

TESIS

PENGARUH PERBEDAAN DURASI THAWING SEMEN BEKU TERHADAP KAPASITASI, UPTAKE Ca^{2+} DAN EKSPRESI SITOKROM C PADA KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN ETTAWA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh :

BETA PURNAMA SARI
NIM 061214153006

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2014**

**PENGARUH PERBEDAAN DURASI *THAWING* SEMEN BEKU
TERHADAP KAPASITASI, *UPTAKE* Ca²⁺ dan EKSPRESI
SITOKROM C PADA KUALITAS SPERMATOZOA
KAMBING PERANAKAN ETTAWA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

BETA PURNAMA SARI

061214153006

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

2014

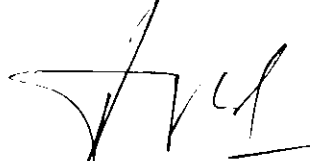
iii

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
Tanggal 14 April 2014

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Wurlina, drh., MS

NIP. 19540918 198301 2 001

Pembimbing



Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes

NIP. 19590808 18701 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, drh., MS

NIP. 19540918 198301 2 001

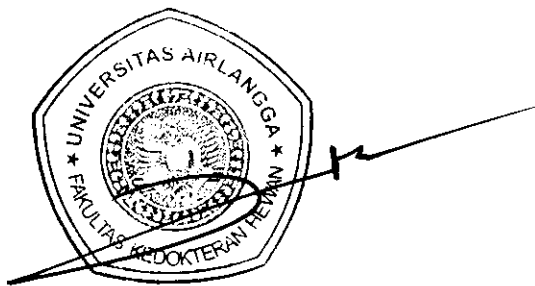
Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 11 April 2014

KOMISI PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.
Anggota : 1. Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.
2. Dr. Abdul Samik, drh., M. Si.
3. Prof. Dr. Wurlina, drh., MS
4. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Surabaya, 15 April 2014
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.
NIP. 195312161978062001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas nikmat, karunia dan hidayah yang telah dicurahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar Magister pada Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan Tesis yang berjudul **“PENGARUH PERBEDAAN DURASI THAWING SEMEN BEKU TERHADAP KAPASITASI, UPTAKE Ca^{2+} dan EKSPRESI SITOKROM C PADA KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN ETTAWA”** penulis mencoba untuk mengetahui pengaruh perbedaan durasi *thawing* terhadap kapasitas, kadar calcium intraseluler dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa.

Keberhasilan dalam penulisan ini tidak lepas dari bantuan dan kerjasama berbagai pihak. Dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Ibu Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh. atas kasih sayangnya kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ibu Prof. Dr. Wurlina Meles, drh., MS selaku pembimbing ketua dan Ibu Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. selaku pembimbing kedua yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis dengan perhatian dan kesabaran hingga terselesaikannya tesis ini.

Ibu Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes selaku penguji pertama dan pembimbing selama penelitian yang telah bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis, Bapak Dr. Budi Utomo, drh., M.Si., selaku penguji kedua, dan Bapak Dr. Abdul Samik, drh., M. Si. selaku penguji ketiga atas segala bimbingan, kritik, serta saran yang sangat bermanfaat dan banyak membantu penulis untuk menyempurnakan tesis ini.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ayahhanda, Suwarli SE.Ak., dan Ibunda tercinta, Eka Prihyantini, atas segala bantuan doa, semangat, pengorbanan seluruh jiwa dan raga yang tak ternilai. Tak lupa juga kepada kakak, Yoga Surya Nugroho, drh., Maya Tama Arifa, drh., dan Hani Yudayan, drh atas kasih sayang dan dorongan moral selama ini.

Darmaningtyas Satiti, drh., yang telah menemani perjalanan penelitian hingga akhir. Semua teman-teman angkatan 2008, alumni sejawat Dokter Hewan Angaktn 151, Mega Haryna Juwa, drh., Farintan Dwi Putri P., drh., Linda Metalia., drh serta teman seangkatan S2IBR yang telah banyak memberi dorongan semangat kepada penulis.

Semua pihak yang tidak sempat penulis sebutkan satu-persatu yang telah banyak membantu penulis hingga terselesainya penulisan ini.

Penulis sepenuhnya menyadari masih banyak terdapat kekurangan, mengingat terbatasnya pengetahuan dan kemampuan yang penulis miliki oleh

karena itu saran dan kritik yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan semua pihak yang membutuhkan demi kemajuan dan perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran hewan serta turut meningkatkan kualitas ternak di Indonesia.

Surabaya, 13 Maret 2014

Penulis

RINGKASAN

RINGKASAN

Pengaruh Perbedaan Durasi *Thawing* Semen Beku Terhadap Kapasitas, *Uptake* Ca²⁺ Dan Ekspresi Sitokrom C Pada Kualitas Spermatozoa Kambing Peranakan Ettawa

Permasalahan dari semen beku adalah kualitas yang rendah dari spermatozoa setelah dilakukan *thawing*. Selama proses pembekuan dapat terjadi penurunan motilitas yang disebabkan karena pengaruh kerusakan yang disebabkan oleh proses pembekuan (*cold shock*). Kematian spermatozoa sampai pembekuan berkisar antara 20-80% dengan rata-rata 50%.

Pada saat *thawing*, besar kemungkinan terjadi kapasitas secara dini. Kapasitas berkorelasi dengan *hyperpolarization* dari membran plasma spermatozoa. Akibat *hyperpolarization* membran dapat membuka saluran *voltage-dependent* Ca²⁺ dan mendorong Ca²⁺ untuk masuk. Ca²⁺ yang masuk ke dalam sel akibat rangsangan akan diikuti proses perubahan depolarisasi membran dengan mengaktifkan pintu *voltage* (VGC) yang merangsang lebih banyak Ca²⁺ ke dalam sel. Ca²⁺ ATPase memompa Ca²⁺ di dalam sitosol melintasi membran plasma menuju keluar atau ke tempat penyimpanan di dalam retikulum endoplasmik dan mitokondria. Mitokondria memiliki pori-pori khusus (*PT pore*) yang memudahkan Ca²⁺ keluar atau masuk, seperti stres oksidatif dan toksin yang mampu membuka pori-pori mitokondria, sehingga mitokondria tidak bisa menyerap dan gagal menyimpan sejumlah Ca²⁺ yang mengakibatkan kematian sel.

Kematian pada spermatozoa terjadi akibat permeabilitas membran mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis kedalam sitoplasma tanpa memerlukan reseptor kematian spermatozoa. Faktor pertumbuhan dan sinyal yang lain dapat merangsang pembentukan protein anti-apoptosis Bcl-2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein anti apoptosis yang utama adalah Bcl-2 dan Bcl-x yang pada keadaan normal terdapat pada mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan kemudian digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax dan Bim. Sewaktu kadar Bcl-2 dan Bcl-x menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan *cascade caspase*. Salah satu protein tersebut adalah sitokrom c yang diperlukan untuk proses respirasi mitokondria. Pada sitosol, sitokrom c berikatan dengan APAF-1 (*Apoptosis Activating Factor 1*) dan mengaktifkan caspase-9 yang kemudian akan mengaktifkan caspase-3 sehingga terjadi kematian spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara kadar kapasitas, *uptake* Ca²⁺ dan ekspresi sitokrom c sitolitik pada spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE) dan juga hubungan dengan viabilitas dan motilitas spermatozoa dengan perbedaan durasi *thawing*. Kapasitas dideteksi dengan menggunakan pewarnaan *chlortetracycline* (CTC). *Uptake* Ca²⁺ dideteksi dengan pewarnaan Fluo-3 yang kemudian diamati dengan *confocal laser scanning microscope* (CLSM). Ekspresi sitokrom c sitolitik dideteksi dengan

pewarnaan imunohistokimia dengan *Ultravision Detection System*. Pemeriksaan viabilitas dilakukan dengan menggunakan larutan eosin negrosin dan untuk pemeriksaan motilitas dilakukan dengan metode natif untuk melihat pergerakan spermatozoa yang progresif atau maju kedepan.

Dua puluh delapan semen beku mini straw kambing peranakan ettawa digunakan dalam penelitian ini dengan empat kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (P0) yaitu semen beku *dithawing* pada suhu 27°C selama 10 detik, P1 semen beku *dithawing* pada suhu 37°C selama 10 detik, kelompok P2 semen beku *dithawing* pada suhu 37°C selama 20 detik dan kelompok P3 semen beku *dithawing* pada suhu 37°C selama 30 detik. Data dianalisis menggunakan *Multivariate Analysis of Variant (MANOVA)* dengan uji *Wilk's Lamda* untuk mengetahui perbedaan nilai variabel antar kelompok. Jika pada masing-masing perlakuan terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji *Hotteling's Trace (T)*. Kemudian korelasi antar perlakuan dianalisis dengan menggunakan Pearson.

Hasil dari penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara motilitas, viabilitas, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa *post-thawing* kambing peranakan ettawa dengan durasi *thawing* yang berbeda. *Thawing* yang dilakukan pada suhu 27°C selama 10 detik menunjukkan angka persentase terendah pada motilitas, viabilitas, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa. Saat *thawing*, semen mengalami peningkatan suhu yang drastis dan kontak dengan oksigen. Hal ini akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa yang menyebabkan Ca^{2+} masuk secara pasif ke dalam membran yang berakibat penimbunan Ca^{2+} secara berlebihan dalam sitoplasma. Akumulasi Ca^{2+} diketahui sebagai inisiator pembentukan ATP untuk motilitas. Peningkatan Ca^{2+} secara berlebih dapat menyebabkan permeabilitas membrane mitokondria meningkat yang akan memicu terbukanya *PT pore*. *PT pore* yang terbuka akan mengakibatkan pelepasan sitokrom c. sitokrom c yang lepas akan berada pada sitoplasma akan berikatan dengan APAF-1 yang akan mengaktifkan protein caspase sehingga memicu kematian spermatozoa.

Berdasarkan penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa suhu *thawing* yang tepat dilakukan pada suhu 27°C selama 10 detik memberikan hasil persentase terendah motilitas, viabilitas, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa.

SUMMARY

The Effects of Differences In The Duration of The Thawing of Frozen Semen to Capacitation, Uptake Ca^{2+} and Cytochrome C Expression on Sperm Peranakan Ettawa Goat

Main issue of frozen semen is low quality semen after thawing. During freezing process could be decreasing of motility that cause of damage because of cold shock. Sperm mortality during freezing is 20-80% average on 50%.

At thawing, highly probability there is early capacitation. Capacitation has correlation with hyperpolarization from sperm plasma membrane. Cause of hyperpolarization membrane can open voltage dependent Ca^{2+} channel and stimulate Ca^{2+} intake. Influx Ca^{2+} into cell because of stimulation will be followed by changing depolarization membrane process with activation voltage shut (VGC) that stimulate more influx Ca^{2+} . Ca^{2+} ATPase pumps in Ca^{2+} in cytosol traverse plasma membrane to out of cell or to Ca^{2+} deposit organelle in Reticulum Endoplasmic and mitochondria. Mitochondria has special pores (PT pore) that facilitate Ca^{2+} to go in or out, for example there are oxidative stress and toxin can open mitochondria pores, that mitochondria cannot absorb and fail to save Ca^{2+} will be lead cell to dead.

Dead of sperm occurred because mitochondria membrane permeability and pro-apoptosis molecule release into cytoplasm without require dead receptor. Growth factor and others signal can stimulate anti-apoptosis Bcl-2 protein formation, which has function as regulation dead of sperm. The main anti-apoptosis protein is Bcl-2 and Bcl-x that in normal condition can be found in mitochondria and cytoplasm. At the moment cell is stressing, Bcl-2 and Bcl-x will be disappear from mitochondria membrane and then be replaced by pro-apoptosis protein, such as Bak, Bax and Bim. When the level of Bcl-2 and Bcl-x are low, permeability of mitochondria will be high; some protein can activate cascade caspase. One of those proteins is cytochrome c that is needed for mitochondria respiration process. In cytosol, cytochrome c is linked with APAF-1 (Apoptosis Activating Factor 1) and activates caspase-9 that will activate caspase-3 until dead of sperm.

This study has goal to know correlation between level of capacitation, uptake Ca^{2+} and cytochrome c expression cytolitic of Peranakan Ettawa goat sperm and correlation viability and sperm motility with thawing duration differences. Capacitation is detected by using chlortetracycline coloring (CTC). Uptake Ca^{2+} is detected by using Fluo-3 coloring that later will be observed with Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Cytochrome c expression cytosolic is detected by using immunohistochemistry coloring with Ultra Vision Detection System. Viability observation using eosin negrosin solution and for motility observed sperm movement that move forward or progressive.

Twenty eight frozen semen mini straw Peranakan Ettawa goat used in this study with three group treatments. Group P1 frozen semen was thawed at temperature 37°C for 10 second, group P2 frozen semen was thawed at temperature

37°C for 20 second and group P3 frozen semen was thawed at temperature 37°C for 30 second. Semen that was thawed at temperature 28°C for 10 second as control. Data was analyzed by using Multivariate Analysis of Variant (MANOVA) on coefficient of variant at 5% with Wilk's Lamda test to know differentiation variable value between groups. If each treatment continued with Hotteling's Trace (T) test. For correlation between treatment were analyzed using Pearson.

