakteristik sephadex G-100 dan G-200.....	8
5.2. Hasil pemeriksaan semen yang digunakan dalam penelitian	40
5.3. Rata-rata kualitas spermatozoa pada berbagai perlakuan	41
5.4 Rata-rata persentase gambaran kapasitas spermatozoa pada berbagai perlakuan	42
5.5 Rata-rata persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda	43
5.6 Tingkat pendaran spermatozoa setelah perlakuan terhadap medium berkadar ion kalsium berbeda.....	44
5.7 Pendaran normal (sedang) spermatozoa setelah perlakuan inkubasi dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda.....	44
5.8 Perbedaan spermatozoa dengan pendaran normal dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan	45
5.9. Rata-rata motilitas spermatozoa setelah dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda	46
5.10. Perbedaan motilitas spermatozoa dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan.....	46
5.11. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan dengan inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda	47
5.12. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa setelah Inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan	4

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil penelitian pendahuluan	80
2. Analisis statistika pembuktian uji viabilitas antara eosin-negrosin dan hoechst.....	94
3. Analisis statistika pembuktian reaksi arkosom dengan metode CTC dan FITC concanavalin A.....	95
4. Analisis statistika persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan.....	96
5. Analisis statistika persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan.....	97
6. Analisis statistika persentase integritas membran baik spermatozoa setelah perlakuan.....	98
7. Analisis statistika persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan	99
8. Analisis statistika persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan inkubasi medium kadar kalsium berbeda.....	101
9. Analisis statistika pendaran normal spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi pada medium kadar kalsium berrbeda.....	103
10. Analisis statistika motilitas spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi pada medium berkadar kalsium berbeda.....	104
11. Analisis statistika viabilitas spermatozoa dilanjutkan inkubasi pada medium kadar kalsium berbeda	105



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1. Spermatozoa dengan pendaran fluorescen Berbeda	50
5.2. Spermatozoa dengan pembesaran 1000X	50
5.3. Spermatozoa dengan membran yang baik dan kerusakan membran diamati menggunakan mikroskop elektron scanning.....	51
5.4. Ultra struktur kepala spermatozoa	52
5.5. Ultra struktur leher spermatozoa.....	53
6.6. Spermatozoa sapi hasil HOS-TES	57
6.7. Spermatozoa setelah uji viabilitas dengan pewarnaan	58
6.8. Spermatozoa hasil kapasitasi dengan pewarnaan CTC	59
6.9. Spermatozoa hasil staining dengan FITC- con A	59
6.10. Perbedaan hasil pengamatan dengan menggunakan pembesaran 100 X dan 1000X	60
6.11. Tahapan hilangnya ion kalsium pada peristiwa kapasitasi sampai dengan reaksi akrosom	60
12. Perbedaan persentase motilitas spermatozoa pada berbagai medium pengencer	82
13. Perbedaan persentase motilitas spermatozoa Hasil filtrasi sephadex G-100 dan G-200	82
14. Perbedaan persentase viabilitas spermatozoa Setelah filtrasi sephadex G-100 dan G-200 ..	83
15. Perbedaan konsentrasi spermatozoa setelah Filtrasi sephadex G-100 dan G200	83
16. Perbedaan persentase spermatozoa X pada Perbedaan tabung setelah filtrasi sephadex G-100 dan G-200	84

17.	Perbedaan persentase motilitas dan Spermatozoa X pada lapisan bawah pada Berbagai kecepatan dan waktu	84
18.	Penurunan persentase motilitas dan Spermatozoa kapasitas setelah filtrasi dan Sentrifugasi	85
19.	Perubahan gambaran kapasitas spermatozoa Setelah filtrasi dan sentrifugasi	85
20.	Penurunan persentase motilitas dan viabilitas Spermatozoa hasil filtrasi sephadex setelah Pembekuan	86
21.	Penurunan persentase motilitas dan viabilitas Spermatozoa hasil sentrifugasi setelah Pembekuan	87
22.	Embrio hasil fertilisasi in vitro dengan menggunakan spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi.....	93

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Kepanjangan
CTC	Chlortetracyclin
CPD	Critical point Dry
EBSS	Earle's Balance Salt Solution
HOS-Tes	Hypoosmotic swelling Test
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FITC-conA	Fluorescent isothiocyanate
IB	Inseminasi Buatan
PBS	Phosphate buffer saline
PB	Phosphate buffer
Spermatozoa X	Spermatozoa yang berkromosom X
Spermatozoa Y	spermatozoa yang berkromosom Y
SEM	Scanning electron microscope
TEM	Transmission electron microscope
TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TE	Transfer embrio



BAB I

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar belakang masalah

Bioteknologi akhir-akhir ini menjadi topik ilmiah yang sangat penting. Salah satu bioteknologi di sub sektor peternakan yang digunakan adalah inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio (TE). Penerapan IB dan TE dari bibit unggul, sementara ini diarahkan untuk memperbaiki mutu genetik dan produktifitas sapi perah dan sapi potong (Suhaji,1995). Teknologi IB dan TE tersebut dapat ditingkatkan nilainya dengan menggunakan program pedet yang dihasilkan mempunyai jenis kelamin sesuai harapan, karena sangat mendukung program breeding dalam pemilihan bibit unggul. Selain itu keuntungan pemisahan spermatozoa mampu menunjang efisiensi pada peternakan sapi perah dan sapi potong, karena sapi dapat mendapatkan anak dengan jenis kelamin tertentu sesuai dengan pengembangan peternakan tersebut.

Sebagai penelitian pendahuluan telah dilakukan beberapa penelitian mulai dari pemilihan medium pengencer pemisahan yang sesuai pada proses pemisahan, medium dan metode pemisahan spermatozoa yang tepat, uji fertilitas spermatozoa baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Pemilihan medium pengencer yang akan digunakan pada proses pemisahan meliputi : larutan Hank's, phosphat buffer saline, sitrat kuning telur, trisaminomethan , tris aminomethan kuning telur dan 4% *Fetal bovine serum* dalam TCM 199. Hasilnya menunjukkan bahwa aminomethan kuning telur dan 4% *Fetal bovine serum* dalam TCM 199 adalah medium yang dapat mempertahankan kualitas.

Untuk penelitian selanjutnya digunakan aminomethan kuning telur dan 4% *Fetal bovine serum* dalam TCM 199. Penelitian berikutnya adalah seleksi jenis kelamin dengan menggunakan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll. Filtrasi dengan menggunakan sephadex G 100 dan 200. Hasilnya spermatozoa dengan ukuran kepala lebih besar yang ada di filtrat lebih banyak pada filtrasi menggunakan sephadex G-200 dengan motilitas yang masih baik. Sentrifugasi gradien densitas percoll menggunakan 10 lapisan, dengan kecepatan 2000 rpm, 2250 rpm dan 2500 rpm selama 5 dan 10 menit. Hasilnya pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit mempunyai kemampuan pemisahan yang tinggi sebesar 83,1 % dengan kualitas yang masih baik. Hasil uji secara *in vivo* pada spermatozoa hasil filtrasi didapatkan 82,5 % (33 ekor) pedet betina dari 40 ekor pedet yang dilahirkan. Hasil uji secara *in vitro* pada filtrasi dan sentrifugasi berhasil penetrasi sebesar 65%.

Secara umum hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa metode pemisahan dengan cara filtrasi dengan sephadex G-200 dan metoda sentrifugasi gradien densitas percoll mempunyai peluang untuk dikembangkan. Hal ini terbukti dengan kemampuan spermatozoa tersebut melakukan fertilisasi dengan perbandingan jenis kelamin anak sesuai dengan harapan (Susilawati dkk, 1996; Susilawati dkk, 1997). Namun demikian kualitas spermatozoa hasil penelitian menunjukkan motilitas yang relatif rendah dan kurang tahan terhadap proses pembekuan serta menunjukkan sifat-sifat yang berubah terutama pada pola kapasitasnya. Semua fenomena perubahan sifat tersebut diduga kuat sebagai akibat proses pemisahan yang dilakukan sebelumnya. Hal yang mungkin dapat diduga adalah kemungkinan

terjadi gangguan fungsi membran spermatozoa atau bahkan kerusakan struktur membran spermatozoa. Dugaan ini didasarkan atas fakta penurunan motilitas populasi spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi yang tidak bersesuaian dengan fakta peningkatan persentase kapasitas populasi spermatozoa, ada dugaan kuat bahwa kapasitas spermatozoa yang dinilai dengan kenaikan kadar ion kalsium di dalam sel (dengan pengecatan Chlortetracyclin), lebih merupakan akibat dari kerusakan struktur atau gangguan fungsi membran akibat perlakuan pemisahan dengan metode tersebut di atas. Atas dasar latar belakang fakta empiris dari studi pendahuluan tersebut, maka ingin dilakukan klarifikasi tentang status membran spermatozoa setelah pemisahan dengan menitik beratkan pada gangguan fungsi transport ion kalsium.

1.2. Rumusan Masalah

Mengapa perlakuan filtrasi dan sentrifugasi menyebabkan perubahan motilitas, viabilitas dan konsentrasi ion kalsium.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan umum :

Untuk mengetahui apakah filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll berpengaruh terhadap status membran spermatozoa.

Tujuan Khusus:

1. Mengetahui pengaruh filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap kualitas dan konsentrasi ion kalsium spermatozoa.

2. Mengetahui kemungkinan adanya kerusakan membran spermatozoa yang terkait dengan perubahan transport ion kalsium dan penurunan motilitas spermatozoa.

1.4. Manfaat penelitian.

1. Memperoleh pemahaman yang lebih baik terhadap fenomena penurunan motilitas spermatozoa dan pola kapasitas setelah filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll yang berhubungan dengan status membran spermatozoa.
2. Merupakan dasar untuk mengembangkan teknologi yang berhubungan dengan spermatozoa, khususnya metode seleksi jenis kelamin dengan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll.



BAB II

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA



2.1. Seleksi jenis kelamin

Pejantan pada mammalia menentukan jenis kelamin anak yang dilahirkan. Sebagai hasil pembelahan reduksi selama *spermatogenesis*, spermatozoa hanya mengandung setengah jumlah DNA pada sel-sel somatik dari spesies yang sama dan terbentuklah dua macam spermatozoa. Spermatozoa yang mengandung kromosom X (spermatozoa X) jika terjadi fertilisasi akan menghasilkan embrio betina, sedangkan spermatozoa yang mengandung kromosom Y (spermatozoa Y) akan menghasilkan embrio jantan, karena pada kromosom Y terdapat *sex determining Region Y gen* (SRY) yang menentukan terbentuknya testis pada hewan jantan (Bianchi, 1991; Graves, 1994 dan Koopman, 1995).

Spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak dikepalanya, sehingga mengakibatkan ukuran kepala spermatozoa X lebih besar (Hafez, 1993). Spermatozoa Y biasanya lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak, serta kemungkinan materi genetik dan DNA yang dikandung spermatozoa Y lebih sedikit dari pada spermatozoa X (Schilling dan Thormahlen, 1976; Sumner, dan Robinson, 1976; Ericson dan Glass, 1982 dalam Hafez, 1993). Dengan demikian apabila dilakukan sentrifugasi, maka spermatozoa X cenderung

lebih cepat membentuk endapan dibandingkan dengan spermatozoa Y (Mohri, 1987). Spermatozoa Y bergerak ke arah katode tambah Ericson and Glass, 1982 dalam Hafez (1993). Berdasarkan perbedaan - perbedaan tersebut, berkembang metode pemisahan spermatozoa dengan menggunakan kolom albumin, *velocity sedimentation*, sentrifugasi dengan gradien densitas, motilitas dan pemisahan elektroforesis, *isoelectric focusing*, H-Y antigen, Flow Sorting dan sephadex kolom (Hafez, 1993) dan (De Jonge *et al.*, 1997). Dari sekian banyak metode pemisahan spermatozoa X dan Y yang paling umum adalah yang berdasarkan pada perbedaan densitas atau motilitas.

Pemisahan spermatozoa X dan Y saat ini yang menghasilkan populasi spermatozoa X dan Y yang terbanyak adalah dengan flow cytometry, akan tetapi alat yang digunakan harganya mahal (Battacharya *et al.*, 1976; Pinkel and Johnson, 1986; Johnson *et al.*, 1993; Hafez, 1993; Seidel *et al.*, 1997). Secara praktis seleksi jenis kelamin ini bermanfaat untuk (1) menghasilkan pedet jantan atau betina superior sebagai induk untuk menghasilkan susu dan daging (2) menghasilkan pejantan penghasil daging (3) menghasilkan betina untuk penghasil susu (Hafez, 1993 dan De Jonge *et al.*, 1997).

2.1.1. Seleksi jenis kelamin menggunakan filtrasi sephadex.

Filtrasi gel sephadex merupakan suatu pemisahan menggunakan gel yang dibuat dari dasar *dextran*, yaitu suatu jaringan tiga dimensi dari

molekul-molekul linier polisakarida yang berikatan dengan *epichlorohydrin* (Nur dan Adijuwana, 1989 dan Adimoelja, 1984). Sephadex tidak larut dalam semua larutan dan stabil dalam air, larutan garam, larutan organik, larutan alkalin dan larutan asam, namun akan terhidrolisa dalam asam kuat. Sephadex tidak meleleh dan dapat disterilkan pada kondisi basah dengan pH netral atau dapat disterilkan pada kondisi kering dalam autoclave selama 30 menit pada suhu 120°C tanpa kehilangan daya pisahnya. Jika sephadex dipanaskan lebih dari 120°C akan mengalami karamelisasi (Adimoelja, 1984). Bahan ini dapat mengembang dalam air membentuk struktur tertentu, sehingga dapat memisahkan molekul-molekul sesuai dengan ukurannya. Selain bentuk geometrik, sifat-sifat permukaannya juga mempengaruhi kemampuan untuk penyaringannya. Molekul dengan berat molekul seratus sampai beberapa juta dapat dikumpulkan dan dipisahkan dengan metode ini (Nur dan Adijuwana, 1989).

Filtrasi dengan menggunakan gel sephadex merupakan separasi kromatografi berdasar afinitas. Molekul-molekul sephadex yang bersilang menjamin penyaringan yang selektif. Kekuatan mekanis sephadex tergantung pada tingkat ikatannya (*cross linking*) yang akhirnya menjamin porositas partikel-partikel itu (Dowson *et al.*, 1984). Tiap-tiap sephadex G memiliki selang berat molekul yang dapat dipisahkan, sedangkan karakteristik sephadex G-200 terdapat pada tabel 2.1. (Anonymous, 1985).



Tabel 2.1. Karakteristik sephadex G-100 dan G-200

Sephadex	Kisaran Molekul berat fraksi		Diameter (Um)		Vol. Cairan untuk 1gr	BM media yang bisa dilewatkan (Dalton)
	Peptida	Dextran	Kering	Basah		
G-200	$5-600 \times 10^3$	$1-200 \times 10^3$	40-120	129-388	30-40	$6 \times 10^4 - 8 \times 10^6$

Molekul-molekul dengan berat di atas batas atas selang ini tidak dapat menembus gel dan masuk kedalam volume yang kosong. Molekul-molekul yang lebih kecil biasanya dilepas (*Dielusi*) setelah molekul-molekul yang lebih besar dilepas terlebih dahulu (Adimoelja, 1984).

Pemisahan menggunakan filtrasi, didapatkan spermatozoa X bergerak turun berdasarkan berat jenis dan motilitasnya sendiri, sedangkan Y masih ditahan oleh partikel-partikel gel sephadex, sehingga tidak dapat turun. Penyebab lain adalah tertariknya spermatozoa Y yang bermuatan negatif dengan sephadex yang bermuatan positif, dengan demikian dapat difahami jika spermatozoa X yang bermuatan positif akan dilepaskan, sedangkan spermatozoa Y yang bermuatan listrik negatif akan ditarik, hal ini menurut pendapat Ericson dan Glass (1982) dalam Hafez (1993). Filtrasi dengan sephadex dihasilkan 70 persen spermatozoa X pada filtrat (Hafez, 1993). Hasil penelitian Mahaputra dkk (1989) bahwa untuk memisahkan spermatozoa domba dengan sephadex kolom G-200 berhasil mendapatkan spermatozoa X dan Y dengan perbandingan 81,3 persen dan 18,7 persen. Sementara sebelumnya penelitian serupa, yaitu dengan menggunakan

sephadex G-200 telah dilakukan oleh Adimoelja dkk (1984) pada domba dihasilkan 87 persen spermatozoa X. Pada manusia oleh Steeno *et al.*, (1975) berhasil memisahkan 90 persen. Meskipun data tentang keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y akhir-akhir ini diragukan, namun data Geier *et al.*, (1990) membuktikan bahwa pemakaian metode pemisahan ini menghasilkan kelahiran bayi perempuan 80 persen. Hal ini bersesuaian dengan hasil penelitian Susilawati dkk (1997) pada spermatozoa sapi yang menggunakan sephadex G-200 didapatkan kelahiran pedet betina sebesar 82,5 persen dari 40 ekor pedet.

2.1.2. Seleksi jenis kelamin menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Percoll adalah medium yang terdiri dari partikel koloid yang diselaputi dengan *poly vinylpyrrolidone* (PVP) yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Selama ini percoll dapat digunakan untuk memisahkan darah seperti fraksi-fraksi limfosit, monosit, eritrosit dan thimosit. Juga partikel sub seluler seperti membran plasma, liposom dan mitochondria, selain itu juga dapat digunakan untuk memisahkan virus, bakteri dan spermatozoa (Mc Clure *et al.*, 1989).

Menurut Kaneko *et al.*, (1983) penggunaan percoll dalam pemisahan spermatozoa dianggap memenuhi syarat karena percoll mempunyai sifat yang diperlukan antara lain : dapat dibuat dalam berbagai densitas, viskositas rendah, tidak toksik, tidak dapat menembus membran sel, dapat

disterilkan, tidak mempunyai efek negatif pada pemisahan spermatozoa, mudah dilepaskan dari zat yang dipisahkan, mudah membentuk gradien sendiri meskipun dengan pemutaran rendah.

Sifat-sifat fisik percoll menurut Pharmacia Fine Chemical t.t. seperti yang dikutip oleh Downson *et al.*, (1986) yaitu :

1. Komposisi

Percoll mengandung partikel koloid silika yang dilapisi dengan polyvinylpyrrolidone (PVP) berdiameter rata-rata 12 sampai 22 nm (dengan kisaran 15 sampai 30 nm).

2. Viskositas

Percoll mempunyai viskositas 10 ± 5 sentipois pada suhu 20°C . Viskositas percoll lebih rendah dalam larutan garam (0,15 M NaCL) dari pada dalam air maupun dalam 0,25 M sukrosa, sehingga pembentukan gradiennnya lebih cepat.

3. Osmolaritas dan pH

Percoll mempunyai pH $8,90 \pm 0,30$ pada suhu 20°C , namun percoll juga mempunyai kapasitas buffer yang rendah, sehingga dengan mudah disesuaikan menjadi pH 5,50 sampai 10 tanpa merubah sifat-sifatnya. Osmolaritasnya rendah (lebih kecil dari 20 mOs/kg H_2O) dengan demikian dapat membentuk gradien osmolaritas , sehingga diperoleh gradien densitas yang iso-osmotik dan betul-betul sesuai dengan keadaan

fisiologis, karena itu bisa diperoleh sel dengan viabilitas tinggi dan morfologi yang utuh.

4. Densitas

Percoll mempunyai densitas $1,13 \pm 0,005$ g/ml dan dapat membentuk gradien densitas dibawah 1,13 g/ml. Untuk pemisahan sel-sel diencerkan dengan garam fisiologis atau medium kultur jaringan sehingga densitasnya lebih rendah.

Pemisahan spermatozoa menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll, lebih baik jika dibandingkan dengan media lain. Hal ini disebabkan variasi densitas percoll dapat dengan mudah dibuat (Mohri, 1987). Pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi lebih baik dilakukan pada waktu yang cepat, karena untuk menghindari besarnya gesekan akibat sentrifugasi dan terjadinya difusi medium pengencer kedalam spermatozoa (Hafez, 1993).

Kaneko *et al.*, (1983) melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y pada manusia dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll didapatkan spermatozoa Y sebesar 73,1 persen pada densitas 1,06 mg/ml yang terus menurun dengan meningkatnya densitas percoll, dan akhirnya pada sedimen didapatkan 17,4 persen (Densitas lebih dari 1,11 g/ml). Schwerin *et al.*, (1991) melakukan sentrifugasi menggunakan gradien densitas percoll *discontinuous* gradien terdiri dari 10 lapisan masing-masing 0,6 ml larutan percoll dengan densitas antara 1,034 dan 1,068 g/ml. Medium

gradien adalah TCM 199 ditambah buffer bikarbonat 0,35 g/liter. 30 – 45 juta spermatozoa diencerkan dalam 1,5 ml TCM 199 dalam 10 persen *fetal calf serum (FCS)* ditempatkan dalam gradien yang bersuhu 4-6°C disentrifugasi 500 G selama 10 menit dihasilkan spermatozoa X atau Y lebih dari 90 persen. Hasil penelitian Susilawati dkk (1996) dengan metode yang sama tetapi disentrifugasi 2250 rpm (850 G) selama 5 menit, menghasilkan ratio spermatozoa atas dasar ukuran kepala spermatozoa sebesar 83,1 persen dengan penurunan motilitas sekitar 10 persen. Penambahan serum berpengaruh positif terhadap motilitas spermatozoa, menurut Par (1998) bagian yang berpengaruh meningkatkan motilitas adalah protein dengan berat molekul 180 KD setelah diidentifikasi lebih lanjut adalah imunoglobulin G4 dan apolipoprotein.

2.2. Fungsi membran dan analisa integritas membran spermatozoa.

Penurunan fungsi spermatozoa karena sedikitnya spermatozoa perezakulat, penurunan motilitas yang progresif dan bentuk yang normal, lama hidup dan adanya kelainan integritas membran spermatozoa yang akan mengakibatkan gagalnya proses fertilisasi (Ohl & Menge, 1996). Terdapat korelasi yang nyata antara motilitas spermatozoa dengan derajat integritas membran yang disebabkan oleh kerusakan ultra struktur, biokimia dan fungsi membran (Malmgre and Martinez, 1996; Soderquist *et al.*, 1997). Membran bagian kepala spermatozoa memegang peranan pada saat kapasitas, reaksi akrosom dan penetrasi zona pellusida ovum saat

penetrasi, sedangkan membran bagian ekor berfungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi yang digunakan untuk pergerakan (Pedersen & Fawcett, 1976; Zaneveld, 1985).

Membran spermatozoa terdiri dari dua lapisan fosfolipid yang susunannya adalah kepala lapisan fosfolipid hidrofilik membentuk permukaan membran bagian luar, sedangkan permukaan membran bagian dalam lapisan fosfolipid yang bersifat hidrofobik. Diantaranya terdapat protein globular dan protein fibrous dengan distribusi yang bervariasi, ada yang terletak dipermukaan luar, dalam dan menembus membran (sebagai suatu jembatan) sifat fluiditas membran menyebabkan protein-protein ini dapat bergerak dengan bebas. Sebagian besar karbohidrat terdapat pada daerah eksternal dari dua lapisan fosfolipid yang disebut glikokalik (Capaldi, 1974; White *et al.*, 1985; Keeton & Gould, 1986; Evan & Graham, 1989 dan Darnel *et al.*, 1990). Fosfolipid merupakan bagian integral membran spermatozoa yang sangat berperan pada permeabilitas membran, reaksi enzim-enzim yang terdapat pada membran spermatozoa, dan perubahan spermatozoa pada traktus genitalia betina yaitu proses-proses kapasitasi dan proses fertilisasi (White *et al.*, 1976). Fosfolipid merupakan komponen membran spermatozoa yang berfungsi sebagai stabilisator, penyerapan dan proses penyempurnaan fosfolipid terjadi selama proses maturasi di epididimis bersamaan dengan struktur membran dan penyempurnaan sifat permeabilitas membran (Hafez & Prasad, 1976).

Integritas membran spermatozoa dapat diamati dengan evaluasi respons spermatozoa pada kondisi hipoosmotis. Metode *Hipoosmotis swelling test* (Hos tes) berfungsi untuk menguji intak membran yang masih berfungsi dengan aktif bila terjadi pembengkakan spermatozoa. Hal ini karena efek larutan hipoosmotik yang menyebabkan terjadinya transport air yang masuk kedalam membran spermatozoa, sedangkan spermatozoa yang mempunyai membran yang rusak atau membran yang tidak aktif, tidak dapat menyesuaikan tekanan osmosenya sehingga tidak menggelembung (Corea *et al.*, 1996).

Integritas membran dapat diamati dengan memasukkan media isoosmotik ke hipoosmotik dengan perbedaan 290 osmol kg (Gilmore *et al.*, 1996) . Sedangkan menurut Corea *et al.* (1996) dan Corea *et al.*, (1987) dengan larutan hipoosmotik sebesar 100 osmol kg⁻¹ dan diamati dengan mikroskop fasekontras,. Maxwell and Johnson (1997); Magistrini *et al.*, (1997) menyatakan bahwa integritas membran dapat diamati dengan pewarna SyBR-14 (Fertilight™, Molecilar probes, Eugene, OR) yang dikombinasi dengan pewarna propidium iodide (PI), sedangkan status membran spermatozoa dapat diamati dengan FITC-Conjugated lectin yaitu FITC-PSA conjugate (Pisum sativum, FITC labelled, salt-free lyophilized powder, sigma L-0770) yang dikombinasi dengan propidium iodide (PI). Integritas membran juga dapat diamati dengan menggunakan *Scanning Electrone Microscope* (SEM) yang sebelumnya spermatozoa dilakukan

fiksasi dengan 3% glutaral dehide dalam 0,067 M Cocodylate Buffer (50m osm, pH 7,2) kemudian didehidrasi dan selanjutnya dilakukan *coating* dengan menggunakan platinum atau gold (Soderquist *et al.*, 1997).

2.3. Peran kalsium pada kapasitasi dan fungsi membran.

Spermatozoa harus menjalani perubahan-perubahan fisiologis yang disebut dengan kapasitasi sebelum dapat mengaktifkan ovum pada kelinci, tikus, sapi dan mungkin juga hewan lainnya (Hafez, 1993). Menurut Bedford, (1970); Austin dan Shorth (1972); Burk dan Sailing, (1992) kapasitasi adalah suatu proses persiapan dan perubahan fisiologis spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina yang bertujuan untuk mempertinggi daya fertilisasinya. Latar belakang teori yang dapat dikembangkan adalah, untuk meningkatkan kemampuan fertilisasi dengan hilangnya kholesterol selama kapasitasi atau hubungan antara ratio kholesterol dengan phospolipid pada waktu kapasitasi (Roldan and Gomendio, 1992). Selama proses kapasitasi diikuti oleh perubahan - perubahan pada akrosom untuk persiapan proses penetrasi spermatozoa pada ovum, (Austin dan Short, 1972); (Burk dan Sailing, 1992) dan (Hafez, 1993). Di dalam saluran reproduksi jantan dan dalam bentuk semen, kapasitasi spermatozoa dihambat karena adanya D-fruktose. (Mohri *et al.*, 1993 dan Ball *et al.*, 1992).

Yanagimachi, (1988); Roldan dan Gomendio (1992); Dasgupta *et al.*, (1993) berpendapat bahwa untuk menjalani reaksi akrosom pada saat

dan tempat yang tepat, spermatozoa harus bertahan cukup lama, pada saat itu konsentrasi ion K^+ intra seluler yang dijaga tetap tinggi dan konsentrasi ion Na^+ dan Ca^+ intraseluler yang dijaga tetap rendah, hal ini sangat penting bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Keadaan ini diatur oleh ikatan membran $Na^+ - K^+ - ATPase$ yang memompa ion Na^+ ke luar dan ion K^+ ke dalam sel dan $Ca^{2+} - ATPase$ yang memompa Ca^{2+} ke luar dari sel. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Roldan and Gomendio (1992) dan Parish *et al.*, (1993) yang menyatakan bahwa terjadi peningkatan level kalsium *intra* Seluler saat kapasitasi spermatozoa sapi. Selain itu menurut Th'erien *et al.*, (1997) terdapat lipoprotein yang hampir sama yang dihasilkan oleh vesica seminalis yang dinamakan Bsp A1, A2, A3 dengan berat 30kd. Protein ini diikat oleh phospholipidcholin pada permukaan spermatozoa setelah ejakulasi dan apabila berikatan dengan heparin akan menyebabkan terjadinya kapasitasi dan reaksi akrosom.

Kejadian utama kapasitasi adalah pengaturan kembali biokimia membran spermatozoa dalam hal ini kapasitasi spermatozoa sapi dilakukan dengan heparin. Inkubasi spermatozoa dengan heparin sebanyak 10 g/ml selama 4 jam dapat meningkatkan persentase spermatozoa untuk menjalani reaksi akrosom dari 10 persen menjadi 70 persen. Parrish *et al.*, (1988) dan Fukui *et al.*, (1990) menyatakan bahwa keberhasilan fertilisasi meningkat dengan meningkatnya heparin dari 0 sampai 25 g/ml dengan waktu optimal sekitar 25 menit. Penambahan kafein meningkatkan

keberhasilan fertilisasi spermatozoa dengan indikasi peningkatan persentase kapasitas dan reaksi akrosom hal ini menurut pendapat Kim *et al.*, (1990); Youssef *et al.*, (1997). lebih lanjut menurut Park, Ohgoda dan Niwa (1989) kafein dan heparin bekerja sama secara sinergis untuk mempercepat kapasitas dan reaksi akrosom. Hal ini dipakai sebagai teknik persiapan spermatozoa yang baik oleh Brackett dan Oliphant (1975); Nakao dan Nakatsuji (1990) mereka melakukan pencucian spermatozoa dalam media Brackett and Oliphant (BO) tanpa Bovine Serum Albumin (BSA) tetapi mengandung 10 mM kafein.

Yanagimachi (1988) mengemukakan bahwa tidak ada suatu komponen tertentu pada media yang diperlukan untuk kapasitas, karena pada media yang kekurangan K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , substrat-substrat energi eksogen, albumin atau bahkan Na^+ dan Cl^- , akan tetap terjadi kapasitas selama media dan energi endogen masih mendukung kelangsungan hidup spermatozoa. Akan tetapi menurut Gordon (1994) reaksi akrosom bisa terjadi setelah dipicu oleh adanya ion kalsium di luar sel, karena tanpa adanya ion kalsium diluar sel akan gagal terjadi reaksi akrosom pada seluruh ternak mammalia. Dua pernyataan tersebut adalah berlawanan sehingga perlu adanya pembuktian pengaruh ion kalsium terhadap kapasitas dan reaksi akrosom.

Penggunaan ionophore A23187 karena menurut Gordon (1994); Fraser *et al.*, (1995); Heras *et al.*, (1997) Calcium ionophore A23187 dapat

menyebabkan ion kalsium bebas keluar masuk melalui membran spermatozoa, sehingga ion kalsium intra seluler meningkat secara langsung dan menyebabkan terjadinya kapasitasi.

Mattioli *et al.*,(1996) dan Kaul *et al.*, (1997) menjelaskan bahwa pewarnaan Chlortetracycline (CTC Staining) pada spermatozoa dapat memperlihatkan tiga bentuk pendaran fluorescen, yaitu (A) Distribusi fluorescen yang merata pada kepala spermatozoa, (B) Fluorescen terkonsentrasi pada daerah post-acrosomal dan (C) Fluorescen terkonsentrasi pada daerah pangkal akrosom. Prinsip dari metode CTC ini adalah CTC yang mengandung fluorescen mengikat kalsium pada membran plasma spermatozoa dan terdistribusi pada kepala spermatozoa yang dapat berubah sesuai dengan kondisi kapasitasi. Fakta ini telah berhasil digunakan untuk mengetahui kapasitasi *in vitro* pada spermatozoa tikus, manusia, monyet, kuda, sapi, babi dan domba (Perez, *et al.*, 1997). Bedford (1983) dalam Hafez (1987); Fraser (1998) menyatakan bahwa reaksi akrosom meliputi fusi dari membran plasma spermatozoa dengan membran luar akrosom yang diikuti dengan perluasan vesikulasi dan berakhir pada segmen anterior akrosom . Fusi dan vesikulasi dari akrosom melepaskan enzim hyaluronidase dan acrosin dalam penetrasi ovum. Menurut Fraser (1995) mekanisme kontrol ion kalsium *intraseluler* dapat mengatur kemampuan fertilisasi spermatozoa. Menurut pendapat Yanagimachi (1988) pada saat kapasitasi protein membran menjadi aktif

untuk membantu difusi ion kalsium, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi ion kalsium pada akrosom yang menyebabkan transport Na^+ - K^+ menjadi non aktif. Na^+ intra seluler meningkat dan ion H^+ keluar melalui anti porter Na^+/H^+ yang menyebabkan pH intra seluler meningkat. Ion kalsium masuk dan H^+ keluar menyebabkan perubahan pro akrosin menjadi akrosin, selain itu ion kalsium membantu penggabungan 2 selaput akrosom.

Hasil penelitian Susilawati dkk (1999) menunjukkan bahwa spermatozoa setelah filtrasi sephadex dan sentrifugasi dengan menggunakan gradien densitas percoll terjadi peningkatan gambaran kapasitasi dan setelah dilakukan inkubasi terjadi gambaran kapasitasi menjadi hilang dan mengalami penurunan motilitas.

Spermatozoa yang telah selesai mengalami reaksi akrosom pada umumnya merupakan akhir kapasitasi, tetapi terdapat kepala spermatozoa tanpa akrosom yang disebabkan oleh kerusakan membran. Oleh sebab itu perlu membedakan antara reaksi akrosom karena proses fisiologi secara normal atau hilangnya akrosom yang disebabkan oleh kerusakan fisik (Cross dan Meizel, 1989); Valcareel *et al.*, (1997). Perbedaan tersebut dapat diamati dengan kombinasi uji viabilitas menggunakan Hoechst bis-benzimide 33258 dan FITC-Con A , dua metode staining tersebut dapat membedakan reaksi akrosom secara fisiologi (terlepasnya akrosom dan

hidup) dan terlepasnya akrosom karena degeneratif (terlepasnya akrosom dan mati).





BAB III

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konseptual

Program pedet yang dihasilkan mempunyai jenis kelamin sesuai harapan sangat mendukung program pemuliaan dalam pemilihan bibit unggul serta menunjang efisiensi peternakan sapi potong dan sapi perah. Hal ini dapat dilakukan dengan cara pemisahan spermatozoa X dan Y.

Spermatozoa yang berkromosom X (spermatozoa X) dan spermatozoa yang berkromosom Y (spermatozoa Y) mempunyai beberapa perbedaan, antara lain ukuran kepala, motilitas, kandungan DNA dan muatan elektrostatis permukaan spermatozoa. Dari perbedaan-perbedaan inilah maka spermatozoa X dan Y dapat dipisahkan (Ericson and Glass(1982) dalam Hafez ,1993; De Jonge *et al.* ,1997).

Seleksi jenis kelamin dengan menggunakan filtrasi sephadex diharapkan mendapatkan spermatozoa X yang dapat lolos, sedangkan spermatozoa Y terikat oleh gelnya. Sephadex adalah suatu dextran yang digunakan untuk memisahkan sel berdasarkan besarnya sel dan muatan listrik yang dikandungnya. Untuk itu ukuran partikel sephadex dan kekuatan ikat elektrostatis partikel sephadex sangat menentukan keberhasilan pemisahan.

Seleksi jenis kelamin juga dapat menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll yang biasanya digunakan untuk memisahkan sel. Tingginya densitas, kecepatan dan lamanya sentrifugasi berpengaruh terhadap efektifitas pemisahan, sehingga kombinasi yang tepat akan

menghasilkan efektifitas pemisahan yang tinggi dengan spermatozoa yang dapat bertahan hidup.

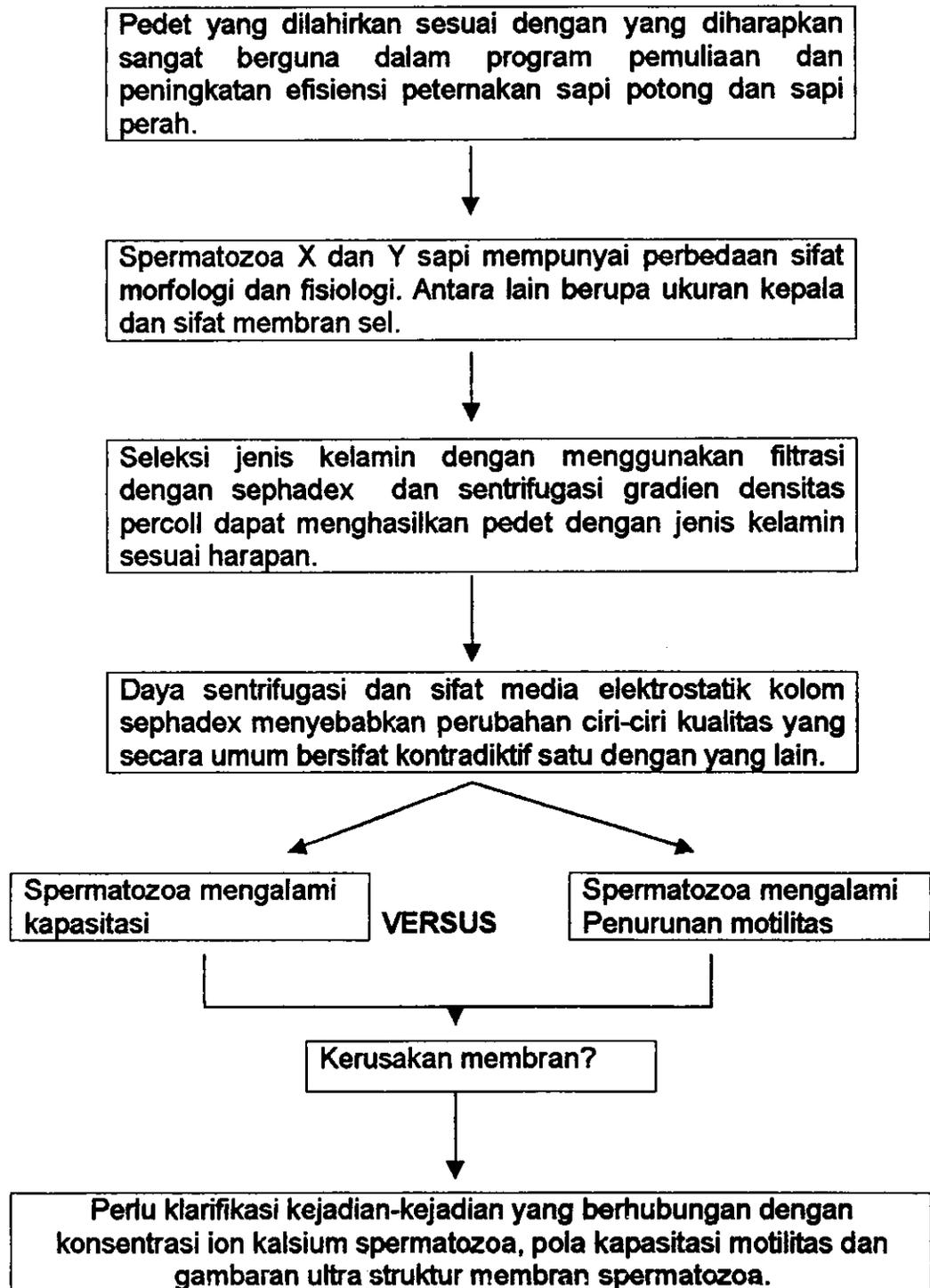
Pada proses seleksi jenis kelamin menggunakan filtrasi sephadex terdapat pengaruh medan elektrostatis dari sephadex pada spermatozoa, sedangkan pada proses pemisahan spermatozoa menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll terdapat gesekan antara medium dengan spermatozoa. Hal ini kemungkinan berpengaruh terhadap perubahan struktur maupun sifat spermatozoa.

Peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler seperti halnya dalam proses kapasitasi selalu diikuti dengan hiperaktivasi berupa peningkatan motilitas spermatozoa (Yanagimachi, 1988). Sedangkan dari hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pada spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi atas dasar pewarnaan CTC diduga mengalami kapasitasi, akan tetapi motilitasnya justru menurun (Susilawati dkk, 1998). Hal yang terlihat kontradiktif ini perlu klarifikasi lebih lanjut. Tingginya konsentrasi ion kalsium pada sperma hasil pemisahan bila memang benar karena peningkatan ion kalsium intra seluler, maka terganggunya motilitas mungkin karena kerusakan fungsi membran. Lebih jelasnya ditulis dalam diagram alir kerangka konseptual

3.2. Hipotesis penelitian

Penurunan motilitas dan viabilitas, serta perubahan konsentrasi ion kalsium spermatozoa pada proses filtrasi dan sentrifugasi adalah akibat dari kerusakan membran spermatozoa.

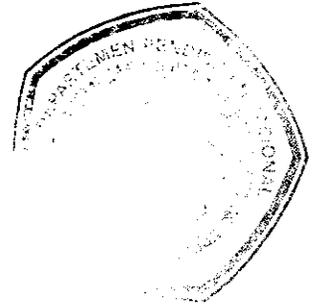
Diagram alir kerangka konseptual:





BAB IV

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN



4.1. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di :

1. Balai Inseminasi Buatan Singosari Untuk uji kualitas awal
2. Laboratorium Mikroskopi Universitas Airlangga untuk pengamatan ultra struktur membran spermatozoa.
3. Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya untuk eksperimen filtrasi sephadex, sentrifugasi gradien densitas percoll dan pembuktian perubahan fungsi membran spermatozoa.

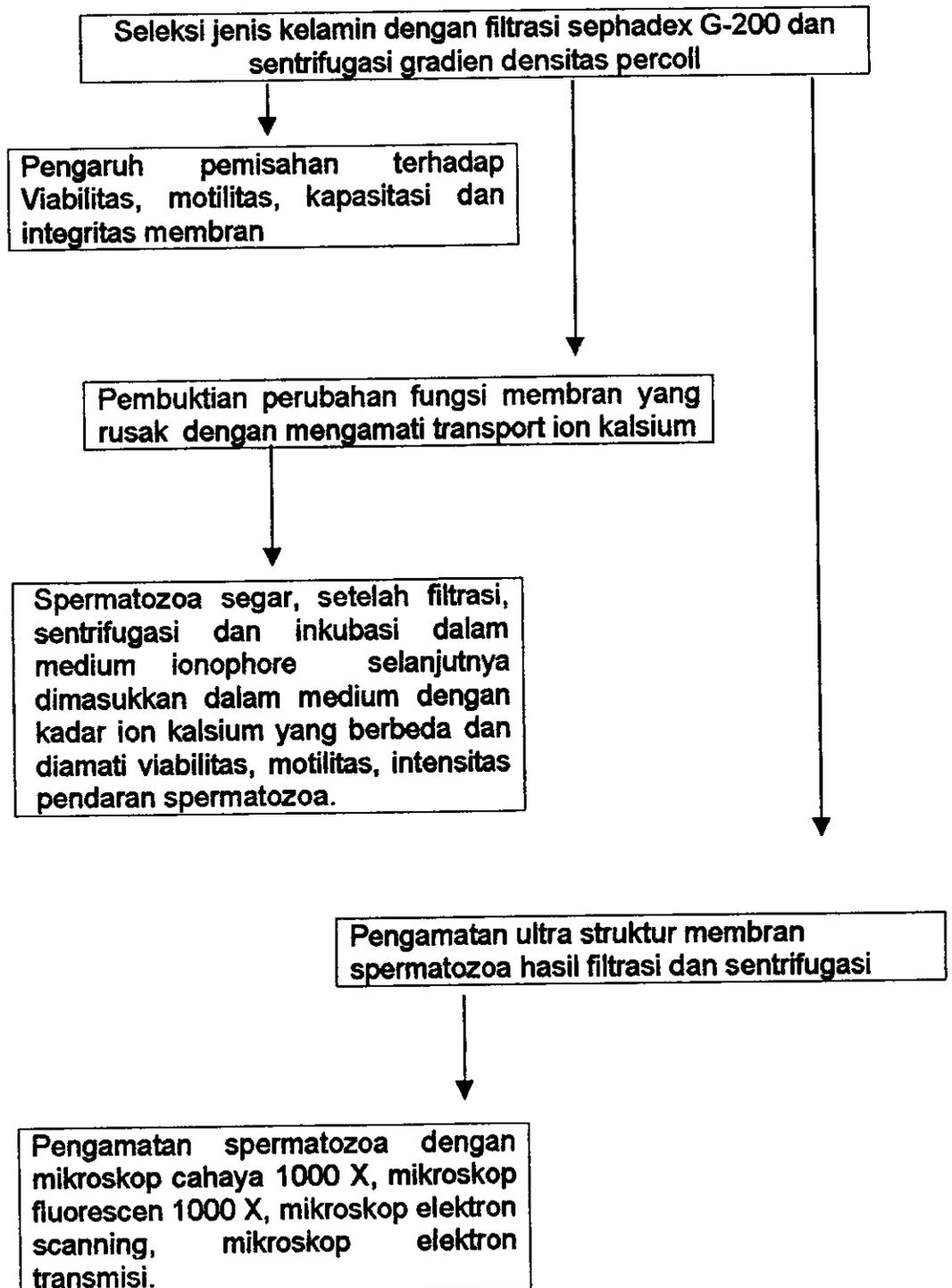
Penelitian ini berupa penelitian experimental terdiri dari tiga penelitian yaitu :

1. Penelitian pengaruh filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap pola kapasitasasi , viabilitas, motilitas spermatozoa dan integritas membran spermatozoa.
2. Eksperimen pembuktian perubahan fungsi membran spermatozoa
3. Pengamatan ultra struktur membran spermatozoa hasil filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Untuk lebih jelasnya terdapat pada diagram alir kerangka operasional.

Sampel semen yang digunakan berasal dari 2 ekor sapi bali yang ada di Balai Inseminasi Buatan Singosari yang telah dilakukan penampungan secara rutin selama 4 tahun. Penampungan dilakukan

Bagan alir kerangka operasional



seminggu sekali untuk diberi perlakuan sesuai yang ditentukan dan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali.

4.2. Alat dan bahan yang digunakan.

Alat yang digunakan : Statif dan klem; kolom (Ukuran panjang 17 cm, diameter atas 1,8 cm dan diameter bawah 0,5 cm pada bagian leher dipasang glass wool); Tabung reaksi berukuran (15 ml); Tabung reaksi (5ml); Tabung ependorf (1.5ml); Mikropipet (200 – 1000 μ l dan 5-50 μ l); Erlenmeyer (50 ml, 100 ml); Gelas beker (50 ml, 100 ml, 500 ml dan 1000 ml); Pipet pasteur; pH meter; Neraca analitis (Sartorius); Sentrifuge (Labofuge B); Autoclave; Oven; Mikroskop cahaya binocular (Nikon); Mikroskop epifluorescent eksitation Blue violet dan violet (Nikon); Mikroskop Fasekontras (Nikon); Objek glass dan cover glass; Ose; Tissue, aluminium foil, Parafilm, Vagina buatan; Vortex; Water bath, Alat- alat untuk pengamatan mikroskop elektron :Staining jar, Grade, Mikroskop inverted, Mikroskop elektron scanning dan transmisi (Geol), Holder, Stub, Ultra mikrotom

Bahan-bahan yang digunakan : Semen sapi Bali dari BIB Singosari Malang dengan persyaratan motilitas individu di atas 70 persen dengan konsentrasi di atas 1000 juta/ml ; PBS Dulbeccos (Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4); Sephadex G-200 (Sigma); Percoll (Sigma); TCM 199 (Sigma); Earle Balance Solution ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , KCl , NaCl , NaH_2PO_4 , D-Glucose, Phenol Red-Na); Fetal Bovine Serum (Sigma); NaHCO_3 ; Chlortetracycline (Sigma); 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-Octane- Dabco (Sigma); Paraformal dehide(Sigma); Triz Benzimide(Sigma); L-Cystein (Sigma);

NaCL Fisiologis (0,9%NaCL); Bis Benzimide (Sigma); FITC- Concanavaline A (Sigma); Aquades ; Aquabides dan diionize water. Bahan-bahan untuk pengamatan dengan mikroskop elektron adalah: Glutaral dehide (Merck), Osmium tetraoksida (OsO₄) (Merck), Alkohol absolut, Amil asetat, Emas 24 karat, Agar, Posphat buffer, Propilen oksida absolut, Epon,PO, Toluidine blue, Uranyl asetat, BB sitrat.

Tahapan percobaan pada masing-masing penelitian adalah sebagai berikut :

4.3. Penelitian pengaruh filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll .

4.3.1. Rancangan percobaan I.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 10 ulangan. Perlakuan dalam penelitian ini adalah ①) Kontrol,(2) Filtrasi sephadex G-200 dan (3) sentrifugasi gradien densitas percoll dan (4) inkubasi dalam ionophore. Sedangkan parameter yang diukur adalah: motilitas, viabilitas, gambaran kapasitasi , dan integritas membran.