Result from this study showed there is significant difference ($p < 0,05$) between motility, viability, capacitation, acrome reaction, uptake Ca^{2+} and cytochrome c expression cytosolic on post-thawing Peranakan Ettawa goat spermatozoa with differences of thawing duration. At thawing, semen come through temperature escalation drastically and contacted with oxygen. This case will caused escalation permeability sperm resulting in Ca^{2+} influx passively into membrane that makes excessive Ca^{2+} buried in cytoplasm. Ca^{2+} accumulation was known as initiator ATP formation for motility. Excessive Ca^{2+} escalation can cause permeability membrane mitochondria increased that will trigger fair PT pore. PT pore that open would lead cytochrome c release in to cytoplasm and would locks down into APAF-1 with that reactivated protein caspase as stimulation of death sperm Mitochondria damage.

Based on study then can be conclude that precise thawing temperature at 27°C for 10 second giving lowest percentage motility, viability, capacitation, uptake Ca^{2+} and cytochrome c cytosolic on sperm.

The Effects of Differences In The Duration of The Thawing of Frozen Semen to Capacitation, Uptake Ca^{2+} and Cytochrome C Expression on Sperm Peranakan Ettawa Goat

Beta Purnama Sari

ABSTRACT

The main purpose of this study is to evaluation the relation between amount of capacitation, uptake Ca^{2+} , and cytochrome c expression cytosolic in Peranakan Ettawa frozen semen and correlation of viability and motility with difference thawing duration. This study used 22 mini straw frozen semen goats with 4 difference treatments, semen that was thawing on $27^{\circ}C$ for 10 second as control (P0), P1 semen was thawed at $37^{\circ}C$ for 10 second, P2 was thawed at $37^{\circ}C$ for 20 second, and P3 was thawed at $37^{\circ}C$ for 30 second. Capacitation was detected by using chlortetracycline coloring (CTC). The positive result showed fluorescent yellow at two-thirds at sperm head region. Uptake Ca^{2+} was detected by using Fluo-3 coloring than observed use Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) and the results are expressed in intensity / μm^2 . Cytochrome c cytosolic expression was detected by using immunohistochemistry coloring with Ultra Vision Detection System. The positive result showed tan brown at sperm neck. Based on data analyzed by using *Multivariate Analysis of Variant* for all treatment and test followed by *Hotteling's Trace 5%*, the result indicated that there is significant difference ($p < 0,05$) between motility, viability, capacitation, uptake Ca^{2+} in sperm post-thawing of Peranakan Ettawa goat with difference duration. Thawed at $27^{\circ}C$ for 10 seond showed lowest percentage on motility, viability, capacitation, uptake Ca^{2+} and cytochrome c cytosolic expression sperm.

Keywords : Thawing duration, Capacitation, Uptake Ca^{2+} , Cytochrome c, Sperm quality

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
ABSTRACT.....	xiv
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Hasil Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kambing Peranakan Ettawa	7
2.2 Anatomi dan Fisiologi Alat Kelamin Kambing Peranakan Ettawa (PE) Jantan	8
2.3 Semen dan Spermatozoa Kambing	11
2.3.1 Semen.....	11
2.3.2 Spermatozoa Kambing	12
2.3.3 Plasma Semen	14
2.4 Semen Beku.....	15
2.5 <i>Thawing</i>	18
2.6 Kapasitasi	19
2.7 <i>Uptake</i> Ca ²⁺	21
2.8 Kematian Spermatozoa	22
2.9 Sitokrom c	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	27
3.1 Kerangka Konseptual	27

3.2 Bagan Kerangka Konseptual	30
3.2 Hipotesis Penelitian.....	31
BAB 4 MATERI DAN METODE	32
4.1 Jenis Rancangan Penelitian	32
4.2 Subyek Penelitian.....	32
4.2.1 Populasi penelitian	32
4.2.2 Besar Sampel.....	32
4.3 Variabel Penelitian	33
4.3.1 Variabel Bebas	33
4.3.2 Variabel Tergantung.....	33
4.3.3 Variabel Kendali	33
4.3.4 Definisi Operasional.....	33
4.4 Bahan Penelitian.....	35
4.5 Instrumen Penelitian.....	35
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	36
4.7 Pengumpulan Data	36
4.7.1 Pemeriksaan Terhadap Presentasi Viabilitas Spermatozoa.....	37
4.7.2 Pemeriksaan Motilitas Setelah Pembekuan Semen (<i>Post Thawing Motility</i>)	38
4.7.3 Pemeriksaan Kapasitasi.....	39
4.7.4 Pemeriksaan <i>Uptake</i> Ca ²⁺	40
4.7.5 Pemeriksaan Ekspresi Sitokrom c Sitosolik dengan Metode Imunohistokimia	41
4.9 Analisis Data	41
4.10 Diagram Alir Prosedur Penelitian	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN	44
5.1 Hasil Semen Segar	44
5.2 Hasil Kualitas Mikroskopis Spermatozoa.....	44
5.3 Hasil Kualitas Seluler Spermatozoa.....	47
5.4 Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas, Kapasitasi, <i>Uptake</i> Ca ²⁺ dan Ekspresi Sitokrom c sitosolik pada Spermatozoa <i>Post-Thawing</i>	53
BAB 6 PEMBAHASAN	55
6.1 Evaluasi Kualitas Semen Segar.....	55
6.2 Persentase Kualitas Mikroskopis Spermatozoa <i>Post-Thawing</i> ...	57
6.3 Persentase Kualitas Seluler Spermatozoa <i>Post-Thawing</i>	61
6.4 Korelasi Kualitas Mikroskopis dan Kualitas Seluler pada Spermatozoa <i>Post-Thawing</i>	71
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	73
7.1 Kesimpulan.....	73
7.1.1 Kesimpulan Khusus	73

7.1.2 Kesimpulan Umum	73
7.2 Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN.....	85

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Karakteristik Semen Kambing.....	12
5.1 Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar kambing PE.....	44
5.2 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa <i>Post-thawing</i> Semen Kambing PE.....	45
5.3 Rerata dan Standar Deviasi Kualitas Seluler Spermatozoa <i>Post-thawing</i> Semen Kambing PE.....	48
5.4 Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas, Kapasitas, Uptake Ca ²⁺ dan ekspresi sitokrom c sitosolik Pada Spermatozoa <i>Post-thawing</i>	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Kambing Peranakan Ettawa Jantan Dewasa	8
2.2 Alat Reproduksi Kambing Jantan	11
2.3 Morfologi Spermatozoa	14
2.4 Proses Kapasitasi Spermatozoa	20
2.5 Proses Kematian Spermatozoa	24
2.6 Jalur Skematis Sitokrom c	26
3.1 Bagan Kerangka konseptual	30
3.1 Prosedur Operasional Penelitian	43
5.1 Rerata Selisih Motilitas Spermatozoa <i>post-thawing</i> Semen Kambing Peranakan Ettawa	45
5.2 Viabilitas pada spermatozoa	46
5.3 Rerata Selisih Kapasitasi, <i>uptake</i> Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik Spermatozoa <i>post-thawing</i> Semen Kambing Peranakan Ettawa	48
5.4 Kapasitasi pada spermatozoa	49
5.5 <i>Uptake</i> Ca^{2+} pada spermatozoa	50
5.6 Histogram kadar Ca^{2+} intraseluler	51
5.7 Ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa	52
6.1 Grafik Peningkatan Motilitas Seiring dengan Peningkatan Viabilitas, Kapasitasi, Reaksi Akrosom, <i>Uptake</i> Ca^{2+} dan Ekspresi Sitokrom C Sitosolik	71

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Proses Pembuatan Semen Beku	85
2 Alur Pemeriksaan Kapasitas	88
3 Komposisi dan Pembuatan Reagen CTC	89
4 Prosedur Pewarnaan Ekspresi Sitokrom c Sitosolik dengan Teknik Imunohistokimia	91
5 Pengolahan Data Statistik	93
6 Foto Penelitian	122

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

°C	: <i>Celcius</i>
-SH	: <i>Sulfhidril</i>
AC	: <i>Adenyl Cyclase</i>
AIF	: <i>Apoptosis Inducing Factor</i>
ANT	: <i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
APAF 1	: <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
APAF 2	: <i>Apoptotic Protease Activating Factor 2</i>
ATP	: <i>Adenosin triphosphate</i>
ATPase	: <i>Adenosin Triphosphatease</i>
Bax	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl 2	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x	: <i>B-cell lymphoma x</i>
Bax	: <i>Protein Pro-apoptosis 10,11</i>
Bid	: <i>Bcl-2 Interacting Protein Domain</i>
C	: <i>karbon</i>
Ca ²⁺	: <i>kalsium</i>
Ca ²⁺ -K-ATPase	: <i>Calcium-Kalium- Adenosin Triphosphatease</i>
cAMP	: <i>cyclic Adenosin Monophosphate</i>
Caspase	: <i>Cystein aspartyl-specific protease</i>
Cl ⁻	: <i>Clorida</i>
cm	: <i>centi meter</i>
CPE	: <i>Corona Penetrating Enzyme</i>
CTC	: <i>Chlor Tetra Cyclin</i>
Cu ²⁺	: <i>Cuprum</i>
DAB	: <i>Diaminobenedine</i>
DABCO	: <i>1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktana</i>
DAG	: <i>Diacylglycerol</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DNA	: <i>Deoksiribonukleat</i>
EndoG	: <i>Endonuclease G</i>
ER	: <i>Endoplasmic Reticulum</i>
FAD	: <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FADH ₂	: <i>Flavin Adenine Dinucleotide Hidrogen</i>
FADD	: <i>Fas Associated Death Domain</i>
FMN	: <i>Flavin Monomucleotide</i>
FMNH ₂	: <i>Flavin Monomucleotide Hidrogen</i>
FasL	: <i>Fas ligand</i>
Fe ²⁺	: <i>Ferro</i>
Fluo-3	: <i>4-(6-Acetoxymethoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl) ester</i>
H ⁺	: <i>Hidrogen</i>

H ₂ O	: Hidrogen Oksida
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HCO ₃ ⁻	: Ion bikarbonat
IAP	: <i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IB	: Inseminasi Buatan
IU	: <i>International Unit</i>
IP3	: <i>Inositol Triphosphate</i>
K ⁺	: Kalium
kDa	: kilo Dalton
kg	: kilogram
LPO	: Lipid Peroxidase
M	: Molar
MANOVA	: <i>Multivariate Analysis of Variant</i>
mg	: miligram
µm	: mikro meter
µm ²	: mikro meter persegi
mM	: mili Molar
MPT	: <i>Mitochondrial Permeability Transtition</i>
n	: ulangan
N ₂	: Nitrogen
Na ⁺	: Natrium
Na ⁺ -K-ATPase	: <i>Natrium-Kalium-Adenosin Triphosphatease</i>
NAD ⁺	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hidrogen</i>
NADPH	: <i>Nikotinamida Adenina Dinukleotida Phosphat Hidrogen</i>
O ₂	: Oksigen
O ₂ ^{o-}	: Superoksida anion
OH ^{o-}	: Radikal hidroksil
P0	: Kontrol
P1	: Perlakuan pertama
P2	: Perlakuan kedua
P3	: Perlakuan ketiga
p53	: <i>Protein 53</i>
PBS	: <i>Phosphat Buffer Saline</i>
PE	: Perankan Ettawa
pH	: <i>Power of Hydrogen</i>
PKA	: Protein Kinase A
PKC	: Protein Kinase C
PLA ₂	: <i>Phospholipase A2</i>
PLC _{γ1}	: <i>Phospholipase C gammal</i>
PTM	: <i>Post Thawing Motility</i>
PT pore	: <i>Permeability Transition pore</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SPSS	: <i>Statistical Product for Solution Service</i>
t	: perlakuan

T	: <i>Hotteling's Trace</i>
tBid	: Truncated Bid
VDAC	: <i>Voltage-gated-canal-anion</i>
VDCC	: <i>Voltage Dependent Calcium Channels</i>
VGC	: <i>Voltage Gated Channel</i>
Zn ²⁺	: Zinc

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inseminasi buatan adalah teknik perkawinan dengan memasukkan semen ke dalam alat reproduksi betina sehat untuk dapat membuahi sel telur dengan menggunakan alat inseminasi agar ternak bunting (Dirjennak, 2007). Penerapan teknologi IB pada kambing hingga saat ini masih belum sesuai dengan yang diharapkan dan ini ditandai dengan angka kebuntingan rendah, terutama apabila menggunakan semen beku. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa angka kebuntingan pada kambing yang diperoleh dengan menggunakan semen beku bervariasi dari 40-46% (Achlis, 2011).

Kualitas semen beku merupakan salah satu faktor pembatas terhadap keberhasilan program IB pada kambing. Semen kambing mudah mengalami kerusakan akibat proses pembekuan karena terjadinya pembentukan kristal-kristal es yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. Kristal-kristal es yang terbentuk akan menyebabkan konsentrasi elektrolit meningkat di dalam sel yang akan melarutkan selubung protein dinding sel spermatozoa, dan pada waktu *thawing* akan mengubah permeabilitas membran plasma sehingga spermatozoa akan mati (Toelihere, 1985).

Menurut Tambing dkk. (1999) *thawing* semen beku kambing PE dengan air pada suhu 37°C selama 30 detik menghasilkan persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa terbaik pasca *thawing*. Menurut Suindarti (2013)

durasi *thawing* yang dapat digunakan sebagai pedoman dalam proses *thawing* semen beku kambing dengan air pada suhu 37°C selama 20 detik.

Kapasitasi merupakan proses fisiologis yang terjadi pada spermatozoa yaitu mengalami perubahan kestabilan membran plasma selama berada di saluran reproduksi betina, serta memperoleh kemampuan bergerak atau motil (Djuwita *et al.*, 2000). Proses kapasitasi memungkinkan terjadinya perubahan membran spermatozoa serta pelepasan suatu komponen dari permukaan akrosom (Blandau, 1980). Kapasitasi juga berkorelasi dengan *hyperpolarization* dari membran plasma spermatozoa. Akibat *hyperpolarization* membran dapat membuka saluran *voltage-dependent* Ca^{2+} dan mendorong masuknya Ca^{2+} (Gadella and Visconti, 2006).

Ca^{2+} yang masuk ke dalam sel akibat rangsangan akan diikuti proses perubahan depolarisasi membran dengan mengaktifkan pintu *voltage* (VGC) yang merangsang lebih banyak Ca^{2+} masuk ke dalam sel (Lamb *et al.*, 1986). Keadaan ini tampaknya sesuai dengan pendapat Kohler *et al.*, (2001) yang menyatakan meningkatnya Ca^{2+} di dalam sel akan menambah kecepatan depolarisasi sehingga masuknya Ca^{2+} ke dalam sel semakin meningkat. Peristiwa tersebut juga dapat terjadi akibat kerusakan membran biasanya terjadi akibat perubahan suhu atau peristiwa keracunan, hal ini berakibat berubahnya konsentrasi Ca^{2+} di dalam sitosol dan menyebabkan kematian sel (Blanco *et al.*, 1998). Ca^{2+} ATPase memompa Ca^{2+} di dalam sitosol melintasi membran plasma menuju keluar atau ke tempat penyimpanan di dalam retikulum endoplasmik dan mitokondria. Mitokondria memiliki pori-pori khusus (PT *pore*) yang memudahkan Ca^{2+} keluar

atau masuk, misalkan adanya stres oksidatif dan toksin yang mampu membuka pori-pori mitokondria, sehingga mitokondria tidak bisa menyerap dan gagal menyimpan sejumlah Ca^{2+} yang mengakibatkan kematian sel (Batistatou *et al.*, 1993).

Kematian pada spermatozoa melalui terjadi akibat permeabilitas membran mitokondria meningkat dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein anti-apoptosis Bcl-2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein anti apoptosis yang utama adalah Bcl-2 dan Bcl-x yang pada keadaan normal terdapat pada mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan kemudian digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax dan Bim. Sewaktu kadar Bcl-2 dan Bcl-x menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan *cascade caspase*. Salah satu protein tersebut adalah sitokrom c yang diperlukan untuk proses respirasi mitokondria. Pada sitosol, sitokrom c berkaitan dengan APAF-1 (*Apoptosis Activating Factor 1*) dan mengaktifkan caspase-9 yang kemudian akan mengaktifkan caspase-3 sehingga terjadi kematian pada spermatozoa (Lumongga, 2008).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat pengaruh durasi *thawing* terhadap kualitas mikroskopis meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)?
2. Apakah terdapat pengaruh durasi *thawing* terhadap kapasitas spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)?
3. Apakah terdapat pengaruh durasi *thawing* terhadap *uptake* Ca^{2+} spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)?
4. Apakah terdapat pengaruh durasi *thawing* terhadap ekspresi sitokrom c spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)?
5. Apakah terdapat korelasi antara kualitas mikroskopis, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE) dalam berbagai durasi *thawing* yang berbeda?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan durasi *thawing* terhadap kualitas mikroskopis spermatozoa serta kaitannya dengan kualitas seluler meliputi kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dengan sitokrom c sitosolik pada spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE).

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh durasi *thawing* semen beku kambing PE terhadap kualitas mikroskopis meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing peranakan etawa (PE) *post-thawing*
2. Membuktikan pengaruh durasi *thawing* semen beku kambing PE terhadap kualitas seluler meliputi kapasitas melalui pewarnaan CTC.
3. Membuktikan pengaruh durasi *thawing* semen beku kambing PE terhadap kualitas seluler meliputi *uptake* Ca^{2+} melalui pewarnaan Fluo-3.
4. Membuktikan pengaruh durasi *thawing* semen beku kambing PE terhadap kualitas seluler meliputi ekspresi sitokrom c sitosolik melalui pewarnaan Imunohistokimia.
5. Membuktikan adanya korelasi antara kualitas mikroskopis dan kualitas seluler spermatozoa yang *dithawing* dengan waktu yang berbeda.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Manfaat yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai informasi penelitian pendahuluan semen beku kambing peranakan etawa (PE) yang dalam mempertahankan kualitas *post-thawing*nya dalam hal ini kualitas mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas dan kualitas seluler meliputi kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil dari penelitian ini nantinya dapat diharapkan dapat dijadikan acuan dalam memperbaiki metode *thawing* semen beku kambing peranakan ettawa (PE) sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa *post-thawing* yang memberikan persentase kebuntingan yang baik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kambing Peranakan Ettawa

Kambing Peranakan Ettawa atau yang lebih dikenal dengan kambing Jawarandu merupakan hasil persilangan antara kambing kacang dengan kambing ettawa yang keberadaannya sudah sangat adaptif dengan topografi di Indonesia serta sudah banyak dikembangkan. Sistem pemeliharaan yang tidak memerlukan lahan yang luas budidaya relatif mudah. Umur dua tahun kambing peranakan ettawa dapat beranak tiga kali dengan sekali beranak rata-rata dua ekor anak. Kambing ini merupakan penghasil daging dan susu (*dual purpose*) (Setiawan dan Tanius, 2005).

Kambing PE mempunyai ciri-ciri yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 yaitu (1) bagian hidung ke atas melengkung, (2) panjang telinga antara 15-30 cm, menggantung ke bawah dan sedikit kaku, (3) warna bulu bervariasi antara hitam dan coklat, (4) kambing jantan mempunyai bulu yang tebal dan agak panjang di bagian bawah leher dan pundak, sedangkan bulu kambing betina agak panjang terdapat di bagian bawah ekor arah garis kaki, (5) berat badan hidup kambing PE jantan sekitar 40 kg dan PE betina sekitar 35 kg (Mulyono, 2003)

Pejantan yang dapat diambil semen adalah pejantan setelah berumur lebih dari satu tahun dan bisa digunakan sampai umur 5-6 tahun dengan pemberian pakan yang baik. Pejantan yang sudah mencapai umur 4 tahun, lebih baik sudah disiapkan pejantan pengganti dari keturunan terdahulu untuk menjaga kesinambungan program penerapan sistem perkawinan dan seleksi. Kriteria

pemilihan pejantan antara lain berasal dari induk yang produksi susu tinggi dan laju pertumbuhan relatif cepat (Sodiq dan Abidin, 2008).



Gambar 2.1 Kambing Peranakan Ettawa (Prabowo, 2010).

2.2 Anatomi dan Fisiologi Alat Kelamin Kambing Peranakan Ettawa (PE) Jantan

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

Sistem reproduksi kambing jantan dapat dilihat pada Gambar 2.2 terdiri dari 3 (tiga) bagian besar yaitu: 1) Gonad atau testis yang merupakan bagian alat kelamin utama, 2) saluran-saluran reproduksi yang terdiri atas: epididimis, vas deferens, ampula dan uretra sedangkan kelenjar-kelenjar asesoris terdiri atas: vesika seminalis, prostat dan bulbouretralis (Cowper), 3) alat kelamin bagian luar yaitu: penis, preputium dan skrotum (Ismudiono dkk., 2010).

Testis terbungkus dalam kantong skrotum yang berisi dua lobi testis yang masing-masing lobi mengandung satu testis. Testis sebagai organ kelamin utama mempunyai dua fungsi yaitu (1) fungsi reproduktif yang menghasilkan sel spermatozoa, (2) fungsi endokrinologis yang berfungsi menghasilkan hormon jantan yaitu androgen (Ismudiono dkk., 2010).

Epididimis merupakan saluran reproduksi jantan yang terdiri dari tiga bagian, yaitu *caput epididimis*, *corpus epididimis* dan *cauda epididimis*. Caput epididimis merupakan muara dari sejumlah duktus efferentes dan terletak pada bagian ujung atas dari testis. Corpus epididimis merupakan saluran kelanjutan dari caput yang berada di luar testis, sedangkan cauda epididimis merupakan kelanjutan dari corpus yang terletak pada bagian ujung bawah testis. Epididimis mempunyai 4 fungsi utama antara lain (1) transportasi yaitu mengangkut spermatozoa, (2) konsentrasi yaitu menyerap air selama perjalanan di epididimis oleh saluran terutama pada caput sehingga sesampai pada bagian cauda konsentrasi spermatozoa menjadi sangat tinggi, (3) pendewasaan yaitu pelepasan *cytoplasmic droplet* yang membalut bagian leher yang dalam perjalanan selama di epididimis, butiran sitoplasma tersebut berpindah ke ekor bagian bawah sampai hilang sama sekali dari ekor, (4) penyimpanan yaitu menyimpan spermatozoa pada bagian cauda epididimis (Ismudiono dkk., 2010).

Vas deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis dengan uretra. Dinding vas deferens mengandung otot polos yang berperan dalam pengangkutan spermatozoa. Kedua vas deferens berangsur-angsur membesar

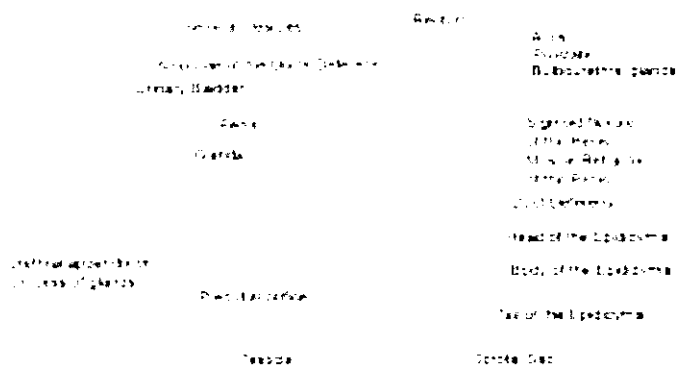
membentuk *ampullae ductus deference*. Kelenjar ampula mensekresikan fruktosa dan asam sitrat (Ismudiono dkk., 2010).

Uretra merupakan saluran ekskretori bersama untuk urine dan semen. Uretra dibedakan atas tiga bagian yaitu (1) bagian pelvis merupakan saluran silindrik diselubungi oleh otot uretra dan terletak pada lantai pelvis, (2) bulbus urethrae adalah bagian melengkung seputar *arcus ischiadicus* dan (3) bagian penis adalah bagian ujung pada *gland penis* (Ismudiono dkk., 2010).

Kelenjar asesoris terdiri dari vesika seminalis, kelenjar prostat dan kelenjar cowper. Vesika seminalis terdapat sepasang dan mengapit kedua ampula. Sekresi kelenjar ini merupakan cairan keruh dan lengket mengandung protein, kalium, asam sitrat, fruktosa dan beberapa enzim dalam konsentrasi tinggi. Prostat pada kambing tidak mempunyai korpus, hanya ada pars disseminata yang berdifusi dengan sebagian besar uretra. Bulbouretralis (cowper) terdapat sepasang, berbentuk bulat dan berselubung tebal. Sekresi kelenjar ini berfungsi untuk membersihkan dan menetralsir uretra dari bekas urin dan kotoran lain sebelum ejakulasi (Ismudiono dkk., 2010).

Penis mempunyai dua fungsi yaitu peletakan semen ke dalam alat reproduksi betina dan saluran urinasi. Pada kambing, penis bertipe fibroelastis, yang berarti selalu dalam keadaan agak kaku dan kenyal meskipun dalam keadaan non-aktif atau non-ereksi. Penis terdiri dari bagian akar, badan dan ujung yang berakhir pada *gland penis*. Bagian penis terdiri dari *corpus cavernosum* urethra. Kedua bagian ini akan bersatu pada *gland penis* membentuk *corpus fibrosum* (Poernomo dkk., 2006).

Preputium menyelubungi bagian penis sewaktu tidak ereksi dan menyelubungi badan penis caudal sewaktu ereksi. Skrotum adalah kantong tertis, terdapat lapisan-lapisan pada skrotum berfungsi sebagai peredam kejut apabila terjadi benturan fisik juga sebagai pelindung terhadap temperatur lingkungan dan gangguan mekanis lain (Ismudiono dkk., 2010).



Gambar 2.2 Alat Reproduksi Kambing Jantan (Leite-Browning, 2009).

2.3 Semen dan Spermatozoa Kambing

2.3.1 Semen

Hardijanto dkk., (2010) menyatakan semen kambing adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina sewaktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Semen kambing terdiri dari dua bagian yaitu spermatozoa dan plasma seminalis.

Warna semen kambing PE adalah krem. Substansi organik dan anorganik untuk melindungi dan menyediakan energi bagi spermatozoa. Plasma semen

bersifat ionik, cairan netral dengan pH 7 (Yusuf dkk., 2005). Karakteristik semen kambing tercantum pada Tabel 2.1.

Sel spermatozoa dihasilkan di dalam testis, sedangkan plasma semen adalah campuran sekresi yang berasal dari epididimis dan kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap seperti vesikularis, prostat, dan bulbouretralis. Semen juga mengandung larutan-larutan penyangga (*buffer*) seperti sitrat dan bikarbonat, tetapi bahan-bahan penyangga ini tidak dapat mempertahankan pH netral akibat jumlah asam laktat yang terbentuk dari pemecahan fruktosa di dalam plasma semen (Ismudiono dkk, 2010).