4.3.2. Pelaksanaan penelitian

a. Filtrasi sephadex G-200

Pembuatan medium .

1. Medium pengencer sephadex yaitu PBS dulbeccos

2.16 gr Na₂HPO₄.; 8 gr NaCL; 0.2 gr KH₂PO₄ ; 0.2 gr KCL di masukkan dalam aquabides sebanyak 1 liter dan diaduk sampai merata, sehingga dapat disimpan dalam refrigerator sampai larutan ini digunakan.

2. Medium 4 persen dalam TCM 199.

0,98 gram TCM 199 powder dimasukkan dalam aquabides steril sebanyak 100 ml diaduk sampai merata kemudian diatur pHnya agar mencapai 7,2 – 7,5 dengan menambahkan NaHCO_3 sedikit-demi sedikit.

Cara pembuatan larutan 4 % FBS dalam TCM 199 adalah 4 ml FBS dimasukkan dalam 96 ml larutan TCM 199 kemudian diaduk sampai rata. Larutan tersebut dibuat sesaat sebelum digunakan dan saat digunakan dihangatkan pada suhu 30°C .

Pembuatan gel sephadex dalam kolom

1. Persiapan kolom

Kolom dengan ukuran diameter atas 1,8 cm, Tinggi 17 cm, diameter bawah 0,1 cm dipasang *glass wool* pada dasar lehernya dan pada ujung bawah di pasang slang dari karet dan dipasang tegak pada statip.

2. Pembuatan gel sephadex

1 gram sephadex diencerkan dengan 100 ml PBS dulbeccos dan diaduk sampai rata, kemudian dimasukkan dalam kolom yang telah disediakan dan ujung bawahnya dijepit dengan klem dan ditunggu gel sephadex sampai mengeras.

3. Pelaksanaan filtrasi

Spermatozoa yang memenuhi syarat (motilitas diatas 70 persen dan konsentrasi $2-5 \cdot 10^9$) sebanyak 1 ml dimasukkan dalam kolom yang berisi gel sephadex, penutup kolom bagian bawah dibuka dan ditetesi terus menerus dengan 4 persen FBS dalam TCM 199 dan filtrat di tampung dalam tabung yang berisi 1 ml, bila telah penuh dipindahkan ketabung berikutnya sampai tidak terdapat spermatozoa. Hasil filtrasi diamati

persentase hidup, motilitas , integritas membran dan gambaran kapasitas spermatozoa.

b. Sentrifugasi gradien densitas percoll

1. Pembuatan gradien densitas percoll

Gradien densitas yang digunakan adalah 1,036; 1,038; 1,043; 1,047; 1,052; 1,055; 1,057; 1,0605; 1,065 sampai 1,070 yang diperoleh dari pengenceran percoll dengan 4 persen FBS dalam TCM 199 menjadi 21,7 %; 28,7%; 32,4%; 36,1% ; 39,8%; 43,5%; 47,5 %; 50,9%; 55% dan 60 %. Kemudian larutan dari berbagai densitas tersebut disusun dalam tabung secara berurutan dari densitas tertinggi sampai terendah masing-masing 0,5 ml.

2. Pelaksanaan sentrifugasi .

1 ml semen yang telah memenuhi syarat dimasukkan tabung yang telah berisi gradien densitas percoll, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm (850 G) selama 5 menit. Hasil sentrifugasi menjadi 6 lapisan pada lapisan teratas adalah seminal plasma dibuang dan pada lapisan kedua adalah yang banyak mengandung spermatozoa Y sedangkan hanya pada lapisan bawah yang banyak mengandung spermatozoa X diambil dan dimasukkan dalam tabung yang telah berisi 4% FBS dalam TCM 199 sebanyak 3 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm (380 G) selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan 2 ml cairan yang banyak mengandung spermatozoa.

c. Pengamatan persentase hidup spermatozoa dengan dua metode yaitu (1) Pewarnaan dengan eosin - negrosin dan (2) *supravital stain* dengan Fluorochrome.

1. Pewarnaan dengan eosin - negrosin.

Semen dan larutan eosin-negrosin diletakkan pada objek glass, kemudian dicampur dan dibuat smear dan dikeringkan. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna sedangkan yang hidup tidak menyerap warna.

2. *Supravital stain* dengan fluorochrome

Jumlah ratio sel hidup dan mati diamati dengan pewarnaan *diferensial fluorochrome* seperti yang dilaporkan oleh Handyside and Hunter (1984) dengan sedikit modifikasi. Spermatozoa dengan konsentrasi 2×10^6 sel/ml diinkubasi dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) Bisbenzimidazole atau hoechst ($10 \mu\text{g/ml}$) selama 30 menit dalam inkubator $38,5^\circ\text{C}$. Setelah diinkubasi spermatozoa diulas pada glass objek dan ditutup dengan gelas penutup. Semua pekerjaan diusahakan sesedikit mungkin terkena cahaya. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *fluorescent*. Inti dari sel yang hidup (bis benzimidazole- positif) akan mengambil warna hijau kebiruan

D. Pengujian Motilitas

Spermatozoa yang akan diuji ditetaskan dalam gelas objek yang terdapat lekukan dibagian tengah, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Dari seratus spermatozoa dihitung spermatozoa yang bergerak maju kedepan (Hafez, 1980).

E. Pengamatan kapasitas spermatozoa dengan pewarnaan Chlortetracycline (CTC).

1. Persiapan Reagen

Langkah 1 : Pembuatan Larutan DABCO

1. 250 mg DABCO (D-2522) dilarutkan dalam 9 ml gliserol (ditempatkan dalam tabung yang dibungkus aluminium foil agar terlindung dari sinar).
2. Diletakkan pada waterbath dengan temperatur 37°C selama 3-4 jam dan dikocok dari waktu ke waktu.
3. Tambah 1 mililiter PBS dulbecco's ke dalam larutan dan dicampur hingga merata.
4. Larutan dibagi dalam 3 tabung tertutup yang dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan di Freezer.

Langkah 2 : Pembuatan CTC Buffer 20mM NaCL

1. 0.2422 gram tris (Trizma base, Sigma T-1503) dan 0.7592 gram NaCL dilarutkan kedalam 100 mililiter *Diionized water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

Langkah 3 : Fixative Buffer : 1 M Tris (Trizma base Produksi Sigma T-1503)

1. 6.057 gram Tris dilarutkan dalam 50 mililiter *Diionized Water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

Langkah 4. Paraformaldehyde 25% (Sigma P-6148).

1. 12.5 gram *paraformal dehyde* dilarutkan dalam 50 mililiter *Diionize Water* yang dikerjakan di ruang asam (lemari uap).

2. Larutan dipanaskan sambil *distirer* sampai berwarna putih susu (5 sampai 10 menit) dan di tambahkan 1 M NaOH sampai larutan menjadi terang .

Langkah 5. CTC Fixative : 12.5% Paraformaldehyde dalam 0.5 Tris.

1. Larutan *paraformaldehyde* (langkah 4) dicampur dengan larutan *buffer* 1 M Tris (langkah 3) 1: 1.
2. PH diatur sampai 7.4 dengan 0.2 M HCL secara hati-hati, selanjutnya disimpan dalam refrigerator..

Langkah 6. Larutan Pewarna CTC

1. 0.0044 gram CTC powder (Sigma C-7880) dimasukkan dilam tabung yang dibungkus dengan aluminium foil ditambahkan 0.0044 gram L-Systein (*Hydrochloride Monohydrate*) dan ditambahkan 5 mililiter *CTC Buffer* (Langkah2).
2. PH diatur sampai 7.8 dengan 0.2 M HCL secara hati-hati.

Catatan : Ada 3 reagen akhir yaitu :

1. Larutan DABCO
2. Larutan CTC Fixative
3. Larutan Pewarna CTC

Metode yang digunakan adalah modifikasi metode yang diuraikan oleh Fraser (1995) dengan cara sebagai berikut : 45 μ l larutan pewarna CTC dimasukkan dalam tabung ependorf kapasitas 1,5 ml yang ditutup dengan aluminium foil, lalu ditambah 8 μ l CTC fiksatif dan di vortex selama 1 menit, larutan tersebut diambil 10 μ l dan ditempatkan pada objek glass , kemudian ditambahkan 10 μ l DABCO dan dicampur secara hati-hati

kemudian ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya ditutup dengan kertas tissue yang tebal dan ditekan secara hati-hati, selanjutnya tepi *cover glass* ditutup dengan *cutex*. Gambaran yang tampak adalah : 1) Kepala spermatozoa keseluruhan berwarna terang adalah spermatozoa yang belum kapasitasasi 2) Kepala spermatozoa separo bagian atas berwarna terang adalah spermatozoa yang mengalami kapasitasasi 3) Kepala spermatozoa tidak berwarna terang dan hanya bagian tengah saja yang terang adalah spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom .

F. Evaluasi status akrosom dengan FITC- Con A

Spermatozoa difiksasi dengan 4% *formal dehyde* , kemudian dicuci dengan penambahan PBS 3 ml dan disentrifugasi 4000 G selama 30 menit , kemudian dibuang supernatannya dan dimasukkan 0,1 ml FITC con A (Sigma) yang mengandung 10 $\mu\text{g/ml}$ dalam PBS dulbeccos. Staining dilakukan selama 25 menit pada suhu ruangan, selanjutnya dicuci 2 kali dengan sentrifugasi 4000G selama 10 menit, supernatan dibuang dan endapan ditaruh pada slide , ditetesi 90% gliserol selanjutnya diamati dengan pembesaran 400 kali dengan mikroskop *Fluorescent* (Nikon, Japan). Tiap spesimen diamati dengan epifluorescen illumination dengan *excitation B* (*Excitation* 490 nm dan Emisi 525 nm) untuk mengamati terdapatnya *fluorescent* pada spermatozoa hasil FITC dengan menggunakan modifikasi dari metode Nishikima (1997).

H. *Hypoosmotic swelling Test* (HOS TES).

Untuk mengamati integritas membran spermatozoa dilakukan dengan HOS TES sesuai dengan (Jayendra *et al*, 1984 dan WHO, 1992)

dengan urutan kerja sebagai berikut : 1 ml larutan hiposmotik 150 m osmol (yang dibuat dari 7,35 gram natrium sitrat. $2\text{H}_2\text{O}$, 13.52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquades) ditambah dengan 0.1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya diamati dengan pembesaran 400 X perubahan yang khas yaitu adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujungnya .

4.4 .Eksperimen pembuktian perubahan fungsi membran spermatozoa

Percobaan ini adalah pengamatan perubahan fungsi membran dengan melihat transport ion kalsium, yaitu dengan cara memasukkan spermatozoa hasil perlakuan kedalam medium bebas ion kalsium , mengandung ion kalsium standard 1,80 mmol $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ dan medium ion kalsium tinggi 3,60 mmol $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$. Pada spermatozoa yang sistim membrannya berfungsi maka kandungan ion kalsium diluar sel tidak akan merubah konsentrasi ion kalsium dalam sel. Selain itu juga dilakukan percobaan memasukkan spermatozoa segar kedalam Ionosphere A23187, kemudian dimasukkan medium berkadar ion kalsium yang berbeda dapat keluar masuk dengan bebasnya. Dengan demikian bisa dibandingkan apakah mekanismenya sama antara pengaruh filtrasi dan sentrifugasi percoll dengan pengaruh inkubasi Ionosphere A23187.

4.4.1. Rancangan percobaan II

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan faktorial dengan ulangan 10 kali, sedangkan perlakuan dalam percobaan ini adalah (1) Kontrol, filtrasi sephadex G-200, sentrifugasi gradien densitas percoll dan inkubasi dalam ionosphere, sedangkan (2) adalah di masukkan dalam

medium berkadar ion kalsium yang berbeda. Parameter yang diukur adalah : viabilitas, motilitas , kapasitas spermatozoa dan (intensitas) pendaran fluorescent spermatozoa.

4.4.2. Pelaksanaan penelitian

Pelaksanaan filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll, inkubasi dalam ionophore sama dengan percobaan di atas , kemudian hasilnya dimasukkan dalam medium EBSS bebas ion kalsium medium EBSS mengandung 1,80 mmol CaCl_2 dan medium EBSS yang mengandung 3,6 mmol CaCl_2 . Kontrol dilakukan pada semen tanpa perlakuan dan juga dibandingkan dengan inkubasi dalam ionophore sebagai pembanding pada spermatozoa yang mengalami kerusakan fungsi membran. Selanjutnya diamati persentase motilitas dan pewarnaan dengan Chlortetracycline .

Persiapan medium :

Mula-mula dilakukan pembuatan medium Earle Balance Salt Solution (EBSS) tanpa CaCl_2 . dengan komposisi MgSO_4 0.0488 Gr, KCL 0.2 gr, NaCL 3.4 gr, NaH_2PO_4 0.061 gr, D-Glukosa 0.5 gr kemudian ditambahkan 500 ml aquabides. Pada medium standard ditambahkan 1.80 mmol, sedangkan dengan kadar tinggi adalah 3.6 mmol $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

5 mmol larutan stok *ionophore* A 23187 (Sigma) dipersiapkan dalam *dimetilsulfoksida* (DMSO) dan disimpan menjadi 10 μl *aliquots* pada suhu – 20 °C, sebelum digunakan *aliquot* dicairkan (*thawing*) dan ditambahkan 90 μl medium TCM 199.

4.5. Pengamatan ultra struktur membran spermatozoa hasil filtrasi sephadex G-200 dan sentrifugasi gradien densitas percoll.

Pengamatan struktur membran spermatozoa dengan menggunakan:

1. Mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 X
2. Mikroskop Epifluorescen dengan pembesaran 1000 X
3. Mikroskop elektron scanning.
4. Mikroskop elektron transmisi.

yaitu untuk mengamati membran spermatozoa setelah dilakukan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percol

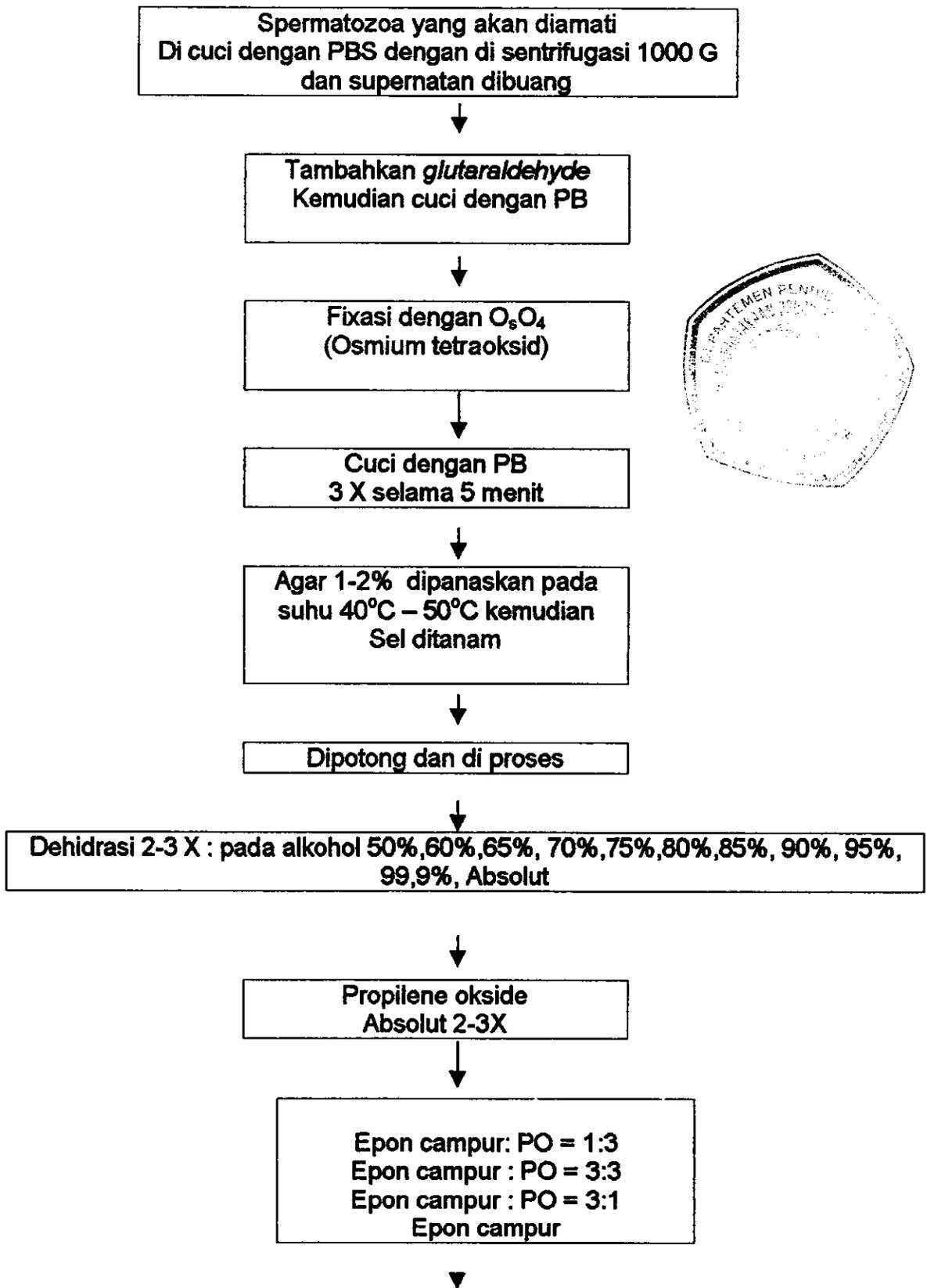
4.5.1. Rancangan percobaan III

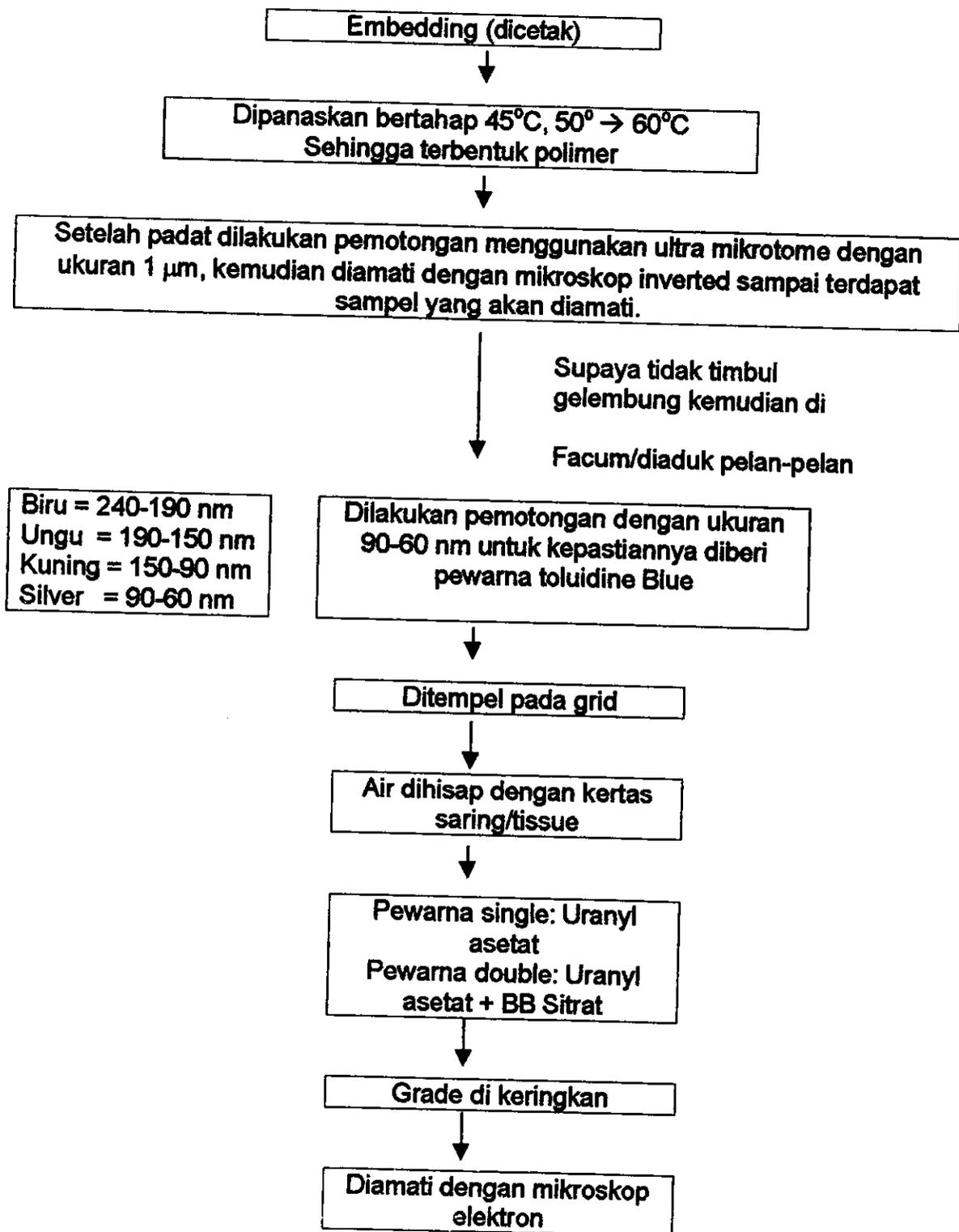
Pada percobaan ini adalah pengamatan diskriptif

4.5.2. Pelaksanaan penelitian

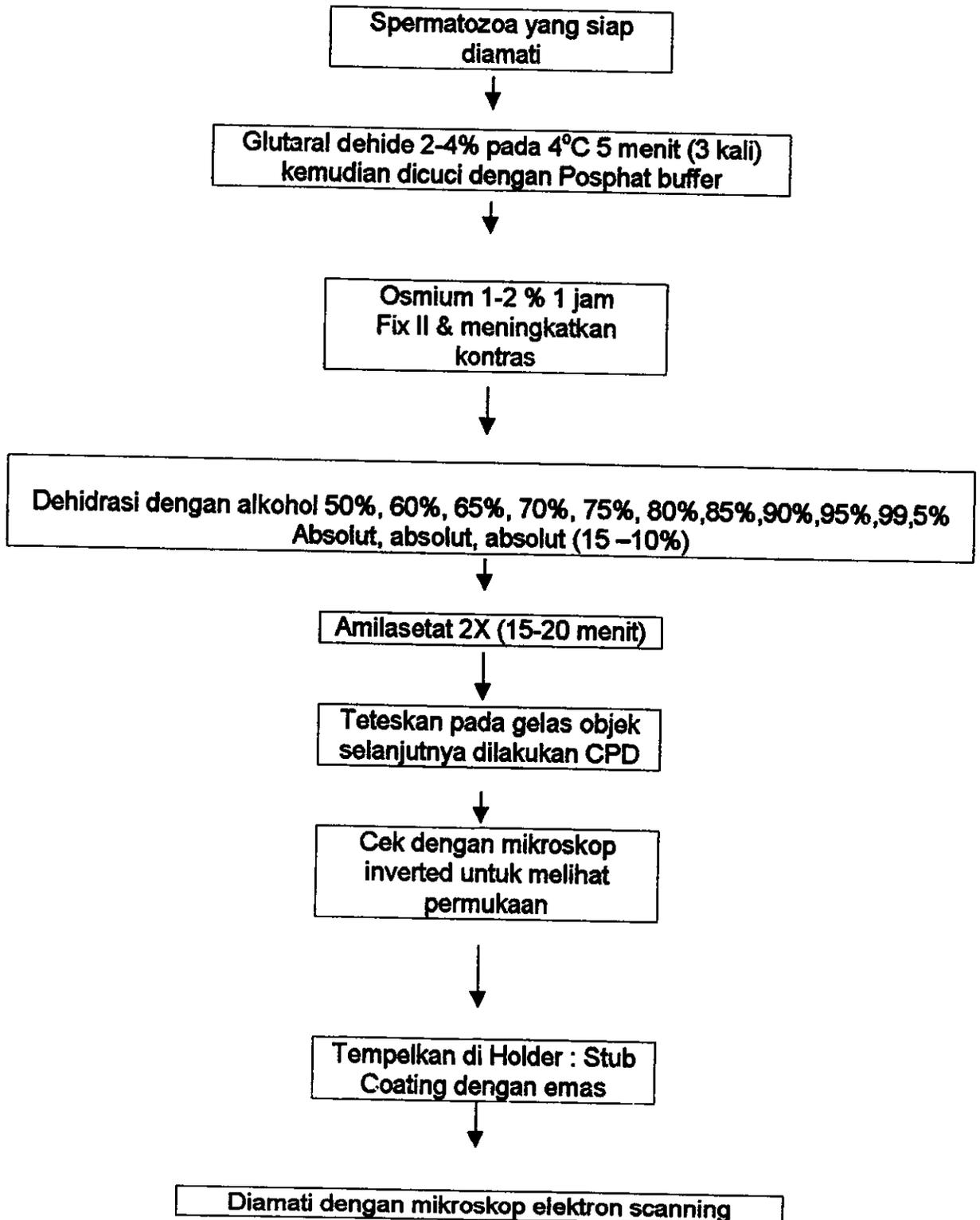
Spermatozoa yang akan diamati ada tiga macam yaitu spermatozoa tanpa perlakuan, spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-200 , spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dan spermatozoa setelah inkubasi dengan Ionophore. Sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop elektron maka dilakukan tahapan-tahapan perlakuan persiapan yaitu seperti pada diagram dibawah ini.