Tabel 2.1. Karakteristik Semen Kambing

Waktu Ejakulasi	1 detik
Volume (ml)	0,8 – 1,2
Konsentrasi sperma/ml x 10 ⁶	2000 – 3000
Persentase motilitas (%)	75
Persentase spermatozoa normal (%)	95
pH	5,9 – 7,3
Fruktosa (mg/100ml)	250
Sorbitol (mg/100ml)	26 -170
Asam sitrat (mg/100ml)	110 – 260
Inositol (mg/100ml)	7 – 4
Glycerolphosphorilcholine (mg/100ml)	1100 – 2100
Sodium (mg/100ml)	178 ± 11
Potassium (mg/100ml)	89 ± 4

Sumber: Hafez and Hafez (2000)

2.3.2. Spermatozoa Kambing

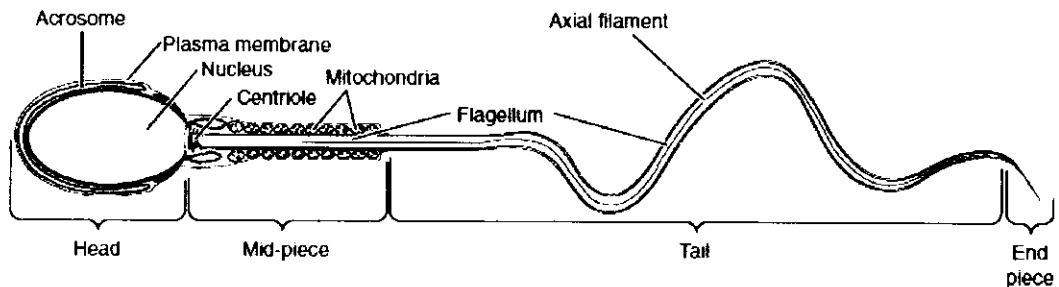
Morfologi spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 2.3 terdiri dari tiga bagian yaitu bagian kepala, leher, dan ekor. Bagian kepala terdiri dari asam deoksiribonukleat (DNA) yang sebagian besar terdapat di dalam inti (Bearden and Fuquay, 1992). Pada bagian kepala juga terdapat bagian yang sangat penting yaitu

akrosom. (Hardijanto dkk., 2010). Pada bagian akrosom ini terdapat enzim spesifik antara lain *hialuronidase*, *Corona Penetrating Enzyme (CPE)*, *akrosin*, *neuromidase*, *ATP-ase*, *fosfatase*, *asparatil amidase* dan *glukoronidase*. Enzim-enzim ini mempunyai peranan penting pada proses fertilisasi (Polakoski and Zenevald, 2000). Bagian leher terdapat sentriol sebagai pusat genetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak (Bearden *et al.*, 2004; Pineda dan Dooley, 2003). Bagian leher selain mengandung lipid yang sebagian besar lipoprotein, plasmalogen dan juga terdapat sitokrom yang berfungsi dalam reaksi pernafasan spermatozoa (Bearden and Fuquay, 1992).

Bagian ekor merupakan bagian metabolis yang menghasilkan energi dan yang menyediakan mekanisme motilitas (Bearden *et al.*, 2004; Pineda dan Dooley, 2003). Rata-rata panjang ekor spermatozoa kambing adalah $70,0 \times 1,24 \mu\text{m}$ yang terbagi dalam 3 bagian utama yaitu *middle piece* (ekor bagian tengah), *principle piece* (ekor bagian utama) dan *end piece* (ekor bagian ujung). Bagian tengah (*middle piece*) terdapat mitokondria sebagai tempat proses-proses metabolisme spermatozoa dalam menghasilkan energi bagi kehidupan dan pergerakan spermatozoa. Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus krebs dan transport elektron serta fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphosphate (ATP)* untuk menggerakkan spermatozoa. (Sonjaya dkk., 2005).

Spermatozoa kambing memiliki rincian kepala spermatozoa berbentuk bulat lonjong (ellips) dengan panjang $9 \mu\text{m}$, lebar $4 - 4,5 \mu\text{m}$ dan tebal kepala $1 - 2 \mu\text{m}$. Bagian leher dengan panjang $13 \mu\text{m}$ dengan diameter $1 \mu\text{m}$ yang

menghubungkan dasar kepala dengan bagian tengah dan mengandung sentriol. Bagian ekor dengan panjang 44 – 50 μm dengan diameter 0,25 – 0,5 μm dan berat jenis spermatozoa kambing berkisar antara 1,24 – 1,033 (Garner and Hafez, 2000).



Gambar 2.3 Spermatozoa (Anonimus, 2013)

2.3.3 Plasma Semen

Plasma semen adalah campuran cairan yang disekresikan terutama oleh kelenjar vesikula. Plasma semen mempunyai 3 (tiga) fungsi dasar yaitu sebagai cairan pembawa spermatozoa, mengangkut spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan sampai ejakulasi, sebagai media untuk mengaktivasi spermatozoa yang belum motil. Plasma semen merupakan media yang bersifat buffer (pH 6,8 – 7,0), berwarna kuning, kaya akan zat gizi untuk menunjang daya tahan spermatozoa (Ismudiono dkk., 2010).

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

Fruktosa merupakan gula yang ditemukan di dalam semen sapi, kambing, domba dan babi yang berasal dari glukosa darah. Konsentrasi glukosa dalam semen sapi, kambing dan domba sangat tinggi dan merupakan makanan utama dari spermatozoa. Sorbitol juga terdapat dalam semen dan dapat dioksidasi menjadi fruktosa oleh sel-sel spermatozoa untuk dikonsumsi kemudian. Asam sitrat tidak dipakai sebagai sumber energi oleh spermatozoa. Inositol dan asam sitrat tidak dimetabolisir oleh spermatozoa (Ismudiono, 2010).

Bahan-bahan antioksidan yang terdapat dalam plasma semen antara lain vitamin C, Zn, transferin, laktoferin, albumin dan asam urat, yang memiliki kadar bervariasi antar individu yang satu dengan yang lain (Subartha, 1998)

2.4 Semen Beku

Semen beku adalah semen yang berasal dari pejantan unggul yang sehat, bebas penyakit hewan menular yang diencerkan sesuai dengan prosedur produksi sehingga menjadi semen beku dan disimpan di dalam rendaman nitrogen cair pada suhu -196°C dalam kontainer kriogenik (Dirjennak, 2007). Pembuatan semen beku merupakan upaya manusia memperpanjang daya hidup dan daya fertilitas spermatozoa sehingga masa pakai semen tersebut dapat lebih lama (Kartasudjana, 2001).

Kematian spermatozoa terjadi pada suhu kritis antara $-1,5^{\circ}\text{C}$, semen baru akan membeku pada suhu $-0,53^{\circ}\text{C}$ atau sedikit lebih rendah tetapi kristal-kristal es belum terbentuk sempurna. Kristal es akan terbentuk sempurna pada suhu $\pm -1,7^{\circ}\text{C}$. Pembentukan kristal es dalam proses pembekuan semen dapat dihindari

dengan menggunakan zat anti kristalisasi dan penurunan suhu sampai -79°C atau -196°C yang berlangsung cepat. Penambahan gliserol ke dalam semen dan cairan pengencer dapat memperendah titik beku cairan. Hal ini berfungsi untuk mencegah terjadi kristal-kristal es dan menghindari penimbunan elektrolit intrasellular di dalam spermatozoa. Fertilitas yang optimum dapat dipertahankan dengan menghambat baik secara fisik atau kimiawi, dalam hal ini proses-proses metabolisme spermatozoa dapat ditekan dengan penurunan suhu dan proses tersebut mudah dipulihkan kembali dengan mengembalikan pada suhu yang normal (Hardijanto dkk, 2010).

Kecepatan penurunan suhu sangat berpengaruh terhadap metabolisme dan daya hidup dari sel spermatozoa. Penurunan suhu yang terlalu cepat dapat mengakibatkan "*cold shock*" terhadap spermatozoa dalam cairan semen. Keberhasilan proses pembekuan semen pada suhu -79°C sampai -196°C perlu memperhatikan beberapa faktor antara lain : jumlah gliserol yang dipakai dalam cairan pengencer. Gliserol dalam dosis yang tinggi bersifat racun terhadap kehidupan spermatozoa di samping akan menghambat kerja antibiotik di dalam bahan pengencer. Setiap penambahan harus disertai dengan pengadukan perlahan-lahan dan dilakukan pada suhu yang sama yaitu pada suhu 5°C . Waktu equilibrasi yaitu waktu yang dibutuhkan oleh sel-sel spermatozoa untuk mengadakan keseimbangan dengan cairan pengencer yang telah ditambah dengan gliserol selama jangka waktu tertentu pada suhu di atas titik beku sebelum proses pembekuan dimulai. Gliserol memasuki kepala spermatozoa untuk menggantikan sebagian dari air yang ada di dalam sel. Gliserol berfungsi untuk mencegah

pembentukan kristal-kristal es di dalam spermatozoa yang terbentuk selama pembekuan. Gliserol juga berperan untuk mendesak keluar elektrolit-elektrolit sehingga dapat mengurangi konsentrasi elektrolit di dalam sel yang dapat merusak pada waktu pembekuan (Hardijanto dkk, 2010).

Semen beku memiliki keuntungan dan kerugian. Keuntungan dari semen beku ialah dapat mengatasi hambatan-hambatan waktu dan jarak. Spermatozoa dalam semen beku dapat bertahan hidup bertahun-tahun. Spermatozoa yang dibekukan dan disimpan pada suhu -79°C di dalam CO_2 padat dan alkohol tahan hidup 3-4 tahun, sedangkan pada suhu -196°C di dalam nitrogen cair spermatozoa tahan hidup untuk waktu yang tidak terhingga (Wardhani, 2011).

Kerugian semen beku adalah sebagai berikut: a). jika penggunaan pejantan tidak unggul akan merusak peternakan secara luas, b). pemeliharaan dan pemeriksaan pejantan yang tidak baik berpotensi menyebarkan penyakit, c). peralatan untuk proses pembekuan dan penyimpanan mahal, d). selama proses pembekuan, 40-80% spermatozoa mati, e). 10-20% semen tidak tahan pembekuan. Problema pembekuan semen berkisar pada dua fenomena yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal (Hardijanto dkk., 2010).

Pengemasan semen beku dilakukan dalam bentuk *straw* dari plastik dan ampul dari gelas. Semen beku tipe *straw* lebih banyak dipakai, karena mempunyai kebaikan, antara lain adalah : relatif murah, lebih tahan terhadap perubahan-perubahan fisik dan kimia dalam pembekuan sampai pada suhu yang sangat

rendah, penutupan dengan *polyvinyl* alkohol dapat dijamin kerapatan, mudah diadaptasikan dengan permintaan-permintaan di luar negeri dan memberikan angka konsepsi (*conception rate*) yang cukup tinggi. Pada waktu tertentu perlu diperiksa kualitas semen sesudah *thawing* dengan mengevaluasi motilitas pada suhu tubuh (Hardijanto dkk., 2010).

2.5 *Thawing*

Thawing merupakan proses pencairan kembali semen yang telah dibekukan sebelum digunakan dalam fertilisasi. Menurut Salisbury dan VanDenmark (1985) *thawing* semen harus melewati proses yang cepat karena proses yang lambat akan berpengaruh pada kerusakan membran. Hal ini dikarenakan pada proses *thawing* yang cepat dapat mengembalikan kondisi normal komposisi ionic intraseluler. *Thawing* yang lambat mempengaruhi stabilitas membran sel akibat pencairan yang kurang sempurna (Arthur *et al.*, 1996).

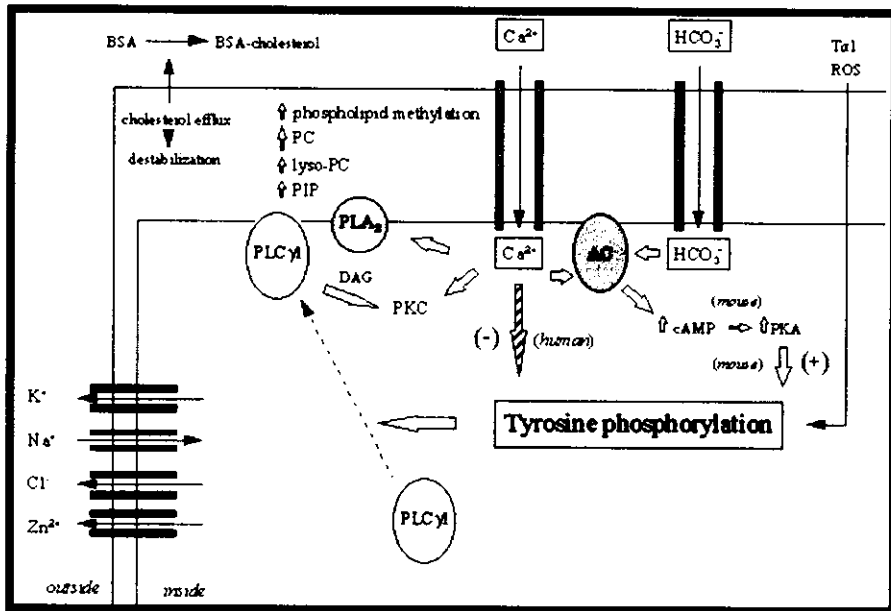
Thawing dipengaruhi oleh suhu dan lama waktu *thawing*. *Thawing* dengan suhu yang tinggi dan waktu yang singkat mengakibatkan peningkatan tekanan osmotik dan rehidrasi karena kristal-kristal es ekstraseluler mencair sehingga cairan ekstraseluler bersifat hipotonis terhadap cairan intraseluler dan akan masuk ke dalam sel. Sedangkan *thawing* dengan suhu rendah dan waktu yang lama akan mengakibatkan air intrasel menjadi mikrokristal dan mengakibatkan kerusakan membrane sel spermatozoa akibat tekanan mekanik dari kristal-kristal es tersebut (Jamieson, 1991; Correa *et al.*, 1996).