Bagan alir tahapan persiapan pengamatan spermatozoa dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi





Bagan alir tahapan persiapan pengamatan spermatozoa dengan menggunakan mikroskop elektron scanning





BAB V

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN



5.1. Kualitas semen yang digunakan sesuai standard yang ditetapkan

kualitas semen yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan syarat yang ditentukan dalam metodologi penelitian yang secara lengkap terdapat pada tabel 5.2. Kualitas semen yang didapat berasal dari 10 kali pengambilan semen yang dilakukan setiap 1 minggu sekali.

Tabel 5.2. Hasil pemeriksaan semen yang digunakan dalam penelitian

Parameter	Nilai
Volume (miliiliter)	6.75 ± 2.73
PH	$6,40 \pm 0.19$
Motilitas massa	2^+
Motilitas individu (%)	72.50 ± 2.64
Viabilitas (%)	86.70 ± 2.21
Konsentrasi (Juta/miliiliter)	1189 ± 114.15
Hasil pewarnaan dengan CTC	
- Spermatozoa yang non kapasitasasi (%)	$91,30 \pm 0,95$
- Spermatozoa yang kapasitasasi (%)	
- Spermatozoa yang telah reaksi akrosom (%)	$8,70 \pm 0,94$
Respon terhadap HOS - TES (integritas membran baik) (%)	$84,40 \pm 9,47$

Kisaran data yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam kategori homogen, semua data telah diuji dengan uji asumsi yang menunjukkan bahwa data pada sebaran normal. Sehingga apabila terjadi perubahan kualitas memang disebabkan oleh perlakuan pada percobaan yang dilakukan.

5.2. Peningkatan kapasitas spermatozoa setelah perlakuan seiring dengan penurunan kualitas spermatozoa.

Secara umum setelah perlakuan terjadi penurunan kualitas spermatozoa beriringan dengan peningkatan gambaran kapasitas dan reaksi akrosom. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah perlakuan mengalami penurunan ($P=0,00$), akan tetapi perlakuan inkubasi dalam ionophore terjadi penurunan yang tajam dibandingkan filtrasi dan sentrifugasi, analisisnya terdapat pada lampiran 4 dan 5.

Persentase Integritas membran mengalami penurunan setelah perlakuan ($P=0,00$), hasil analisis lebih lanjut menunjukkan integritas membran yang terendah terdapat pada spermatozoa setelah sentrifugasi, sedangkan pada pada spermatozoa hasil filtrasi hanya terjadi sedikit penurunan, lebih lanjut ditampilkan pada tabel 5.3, sedangkan analisis statistika terdapat pada lampiran 6.

Tabel 5.3. Rata-rata kualitas spermatozoa pada berbagai perlakuan

Variabel	kontrol	Filtrasi	Sentrifugasi	Ionophore
Motilitas (%), BNT5% = 7,96. $P= 0,00$	72,50± 2,64 ^c	64,50 ± 1,58 ^b	62,00 ± 11,13 ^b	23,00 ± 5,90 ^a
Viabilitas (%) BNT5% = 3,98. $P= 0,00$	86,70± 2,21 ^c	78,50± 3,92 ^c	72,80 ± 8,28 ^b	40,00 ± 4,70 ^a
Integritas membran baik (%) BNT5% = 5,02. $P = 0,00$	83,00± 8,23 ^c	65,50± 10,40 ^b	29,60 ± 4,92 ^a	44,80 ± 6,50 ^c

Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang berbeda menurut baris menunjukkan perbedaan ($P<0,05$).

Hasil pewarnaan CTC menghasilkan 3 macam gambaran yaitu : non kapasitas, kapasitas dan setelah reaksi akrosom. Oleh

karena spermatozoa yang mengalami kapasitas menunjukkan dua gambaran kapasitas dan reaksi akrosom, maka analisis statistiknya menggunakan data spermatozoa yang non kapasitas . Spermatozoa setelah perlakuan mengalami penurunan spermatozoa yang non kapasitas atau terjadi peningkatan gambaran kapasitas dan selesainya reaksi akrosom ($P=0,00$), penurunan spermatozoa yang nonkapasitas tersebut sangat tajam pada spermatozoa setelah inkubasi dalam medium ionophore, jika dibandingkan dengan filtrasi dan sentrifugasi ($P=0,00$), seperti tampak pada tabel 5.4 dan hasil analisis statistika pada lampiran 7.

Tabel 5.4. Rata-rata persentase gambaran kapasitas spermatozoa pada berbagai perlakuan.

Perlakuan	Non kapasitas (%) BNT5% = 8,06 P = 0,00	Kapasitasi (%)	Reaksi akrosom (%)
Kontrol	91,30 ± 0,95 ^c	8,70 ± 0,94	-
Setelah filtrasi	25,50 ± 16,66 ^b	73,00 ± 16,55	1,50 ± 4,06
Setelah sentrifugasi	18,00 ± 15,97 ^b	77,40 ± 12,42	4,60 ± 7,53
Setelah Ionophore	1,10 ± 1,29 ^a	96,20 ± 2,62	2,70 ± 2,31

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda menurut kolom menunjukkan perbedaan dengan ($P < 0,05$)

Selain dari pada itu, juga diamati pengaruh kadar kalsium dalam medium terhadap gambaran kapasitas, hasilnya menunjukkan terjadinya peningkatan kapasitas seiring dengan meningkatnya kadar kalsium dalam medium EBSS ($P=0,00$). Rata-

rata hasilnya seperti pada tabel 5.5 dan hasil analisis statistika pada lampiran 8.

Setelah inkubasi kedalam medium EBSS, gambaran kapasitas spermatozoa hasil filtrasi sentrifugasi dan ionophore hilang dan tampak spermatozoa dengan intensitas pendaran fluorescent tinggi, sedang dan rendah.

Tabel 5. 5. Rata-rata persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda.

Inkubasi medium	Belum kapasitas P=0,00 BNT 5%= 9,76	Kapasitasi	Reaksi akrosom
Tanpa kalsium	30,90 ± 9,52 ^o	70,70 ± 11,36	0,40 ± 0,70
Kalsium standard	12,20 ± 12,33 ^a	86,30 ± 13,87	1,60 ± 2,91
Kalsium tinggi	3,20 ± 4,21 ^a	91,50 ± 7,93	5,30 ± 4,83

Nilai rata-rata yang didampingi huruf yang berbeda menurut kolom menunjukkan perbedaan (P<0,05).

5.3. Pendaran fluorescensi dipengaruhi kadar ion kalsium medium.

Inkubasi spermatozoa kedalam medium EBSS spermatozoa dengan intensitas pendaran fluorescen yang berbeda. Sebagian besar spermatozoa pada kontrol mempunyai pendaran yang normal, akan tetapi pada medium tanpa kalsium terjadi sedikit penurunan (P=0,00). Spermatozoa setelah perlakuan mengalami penurunan jumlah spermatozoa yang mempunyai pendaran normal, hal ini karena adanya kecenderungan terjadinya peningkatan jumlah spermatozoa dengan pendaran tinggi pada medium EBSS yang mengandung ion kalsium. Hal yang sebaliknya terjadi peningkatan

jumlah spermatozoa yang mempunyai pendaran rendah pada medium EBSS tanpa ion kalsium, seperti pada tabel 5.5.

Tabel 5.6. Tingkat pendaran spermatozoa setelah perlakuan terhadap medium berkadar ion kalsium yang berbeda.

Perlakuan	Inkubasi dalam medium	persentase Spermatozoa dengan pendaran		
		Tinggi	sedang	Rendah
Kontrol	Tanpa kalsium	0	93,50 \pm 2,88	6,50 \pm 2,88
	Kalsium standard	0	98,10 \pm 1,37	1,90 \pm 1,37
	Kalsium tinggi	2,00 \pm 2,00	98,10 \pm 1,79	0
Filtrasi	Tanpa kalsium	0	18,10 \pm 5,97	81,90 \pm 5,97
	Kalsium standard	61,10 \pm 6,08	39,90 \pm 7,34	0
	Kalsium tinggi	65,80 \pm 5,03	34,20 \pm 5,03	0
Sentrifugasi	Tanpa kalsium	0	1,00 \pm 1,05	99,00 \pm 1,05
	Kalsium standard	83,50 \pm 4,33	16,50 \pm 4,33	0
	Kalsium tinggi	95,20 \pm 3,49	4,80 \pm 3,49	0
Ionophore	Tanpa kalsium	0	3,90 \pm 1,37	96,10 \pm 1,37
	Kalsium standard	19,30 \pm 6,78	80,70 \pm 6,78	0
	Kalsium tinggi	89,70 \pm 6,68	10,30 \pm 6,68	0

Tabel 5.7. Pendaran sedang (normal) spermatozoa setelah perlakuan dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda .

Perlakuan	Rata-rata \pm SD BNT = 2,29 P=0,00
Kontrol	96,53 \pm 3,03 ^c
Filtrasi	30,73 \pm 11,13 ^b
Sentrifugasi	7,43 \pm 7,41 ^a
Ionophore	31,63 \pm 35,79 ^b

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda menunjukkan perbedaan dengan ($P < 0,05$)

Inkubasi ke dalam medium EBSS tanpa kalsium, kalsium standard dan kalsium tinggi pada spermatozoa setelah perlakuan filtrasi, sentrifugasi dan ionophore menurunkan jumlah spermatozoa dengan pendaran normal.

Hal ini terjadi secara berurutan pada spermatozoa hasil inkubasi ionophore, filtrasi dan sentrifugasi, seperti pada tabel 5.6. Pendaran normal pada spermatozoa setelah filtrasi, sentrifugasi dan ionophore, lebih banyak dijumpai pada medium EBSS yang mengandung ion kalsium standard dibandingkan pada medium EBSS tanpa ion kalsium atau kalsium tinggi ($P=0,00$), seperti tertera pada tabel 5.7 Sedangkan pada spermatozoa kontrol, pendaran normal sama banyaknya pada medium EBSS dengan kadar ion kalsium standard dan tinggi ($P=0,04$). Analisis statistika pada lampiran 9.

Tabel 5.8. Perbedaan spermatozoa dengan pendaran normal dalam EBSS berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan

Peubah	Inkubasi dalam medium	Rata-rata \pm SD BNT 5% (A*B) = 3,96
Kontrol $P = 0,04$	Tanpa ion kalsium	$93,50 \pm 2,88^a$
	Ion kalsium standard	$98,10 \pm 1,37^b$
	Ion kalsium tinggi	$98,00 \pm 2,00^b$
Filtrasi $P = 0,00$	Tanpa ion kalsium	$18,10 \pm 5,97^a$
	Ion kalsium standard	$39,90 \pm 7,34^c$
	Ion kalsium tinggi	$34,20 \pm 5,05^b$
Sentrifugasi $P = P,00$	Tanpa ion kalsium	$1,00 \pm 1,05^a$
	Ion kalsium standard	$16,50 \pm 4,33^b$
	Ion kalsium tinggi	$4,80 \pm 3,49^a$
Ionophore $P = 0,00$	Tanpa ion kalsium	$3,90 \pm 1,37^a$
	Kalsium standard	$80,70 \pm 6,78^c$
	Ion kalsium tinggi	$10,30 \pm 6,68^b$

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda menunjukkan perbedaan dengan ($P < 0,05$)

Tabel 5.9. Rata-rata motilitas spermatozoa dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda.

Perlakuan	Rata-rata \pm SD BNT = 1,64 P = 0,00
Kontrol	19,17 \pm 8,87 ^d
Filtrasi	10,47 \pm 3,12 ^c
Sentrifugasi	5,67 \pm 2,86 ^b
Ionophore	1,67 \pm 2,40 ^a

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan dengan $P < 0,05$

Tabel 5.10. Perbedaan motilitas spermatozoa setelah inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	Inkubasi dalam medium	Rata-rata \pm SD BNT 5% (A*B) = 2,284
Kontrol P = 0,00	Tanpa ion kalsium	9,00 \pm 1,33 ^a
	Ion kalsium standard	23,50 \pm 7,47 ^b
	Ion kalsium tinggi	25,00 \pm 4,71 ^b
Filtrasi P = 0,03	Tanpa ion kalsium	8,80 \pm 1,32 ^a
	Ion kalsium standard	12,60 \pm 3,95 ^b
	Ion kalsium tinggi	10,00 \pm 2,36 ^{ab}
Sentrifugasi P = 0,28	Tanpa ion kalsium	5,00 \pm 3,33 ^a
	Ion kalsium standard	7,00 \pm 2,58 ^a
	Ion kalsium tinggi	5,00 \pm 2,36 ^a
Ionophore P = 0,72	Tanpa ion kalsium	1,00 \pm 2,11 ^a
	Kalsium standard	2,00 \pm 2,58 ^a
	Ion kalsium tinggi	2,00 \pm 2,58 ^a

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan dengan $P < 0,05$

Motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil perlakuan dilanjutkan dengan inkubasi dalam medium EBSS dengan kadar ion kalsium berbeda, lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Urutan rendahnya motilitas dan viabilitas adalah filtrasi, sentrifugasi dan ionophore seperti tabel 5.9 dan tabel 5.11. Analisis statistika pada lampiran 10 dan 11.

Motilitas spermatozoa kontrol dan hasil filtrasi dalam medium EBSS tanpa ion kalsium, hasilnya lebih rendah dibandingkan dalam medium EBSS dengan kadar kalsium standard dan kalsium tinggi seperti pada tabel 5.10 dan tabel 5.12. Sedangkan motilitas spermatozoa hasil sentrifugasi dan ionophore dalam medium EBSS tanpa dan dengan ion kalsium, tidak menunjukkan perbedaan ($P=0.28$ dan $P = 0.72$).

Tabel 5.11. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda.

Perlakuan	Rataan \pm SD BNT 5% = 2.09 P=0,00
Kontrol	22,90 \pm 8,97 ^d
Filtrasi	15,93 \pm 3,53 ^c
Sentrifugasi	9,30 \pm 4,43 ^b
Ionophore	5,13 \pm 3,83 ^a

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan ($P<0,05$)

Viabilitas spermatozoa kontrol dalam medium EBSS tanpa kalsium adalah lebih rendah dibandingkan dalam medium EBSS yang mengandung kalsium ($P=0,01$). Viabilitas spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi dalam medium EBSS dengan kadar ion kalsium standard lebih tinggi, dari pada tanpa ion kalsium atau kalsium tinggi ($P=0,02$ dan $P=0,11$). Tidak ada perbedaan viabilitas spermatozoa hasil ionophore dalam media EBSS berkadar ion kalsium berbeda ($P=0,79$).

Tabel 5.12. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa setelah inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda pada masing-masing perlakuan.

Perlakuan	Inkubasi dalam medium	Rata-rata \pm SD BNT 5% (A*B) = 3,62
Kontrol P = 0,00	Tanpa ion kalsium	13,20 \pm 4,05 ^a
	Ion kalsium standard	27,50 \pm 8,25 ^b
	Ion kalsium tinggi	28,00 \pm 4,22 ^b
Filtrasi P = 0,02	Tanpa ion kalsium	13,60 \pm 2,50 ^a
	Ion kalsium standard	18,70 \pm 4,08 ^b
	Ion kalsium tinggi	15,50 \pm 1,58 ^a
Sentrifugasi P = 0,11	Tanpa ion kalsium	9,70 \pm 4,37 ^a
	Ion kalsium standard	11,00 \pm 4,85 ^b
	Ion kalsium tinggi	7,20 \pm 3,52 ^a
Ionophore P = 0,79	Tanpa ion kalsium	4,40 \pm 3,13 ^a
	Kalsium standard	5,50 \pm 4,14 ^a
	Ion kalsium tinggi	5,50 \pm 4,40 ^a

Nilai rata-rata yang didampingi huruf berbeda pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan (P<0,05)

5. 4. Struktur membran spermatozoa berubah setelah perlakuan

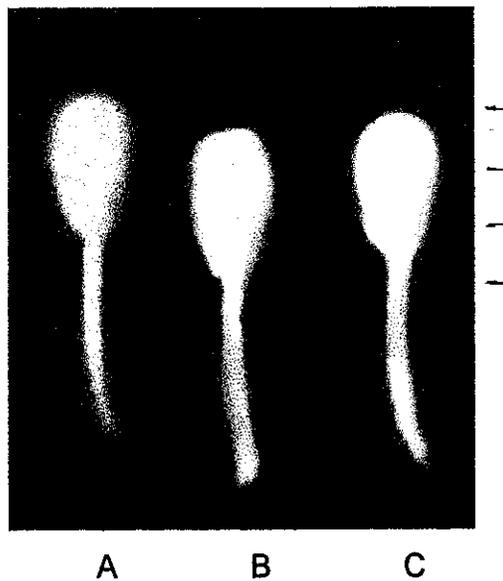
Spermatozoa kontrol dan setelah filtrasi dilakukan pengamatan dengan pembesaran 1000X memberikan gambaran yang sama , yaitu seperti pada gambar 5.1A yaitu membran spermatozoa dalam keadaan intak, sedangkan spermatozoa setelah sentrifugasi mengalami kerusakan membran berupa penggelembungan membran kepala spermatozoa dan membran tampak sobek seperti pada gambar 5.1B. Gambaran spermatozoa yang rusak setelah dilakukan sentrifugasi gradien densitas percotti sebanyak 51,2 \pm 5,59 persen.

Pengamatan yang lebih detil dengan menggunakan mikroskop elektron scanning dengan pembesaran 15.000 X pada spermatozoa kontrol dan setelah filtrasi menunjukkan membran spermatozoa yang

masih baik seperti pada gambar 5.2A, sedangkan spermatozoa dengan ionophore menunjukkan gambaran terlepasnya membran akrosom, seperti pada gambar 5.2B. Spermatozoa setelah sentrifugasi menunjukkan adanya perubahan yaitu membran kepala rusak dan terdapatnya bayangan hitam antara kepala dengan leher seperti pada gambar 5.3.

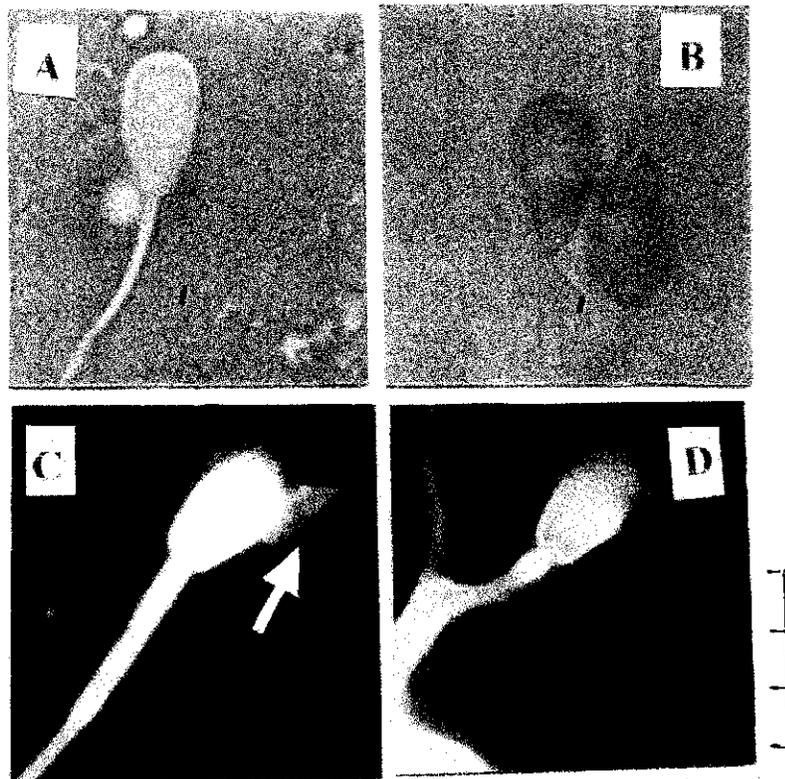
Spermatozoa hasil sentrifugasi lebih banyak dijumpai spermatozoa yang rusak dibandingkan dengan perlakuan lain, dan gambaran yang lebih detil dengan mengamati ultrastruktur dengan irisan membujur pada bagian kepala spermatozoa didapatkan hasil seperti gambar 5.4. Pada gambar tersebut tampak adanya pengelembungan atau tidak teraturnya bentuk membran kapala spermatozoa . Begitu juga keadaan membran pada bagian leher yang dilakukan dengan irisan membujur maupun melintang terdapat perbedaan bentuk membrannya terdapat kerusakan pada membran bagian leher spermatozoa.





Gambar 5.1 . Spermatozoa dengan pendaran yang berbeda
Diamati menggunakan mikroskop fluorescent dengan pembesaran
400X. (Ukuran diantara garis 1 mikro meter)

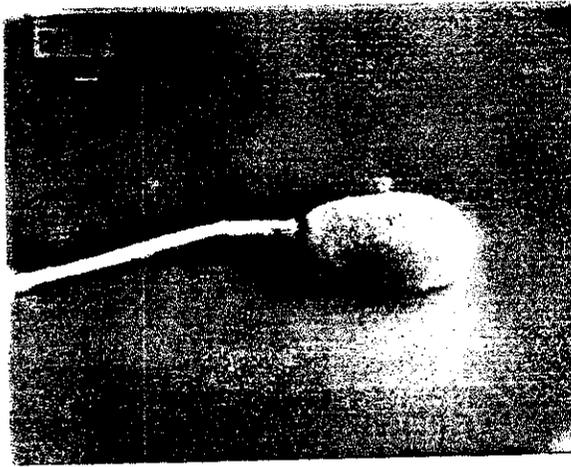
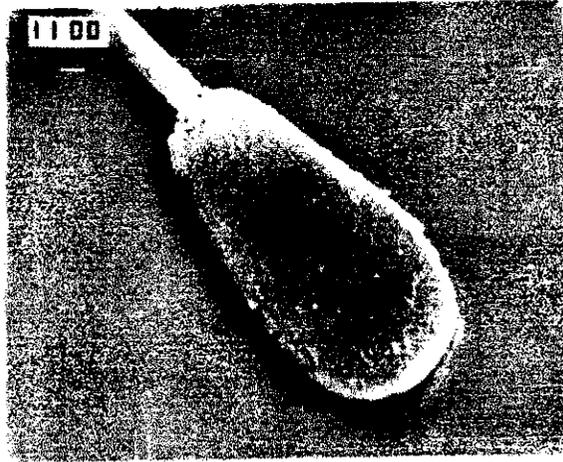
- A. Spermatozoa dengan pendaran rendah
- B. Spermatozoa dengan pendaran sedang
- C. Spermatozoa dengan pendaran tinggi



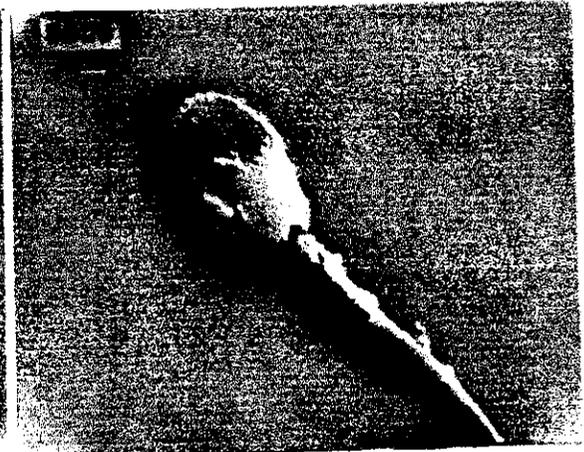
Gambar 5.2. Spermatozoa dengan pembesaran 1000 X
(Ukuran diantara baris 1 mikro meter)

- a. Spermatozoa dengan membran yang baik
- b. Spermatozoa yang membrannya rusak setelah sentrifugasi

a

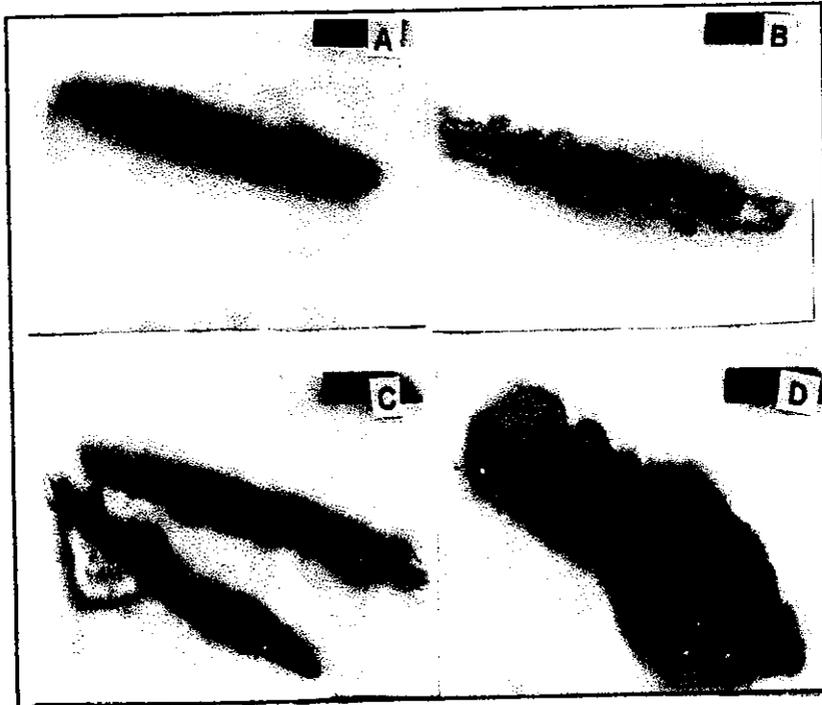


b



c

Gambar 5.3. Spermatozoa dengan membran yang baik , pengamatan menggunakan mikroskop elektron scanning
 a. Spermatozoa dengan membran kepala yang baik, pada spermatozoa kontrol dan filtrasi dengan pembesaran 15.000X
 b. dan c. Spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dengan pembesaran 10.000X. Gambaran seperti ini hanya terlihat pada spermatozoa yang mengalami kerusakan struktural.

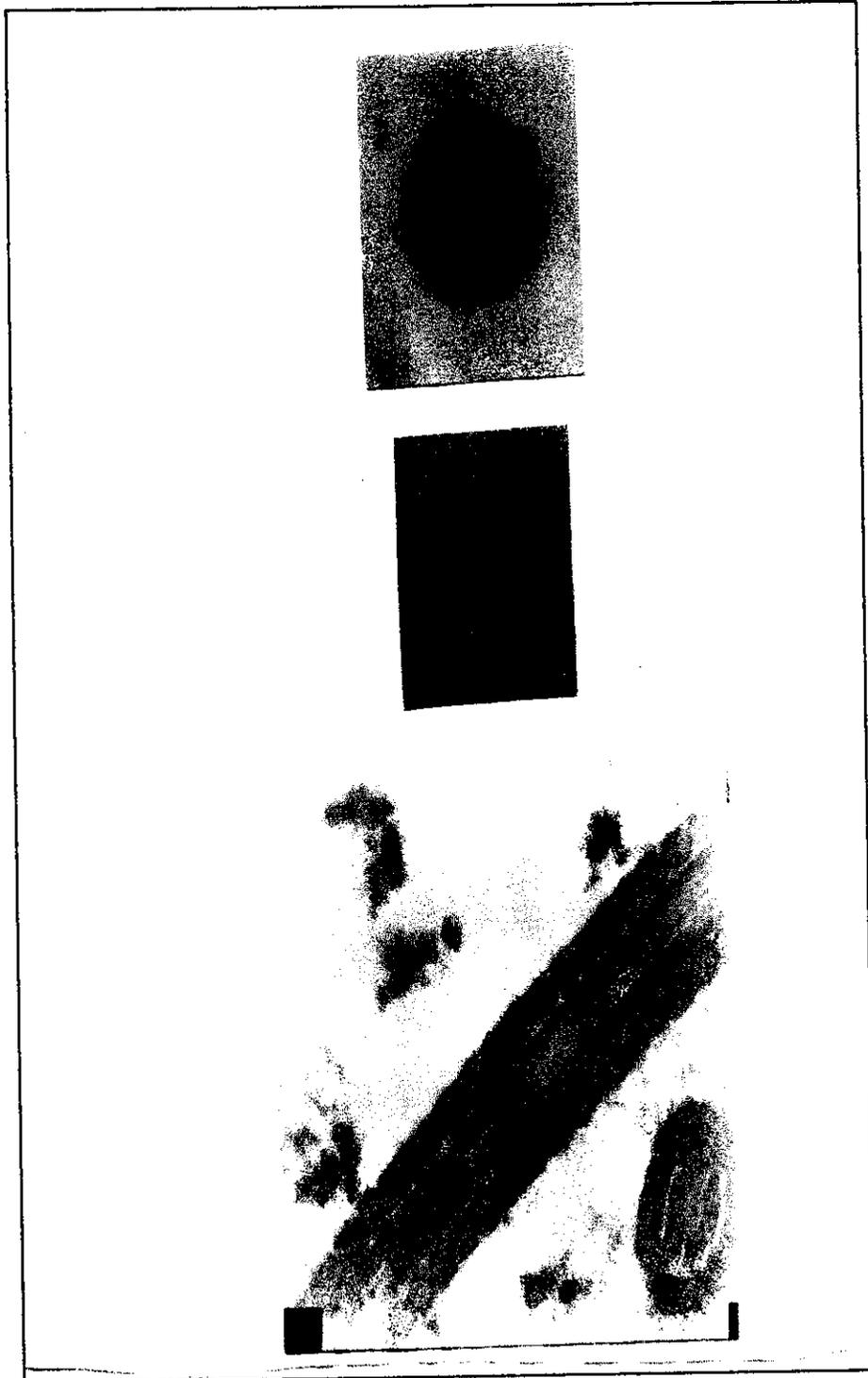


Gambar 5.4 Ultra struktur kepala spermatozoa pada irisan melintang.

Hasil fotografi menggunakan mikroskop elektron transmisi dengan pembesaran 15.000 X

A. Kepala spermatozoa dengan membran yang masih baik.

B. ,C dan D Kepala spermatozoa dengan membran yang rusak.



Gambar 5.5 Ultra struktur leher spermatozoa pada irisan melintang dan membujur.

Hasil fotografi menggunakan mikroskop elektron transmisi dengan pembesaran 15.000X

- A. Irisan melintang leher spermatozoa dengan membran yang baik
- B. Irisan melintang ekor spermatozoa dengan membran yang rusak
- C. Irisan membujur spermatozoa dengan membran yang baik



BAB VI

BAB 6

PEMBAHASAN

6. 1. Penentuan standard kualitas semen dan metode pewarnaan

Kualitas semen sebelum perlakuan pada penelitian menunjukkan bahwa semen yang digunakan mempunyai kategori normal, hal ini sesuai dengan pendapat Garner and Hafez (1993); Bearden and Fuquy (1984) bahwa untuk semen yang normal mempunyai volume antara 5-8 mililiter, warna krem sampai putih susu, motilitas antara 50-80 persen, pH antara 6.4 - 7.8, konsentrasi antara 700 - 2000 juta permililiter.

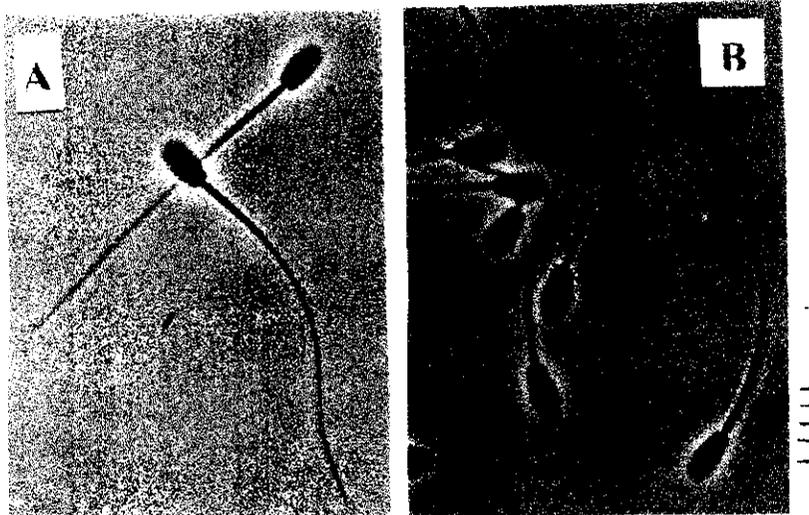
Batasan kualitas yang digunakan adalah standard yang digunakan untuk pembekuan spermatozoa yaitu mempunyai motilitas individu 70 % dengan konsentrasi diatas 1000 juta / ml. Pemilihan standard tersebut berdasarkan penelitian terdahulu Susilawati dkk (1996) bahwa pada semen yang mempunyai persentase motilitas diatas 70% lebih tahan hidup dibandingkan bila lebih rendah dari 70%. Hal ini digunakan agar terdapat keseragaman kualitas spermatozoa pada sampel dan apabila terjadi perubahan kualitas, memang disebabkan oleh perlakuan. Selain itu dengan tingginya kualitas spermatozoa, maka spermatozoa lebih mampu mempertahankan hidup dan motilitasnya selama proses filtrasi dan sentrifugasi.

Dari hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan, antara viabilitas dan motilitas individu sekitar 14 persen Hal ini karena

hidup spermatozoa pada akhir-akhir ini antara lain menurut Nishikima (1997). Kedua metode tersebut menunjukkan tidak terdapat perbedaan ($P=0.22$). Analisa statistik terdapat pada lampiran 2. Sehingga untuk selanjutnya digunakan pewarnaan eosin negrosin mengingat secara teknis lebih mudah dan murah. Selain itu menurut Challah dan Brillard (1997) bahwa campuran eosin-negrosin dapat untuk menguji viabilitas dan morfologi spermatozoa berdasarkan derajat permeabilitas membran spermatozoa yang mati berwarna eosin (warna pink). Gambaran spermatozoa hasil pewarnaan tersebut seperti terlihat pada gambar 6. 7

Selain itu juga dilakukan perbandingan antara 2 metode untuk mengamati ada atau tidaknya tudung akrosom yaitu menggunakan metode FITC Concanavalin A (Nishikima,1997) dan pewarnaan CTC (Mattioli *et al.*, 1996 dan Kaul *et al.*, 1997). FITC Concanavalin A pada prinsipnya adalah adanya lectin yang mengikat glukosa atau D-Mannosa yang ada pada inner membran akrosom, sehingga spermatozoa yang masih terdapat akrosom akan memancarkan fluorescen (Nishikima 1997). Sedangkan CTC berdasarkan influx ion kalsium, yang apabila tidak terdapat tudung akrosom spermatozo tidak berfluorescen (gambar 6.8 dan 6.9). Hasil analisis statistika menunjukkan tidak terdapat perbedaan ($P=0,29$). Lebih jelasnya terdapat pada lampiran 3. Untuk selanjutnya digunakan pewarnaan CTC untuk identifikasi ada tidaknya tudung akrosom, karena dengan metode ini selain diketahui

Spermatozoa yang selesai mengalami reaksi akrosom atau terlepasnya tudung akrosom, juga dapat diketahui spermatozoa yang mengalami kapasitasi, sedangkan metode FITC- Concanavalin A tidak dapat untuk mengamati kapasitasi. Pertimbangan lain secara teknis adalah metode CTC relatif lebih mudah, cepat dan lebih murah.



Gambar 6.6. Spermatozoa sapi hasil HOS-TES
Diamati menggunakan mikroskop fase kontras dengan pembesaran 400 kali.

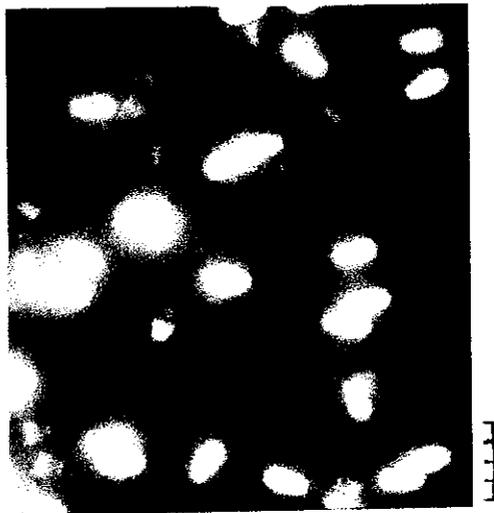
- a. Spermatozoa dengan ekor tetap lurus pada ujungnya adalah spermatozoa dengan integritas membran buruk.
- b. Spermatozoa dengan ekor melingkar adalah spermatozoa dengan integritas membran baik.

Gambaran A dan B terjadi pada spermatozoa yang berada pada larutan hiposmotik

A

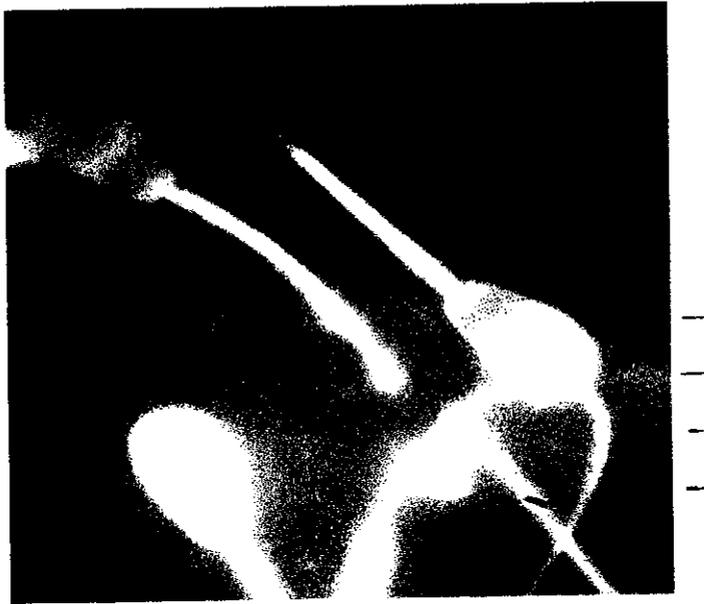


B



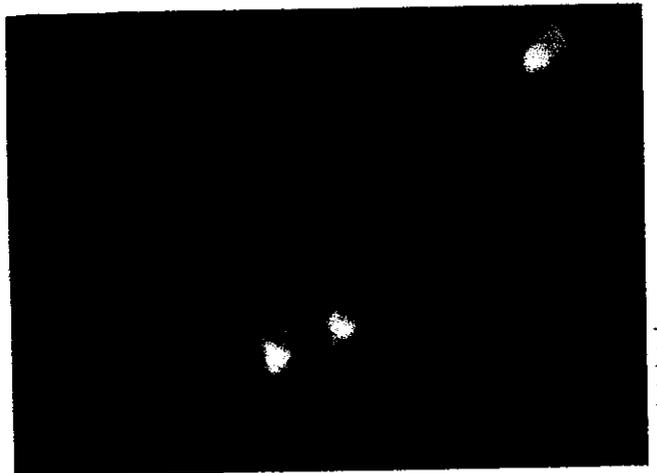
Gambar 6.7. Spermatozoa setelah uji viabilitas dengan pewarnaan.

- A. Spermatozoa dengan pewarnaan eosin nigrosin (warna merah yang mati, sedangkan yang jernih adalah hidup). Diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X
- B. Spermatozoa dengan pewarnaan hoechst (warna yang berpendar adalah yang mati, sedang yang tidak berpendar yang hidup). Diamati menggunakan mikroskop fluorescent dengan exitation violet dengan pembesaran 400 X



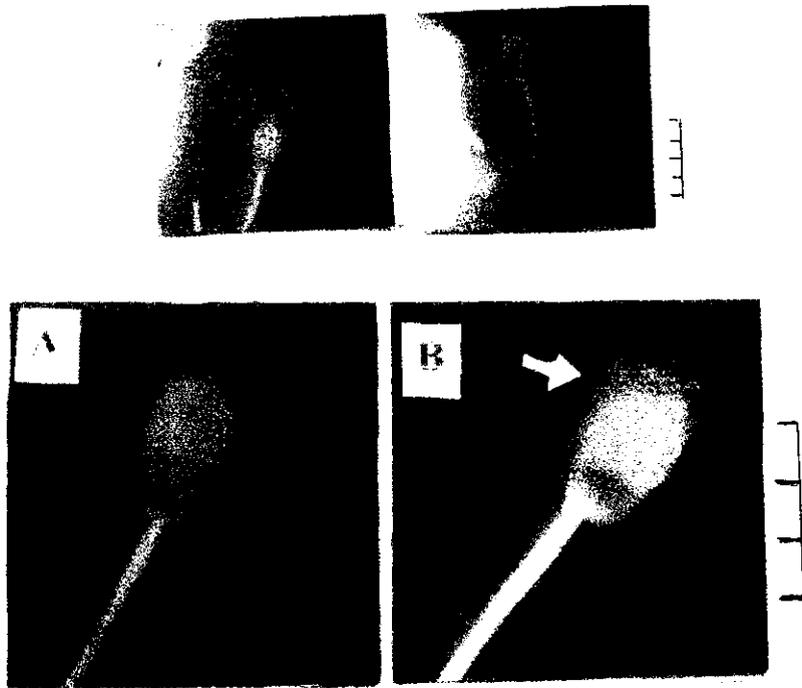
Gambar 6.8. Spermatozoa hasil pewarnaan dengan CTC
(Ukuran diantara garis 1 mikro meter)

- A. Spermatozoa non kapasitasasi
- B. Spermatozoa kapasitasasi
- C. Spermatozoa selesai reaksi akrosom



Gambar 6.9. Spermatozoa hasil staining dengan FITC Con A
(Ukuran diantara garis 1 mikro meter)

- A. Spermatozoa dengan intak akrosom
- B. Spermatozoa tanpa akrosom.



Gambar 6.10. Perbedaan hasil pengamatan dengan menggunakan pembesaran 100X dan 10.000 X

- Spermatozoa normal
- Spermatozoa setelah sentrifugasi



Gambar 6.11. Tahapan hilangnya ion kalsium pada peristiwa kapasitasi sampai dengan reaksi akrosom.



Pewarnaan dengan CTC selain dapat untuk melihat kapasitas juga dapat untuk mengetahui keberadaan ion kalsium yang membentuk senyawa kompleks dengan CTC yang memunculkan pendaran fluorescen, sehingga tampak tahapan penghilangan ion kalsium pada proses kapasitasi dan reaksi akrosom (gambar 6.11).

Gambaran kapasitasi spermatozoa menunjukkan pendaran fluorescen yang rendah pada bagian basal kepala spermatozoa, dan dibandingkan pada bagian membran akrosom. Hal ini berdasarkan atas keterangan referensi yang ada (Word dan Storey, 1984). Kenyataan yang ada menunjukkan bahwa intensitas flouresensi lebih tinggi pada bagian akrosom dibandingkan bagian basal. Oleh karena pewarna CTC mengikat ion kalsium yang ditunjukkan dengan adanya flouresensi, berarti pada bagian akrosom banyak terdapat ion kalsium dibandingkan bagian basal atau sitosol. Kejadian tersebut perlu dicermati karena pada penelitian ini menggunakan mikroskop epifluorescen yang intensitas flouresensinya berdasarkan pantulan cahaya, sehingga benda yang tak terhalang lebih terang dari pada benda yang terhalang. Oleh sebab itu masih ada kemungkinan, tidak adanya flouresensi pada bagian basal, bukanlah berarti tidak adanya ion kalsium pada bagian sitosol akan tetapi karena terhalangnya flouresensi ion kalsium pada bagian sitosol.

Secara umum hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ion kalsium rendah pada sitosol kepala spermatozoa, sedangkan

pendaran yang relatif tinggi pada wilayah membran akrosom disebabkan oleh protein menjadi aktif untuk membantu difusi ion kalsium pada akrosom. Menurut pendapat Yanagimachi (1988) bahwa pada saat kapasitasi, konsentrasi ion kalsium intra seluler dipertahankan agak rendah oleh mekanisme pompa ion kalsium - ATP ase dan influx kalsium melalui antiporter Na^+/Ca^+ pada membran. Hasil pengamatan menunjukkan tingginya pendaran fluoresensi pada bagian leher spermatozoa, mengingat pada bagian leher spermatozoa banyak terdapat mitochondria, maka dapat dikatakan bahwa saat kapasitasi banyak ion kalsium yang ada di mitochondria, kejadian tersebut memperkuat pendapat Yanagimachi (1988) bahwa saat kapasitasi rendahnya ion kalsium dalam sitosol, karena ada mekanisme "sequestrisasi" ke bagian mitochondria. Barangkali ini diperlukan untuk pergerakan mikrotubulus pada ekor spermatozoa saat hiperaktivasi.

6.2. Penurunan kualitas membran spermatozoa setelah perlakuan.

Penurunan viabilitas dan motilitas spermatozoa setelah filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh waktu pelaksanaan, temperatur serta terpisahnya spermatozoa dengan seminal plasma, mengingat viabilitas dan motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme spermatozoa yang ditunjang oleh lingkungannya antara lain temperatur, lama hidupnya serta komponen-komponen yang terdapat pada medium. Selain itu spermatozoa tetap bergerak

selama proses filtrasi dan sentrifugasi yang dalam pergerakannya tersebut membutuhkan energi, sehingga dengan keterbatasan energi endogen yang dimilikinya, serta exogen yang dapat digunakan dari medium yang mempengaruhi daya geraknya . Selain itu seminal plasma juga berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh luar yang merupakan medium hidup, menurut pendapat Yanagimachi (1988), Buhr (1998) dan Hafez (1993) bahwa pada saat spermatozoa masuk kedalam seminal plasma, maka membran spermatozoa lebih stabil, jadi dengan terpisahnya spermatozoa dengan seminal plasma, maka membran spermatozoa menjadi tidak stabil.

Integritas membran yang terburuk pada penelitian ini adalah hasil sentrifugasi gradien densitas percoll, dibandingkan dengan filtrasi sephadex dan inkubasi dalam medium ionophore. Penurunan integritas membran spermatozoa setelah sentrifugasi karena adanya pengaruh fisik dan kimia , pengaruh fisik misalnya gaya sentrifugal, terjadinya gesekan antara spermatozoa dengan medium dan dengan tabung, sedangkan pengaruh kimia adalah pengaruh medium pengencer maupun percoll. Spermatozoa saat filtrasi melakukan pergerakan turun, karena gaya gravitasi bumi, akan tetapi masih terjadi gesekan antara spermatozoa dengan medium dan sephadex yang digunakan. Selain itu sephadex memiliki sifat hidrofilik yang kuat, sehingga sephadex menarik cairan maupun komponen-komponen dari spermatozoa. Kejadian ini mengakibatkan komponen

penyusun membran akan berubah dan proses fisiologis membran akan terganggu. Hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian Check *et al.*, (1992) yang menunjukkan bahwa pada sentrifugasi integritas membrannya lebih baik dari pada filtrasi sephadex. Hal ini ada kemungkinan terdapat perbedaan bahan dan kecepatan sentrifugasi serta macam sephadex yang digunakannya, karena bahan pemisah maupun kecepatan sentrifugasi berpengaruh terhadap kerusakan membran.

Terdapat suatu pertentangan antara kenyataan bahwa spermatozoa setelah mengalami filtrasi dan sentrifugasi terjadi peningkatan gambaran kapasitas akan tetapi terjadi penurunan motilitas, padahal menurut Gordon (1994) bahwa selama proses kapasitas terjadi peningkatan fisiologis dan fluiditas membran yang menyebabkan peningkatan motilitas, juga diperjelas oleh Yanagimachi (1988) bahwa selama kapasitas terjadi perubahan karakteristik fisik dan kimia, juga terjadi perubahan lipid yang diketahui membantu pemasukan ion kalsium kedalam sel, peningkatan ion kalsium yang masuk kedalam membran dapat merangsang ikatan membran dengan cAMP intraselluler, Ca^{++} dan cAMP diketahui sebagai pengatur untuk pergerakan ekor. Hal inilah yang lebih lanjut perlu adanya suatu pembuktian gambaran kapasitas spermatozoa setelah filtrasi dan sentrifugasi apakah merupakan kapasitas yang menunjukkan gambaran fungsi membran yang masih baik atau telah terjadi kerusakan membran,

sehingga ion kalsium dapat masuk dalam spermatozoa, dan berakibat tampak seperti spermatozoa yang mengalami kapasitasi.