Lama *thawing* berpengaruh besar terhadap keadaan spermatozoa terutama keutuhan membran spermatozoa dalam semen. Keutuhan membran spermatozoa harus tetap terjaga agar kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas dan kemampuan fertilisasi dapat dipertahankan. Hal ini dikarenakan, selain sebagai pelindung organel-organel spermatozoa dari kerusakan mekanik, membran spermatozoa juga berfungsi sebagai penjaga keseimbangan elektrolit intra dan ekstraseluler (Hunter, 1981).

2.6 Kapasitasi

Spermatozoa mengalami suatu perjalanan sebelum proses fertilisasi. Selama perjalanan ini spermatozoa harus mengalami kapasitasi untuk memperoleh kemampuan fertilisasi pada sel telur. Spermatozoa harus dapat mengenali, menempel pada sel telur, dan melakukan penetrasi pada sel telur (Poernomo dkk., 2006).

Kapasitasi merupakan proses fisiologis yang terjadi pada spermatozoa yaitu mengalami perubahan kestabilan membran plasma selama berada di saluran reproduksi betina, serta memperoleh kemampuan bergerak atau motil (Djuwita *et al.*, 2000). Anderson (1977) mengemukakan bahwa kapasitasi spermatozoa dapat dilihat dari dua mekanisme yaitu, pelepasan faktor kimia (faktor dekapasitasi) dari spermatozoa dan aktivasi enzim akrosom (reaksi akrosom). Proses kapasitasi yang dapat dilihat pada Gambar 2.4 memungkinkan perubahan membran spermatozoa serta pelepasan suatu komponen dari permukaan akrosom (Blandau, 1980).



Gambar 2.4 Proses Kapasitasi Spermatozoa (Baldi *et al.*, 1996)

Perubahan permeabilitas membran akibat peningkatan Ca^{2+} yang masuk ke dalam sel dan bikarbonat (HCO_3^-) memainkan peran utama dalam proses kapasitasi. Pada spermatozoa, peningkatan fosforilasi tirosin terutama tergantung peningkatan Ca^{2+} dan bikarbonat yang mengaktifkan adenil cyclase (AC) dan memecah ATP untuk menghasilkan adenosit monofosfat siklik (cAMP) yang mengaktifasi protein kinase A (PKA). Aktifasi PKA menyebabkan perubahan membrane plasma pada redistribusi bilayer aminophospholipids dan redistribusi lateral seminolipid dan kolesterol. PKA juga menginduksi fosforilasi tirosin aktifasi protein tirosin kinase (Baldi *et al.*, 1996).

Kapasitasi juga mengakibatkan *hyperpolarization* membran plasma spermatozoa yang menyebabkan pembukaan saluran kalium yang mengakibatkan efluk ion kalsium dari sitosol. Akibat *hyperpolarization* membrane juga

mengakibatkan saluran voltage dependent- Ca^{2+} terbuka yang mendorong Ca^{2+} masuk ke dalam sel (Gladella and Visconti, 2006).

2.7 Uptake Ca^{2+}

Kalsium memegang peranan penting dalam fungsi regulasi spermatozoa. Konsentrasi ion kalsium mempengaruhi motilitas flagella yang sangat penting dalam proses fertilisasi. Penyerapan kalsium oleh spermatozoa hampir secara keseluruhan dilakukan oleh *outer membrane* mitokondria. Kapasitas penyerapan kalsium basal relatif tinggi pada spermatozoa yaitu $10\text{-}30 \text{ nmoles } \text{Ca}^{2+} / 10^8$ spermatozoa (Lubart *et al.*, 1997; Sikdar *et al.*, 1993; Vijayaraghavan *et al.*, 1989)

Gradien kalsium antara bagian dalam dan luar spermatozoa dengan tingkat sitoplasmik menjadi $10^3\text{-}10^4$ lebih rendah daripada level kalsium ekstraseluler. Perubahan konsentrasi kalsium bebas dalam sitosolik memainkan peran penting dalam reaksi hormon dan rangsangan internal lain (seperti calmodulin pada metabolisme sel) (Lubart *et al.*, 1997; Sikdar *et al.*, 1993; Vijayaraghavan *et al.*, 1989).

Koordinasi dan motilitas spermatozoa diregulasi oleh level kalsium intaseluler, sehingga sangat penting untuk fertilisasi. Pengendalian konsentrasi kalsium intraseluler yang memainkan peran penting dalam fungsi sel normal diregulasi oleh beberapa mekanisme, antara lain ATP-kalsium pump dan Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase (Lubart *et al.*, 1997; Sikdar *et al.*, 1993; Vijayaraghavan *et al.*, 1989).

Akibat terdapat kalsium intraseluler adalah terjadi reaksi kapasitasi yaitu terdapat peningkatan permeabilitas membran kalsium yang memungkinkan penyerapan kalsium ke dalam spermatozoa. Penyerapan kalsium ini diperlukan untuk penyatuan membran plasma dan membrane akrosomal luar, untuk memulai reaksi akrosom spermatozoa (Lubart *et al.*, 1997; Sikdar *et al.*, 1993; Vijayaraghavan *et al.*, 1989).

2.8 Kematian Spermatozoa

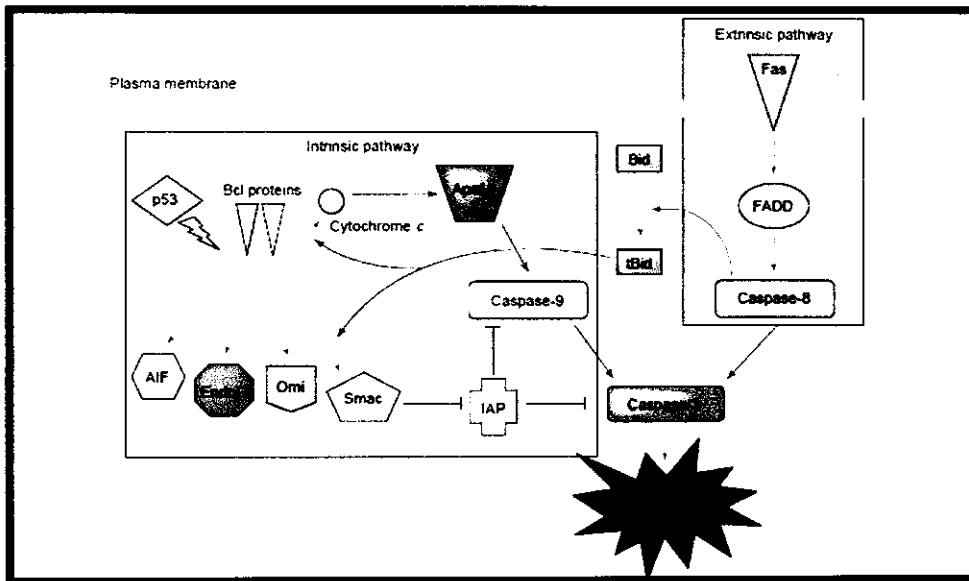
Kematian spermatozoa dikendalikan oleh berbagai protein yaitu kelompok protein pro-apoptosis dan kelompok protein anti-apoptosis. Selain itu terdapat serangkaian kelompok protein caspase. Caspase yang satu akan mengaktifkan caspase yang lain sehingga membentuk cascade-caspase untuk memulai proses apoptosis (Tauhid dkk., 2000; Renehan, 2001, Robens, 2001).

Respon dari signal awal kematian spermatozoa, beberapa protein yang berasal dari ruang antar membran pada mitokondria akan dikeluarkan ke sitoplasma, protein ini adalah sitokrom c. Kelompok protein Bak, Bax dan Bim yang pro-apoptosis akan bertindak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria sehingga mengakibatkan sitokrom c terlepas. Sitokrom c akan berikatan dengan protein APAF 1 di sitoplasma menyebabkan protein APAF 1 mengikat ATF dan membentuk suatu kompleks oligomer yang disebut apoptosome. Apoptosome akan mengaktifasi inisiatos caspase yaitu caspase 9. Caspase 9 yang telah aktif akan berikatan dan mengaktifkan *holoenzymes*. Ikatan caspase 9 dengan holoenzyme akan mengaktifkan efektor caspase yaitu caspase 3

dan caspase 7 (Sahara, 1999; Boatright, 2003; Shizoki and Shi, 2004). Kelompok protein Bcl-2 yang anti-apoptosis akan menghambat apoptosis melalui dua cara, yaitu bereaksi langsung pada mitokondria untuk mencegah peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga mencegah sitokrom c terlepas dan menghambat Apaf 1 menginduksi caspase meskipun sitokrom c terlepas. Permeabilitas mitokondria ditentukan oleh perbandingan relatif anggota pro-apoptosis dan anti-apoptosis (Renehan,2001). Proses tersebut tercantum pada Gambar 2.5 yang menggambarkan proses terjadinya kematian spermatozoa melalui jalur intrinsik.

Selain melalui jalur intrinsik, proses kematian sel juga dapat melalui jalur ekstrinsik. Jalur ekstrinsik terjadi apabila terdapat ligand ekstra seluler yang mati (misal Fas L) berikatan dengan reseptor yang sesuai (misal Fas) pada plasma membran. Ikatan antara Fas L dan Fas akan menarik FADD (*Fas Associated Death Domain*) dan caspase 8, membentuk suatu kompleks oligomeric yang disebut DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kompleks oligomeric ini akan mengaktifasi caspase yaitu caspase 3. Efektor caspase 3 akan mengadakan pembelahan intra molekuler yang akan mengakibatkan kematian sel (apoptosis). Fungsi DISC disini analog apoptosom yang mengaktifasi caspase 9.

Jalur intrinsik dan ekstrinsik akan berinteraksi dengan caspase 8 *mediated cleavage of bid* yang kemudian akan memacu pelepasan pro-apoptotic protein dari ruang inter membran pada mitokondria ke sitoplasma (Sahara *et al.*, 1999; Boatright, 2003; Shizoki and Shi, 2004)



Gambar 2.5 Proses Kematian Spermatozoa (Shizoki and Shi, 2004)

2.9 Sitokrom c

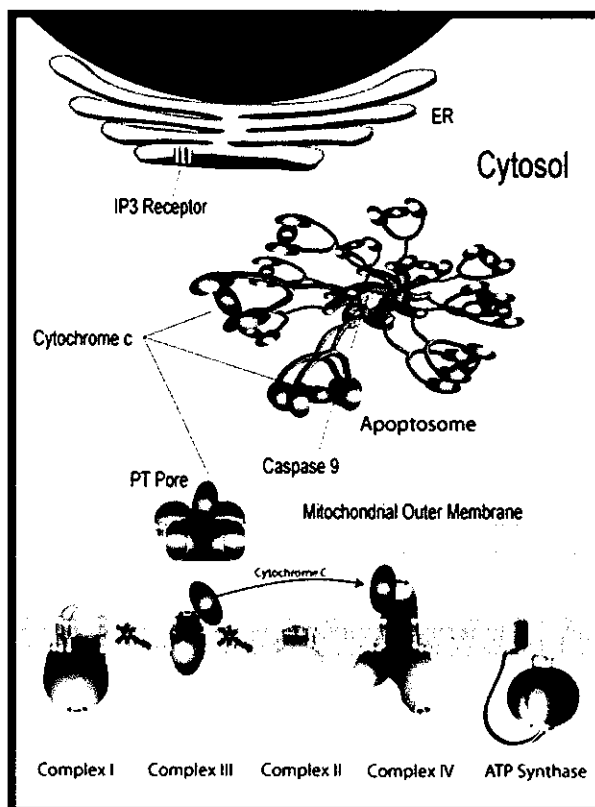
Sitokrom c adalah sebuah protein dasar dengan berat molekul 12 kDa (Margoliash, 1963) yang terdiri dari 104 asam amino, termasuk 19 residu lisin. Sitokrom c adalah sebuah protein mitokondria yang merangsang apoptosis, ketika sitokrom c terdapat dalam jumlah yang banyak dalam sitosol karena sebuah mekanisme yang diatur oleh kelompok protein Bak, Bax dan Bim (Tsoneva *et al.*, 2005).

Menurut Liu, X. *et al.*, (1996), Narita, M., *et al.*, (1998), dan Li, P., *et al.*, (1997) sitokrom c masuk ke dalam sitoplasma merangsang apoptosis dan digunakan sebagai indikator apoptosis di tingkat sel. Protein sitokrom c sebagai indikator kematian sel – diinduksi pada kondisi proapoptosis, dua protein dalam kelompok Bcl-2 yang mempengaruhi yaitu Bax dan Bak yang berikatan dengan saluran komponen bergantung pada membran luar dari mitokondria. Ca^{2+}

mitokondria yang berlebihan mempromosikan pembukaan pori-pori. Hal ini meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dalam menyebabkan pembengkakan, matriks dan membran luar mitokondria pecah dan pelepasan sitokrom c.

Suindarti (2013) menyebutkan bahwa protein sitokrom c keluar dari mitokondria setelah perubahan potensial elektrokimia di membran. Perubahan potensial menyebabkan pembukaan suatu kanal yang nonspesifik dalam membran yang permeabel, terdiri atas dua protein selaput bagian dalam (adenine nucleotide translocator-ANT) dan suatu protein bagian luar, (porin, voltage-gated-kanal anion VDAC). Protein ini bertindak bersama-sama, kemungkinan pada sisi luar dan sisi dalam terjadi kontak. Saluran ini dapat dilewati zat yang memiliki bobot molekular kurang dari 1500 dalton. Perubahan gradien proton menyebabkan oksidasi dan fosforilasi di mitokondria perubahan kekuatan ion menyebabkan pembengkakan matriks. Karena sisi bagian dalam sangat kusut dan memiliki luas permukaan jauh lebih besar dibanding selaput yang luar, bengkak pada matriks mengarah pada kerusakan sisi luar, sehingga sitokrom c dan Apaf-1 keluar masuk sitoplasma. Proses ini bergantung pada kalsium yang memungkinkan pelepasan sitokrom c dari intramembrane mitokondria ke sitoplasma. Pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma dapat mengakibatkan ikatan sitokrom c dengan reseptor inositol phosphate-3 (IP3) yang bertindak sebagai saluran kalsium. Pada membran luar sitoplasma, pelepasan dari ion kalsium ke sitoplasma yang dapat menginduksi kematian spermatozoa. Proses tersebut tercantum pada Gambar 2.6 yang menggambarkan proses pelepasan sitokrom c.

Menurut Tantral *et al.*, (2003) sitokrom c juga berperan dalam sitosolik proteolitik caspase cascade dari apoptosis sebagai komponen Apoptic Protease Activating Factor (Apaf). Ikatan sitokrom c dengan Apaf-1 mengakibatkan pembentukan kompleks protein apoptosome yang dapat merekrut dan mengaktifkan pro-caspase 9 (APAF-3). Aktifasi dari caspase-3 dan 7 mengakibatkan kematian spermatozoa.



Gambar 2.6 Jalur Skematis Sitokrom c (Anonimus, 2013)

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Saat *thawing*, semen mengalami peningkatan suhu yang drastis dan kontak dengan oksigen. Hal ini akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa yang menyebabkan penurunan kualitas semen beku (Rizal, 2005). Menurut Tambing dkk. (1999) *thawing* semen beku kambing PE dengan air pada suhu 37°C selama 30 detik menghasilkan persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa terbaik dan *thawing* semen beku kambing PE dengan air pada suhu 27°C menghasilkan persentase tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa terbaik pasca *thawing*. Menurut Suindarti (2013) durasi *thawing* yang dapat digunakan sebagai pedoman dalam proses *thawing* semen beku kambing dengan air pada suhu 37°C selama 20 detik.

Perbedaan temperatur pada saat pembekuan dan pasca *thawing* akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Suprayogi, 1996). Suindarti (2013) menyatakan bahwa semakin panjang durasi *thawing* maka semakin banyak akumulasi ROS dapat terbentuk dari hasil proses reduksi molekul O₂ dalam rangkaian transport elektron, sedangkan ketersediaan antioksidan dalam semen semakin berkurang sehingga ROS yang semakin banyak inilah yang menginisiasi pelepasan sitokrom c.

Peningkatan permeabilitas membran spermatozoa mengawali kejadian kapasitas sehingga konsentrasi Ca²⁺ di luar spermatozoa masuk ke spermatozoa.

Peningkatan ion Ca^{2+} di dalam spermatozoa yang menyebabkan hiperaktivasi spermatozoa. (Asmarinah, 2010). Mitokondria memiliki pori-pori khusus (*PT pore*) yang memudahkan Ca^{2+} keluar atau masuk. Keberadaan stres oksidatif dan toksin, mampu membuka pori-pori mitokondria, sehingga mitokondria tidak bisa menyerap Ca^{2+} dan gagal menyimpan sejumlah Ca^{2+} yang mengakibatkan kematian spermatozoa (Batistatou *et al.*, 1993).

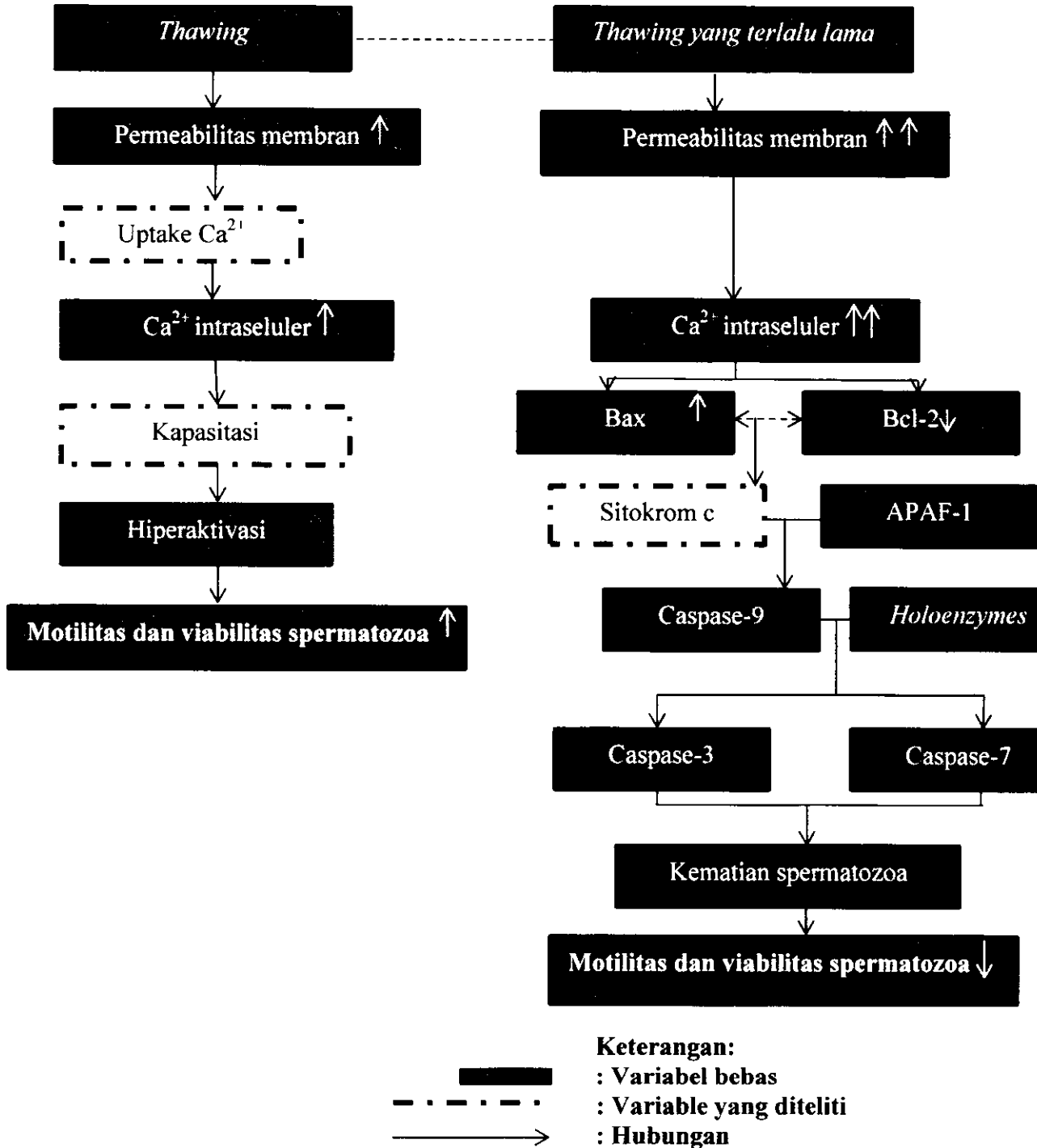
Kematian spermatozoa melalui jalur intrinsik terjadi akibat peningkatan permeabilitas membran mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma tanpa memerlukan reseptor kematian. Ca^{2+} mitokondria yang berlebihan mempromosikan pembukaan pori-pori. Pada saat spermatozoa mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan kemudian digantikan oleh protein pro-apoptosis, seperti Bak, Bax dan Bim. Sewaktu kadar Bcl-2 dan Bcl-x menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan *cascade caspase*. Salah satu protein tersebut adalah cytochrome-c yang diperlukan untuk proses respirasi pada mitokondria. Protein sitokrom c keluar dari *inner membrane* mitokondria setelah perubahan potensial elektrokimia. Perubahan potensial menyebabkan pembukaan suatu kanal yang nonspesifik dalam membran yang permeabel, terdiri atas dua protein selaput bagian dalam (*adenine nucleotide translocator-ANT*) dan suatu protein bagian luar, (*porin, voltage gated anion canal-VDAC*). Protein ini bertindak bersama-sama, kemungkinan pada sisi luar dan sisi dalam terjadi kontak. Perubahan gradien proton menyebabkan oksidasi dan fosforilasi di mitokondria perubahan kekuatan ion menyebabkan pembengkakan matriks. Sisi

bagian dalam sangat kusut dan memiliki luas permukaan jauh lebih besar dibanding selaput yang luar sehingga pada matriks mitokondria mengalami pembengkakan dan mengarah pada kerusakan sisi luar. Pada sitosol, cytochrom c berkaitan dengan APAF-1 (*Apoptosis Activating Factor 1*) dan mengaktifkan caspase-9 (Lumongga, 2008; Fernandez *et al.*, 2012; Said *et al.*, 2010; Norberg *et al.*, 2010).

Caspase-9 yang telah aktif akan berikatan dan mengaktifkan *holoenzymes*. Ikatan caspase-9 dengan *holoenzymes* akan mengaktifkan efektor caspase yaitu caspase-3 dan caspase-7. Aktivasi efektor caspase ini akan menyebabkan menuju ke kematian spermatozoa (Lukitasari, 2006).

3.2. Bagan Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual secara skematis dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

3.3. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka dapat ditarik hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Durasi *thawing* dapat memberikan perbedaan kualitas mikroskopis meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)
2. Durasi *thawing* dapat memberikan perbedaan kapasitas spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)
3. Durasi *thawing* dapat memberikan perbedaan *uptake* Ca^{2+} spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)
4. Durasi *thawing* dapat memberikan perbedaan ekspresi sitokrom c spermatozoa kambing peranakan ettawa (PE)
5. Terdapat korelasi antara kualitas mikroskopis, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dengan ekspresi sitokrom c sitosolik kambing peranakan ettawa (PE) yang *dithawing* durasi *thawing* yang berbeda.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Secara garis besar, penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Sampel penelitian terbagi menjadi empat perlakuan semen yang *dithawing* dengan suhu 27°C selama 10 detik sebagai kontrol (P0), 37°C selama 10 (P1), semen yang *dithawing* dengan suhu 37°C selama 20 (P2) dan semen yang *dithawing* dengan suhu 37°C selama 30 detik (P3).

4.2 Subyek Penelitian

4.2.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah semen beku kambing peranakan ettawa (PE) di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Malang.

4.2.2 Besar Sampel

Besar sampel minimal yang dipergunakan untuk pengujian hipotesis penelitian ini, menggunakan rumus : $t(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2010). Ulangan minimal dalam penelitian ini adalah sebanyak:

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$N \geq 5$, sehingga ulangan paling sedikit adalah 6.

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan ulangan yang dibutuhkan setiap perlakuan adalah 7, sehingga keseluruhan untuk 4 perlakuan adalah 28 sampel.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama *thawing* semen beku yaitu 37°C selama 10 detik, 37°C selama 20 detik dan 37°C selama 30 detik.

4.3.2 Variabel tergantung

- a) Kualitas mikroskopis spermatozoa meliputi viabilitas dan motilitas spermatozoa pasca *thawing*.
- b) Kualitas seluler spermatozoa meliputi kapasitas, *Uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa pasca *thawing*.

4.3.3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini antara lain adalah : jenis pengencer semen beku, suhu *thawing* dan volume semen.

4.3.4. Definisi Operasional

- a) Motilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang motil bergerak progresif yang diperiksa dengan cara meneteskan sedikit semen di atas gelas obyek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% dan ditutup

dengan gelas penutup kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Jumlah spermatozoa dengan motilitas progresif pada setiap sampel, merupakan jumlah total yang ditemukan pada lima (5) lapang pandang yang berbeda per 100 spermatozoa.

- b) Viabilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang hidup *pasca thawing* yang diperiksa melalui pembuatan preparat ulas dengan zat warna eosin- negrosin dan dilihat di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400X per 100 spermatozoa.
- c) Kapasitas spermatozoa adalah perubahan membran spermatozoa setelah pembekuan (*post thawing*) melibatkan perubahan metabolisme dan influk Ca^{2+} . Spermatozoa yang terkapasitasi ditandai dengan bagian 2/3 akrosom berfluoresen dengan pewarnaan CTC. Ca^{2+} intraseluler adalah konsentrasi/kadar kalsium intraseluler yang berasal dari Ca^{2+} yang masuk dari ekstraseluler.
- d) Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler diukur berdasarkan densitas yaitu dengan cara mengukur intensitas $Ca^{2+}/\mu m^2$ dengan pewarnaan fluo-3 yang diamati dengan *confocal laser scanning microscope*.
- e) Ekspresi sitokrom c sitosolik sebagai indikator atau marker factor pro-apoptosis dari spermatozoa dengan waktu *thawing* yang berbeda pada semen beku kambing peranakan ettawa (PE). Ekspresi sitokrom c sitosolik diketahui melalui pewarnaan secara Imunohistokimia menggunakan *UltraVision Detection System*, spermatozoa yang mengekspresikan sitokrom c sitosolik tampak berwarna coklat pada *sperm tail* yaitu *middle*

piece hingga *end piece*. Jumlah spermatozoa yang mengekspresikan sitokrom c sitosolik pada setiap sampel, merupakan jumlah total yang ditemukan pada 5 (lima) lapang pandang yang berbeda, pada pembesaran 400 kali per 100 spermatozoa.