Pada prinsipnya, ionophore akan mengikat protein membran, sehingga tidak berfungsi, dan akibatnya ion kalsium dapat berdifusi secara pasif yang pergerakannya berdasarkan gradien konsentrasi *electrochemical*, akan tetapi spermatozoa yang diinkubasi pada medium yang mengandung ionophore terjadi peningkatan spermatozoa yang mengalami kapasitasi. Menurut pendapat Gordon (1994) yang menyatakan bahwa kalsium ionophore A23187 dapat digunakan untuk influx ion kalsium dan juga dibuktikan perlakuan ionophore dapat meningkatkan aktifitas respirasi spermatozoa sapi. Lebih lanjut menurut Gordon (1994) menyatakan bahwa perlakuan ionophore menghasilkan hiperaktifasi dan reaksi akrosom fungsional yang memungkinkan terjadinya penetrasi oosit bebas zona pada hamster. Akan tetapi menurut pendapat Watson *et al* (1991) yang disitir oleh Gordon (1994) bahwa perlakuan ionophore yang menyebabkan reaksi akrosomal secara ultra struktur tidak sama dengan reaksi akrosomal secara alamiah. Buruknya integritas membran dan meningkatnya gambaran kapasitasi spermatozoa setelah sentrifugasi dapat dijelaskan dengan gambaran membran spermatozoa setelah dilakukan pewarnaan dengan CTC dan diamati dengan mikroskop fluorescen dengan pembesaran 1000X yang menunjukkan terjadinya kerusakan membran yang jumlahnya $51,2 \pm 5,59$ padahal kalau diamati dengan pembesaran

kecil tampak seperti kapasitas seperti pada gambar 6.10. Hal ini telah diperkuat dengan menggunakan mikroskop elektron scanning dan transmisi seperti pada gambar 5.3 dan 5.4.

Peristiwa sentrifugasi dan filtrasi , merangsang terjadinya kapasitas dan reaksi akrosom yang berakhir dengan hilangnya akrosom yang juga secara mekanik merusak membran akrosom. Selain itu menurut hasil penelitian Susilawati dkk (1999) seperti pada gambar 19 bahwa spermatozoa setelah filtrasi dan sentrifugasi mengalami peristiwa dekapasitasi atau hilangnya gambaran kapasitas dan terjadi penurunan motilitas. Sehingga apabila akan dilakukan fertilisasi dijaga spermatozoa pada posisi kapasitas dan motilitas masih bagus, sehingga harus dilakukan sesegera mungkin. Mengingat pada hasil gambar 19 menunjukkan bahwa setelah 15 menit spermatozoa yang mengalami kapasitas hanya 30 persen, sedangkan sisanya tidak menunjuknya gambaran kapasitas, maka perlu pengkajian lebih lanjut tentang waktu yang tepat untuk fertilisasi yang dihubungkan dengan saat spermatozoa kapasitas. Hasil tersebut juga perlu untuk pertimbangan pada persiapan spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro*, karena setiap perlakuan preparasi spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro* dilakukan induksi kapasitas dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm (150G), dari hasil penelitian ini perlu diperhitungkan lebih lanjut dalam preparasi spermatozoa.

6.3. Kerusakan sistim transport ion kalsium setelah filtrasi dan sentrifugasi.

Inkubasi dalam medium EBSS meningkatkan jumlah spermatozoa yang mempunyai gambaran kapasitasi, meskipun medium tidak mengandung ion kalsium. Pada medium yang mengandung ion kalsium, jumlah spermatozoa dengan gambaran kapasitasi meningkat. Hasil penelitian tersebut memperkuat pendapat Yanagimachi (1988) bahwa inisiasi terjadinya proses kapasitasi lebih ditentukan oleh faktor endogen bukan kadar ion kalsium di luar spermatozoa dan juga pendapat Gordon (1994) bahwa ion kalsium dalam medium mempercepat terjadinya kapasitasi.

Hasil inkubasi dengan ionophore membuktikan bahwa kerusakan sistim influx melalui antiporter Na^+/Ca^+ menyebabkan transport ion kalsium intra selluler sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ion kalsium diluar sel, kejadian ini karena terjadinya difusi pasif yang menyebabkan ion kalsium bebas keluar masuk tanpa adanya kontrol.

Selanjutnya dilakukan analisis pengaruh kadar kalsium dalam medium terhadap kadar kalsium spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-200, sentrifugasi gradien densitas percoll dan inkubasi dalam ionophore. Hasilnya menunjukkan inkubasi spermatozoa ke dalam medium berkadar kalsium berbeda menimbulkan gambaran pendaran yang berbeda pula. Pendaran rendah yang banyak terdapat pada medium berkadar kalsium rendah menunjukkan

keluarnya ion kalsium dari spermatozoa, dan pendaran yang tinggi pada spermatozoa yang berada dalam medium berkadar ion kalsium tinggi menunjukkan masuknya ion kalsium dalam jumlah banyak, kejadian tersebut sama dengan pada spermatozoa setelah inkubasi dengan ionophore, yaitu terjadi difusi pasif.

Kerusakan fungsi membran spermatozoa terjadi karena sephadex mempunyai sifat hidrofilik yang kuat (Dawson *et al*, 1986), sehingga ruda paksa komponen sel penyusun membran karena tarikan atau tolakan oleh sephadex selama perjalanan elusi filtrasi, Walaupun secara mikroskopis tidak tampak terjadi kerusakan struktur, namun fenomena rudapaksa ini mungkin merusak struktur protein membran sel. Gambaran membran spermatozoa setelah filtrasi seperti yang disajikan pada gambar 5.3a. Pernyataan di atas ditunjang oleh pendapat Bonventre (1992) bahwa protein membran berperanan dalam transport ion kalsium secara transselluler. Sehingga apabila terjadi kerusakan atau perubahan protein membran akan mempengaruhi transport ion kalsium kedalam maupun ke luar membran spermatozoa.

Berbeda dengan gambaran mikroskopis spermatozoa hasil filtrasi , kerusakan fungsi transport ion kalsium pada spermatozoa setelah sentrifugasi, rupanya disertai dengan kerusakan struktur membran spermatozoa. Kejadian tersebut diperjelas dengan hasil analisa ultra struktur membran pada gambar 5.3 dan 5.4. Pada gambar 5.3. menunjukkan bahwa spermatozoa setelah mengalami

sentrifugasi tampak adanya jarak antara kepala dan ekor juga tampak terkelupasnya membran kepala maupun ekor. Terkelupasnya membran kepala dapat diperjelas dengan potongan melintang kepala spermatozoa hasil pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi pada gambar 5.4, sedangkan gambar 5.5 menunjukkan adanya kerusakan membran bagian ekor spermatozoa. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa akibat sentrifugasi menyebabkan kerusakan struktur membran spermatozoa pada bagian kepala maupun bagian ekor.

Motilitas spermatozoa kontrol, hasil filtrasi dan sentrifugasi yang dalam medium yang mengandung kalsium, menghasilkan motilitas yang lebih baik dari pada spermatozoa dalam medium tanpa ion kalsium. Kenyataan tersebut menunjukkan bahwa ion kalsium berperan pada motilitas spermatozoa. Sesuai dengan pendapat Mitchel dan warner (1981) yang berperan dalam sliding mikrotubulus adalah kerjasama antara ATPase dynein dengan energi yang dihasilkan oleh hidrolisis ATP. Ligan Dinein yang berada diantara mikrotubulus mempunyai kekuatan untuk menggerakkan dan Mg^{2+} dan Ca^{2+} berperan penting pada kerja dinein ini walaupun mekanisme kerjanya belum jelas diketahui.

Peningkatan ion kalsium yang terlalu tinggi menyebabkan penurunan motilitas pada spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi, sedangkan pada spermatozoa kontrol tidak menyebabkan penurunan motilitas Motilitas spermatozoa secara keseluruhan

mengalami penurunan, setelah inkubasi dalam medium berkadar ion kalsium yang berbeda. Menurut pendapat Mitchel dan Warner (1981) bahwa faktor yang mempengaruhi pergerakan mikrotubulus merupakan suatu yang kompleks. Oleh sebab itu peran dari pada membran sangat besar terhadap motilitas spermatozoa.

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa pengaruh kadar ion kalsium medium terhadap pola perubahan konsentrasi ion kalsium intra seluler tidak sama dengan pola kadar ion kalsium terhadap motilitas, sehingga ada dugaan konsentrasi ion kalsium tidak mempengaruhi perubahan motilitas spermatozoa yang mengalami kerusakan membran, oleh sebab itu perlu adanya penelitian lebih lanjut.



BAB VII

BAB 7

KESIMPULAN

1. Spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-200 mengalami kerusakan fungsi membran, sedangkan spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll mengalami kerusakan struktur membran spermatozoa.
2. Peningkatan konsentrasi ion kalsium dalam spermatozoa setelah filtrasi dan sentrifugasi, karena tidak berfungsinya kontrol ion kalsium, berakibat terhadap penurunan motilitas spermatozoa.

SARAN

1. Hasil penelitian menunjukkan motilitas dan viabilitas berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa, sesuai dengan kenyataan bahwa penurunan fertilitas secara *in vivo* terkait erat dengan konsentrasi spermatozoa yang jumlahnya sedikit. Penelitian yang mengungkap sistem komunikasi diantara mereka barangkali juga merupakan hal yang strategis untuk menjawab permasalahan turunnya viabilitas dan motilitas pada spermatozoa hasil seleksi jenis kelamin.
2. Penelitian ini merupakan titik awal yang memperjelas perubahan fungsi membran daerah akrosom yang berhubungan dengan peran ion kalsium. Hal ini diyakini merupakan suatu yang strategis untuk mengembangkan teori yang lebih baik tentang mekanisme kapasitas yang sampai saat ini masih belum jelas.
3. Fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi gradien densitas percoll dianjurkan kurang dari 15 menit.

Untuk pengembangan metode seleksi jenis kelamin lebih baik mencegah dekapasitasi untuk memperpanjang viabilitas dan motilitas.



DAFTAR PUSTAKA

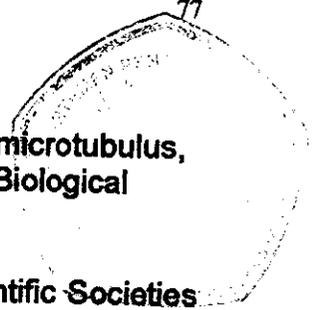
DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelja A, 1984. Separation of X- spermatozoa with the sephadex gel filtration method for female sex pre selection. Thesis submitted. Universitas Airlangga.
- Adimoelja A , Anwar H, Wurlina, Amitaba IGB. 1984. Studi perbandingan tentang penentuan jenis kelamin dengan teknik sephadex filtrasi dan teknik pemusingan terhadap domba melalui inseminasi buatan. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Anonimous. 1995. Chromatography Product. Supelco- USA
- Austin CR, Short RV, 1972. Reproduction in mammals. Book 1. University press. Cambridge: 150
- Ball BA, Brinsko SP, Thomas PGA, Miller PG , Ellington JE, 1992. Development of 1-8 cell equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelial cells. Proceeding of the third international on equine embryo transfer (Buenos Aires): 15.
- Battacharya BC, Shone MS, Gunter AH, Evans BM, 1976. Succesful separation of X and Y in human and bull semen. Int. J. Fertil. 22 : 23-25
- Bearden JH, Fuquay JW, 1984. Applied animal reproduction 2nd edition reston publishing company inc. A prentice Halls Company Virginia:341-345
- Bedford JM, 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol.Reprod. 2 : 28.
- Bianchi NO, 1991. Sex determination in mammals. How many genes are involves?. Biology of Reproduction 44 : 393-397.
- Bonventre JV, 1992. Celluler calcium transport system in membrane transport in biology vol.6 ed by Shafer JA, Usiing HH, Kristensen P, Giebisch GH : 262-316.
- Brackett BG, Olliphant G, 1975. Capacitation of rabbit Spermatozoa in vitro. J. Biol. Reprod.12: 260, 276.
- Buhr MM, 1998. Manipulation of sperm to improve fertility in new direction in animal production system. Proceeding of the annual meeting Canadian society of animal science July 5-8 1998. Vancouver, British Columbia Canada VGT 124. Ed by Blair,Raja R, Mahendra R, Mohan M, Stephen LS, Yang My : 334-336

- Burks DJ, Sailing PM, 1996. Molecular mechanisms of fertilization and activation on development. *Animal Reproduction Science*. 28: 79-86.
- Capaldi RA, 1974. A Dynamic model of Cell Membrane. *Sc. Am.* 230: 26-33
- Check JH, Katsoff D, Rozak J, Lurie D, 1992. Effect of swim up, percoll and sephadex sperm separation methods on the hypoosmotic swelling test. *Human Reprod.* ; 7.1 : 109-11
- Correa JR., Heersche G, Zavos PM, 1996. Sperm membrane functional integrity and response of frozen thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*. 47: 715 -723.
- Corea JR, Rodriquez MC, Patterson DJ, Zavoz PM, 1997. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperature and their effects on sperm viability osmotic shock and sperm membran functional integrity. *Theriogenology*. 46: 789-790
- Cross NI, Meizels, 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalia sperm *Biol. Reprod.*41: 635 – 641.
- Darnell J, Loduss H and Baltimore D. 1990. *Molecular cell biology*. 2nd edition *Sci Am.Books.*: 491-527.
- Dasgupta, Mills SCL, Fraser CR, 1993. Ca^{2+} regulating mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40 : 233-241.
- De Jonge CJ, Flaherty SP, Barness AM, Swann NJ, Mathew, 1997. Failure of multitube sperm swim-up for pre selection fertility and sterility *Vol. 67 no. 6* : 1109-1114.
- Dowson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM, 1986. *Data for biochemical research* 3rd edition. Oxford Science. Publication. New York: 514-515
- Evans WH, Graham JM, 1989. *Membrane structure and function*. IRL Press.Oxford University Press. Oxford : 11-28.
- Fraser LR, 1995 *Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction*. *Human Reprod*, 10 Suppl 1, : 22-30.
- Fraser LR, Ebeydeera LR, Niwa K, 1995. Ca^{++} regulating mechanism that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol-Reprod Dev.*, 40 : 233 - 241.

- Fraser LR, 1998 Sperm capacitation and the acrosome reaction . Human Reprod 13.1 : 9-19
- Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H, 1990. Effect of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. Theriogenology, 34 : 579-591.
- Garner DL, Hafez ESE, 1993. Spermatozoa and seminal plasma in reproduction in farm animals 6th edition. Ed by Hafez ESE, Lea and Febiger. Philadelphia: 165-187
- Geier MR, Young JL, Kesster D, 1990. Too much or too little science in sex selection techniques? Fertil. Steril, 53: 1111-1112.
- Graves JAP, 1994. Mammalian Sex Determining Genes in the Differences Between The sexes ed by RV Short and E. Balaban. Cambridge University Press: 397-418.
- Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK, 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation J. Reprod. Fertil.996. 107: 87-95.
- Gordon I, 1994. Laboratory production of cattle embryos CAB International : 143-150.
- Hafez ESE, Prasad MRN, 1976. Fuctional aspect of the epididymis. In Hafez ESE Eds Human semen and fertility regulation in Man. St. Louis. The C.V. Mosby Comp.: 31-40.
- Hafez ESE, 1980. Reproduction in farm animal 4th edition. Lea Febiger. Philadelphia.: 165.
- Hafez ESE, 1987. Reproduction in Farm Animal 5th edition. Lea ebiger. Philadelphia: 170-175.
- Hafez ESE, 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th Edition. Lea Febiger. Philadelphia: 440-443.
- Handyside AH, Hunter SA, 1984. A Rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophoctoderm nuclei the mouse blastocyst insitu using polynucleotide- specific fluochromes..J.Exp.Zool.231: 429-434.
- Heras MA, Valcarcel A., Perez IJ, Moses DF,1997. Actin location in ram spermatozoa effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore- induced acrosomal exocytosis tissue cell. 29 1: 27-53

- Johnson LA, Welch GR, Keyvan F, Darfman A, Fugger EF, Schulman JD, 1993. Gender pre selection in Human? Flow Cytometric Separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases human reproduction 8 .10 : 1733 -1739
- Kaneko, Yamaguchi J, Kobayashi T, Lizuka R. 1983. Separation of human X and Y bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. J. Fertil. Steril.40: 235-240.
- Kaul G, Singhs S, Gandhi KK, Anand SR, 1997. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assested by chlortetracycline assay. Andrologia. 29 .5: 243-51.
- Keeton WF and Gould JM 1986. Structure of cell membrane. Biological Science. 4th edition. New York.W.E Nroton & Comp: 94-102
- Kim CI, Ellington JE, Foote RH, 1990. Maturation, Fertilization and Development of Bovine Oocytes In Vitro Using TCM-1999 and Simple Defined Medium With Co-cultur. Theriogenology.33: 433-440.
- Koopman P, 1995. Molecular biology of SRY and its Role in sex determination in mammals. Reprod.Fertil. Dev. 7: 712-722
- Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle JCL, Vidament M, Kerboeuf, Palsner E, 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. Theriogenology. 48.7 :1229-1235.
- Maxwell WMC , Johnson LA, 1977. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology. 48 . 2 : 209-220.
- Mahaputra L, Wurlina, Sulistiyati TD, Mulyati S, 1989. Pemisahan sel spermatozoa domba dengan sephadex coulom G-200. Media Kedokteran Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya 5: 31-37.
- Malmgre L, Martinez HR, 1996. Change in sperm motility and plasma membran integrity in equine spermatozoa after storage under different conditions. Presented by 13th international congress on animal reproduction poster session :24-6
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E, 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. Theriogenology, 4: 373-376.
- Mc Clure RD, Nunes L, Tom R, 1989. Semen manipulation : Improved sperm recovery and function with a two layer percoll gradient. Fertil. Steril. 51 : 5



- Mitchell DR, Warner FD, 1981. Binding of Dynein 21 S ATP ase to microtubulus, effects of ionic conditions and substrate analogs. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 12535-12544.
- Mohri H. 1997. *New horizons in sperm cell research*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo: 474.
- Mori K, Daitoh T, Kmada M, Maeda N, Maegawa M, Hirano K, Irahara M, Aono T, 1993. Blocking of human fertilization by carbohydrates. *Human Reproduction*.8: 1728-1732.
- Nakao H, Nakatsuji N, 1990. Effect of co-culture, medium component and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro bovine embryos. *Theriogenology*. 33: 591-600.
- Nishikima A, Yamada M, Minami N, Utsumi K, 1997. Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin A lectin. *Theriogenology* .48: 1007-1016.
- Nur MA, Adijuwana H, 1989. Teknik pemisahan dalam analisis biologis departemen pendidikan dan kebudayaan. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor : 35-40
- Ohl DA, Menge AC, 1996. Assesment of sperm fuction frontier in *Bioscience*,1, 196-108 : 2-10
- Parrish,J.J., Susko-Parish,J., Winer,M.A, First,N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *J. Biol.Reprod*.38: 1171-1180.
- Parish JJ, Vredenburg WL, Levin CA, 1993. Increase in bovine sperm intracelluler calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. *Biol. Reprod*. 48 :192.
- Par KGL. 1998. Aspects of the regulation of human sperm motility. From the departments of woman & child health and laboratory science & technology. Karolinska Institutet. Stockholm.
<http://info.ki.se/form/bild/general/osynlig.gif>.
- Park CK, Ohgoda O, Niwa K, 1989. Penetration of Bovine Follicular Oocytes by Frozen-Thawed Spermatozoa in The presence of Cafein and Heparin. *J. Reprod*. 86: 577-582.
- Pedersen JA, Fawcet DW, 1976. Functional Anatomy of Human spermatozoa in Hafez ESE eds. *Human semen and fertility regulation in Man* St Louis The CV Mosby, : 65-74.

- Perez LJ, Varcарcel MA, de las Heras, Mozes D, Baldassarre H, 1997. The Storage of Pure Ram Semen at Room Temperature Result in Capacitation of A Subpopulation of Spermatozoa. *Theriogenology*, 47: 549-542.
- Pinkel D, Johnson LA, 1986. Modification of a laser- based flow cytometry for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7: 268-273.
- Roldan ERS, Gomendio M, 1992. Morphological, function and biochemical changes underlying the preparation and selection of fertilizing spermatozoa in vivo. *Animal Reproduction Science*. Elsevier Science Publiiser BV. Amsterdam. 28: 69-78.
- Schiling E, Thormahlen A, 1976. Attempt for separation of X and Y Spermatozoa by density gradient centrifugation. *Int. Cong. Of Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Krakow: 90
- Schwerin M, Blottner S, Thomsen PD, Roschlau D, Brockmann, 1991. Quantification of Y chromosom bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. *Molecular Reproduction and Development* 30 : 39-43
- Seidel Jr GE, Johnson LA, Allen CA, Welch GR, 1997. Artificial insemination With X and Y bearing bovine sperm. *Theriogenology* .47: 234-236.
- Soderquist L, Madrid-Bury N, Rodriquez-martinez H. 1997. Assesment of ram sperm membrane integrity following different-thewing procedures. *Theriogenology*. 48. : 115-1126.
- Steno O, Adimoelja A, Steno J, 1975. Separation of X and Y Bearing human spermatozoa with the sephadex gel- filtration method. *Andrologia*, 7 : 95-97
- Suhadji, 1995. Pengembangan bioteknologi peternakan. Keterkaitan penelitian pengkajian dan aplikasi dalam prosiding lokakarya nasional I. Bioteknologi peternakan kerjasama antara kantor menristek dengan departemen pertanian: 45
- Susilawati T, Sumitro SB, Rahayu S, Ciptadi G, Isnaeni N, 1996. Separation of X-Y chromosome bearing sperm in indonesia native bull with sephadex G-200. The 13th Tnt. Cong. On Animal Reproduction Darling Harbour Convention Centre. Sidney..: 24: 3.