4.4. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: semen dari seekor kambing peranakan etawa (PE), Andromed[®], *cutex* transparan, larutan DABCO, larutan CTC, dan larutan CTC fixatif, air suhu 37°C, 22 minisraw semen beku kambing peranakan etawa (PE), NaCl fisiologis, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), N₂ cair, zat warna eosin-negrosin, spiritus, FLuo-3, PBS(-), Antibodi Sitokrom C Sheep (Bioss, MA 01801), *Ultra Detection System Anti-Polyvalent* HRP/DAB Plus (Thermo scientific, TP-015-HD) yang berisi *Hydrogen Peroxide Block* (Thermo scientific, TP-015-HP), *Ultra V Block* (Thermo scientific, TP-015-UB), *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent* (Thermo scientific, TP-015-DN), *Streptavidin Peroxidase* (Thermo scientific, TP-015-HR), *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) *Plus Substrate* (Thermo scientific, TP-015-HSX), *DAB plus Chromogen* (Thermo scientific, TP-015-HCX).

4.5. Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: thermometer, tabung Erlenmeyer (Pyrex[®]), waterbath, mikropipet tips (100µl, 200µl, 20µl), Mikroskop Olympus DP12, Kamera Nikon DS Fi2, Mikroskop Nikon Eclipse H600L,

Mikroskop Confocal Laser Scanning (Argon), obyek glass, cover glass, container, N₂ cair, incubator, spuit (3ml, 5ml), petri disc, Bunsen spiritus, pinset, dan container gas.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel, semen beku dalam bentuk straw dengan pengencer Andromed[®] di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Malang. Pemeriksaan kapasitas dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Pemeriksaan *uptake* Ca²⁺ dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya dan pemeriksaan ekspresi sitokrom c sitosolik dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Februari 2014.

4.7 Pengumpulan Data

- a) Melakukan pemeriksaan terhadap persentase viabilitas spermatozoa pada semen beku kambing peranakan ettawa (PE) dengan lama dan suhu *thawing* yang berbeda
- b) Melakukan pemeriksaan terhadap presentase motilitas spermatozoa pada semen beku kambing peranakan ettawa (PE) dengan lama dan suhu *thawing* yang berbeda

- c) Melakukan pemeriksaan terhadap persentase kapasitas spermatozoa pada semen beku kambing peranakan etawa (PE) dengan lama dan suhu *thawing* yang berbeda
- d) Melakukan pemeriksaan terhadap uptake Ca^{2+} spermatozoa pada semen beku kambing peranakan etawa (PE) dengan lama dan suhu *thawing* yang berbeda
- e) Melakukan pemeriksaan terhadap ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa pada semen beku kambing peranakan etawa (PE) dengan lama dan suhu *thawing* yang berbeda

Seperti yang terlihat pada bagan kerangka operasional dalam Gambar 4.1, sebelum dilakukan pemeriksaan, semen beku harus *dithawing* terlebih dahulu dengan metode sebagai berikut: straw dalam N_2 cair diambil, kemudian diletakkan dalam *waterbath* dengan suhu $27^{\circ}C$ selama 10 detik, suhu $37^{\circ}C$ selama 10 detik (P1), suhu $37^{\circ}C$ selama 20 detik (P2) dan suhu $37^{\circ}C$ selama 30 detik (P3), *straw* yang telah *dithawing* dikeringkan dengan tisu bersih.

4.8.1. Pemeriksaan Terhadap Persentase Viabilitas Spermatozoa

Persentase spermatozoa hidup merupakan indikator kualitas semen yang penting untuk meningkatkan fertilisasi. Pemeriksaan spermatozoa dalam keadaan hidup atau mati digunakan pewarnaan eosin-negrosin. Prinsip pewarnaan spermatozoa adalah perbedaan afinitas menghisap warna antara spermatozoa yang hidup dan yang mati. Spermatozoa yang hidup tidak menghisap warna atau pada bagian kepala spermatozoa yang hidup tidak menghisap warna dengan kata lain

bagian kepala spermatozoa akan terlihat berwarna jernih, hal ini dikarenakan permeabilitas membran spermatozoa masih normal, sedangkan spermatozoa yang mati akan menghisap warna dan bagian kepala berwarna merah dikarenakan kondisi membran telah rusak sehingga tidak mampu mencegah zat warna masuk. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dilakukan melalui pembuatan preparat ulas dengan zat warna eosin-negrosin. 10 μ l suspensi semen diteteskan pada bagian ujung gelas obyek pertama kemudian diteteskan zat warna eosin-negrosin dan dicampur hingga homogen. Kemudian *obyek glass* kedua ditempelkan di bagian ujung *obyek glass* pertama untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin. Kemudian diangin-anginkan sampai kering.

Perhitungan persentase viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400X per 100 spermatozoa. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup, sedangkan yang terwarnai adalah spermatozoa yang mati (Partodihardjo, 1992).

4.8.2. Pemeriksaan Motilitas Setelah Pembekuan Semen (*Post Thawing Motility*)

Pemeriksaan PTM (*Post Thawing Motility*) atau pencairan kembali setelah pembekuan dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100X per 100 spermatozoa yaitu melihat berapa besar persentase motilitas progresif. Semen beku yang diperiksa terlebih dahulu yaitu dimasukkan ke dalam waterbath yang bersuhu 37°C selama 10 detik (P1), suhu 37°C selama 20 detik (P2) dan suhu 37°C selama 30 detik (P3).

Gunting kemasan semen beku pada ujung dan juga sedikit pada bagian tengah, kemudian teteskan (1 tetes) ke gelas obyek yang telah dibersihkan alcohol 70%. Setelah itu tutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400X. Gerakan individu spermatozoa dengan gerak progresif yang dihitung peresentase, gerak individu dinilai dari kriteria kecepatan: 0 berarti tidak ada gerakan individu spermatozoa; 1 berarti gerakan individu spermatozoa lamban; 2 berarti gerakan individu spermatozoa sedang; 3 berarti gerakan individu spermatozoa cepat; 4 berarti gerakan individu spermatozoa sangat cepat.

Bangsa kambing dan domba standar minimal PTM (Progresif) 30% dengan gerakan kecepatan individu spermatozoa 2 ditulis 30/+++ (Dirjennak, 2000).

4.8.3. Pemeriksaan Kapasitas

Menurut Fuller dan Whittingham (1996) yang dikutip dari J.Wattimena (2006) pengamatan kapasitas dan reaksi akrosom dengan pewarnaan *Chlor Tetracycline* (CTC) spermatozoa *swim-up* hasil kapasitas *in vitro* sebanyak 50 μ l semen dimasukkan dalam tabung ependorf kapasitas 1 ml yang ditutup dengan aluminium foil, ditambah 50 μ l larutan pewarna CTC, dicampur selama 2-3 detik lalu ditambah 10 μ l CTC fiksatif dan dilakukan homogenasi selama 10 detik. 10 μ l larutan tersebut ditempatkan pada gelas obyek, kemudian ditambahkan 10 μ l DABCO, dicampur kemudian ditutup dengan *cover glass* dan pinggir *cover glass* ditutup dengan *cutex*. Preparat diperiksa dengan mikroskop fluroscent nikon eclipse E600 dengan perbesaran 400x.

Gambaran yang tampak adalah:

1. Seluruh kepala spermatozoa berfluoresen adalah spermatozoa yang tidak mengalami kapasitasasi,
2. Kepala spermatozoa separuh bagian atas berfluoresen adalah spermatozoa yang mengalami kapasitasasi,

4.8.4. Pemeriksaan *Uptake* Ca^{2+}

Gambaran terdapat serapan ion kalsium pada spermatozoa salah satu produk dari kapasitasasi dapat diamati dengan pewarnaan CTC . Sedangkan untuk memperoleh kejelasan tentang intensitas serapan ion kalsium pada spermatozoa terkapasitasasi dapat digunakan uji fluo-3. Flou-3 dengan konsentrasi 400 μ Mol disiapkan sebagai stock. Bahan yang digunakan yaitu 1 bagian fluo-3 diencerkan dengan 10 bagian PBS (Gillan *et al.*, 2005). Semen dari straw dengan volume \pm 250 μ l dilarutkan dalam PBS 750 μ l. kemudian disentrifus 6000 rpm selama 2 menit, lalu diambil supernatan sedangkan pelet ditambah PBS lagi sampai 1 ml (diulang sekali lagi). Kemudian diambil 10 μ l dan 90 μ l PBS kemudian ditambah 50 μ l fluo-3, lalu diinkubasi dalam suhu kamar selama 45 menit. Kemudian ditambah PBS sebanyak 300 μ l lalu disentrifus 6000 rpm selama 2 menit. Diambil supernatan sedangkan pelet ditambah PBS sebanyak 300 μ l, untuk kepentingan evaluasi diambil 20 μ l dengan mikropipet dari larutan tersebut, teteskan pada gelas penutup dan ditutupi dengan gelas penutup. Pada waktu melakukan preparasi maupun pengamatan di mikroskop suasana dalam keadaan remang-remang. Penamatan dan analisis gambar dilakukan pada mikroskop confocal laser

scanning (Argon 20%) dengan pembesaran 400X sampai 1000 kali (Suprayogi, 2013).

4.8.5. Pemeriksaan Ekspresi Sitokrom C Sitosolik Dengan Metode Imunohistokimia

Teknik imunohistokimia dilakukan untuk mengetahui ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa kambing peranakan etawa (PE) *post-thawing* dengan perbedaan durasi *thawing*. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan di Laboratorim Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Ekspresi sitokrom c sitosolik diketahui melalui pewarnaan secara imunohistokimia menggunakan *UltraVision Detection System*, spermatozoa yang mengekspresikan sitokrom c sitosolik tampak berwarna coklat kehitaman pada *interspace sperm tail* bagian *middle piece*. Jumlah ekspresi sitokrom c sitosolik pada setiap sampel, merupakan jumlah total yang ditemukan pada 5 (lima) lapang pandang yang berbeda, pada pembesaran 400X per 100 spermatozoa.

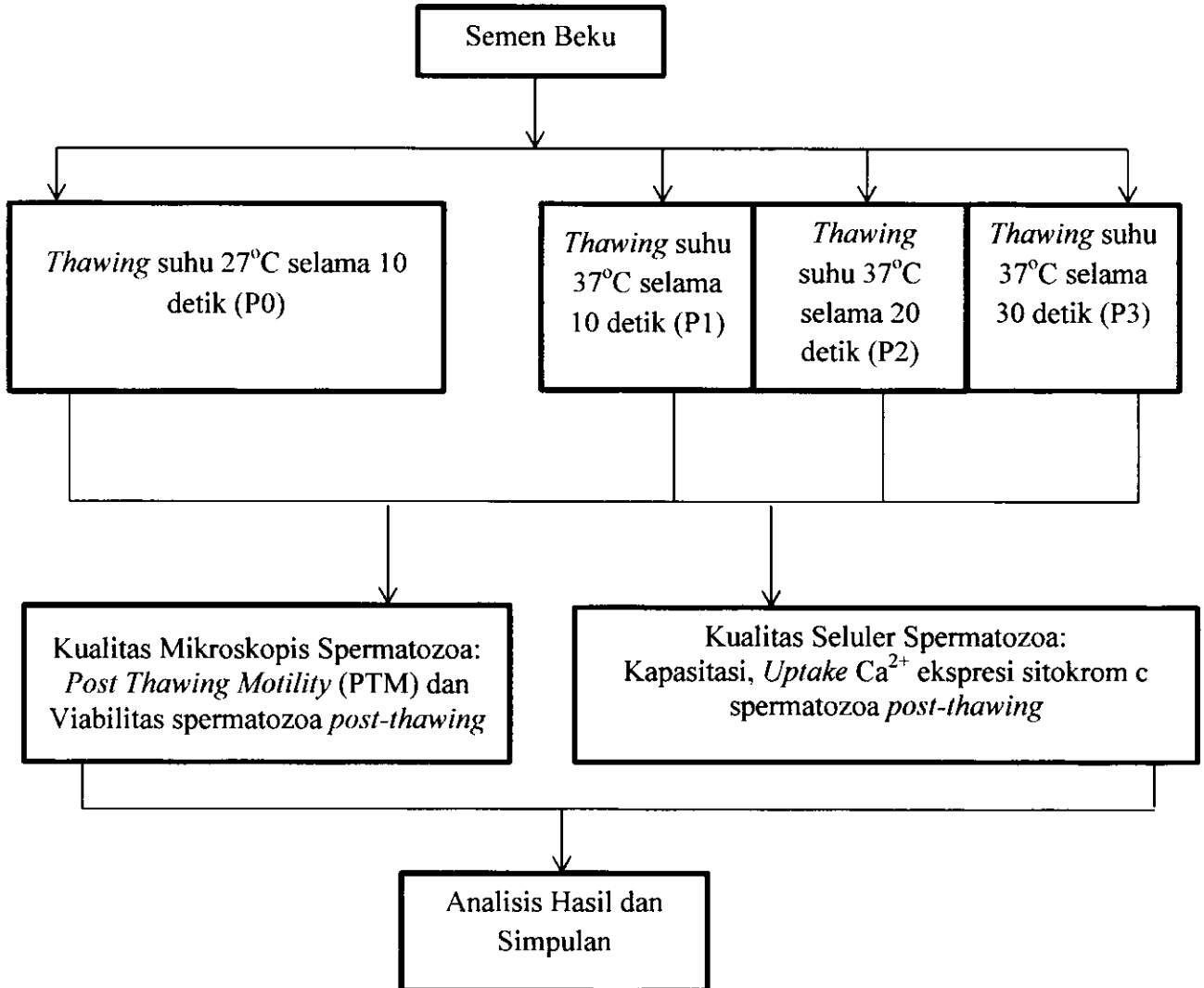
4.9. Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas mikroskopis spermatozoa meliputi viabilitas dan motilitas spermatozoa serta kualitas seluler meliputi kapasitas, uptake Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa *post thawing* dengan durasi *thawing* yang berbeda. Data dianalisis menggunakan *Multivariate Analysis of*

Variant (MANOVA) pada tingkat kepercayaan 5% dengan uji *Wilk's Lamda* untuk mengetahui perbedaan nilai variable antar kelompok. Jika pada masing-masing perlakuan menunjukkan perbedaan dilanjutkan dengan uji *Hotteling's Trace (T)*. (Santoso, 2005). Perangkat lunak yang digunakan untuk analisis data adalah *Statistical Program and Service Solutions version 21 (SPSS)*.