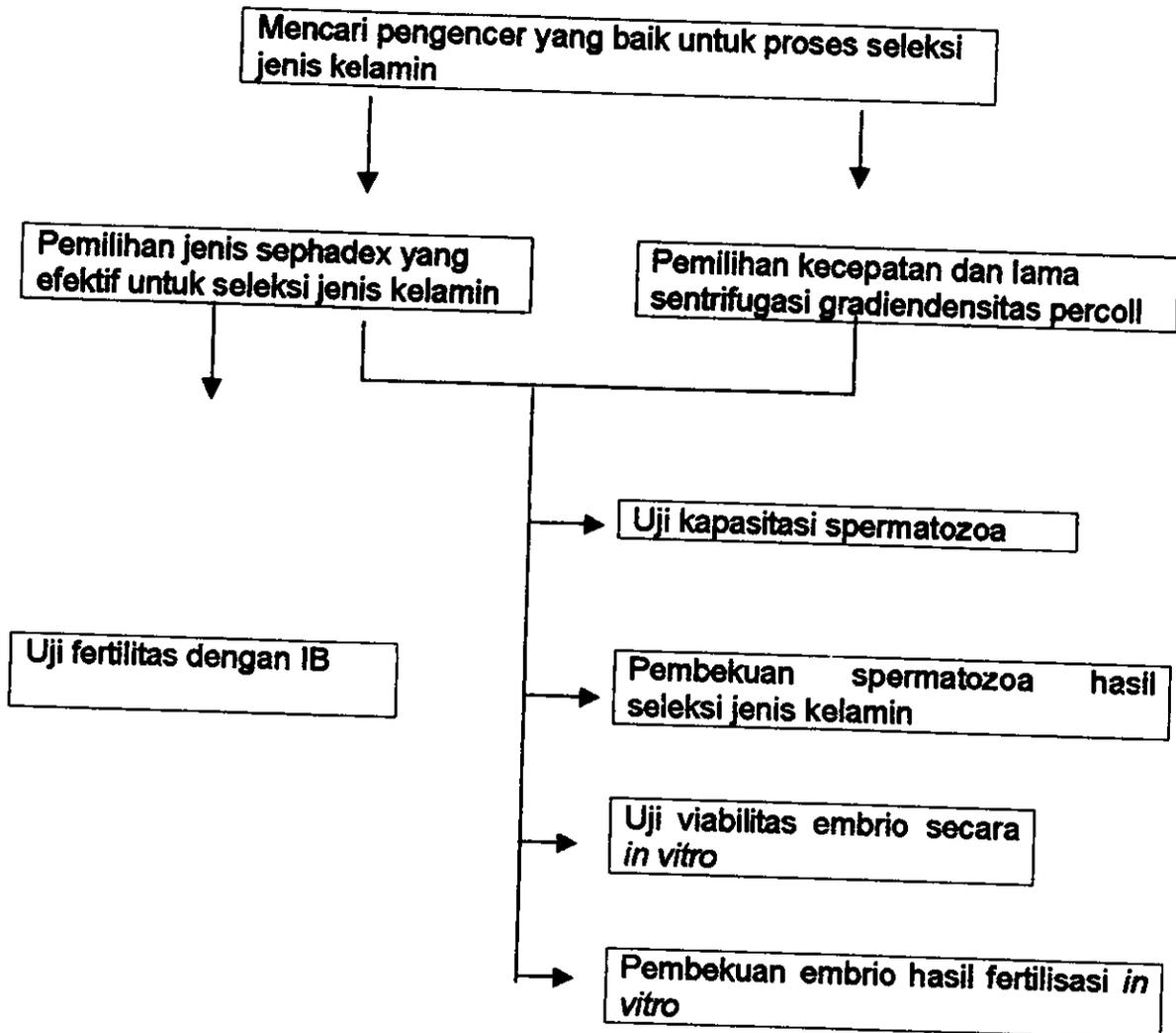
- Susilawati T, Sumitro SB, Sutanto H, 1997. Upaya Pembekuan semen hasil sexing serta penerapannya dalam inseminasi buatan pada sapi untuk mendapatkan pedet dengan jenis kelamin sesuai harapan. Laporan Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu. Universitas Brawijaya: 17-21.
- Susilawati T, Sumitro SB, Harjopranto S, Mantara Y, Nuryadi, 1999. Pola kapasitas spermatozoa X dan Y sapi hasil pemisahan menggunakan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll. Jurnal penelitian ilmu-ilmu hayati 11 : 29-40.
- Sumner AT, Robinson JA, 1976. A difference in dry mass between the heads of X and Y bearing human spermatozoa J. Reprod. Fertil. 48 : 9-15.
- Th'erien I, Soubeyrand S, Manjunath P, 1997. Mayor protein of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high density lipoprotein. Biol.Reprod, 57 : 1088-8.
- Yanagimachi R, 1988. Mammalia Fertilization. In : Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction. Raven Press, Ltd., New York. 5 : 138-152.
- Youssef HM, Doncel GF, Bassiouni BA, Acosta AA, 1997. Effect of sperm viability, plasmalemma integrity and capacitation on pattern of expression of mannosyl-binding sites on human sperm. Arch Androl. 38:1 : 67-74
- Valcarcel A, Heras de las MA, Perez L, Moses DF, Baldassaree H, 1997. Asement of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simaltenous lectin/Hoechst 33258 staining : 556-559
- White G, Darrin-Bennet A, Poulos A, 1976. Lipids of human semen in (Hafez ESE eds) human semen and fertility regulation in Man. St Louis . The CV Mosby Comp: 144-147.
- Zaneveld LJD, 1985. The Biology of human spermatozoa In : Proceeding Pandi Congress Pandi Jakarta.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil penelitian pendahuluan

Diagram alir dari kegiatan penelitian pendahuluan



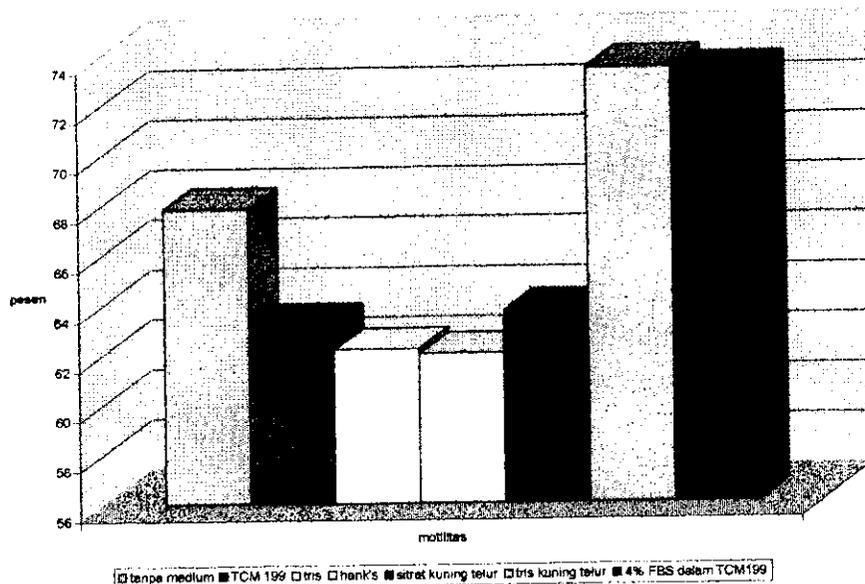
1. Pengencer semen yang baik adalah yang dapat mempertahankan kualitas selama proses pemisahan spermatozoa X dan Y.

Mencari pengencer semen ini perlu dilakukan sebelum perlakuan pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan filtrasi dan sentrifugasi. Pengencer yang digunakan adalah TCM 199, Tris aminomethan, larutan Hank's, sitrat kuning telur dan tris kuning telur dan 4% FBS dalam TCM 199 dan

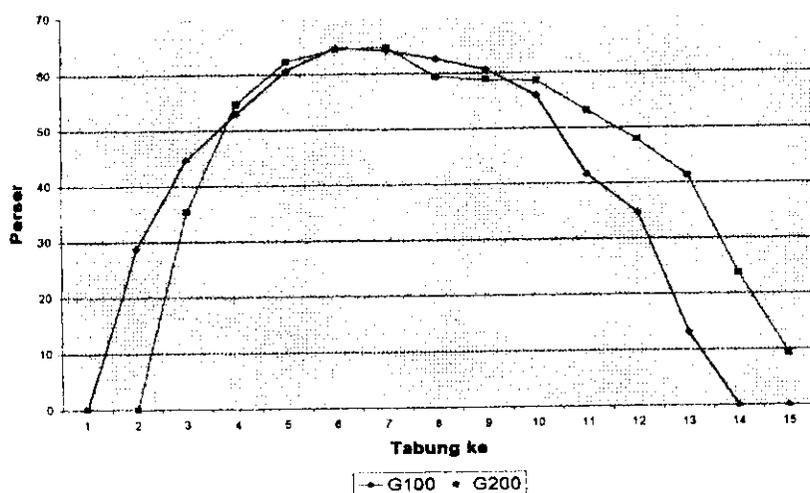
dilakukan inkubasi selama 30 menit. Hasilnya menunjukkan bahwa pengencer tris aminomethan kuning telur dan 4% FBS dalam TCM199 yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Profil persentase motilitas setelah pengenceran adalah seperti pada gambar 1. Semen yang tanpa medium, pengenceran dengan menggunakan larutan TCM 199, PBS ,hanks, sitrat kuning telur terjadi penurunan motilitas yang sangat tajam sedangkan pengencer Tris aminometan kuning telur dan 4% FBS dalam TCM 199 dapat mempertahankan motilitas spermatozoa. Untuk selanjutnya digunakan pengencer 4% FBS dalam TCM 199 dengan pertimbangan , medium yang digunakan lebih encer sehingga tidak mengganggu pergerakan spermatozoa selama proses filtrasi dan sentrifugasi.

2. Jenis sephadex yang digunakan untuk filtrasi seleksi jenis kelamin mempengaruhi kualitas dan keberhasilan seleksi jenis kelamin.

Seleksi jenis kelamin dengan cara pemisahan spermatozoa X dan Y dengan filtrasi sephadex G100 dan G200 menghasilkan motilitas dan viabilitas spermatozoa pada filtrat dalam tabung seperti pada gambar 2 dan 3. Persentase motilitas spermatozoa mula-mula rendah kemudian mengalami kenaikan dan selanjutnya mengalami penurunan. Motilitas spermatozoa mulai tabung ke tiga sampai dengan tabung ke delapan pada sephadex G100 dan kesembilan pada sephadex G200 adalah yang tertinggi.

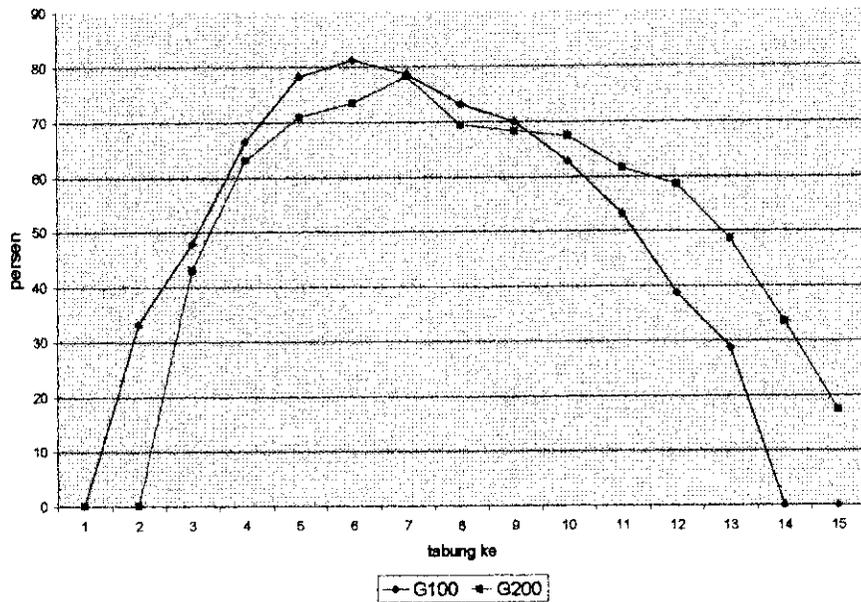


Gambar 12. Perbedaan persentase motilitas spermatozoa pada berbagai medium pengencer

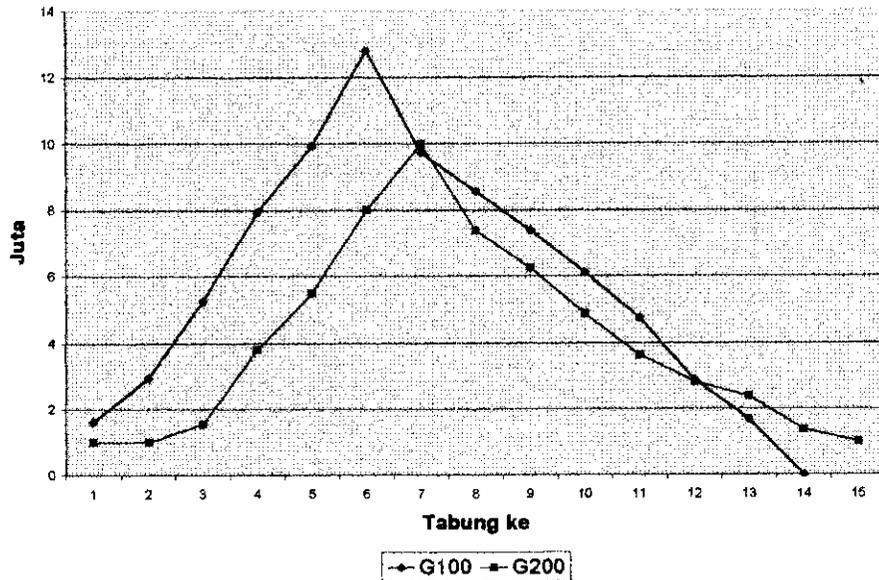


Gambar 13. Perbedaan persentase motilitas spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-100 dan G-200

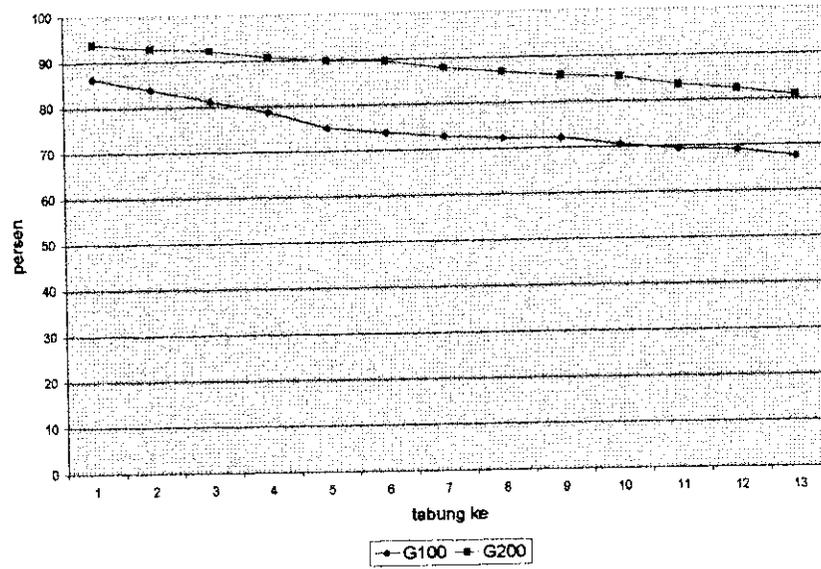
Persentase motilitas spermatozoa setelah filtrasi sephadex G100 dan G200 mengalami peningkatan motilitas semakin meningkat sehingga pada tabung ke 5 sampai dengan 10 didapatkan motilitas diatas 60 persen.



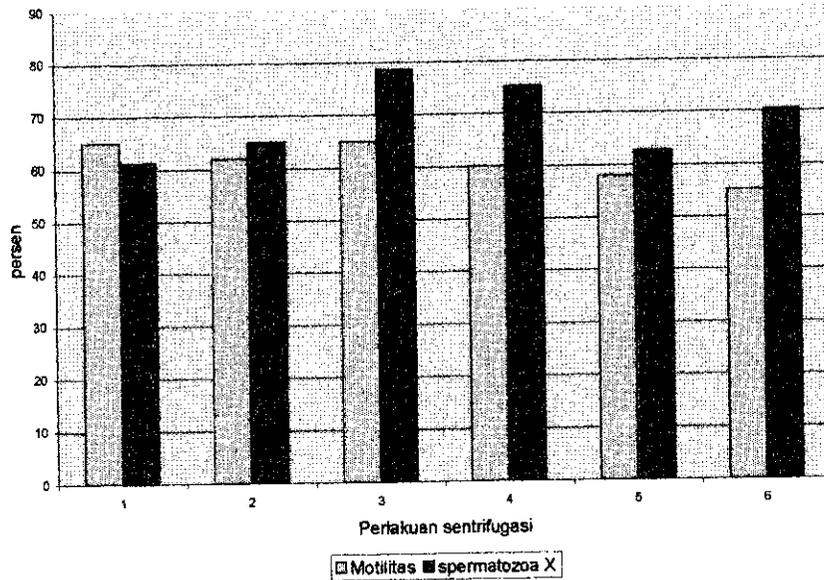
Gambar 14. Perbedaan persentase viabilitas spermatozoa setelah filtrasi sephadex G-100 dan G-200.



Gambar 15. Perbedaan konsentrasi spermatozoa setelah filtrasi sephadex G100 dan G200



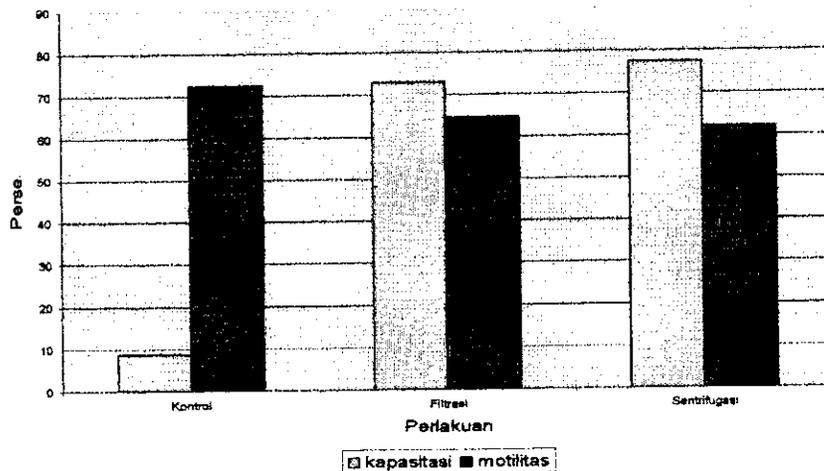
Gambar 16. Perbedaan persentase spermatozoa X pada berbagai tabung setelah filtrasi sephadex G100 dan G200



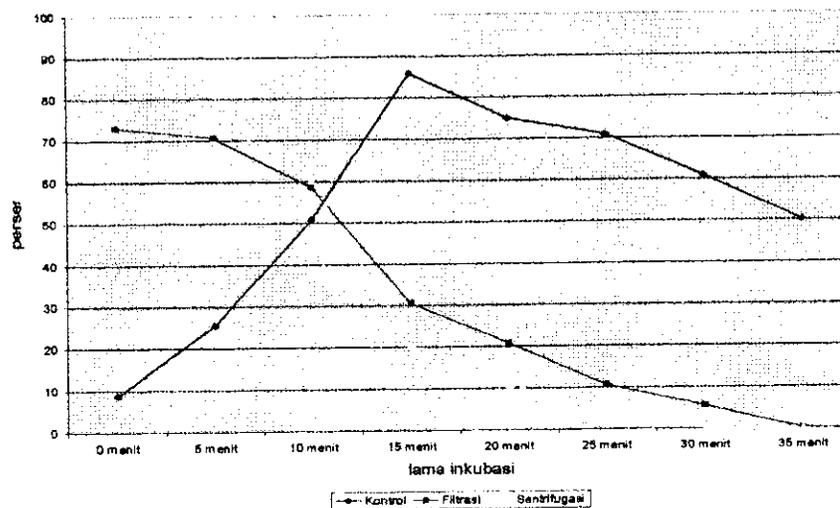
Gambar 17. Perbedaan persentase motilitas dan spermatozoa X pada lapisan bawah pada berbagai kecepatan dan waktu

3. Spermatozoa mengalami peningkatan gambaran kapasitas dan penurunan motilitas setelah filtrasi dan sentrifugasi.

Spermatozoa setelah filtrasi dan sentrifugasi mengalami peningkatan gambaran kapasitas yang ditunjukkan dari penurunan spermatozoa yang non kapasitas seperti pada gambar 18, juga motilitas spermatozoa mengalami penurunan.



Gambar 18. Penurunan persentase motilitas dan spermatozoa kapasitas setelah filtrasi dan sentrifugasi.



Gambar 19. Perubahan gambaran kapasitas spermatozoa setelah Inkubasi secara *in vitro*.

Selanjutnya dilakukan inkubasi dalam medium untuk fertilisasi *in vitro* pada spermatozoa kontrol maupun perlakuan, hasilnya seperti pada gambar 19.

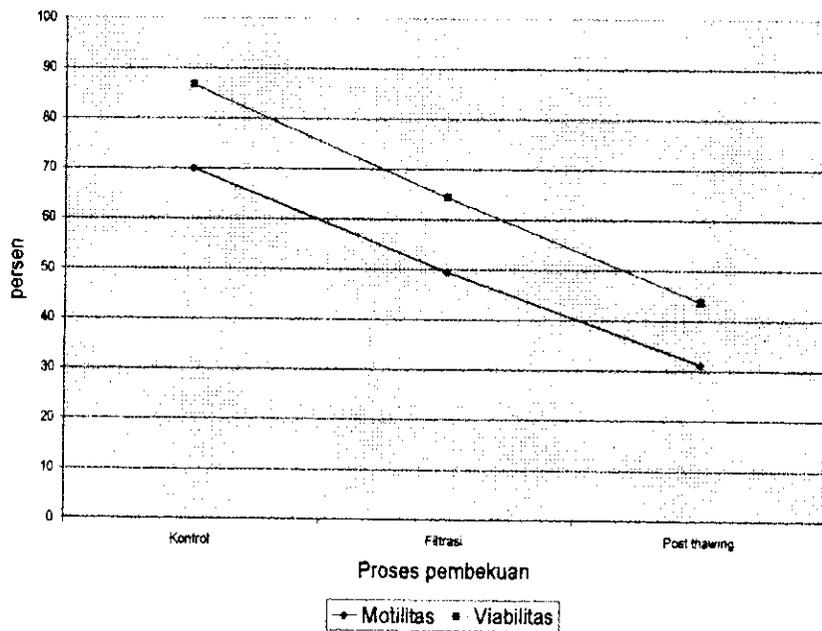
4. Motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi mengalami penurunan setelah proses pembekuan.

Secara umum penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll mempunyai pola yang sama. Motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil filtrasi mengalami penurunan, begitu juga setelah pembekuan penurunan semakin tajam. Hal tersebut dapat diamati pada gambar 20. Sedangkan pada spermatozoa setelah sentrifugasi dan proses pembekuan seperti pada gambar 21.

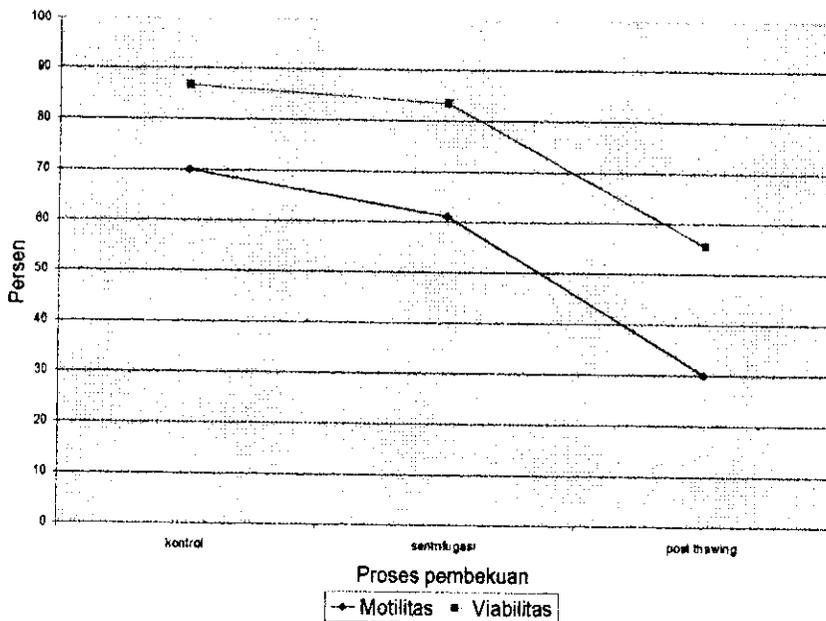
5. Viabilitas embrio hasil fertilisasi *in vitro* dan *in vivo*

Fertilisasi *in vitro* pada penelitian ini digunakan sebagai uji fertilitas spermatozoa hasil pemisahan spermatozoa X dan Y dengan menggunakan filtrasi dan sentrifugasi gradien densitas percoll, yang metodenya merupakan hasil terbaik dari penelitian tahap 1 dan 2. Spermatozoa yang digunakan adalah spermatozoa tanpa perlakuan, spermatozoa hasil filtrasi sephadex G-200, spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll, spermatozoa beku tanpa perlakuan, spermatozoa beku hasil filtrasi, spermatozoa beku hasil sentrifugasi gradien densitas percoll. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

spermatozoa setelah perlakuan filtrasi dan sentrifugasi mengalami penurunan fertilitas, dengan pengamatan terjadinya pembelahan 2 sel



Gambar 20. Penurunan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil filtrasi sephadex setelah pembekuan.



Gambar 21. Penurunan persentase Motilitas dan viabilitas spermatozoa hasil sentrifugasi setelah pembekuan.

menunjukkan penurunan begitu juga dengan kemampuan pembelahan setelah dilakukan kultur secara *in vitro*. Hal ini karena spermatozoa setelah filtrasi banyak yang mengalami kerusakan fungsi membran, sedangkan spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll mengalami kerusakan struktur. Hal tersebut kemungkinan penyebab dari penurunan kemampuan memfertilisasi.

Gambaran penurunan yang drastis terjadi pada embrio hasil fertilisasi menggunakan spermatozoa beku hasil filtrasi dan sentrifugasi. Hal ini terjadi karena kerusakan membran yang berat akibat dari proses perlakuan filtrasi dan sentrifugasi juga proses pembekuan, hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian sebelumnya bahwa terjadi penurunan motilitas yang drastis pada spermatozoa beku hasil filtrasi maupun sentrifugasi. Hasil uji fertilisasi secara *in vivo* dengan melakukan Inseminasi buatan dengan menggunakan spermatozoa hasil filtrasi sephadex G-200 pada 95 ekor sapi betina dan berhasil beranak sebanyak 40 ekor dengan jenis kelamin betina 33 ekor (82,5 persen) dan 7 ekor jantan. Hasil penelitian pendahuluan sebagai penentuan perlakuan berikutnya.

Medium pengencer spermatozoa yang baik adalah yang dapat mempertahankan kualitasnya. Dari berbagai pengencer yang digunakan Tris aminomethan kuning telur dan 4 %TCM 199 kuning telur adalah pengencer yang dapat mempertahankan motilitas pada suhu kamar. Penelitian ini perlu dilakukan, sebab selama proses seleksi jenis kelamin

dilakukan pada suhu kamar selama maksimal 30 menit, untuk itulah perlu pemilihan medium tersebut.

Perbedaan viabilitas embrio hasil fertilisasi *in vitro* menggunakan spermatozoa dengan berbagai perlakuan.

Macam spermatozoa yang digunakan	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel
Spermatozoa tanpa perlakuan (110 oosit)	62 (56,30%)	48 (43,60%)	42 (38,18%)	35 (31,81%)
Spermatozoa hasil filtrasi (105 oosit)	40 (38%)	36 (34,28%)	28 (26,67%)	10 (9,50%)
Spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll (90 oosit)	38 (42,22)	26 (28,88)	5 (5,5)	-
Spermatozoa beku tanpa perlakuan (98 oosit)	40 (40,81)	30 (30,61)	20 (20,41)	15 (15,31)
Spermatozoa beku hasil filtrasi (80 oosit)	10 (12,50)	-	-	-
Spermatozoa beku hasil sentrifugasi (86 oosit)	-	-	-	-

Didalam medium tris amonometan kuning telur antara lain terdapat fruktose dan levulosa yang berfungsi sebagai sumber energi, juga terdapat raffinosa yang selain berfungsi untuk sumber energi juga sebagai *cryoprotektan*. Penambahan kuning telur dilakukan untuk *cryoprotektan extra selluler* yang berguna pada suhu kamar, sedangkan TCM 199 adalah medium yang biasa digunakan untuk kultur, sehingga mengandung bahan-bahan termasuk asam amino yang sangat lengkap, ditambahkan dengan *fetal bovine serum* yang berperan sebagai mempertahankan tekanan osmose. Untuk selanjutnya digunakan 4% TCM 199 karena lebih encer, sehingga didalam proses filtrasi dan sentrifugasi motilitas spermatozoa lebih mudah.

Pola motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa hasil filtrasi sephadex G100 dan G200 yang berpola kubik, ini karena selama perjalanan melewati gel sephadex, pada awalnya membutuhkan energi yang lebih banyak karena sephadexnya masih rapat, oleh sebab itu pada tabung-tabung awal mempunyai konsentrasi kecil dengan viabilitas dan motilitas yang rendah pula. Hasil filtrasi pada tabung selanjutnya mengalami peningkatan, karena gel tidak serapat sebelumnya sehingga energi yang dibutuhkan tidak terlalu banyak sehingga didapatkan konsentrasi yang tinggi dengan motilitas dan viabilitas yang tinggi pula. Setelah mencapai puncak akan mengalami penurunan, hal ini karena ada beberapa faktor misalnya lamanya filtrasi, kebutuhan untuk hidup dan motilitas yang disediakan berangsur habis, daya tampung pengikatnya sudah maksimum. Pola yang sama antara konsentrasi, viabilitas dan motilitas spermatozoa yaitu pola kubik yang menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa yang banyak, maka semakin banyak pula spermatozoa dengan viabilitas dan motilitas yang tinggi, begitu juga sebaliknya. Fakta tersebut menimbulkan pertanyaan bahwa apakah pada spermatozoa juga terdapat sistem komunikasi antar sel spermatozoa yang juga terjadi pada hewan multi seluler, mengingat bahwa spermatozoa juga berasal dari multi seluler.

Berbedanya pola konsentrasi, motilitas dan viabilitas spermatozoa antara sephadex G100 dan G200, adalah karena perbedaan globulnya yang menyebabkan kemampuan untuk memisahkan juga berbeda, Pada

hasil filtrasi sephadex G200 lebih banyak spermatozoa X yang dihasilkan, karena globulnya yang lebih kecil mempunyai kemampuan yang lebih tinggi untuk menyaring spermatozoa dengan cara mengikat spermatozoa Y dan melepaskan spermatozoa X. Hasil dari percobaan tersebut menunjukkan bahwa sephadex G200 lebih dapat memisahkan spermatozoa X dan Y dan kualitas yang dihasilkannya pun juga baik, sehingga untuk selanjutnya digunakan sephadex G200.

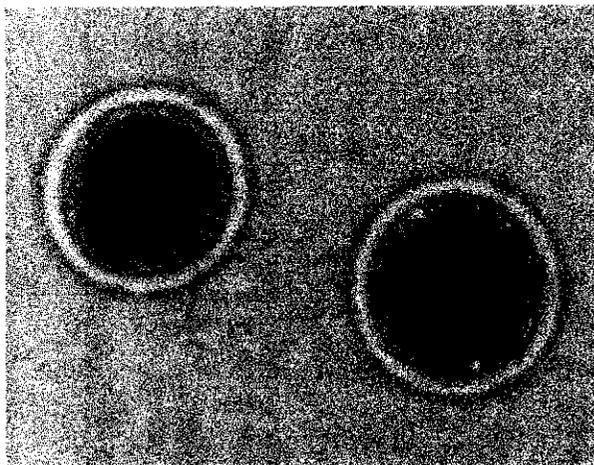
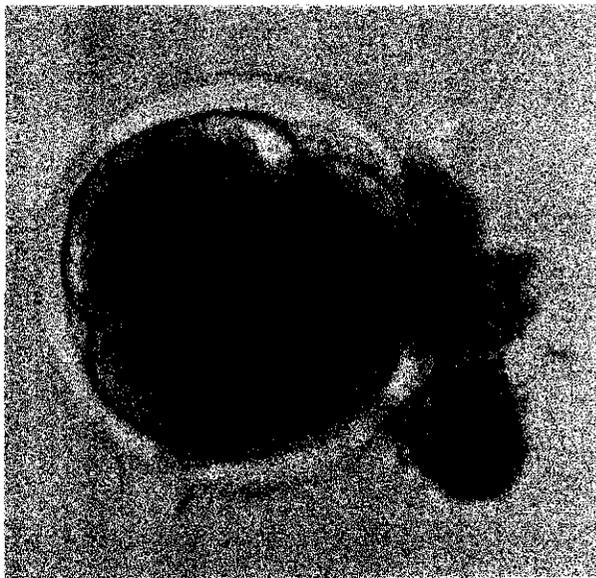
Pemilihan medium pemisah dengan menggunakan percoll, berdasarkan penelitian terdahulu, Susilawati (1994) dilakukan pemisahan spermatozoa dengan Gliserol, maltose, albumin, ficoll dan percoll, hasilnya yang dapat viabilitas tinggi adalah percoll dan ficoll, pemilihan selanjutnya pada percol adalah percoll mudah digunakan sebagai gradien dengan berbagai konsentrasi. Gradien densitas yang digunakan adalah 10 lapis dengan pengenceran 4% FBS dalam TCM 199. Hasil penelitian terdahulu Susilawati dkk (1994) dengan menggunakan 5 lapis , dengan pengencer aquades dan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm didapatkan spermatozoa dengan viabilitas yang masih tinggi tetapi tidak terdapat motilitas.

Pemisahan spermatozoa X dan Y yang dilakukan dengan berbagai kecepatan dan lama sentrifugasi menunjukkan, semakin lama dan kecepatan yang lebih tinggi menyebabkan penurunan motilitas. Hasil ini karena beberapa hal antara lain : Gaya sentrifugal yang menyebabkan spermatozoa dipaksa untuk bergerak kesamping, gesekan antara

spermatozoa dengan medium pengencer dan percoll, Suhu yang meningkat menyebabkan proses metabolisme terganggu.

Kecepatan dan lama sentrifugasi yang sesuai mempunyai kemampuan yang baik untuk memisahkan spermatozoa berdasarkan besarnya, yaitu spermatozoa yang kecil akan keatas sedangkan yang besar akan kebawah. Pada kecepatan 2000 rpm motilitas baik akan tetapi pemisahannya kurang baik , sedangkan 2500 rpm motilitas rendah juga proporsi jeniskelamin yang didapatkan juga rendah, sedangkan 2250 rpm yang didapat motilitas yang tinggi dengan proporsi yang tinggi pula.

Spermatozoa setelah dilakukan pembekuan terjadi penurunan yang drastis, hal ini kemungkinan terjadinya kerusakan membran akibat perlakuan, sehingga pada proses pendinginan dan pembekuan lebih mudah terkena cold shock. Hal tersebut juga dapat diamati dengan rendahnya kemampuan memfertilisasi secara *in vitro* pada semen beku hasil pemisahan.



Gambar 22. Embrio hasil Fertilisasi in vitro dengan menggunakan spermatozoa hasil filtrasi dan sentrifugasi

Lampiran 2. Analisis statistika pembuktian uji viabilitas
antara eosin-negrosin dan hoechst

Ulangan	Eosin negrosin	Hoechst
1	80	81
2	80	80
3	81	82
4	82	81
5	83	80
6	80	81
7	82	81
8	82	83
9	81	82
10	83	83
11	80	81
12	81	60
13	82	80
14	83	81
15	84	85
16	81	82
17	85	84
18	86	85
19	85	85
20	86	86
21	80	81
22	81	80
23	84	83
24	85	86
25	87	86
26	82	80
27	83	83
28	84	85
29	85	84
30	86	85

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	1	1,07	1,07	1,55	7,6	4,18	0,22
Ulangan	29	2,33	8,22	11,96**	2,41	1,85	0,00
Acak	29	19,93	0,68				
Total	59	259,33					

Lampiran 3. Analisis statistika pembuktian reaksi akrosom dengan metode CTC dan FITC concanavalin A

Ulangan	CTC	FITC
1	30	30
2	33	32
3	35	34
4	32	30
5	30	28
6	28	29
7	34	35
8	35	36
9	32	34
10	31	32
11	30	31
12	34	30
13	33	32
14	33	34
15	33	35
16	34	32
17	35	34
18	34	35
19	38	37
20	34	33
21	33	30
22	33	32
23	32	34
24	33	34
25	34	35
26	37	36
27	37	37
28	34	33
29	35	34
30	36	35

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	1	1,35	1,35	1,18	7,6	4,18	0,29
Ulangan	29	272,75	9,41	8,23**	2,41	1,85	0,00
Acak	29	33,15	1,43				
Total	59	307,25					

Lampiran 4. Analisis statistika persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan

Ulangan	Sebelum	Setelah filtrasi	Setelah sentrifugasi	Setelah ionophore
1	75	65	72	20
2	75	65	73	35
3	75	65	70	25
4	70	65	67	20
5	70	65	63	15
6	70	65	67	20
7	70	65	63	25
8	75	65	60	20
9	75	65	40	30
10	70	60	45	20
Total	725	645	620	230
Rata-rata	72.5	64,5	62.0	23
SD	2.64	1,58	11.13	5,9
Variance	6,94	2,5	123,78	34,44

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	3	14.685	4.895	127,94**	4,6	2,96	0,00
Ulangan	9	476	52,89	1,38	3,1	2,25	0,24
Acak	27	1.033	38,26				
Total	39	16.194					

Hasil Uji BNT persentase motilitas spermatozoa

BNT 5% = 7,96

Perlakuan	Rata –rata dan notasi BNT 5%
Kontrol	72,50 ^c
Filtrasi	64,50 ^b
Sentrifugasi	62 ^b
Ionophore	23 ^a

Lampiran 5. Analisis statistika persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan

Ulangan	Sebelum	Setelah filtrasi	Setelah sentrifugasi	Setelah ionophore
1	87	83	72	40
2	85	80	81	45
3	85	70	74	40
4	87	79	75	35
5	82	82	80	40
6	89	80	86	45
7	89	79	63	40
8	89	74	70	40
9	87	77	68	45
10	87	81	59	30
Total	867	785	728	400
Rata-rata	86.7	78.5	72.8	40
SD	2,21	3,91	8.28	4,7
Variance	4,90	15,39	68,62	22,22

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	Fhitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	3	12.579,80	4.193,27	168,05**	4,6	2,96	0,22
Ulangan	9	326,50	36,28	1,45	3,1	2,25	0,00
Acak	27	673,70	24,95				
Total	39	13.580,00					

Hasil Uji BNT persentase viabilitas spermatozoa

BNT 5% = 3,98

Perlakuan	Rata-rata + notasi BNT 5%
Kontrol	86,70 ^c
Filtrasi	78,50 ^b
Sentrifugasi	72,80 ^b
Ionophore	40,00 ^a

Lampiran 6. Analisis statistika persentase integritas membran baik spermatozoa setelah perlakuan

Ulangan	Sebelum	Setelah filtrasi	Setelah sentrifugasi	Setelah lonophore
1	90	70	30	85
2	95	80	20	90
3	85	75	35	80
4	80	70	25	75
5	80	50	35	75
6	85	60	30	85
7	90	75	34	85
8	85	60	32	80
9	70	50	30	70
10	70	65	25	70
Total	830	655	296	795
Rata-rata	83	65,5	29,6	79,5
SD	8,23	10,4	4,92	6,85
Variance	67,77	108,06	115,82	46,94

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	3	17.862,2	5.954,07	149,86**	4,60	2,96	0,00
Ulangan	9	1.150,6	127,84	3,22**	3,10	2,25	0,09
Acak	27	1.072,8	39,73				
Total	39	20.085,6					

Hasil Uji BNT persentase integritas membran baik spermatozoa

BNT 5% = 5,02

Perlakuan	Rata-rata + Notasi BNT5%
Kontrol	83 ^c
Filtrasi	65,50 ^b
Sentrifugasi	29,60 ^a
lonophore	79,50 ^c

Lampiran 7. Analisis statistika persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan.

Persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan

Ulangan	sebelum			Filtrasi			Sentrifugasi			Ionophore		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	91	9	0	47	53	0	23	76	1	0	100	0
2	90	10	0	20	80	0	3	93	4	0	95	5
3	92	8	0	17	83	0	13	87	0	0	95	5
4	92	8	0	18	82	0	10	88	2	2	93	5
5	92	8	0	10	90	0	0	84	16	1	95	4
6	90	10	0	5	95	0	0	79	21	0	98	2
7	91	9	0	49	50	1	32	66	2	3	92	5
8	93	7	0	49	50	1	26	74	0	0	99	1
9	91	9	0	15	72	13	23	77	0	2	98	0
10	91	9	0	25	75	0	50	50	0	3	97	0
Total	913	87	0	155	730	15	180	774	46	11	962	27
Rata	91,3	8,7	0	25,5	73,0	1,5	18,0	77,4	4,6	1,1	96,2	2,7
SD	0,95	0,94	0	16,6	16,5	4,06	15,97		7,53	1,29	2,62	2,31

Keterangan :

A = Belum kapasitas

B = Kapasitas

C = Selesai reaksi akrosom

Persentase spermatozoa yang belum kapasitasi setelah perlakuan

Ulangan	Sebelum	Setelah filtrasi	Setelah sentrifugasi	Setelah lonophore
1	91	47	23	0
2	90	20	3	0
3	92	17	13	0
4	92	18	10	2
5	92	10	0	1
6	90	5	0	0
7	91	49	32	3
8	93	49	26	0
9	91	15	23	2
10	91	25	50	3
Total	914	155	180	11
Rata-rata	91,4	25,5	18,0	1,1
SD	0,95	16,66	15,97	1,29
Variance	0,71	277,39	255,11	1,24

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	3	47.232,41	15.744,14	147,21**	4,6	2,96	0,00
Ulangan	9	1.922,49	213,61	1,99	3,1	2,25	0,06
Acak	27	2.887,61	106,95				
Total	39	52.042,51					

Hasil Uji BNT persentase spermatozoa yang belum kapasitasi

BNT 5% = 8,064

Perlakuan	Rata-rata + Notasi BNT5%
Kontrol	91,4 ^c
Filtrasi	25,5 ^b
Sentrifugasi	18 ^b
lonophore	0,83 ^a

Lampiran 8. Analisis statistika persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan inkubasi medium kadar kalsium berbeda

Persentase gambaran kapasitas spermatozoa setelah perlakuan inkubasi pada medium ion kalsium berbeda

Ulan gan	Sebelum			Tanpa Ca			Ca Standard			Ca Tinggi		
	BK	K	RA	BK	K	RA	BK	K	RA	BK	K	RA
1	98	2	0	88	12	0	45	45	10	5	85	10
2	98	2	0	88	12	0	45	55	10	10	80	10
3	80	20	0	80	20	0	10	90	0	20	80	10
4	80	20	0	90	10	0	30	60	10	10	60	30
5	98	2	0	80	20	0	49	50	1	50	50	0
6	90	9	1	90	7	3	10	60	30	0	60	40
7	95	5	0	80	20	0	0	70	30	10	80	10
8	91	8	1	92	8	0	5	75	20	0	80	20
9	87	9	4	89	11	0	3	92	5	5	65	30
10	96	4	0	92	8	0	0	99	1	3	80	17
Tot	913	81	6	869	128	3	197	676	108	113	72	177
Rat	91.3	8.1	0.6	86.9	12.8	0.3	19.7	67.6	10.8	11.3	7.2	17.7
SD	7.04	6.85	1.26	4.95	5.25	0.95	20.3	17	13	11.85	14.8	12.06

Persentase spermatozoa yang belum kapasitasi setelah perlakuan inkubasi pada medium kadar ion kalsium yang berbeda

Ulangan	Tanpa kalsium	Kalsium standard	Kalsium Tinggi
1	43	19	9
2	15	35	8
3	29	31	10
4	20	6	0
5	29	0	0
6	25	10	0
7	44	5	1
8	39	10	4
9	35	0	0
10	30	5	0
Tot	309	121	32
Rat	30,90	12,1	3,2
SD	9,52	12,33	4,21
Variance	90,54	152,10	17,73

Sidik ragam

SK	db	JK	KT	F hitung	F1%	F5%	P
Perlakuan	2	3.999,80	1.999,90	23,64**	6,01	3,55	0,00
Ulangan	9	820,53	91,17	1,08	3,69	2,50	0,42
Acak	18	1.522,87	84,60				
Total	29	6.343,20					

Hasil Uji BNT persentase spermatozoa yang belum kapasitasi
BNT 5% = 9,76

Perlakuan	Rata-rata + notasi BNT
Tanpa kalsium	30,9 ^b
Kalsium standard	12,1 ^a
Kalsium Tinggi	3,2 ^a

Lampiran 9. Analisis statistik pendaran normal pada spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi pada medium berkadar ion kalsium berbeda,

Perlakuan	Ca	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	Rata	STrd V
A1	B1	95	97	96	95	90	97	90	92	93	90	935	93.50	2.88
	B2	99	98	98	99	100	95	98	99	98	97	981	98.10	1.37
	B3	99	98	98	99	100	99	95	94	98	100	980	98.00	2.00
A2	B1	20	12	15	20	17	25	10	30	15	17	181	18.10	5.97
	B2	35	40	51	34	45	52	30	35	37	40	399	39.90	7.34
	B3	30	35	40	25	35	40	30	32	35	40	342	34.20	5.03
A3	B1	2	1	0	1	3	2	0	0	0	1	10	1.00	1.05
	B2	10	20	15	20	13	22	20	18	10	17	165	16.50	4.3
	B3	5	4	10	11	4	6	4	3	0	1	48	4.80	3.49
A4	B1	2	5	3	6	4	5	3	4	5	2	39	3.90	1.37
	B2	90	92	80	80	75	70	75	80	85	80	807	80.70	6.78
	B3	10	8	20	22	8	15	8	6	5	1	103	10.30	6.68

Analisis ragam

SK	DB	JK	KT	F	F(0.01)	F(0.05)	PROB
Ulangan	9	309.5	34.39	1.73	2.59	1.98	0.0929
Perlakuan	11	172391.2	15671.93	786.58	2.43	1.89	0.0000
A	3	132074.0	44024.67	2209.60	6.22	2.70	0.0000
B dalam A1	2	138.1	69.03	3.46	4.83	3.09	0.0351
B dalam A2	2	2556.5	1278.25	64.16	4.83	3.09	0.0000
B dalam A3	2	1305.3	652.64	32.76	4.83	3.09	0.0000
B dalam A4	2	36318.0	18159.00	911.40	4.83	3.09	0.0000
Galat	99	1972.5	19.92				
Total	119	174673.2					

Nilai BNT

BNT (A) = 2.29

BNT (B) = 1.98

BNT (A*B) = 3.96

Lampiran 10 . Analisis statistika motilitas spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi pada medium berkadar ion kalsium berbeda,

Perlakuan	Ca	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	Rata	STrd V
A1	B1	10	10	7	10	10	7	10	10	8	8	90	9.00	1.33
	B2	30	20	10	30	20	15	30	30	20	30	235	23.50	7.47
	B3	30	20	20	25	25	20	30	30	20	30	250	25.00	4.71
A2	B1	10	10	7	10	10	8	7	10	8	8	88	8.80	1.32
	B2	15	10	15	15	10	20	15	10	8	8	126	12.60	3.95
	B3	10	10	5	10	10	10	10	15	10	10	100	10.00	2.36
A3	B1	5	5	0	5	5	10	5	0	5	10	50	5.00	3.33
	B2	10	5	5	10	5	10	5	5	5	10	70	7.00	2.58
	B3	5	5	5	5	5	5	5	0	5	10	50	5.00	2.36
A4	B1	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0	10	1.00	2.11
	B2	0	0	0	5	5	5	5	0	0	0	20	2.00	2.58
	B3	0	0	0	5	5	5	5	0	0	0	20	2.00	2.58

Analisis ragam

SK	DB	JK	KT	F	F(0.01)	F(0.05)	PROB
Ulangan	9	282.41	31.38	3.07	2.59	1.98	0.0028
Perlakuan	11	6775.49	615.95	60.25	2.43	1.89	0.0000
A	3	5105	1701.67	166.45	6.22	2.70	0.0000
B dalam A1	2	1561.67	780.84	76.38	4.83	3.09	0.0000
B dalam A2	2	75.47	37.74	3.69	4.83	3.09	0.0284
B dalam A3	2	16.67	13.34	1.30	4.83	3.09	0.2760
B dalam A4	2	6.67	3.34	0.33	4.83	3.09	0.7224
Galat	99	1012.09	10.22				
Total	119	8069.99					

Nilai BNT

BNT (A) = 1.64

BNT (B) = 1.42

BNT (A*B) = 2.84

Lampiran 11 . Analisis statistika viabilitas spermatozoa setelah perlakuan dilanjutkan inkubasi pada medium berkadar ion kalsium berbeda,

Perlakuan	Ca	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	Rata	STrd V
A1	B1	15	15	10	15	5	10	15	20	13	14	132	13.20	4.05
	B2	35	25	15	35	20	20	35	35	20	35	275	27.50	8.25
	B3	30	25	25	30	30	25	35	30	20	30	280	28.00	4.22
A2	B1	15	15	10	15	15	10	15	10	15	16	136	13.60	2.50
	B2	17	13	20	20	15	25	20	15	17	25	187	18.70	4.08
	B3	15	15	15	15	15	15	20	15	15	15	155	15.50	1.58
A3	B1	10	9	3	10	10	17	10	3	10	15	97	9.70	4.37
	B2	15	10	10	1	10	20	10	10	10	14	110	11.00	4.85
	B3	10	9	8	7	5	4	5	3	6	15	72	7.20	3.52
A4	B1	1	2	2	10	4	10	4	3	4	4	44	4.40	3.13
	B2	1	3	2	10	10	10	11	3	2	3	55	5.50	4.14
	B3	1	2	3	10	9	12	11	2	3	2	55	5.50	4.40

Analisis ragam

SK	DB	JK	KT	F	F(0.01)	F(0.05)	PROB
Ulangan	9	413.8	45.98	2.76	2.59	1.98	0.0063
Perlakuan	11	7081.77	643.80	38.67	2.43	1.89	0.0000
A	3	5453.6	1817.87	109.18	6.22	2.70	0.0000
B dalam A1	2	1412.6	706.30	42.42	4.83	3.09	0.0000
B dalam A2	2	132.87	66.44	3.99	4.83	3.09	0.0216
B dalam A3	2	74.6	37.30	2.24	4.83	3.09	0.1118
B dalam A4	2	8.07	4.04	0.24	4.83	3.09	0.7853
Galat	99	1648.4	16.65				
Total	119	9143.97					

Nilai BNT

BNT (A) = 2.09

BNT (B) = 1.81

BNT (A*B) = 3.62