4.10. Diagram Alir Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian secara skematis dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4.1 Prosedur Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Semen Segar

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

Tabel 5.1 Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar kambing PE

Pemeriksaan Makroskopis		Pemeriksaan Mikroskopis	
Volume	2 ml	Gerakan massa	+++
Konsistensi	Pekat	Gerakan individu	75%
Warna	Putih susu	Konsentrasi	2.055×10^6
Bau	Normal		
pH	7,8		

Keterangan:

+++ = Gelombang kecil sampai besar yang tebal dan gelombang dalam jumlah banyak dan bergerak cepat

5.2 Hasil Kualitas Mikroskopis Spermatozoa

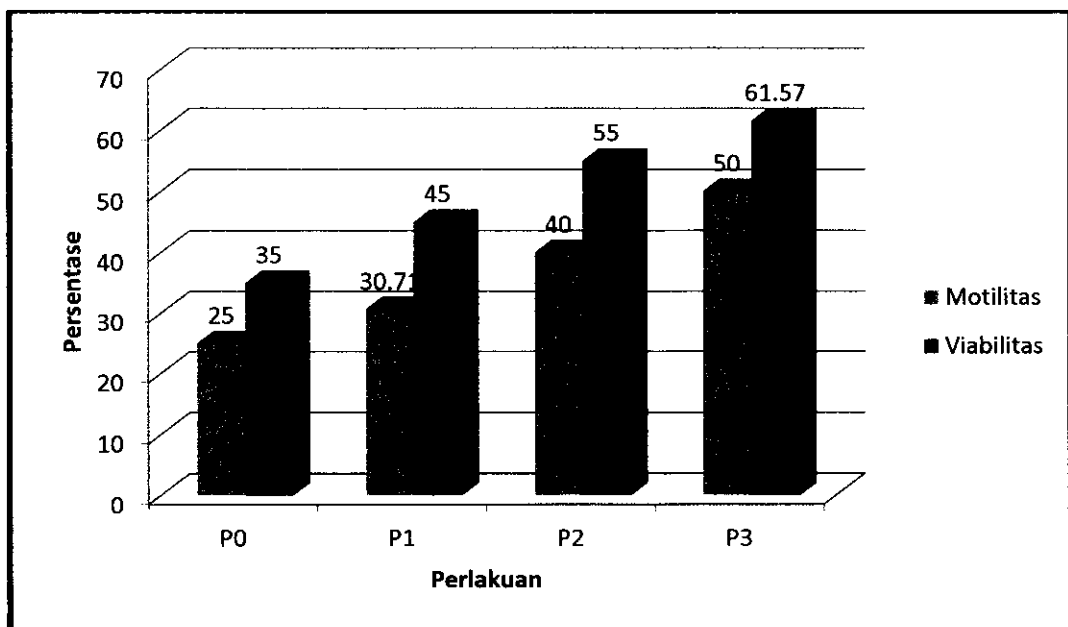
Kualitas Spermatozoa meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa. Data tentang persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa *post-thawing* yang diberi perlakuan berbagai macam durasi *thawing* dengan tiga perlakuan: *thawing* selama 10 detik (P1), *thawing* selama 20 detik (P2) dan *thawing* selama 30 detik (P3) tercantum pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa *Post-thawing* Semen Kambing PE

Variabel	Ulangan	P0	P1	P2	P3
Motilitas	7	25,00 ^a ±4,08	30,71 ^b ±3,45	40,00 ^c ±4,08	50,00 ^d ±4,08
Viabilitas	7	35,00 ^a ±5,77	45,00 ^b ±2,58	55,00 ^c ±2,58	61,57 ^d ±3,95

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

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

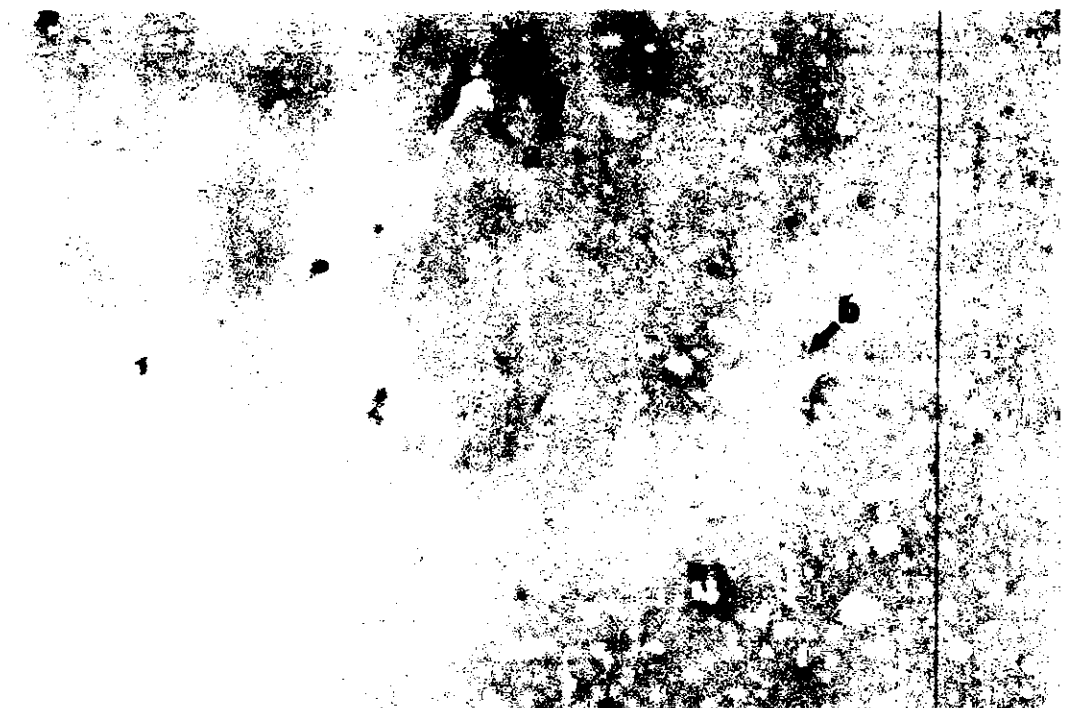


Gambar 5.1 Rerata Selisih Motilitas Spermatozoa *post-thawing* Semen Kambing Peranakan Ettawa

Motilitas spermatozoa dapat diketahui dengan pemeriksaan natif yaitu dengan meneteskan semen pada obyek gelas kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400X dengan mengetahui pergerakan spermatozoa yang progresif saja yang diperhitungkan.

Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$). Urutan rata-rata motilitas spermatozoa kambing PE *post-thawing* dari keempat macam perlakuan mulai yang tertinggi sampai yang terendah adalah P3 dengan rata-rata nilai $50,00 \pm 4,08$ (%), kemudian di urutan kedua adalah P2 dengan rata-rata nilai $40,00 \pm 4,08$ (%), kemudian di urutan ketiga adalah P1 dengan rata-rata nilai $30,71 \pm 3,45$ (%) dan yang berada di urutan terendah adalah P0 dengan nilai rata-rata sebesar $25,00 \pm 4,08$ (%) (Gambar 5.1).

Viabilitas spermatozoa dapat diketahui dengan pewarnaan eosin negrosin, spermatozoa yang mati tampak berwarna merah dan spermatozoa yang hidup tampak berwarna bening (transparan) (ditunjukkan pada Gambar 5.2)



Gambar 5.2 Viabilitas pada spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin (pembesaran 1000X, diambil dengan kamera Sony Cybershot). (A) Spermatozoa mati tampak berwarna merah, (B) spermatozoa yang hidup tampak berwarna bening (transparan)

Pengamatan viabilitas pada setiap sampel, merupakan jumlah yang ditemukan pada 5 (lima) lapang pandang yang berbeda, pada perbesaran 1000X.

Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$). Urutan rata-rata viabilitas spermatozoa kambing PE *post thawing* dari keempat macam perlakuan mulai yang tertinggi sampai yang terendah adalah P3 dengan nilai rata-rata sebesar $61,57 \pm 3,95$ (%), kemudian di urutan kedua adalah P2 dengan rata-rata nilai $55,00 \pm 2,08$ (%), kemudian di urutan ketiga adalah P1 dengan rata-rata nilai $45,00 \pm 2,58$ (%) dan yang berada di urutan terendah adalah P0 dengan nilai rata-rata sebesar $35,00 \pm 5,77$ (%) (Gambar 5.1).

Karena dari tiga perlakuan tersebut menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata maka dilakukan uji selanjutnya yaitu dibandingkan antar perlakuan dengan *Hotteling's Trace* (T) yang memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan P3 dengan kelompok perlakuan P2, P1 dan P0. Hasil yang diperoleh adalah P3 berbeda nyata dengan P2 ($p < 0,05$), P2 berbeda nyata dengan P1 ($p < 0,05$) dan P1 berbeda nyata dengan P0 ($p < 0,05$).

5.3 Hasil Kualitas Seluler Spermatozoa

Kualitas seluler spermatozoa dalam penelitian ini meliputi kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa. Data tentang persentase kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa *post-thawing* yang diberi perlakuan berbagai macam durasi *thawing* dengan tiga

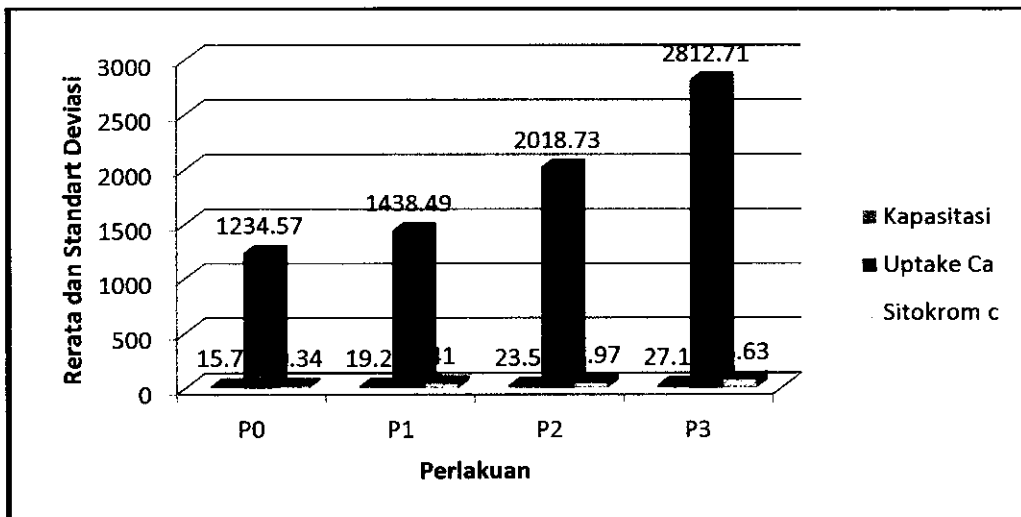
perlakuan: *thawing* selama 10 detik (P1), *thawing* selama 20 detik (P2) dan *thawing* selama 30 detik (P3) tercantum pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Rerata dan Standar Deviasi Kualitas Seluler Spermatozoa *Post-thawing* Semen Kambing PE

Variabel	Ulangan	P0	P1	P2	P3
Kapasitasi	7	15,71 ^a ±0,76 %	19,29 ^b ±0,76 %	23,57 ^c ±0,98 %	27,14 ^d ±2,12 %
<i>Uptake</i> Ca ²⁺	7	1234,57 ^a ±73,23 intensitas / μm^2	1438,49 ^b ±113,85 intensitas / μm^2	2018,73 ^c ±158,12 intensitas / μm^2	2812,71 ^d ±186,14 intensitas / μm^2
Ekspresi Sitokrom c	7	20,34 ^a ±1,28 %	41,00 ^b ±9,78 %	48,97 ^c ±3,50 %	76,63 ^d ±13,61 %

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

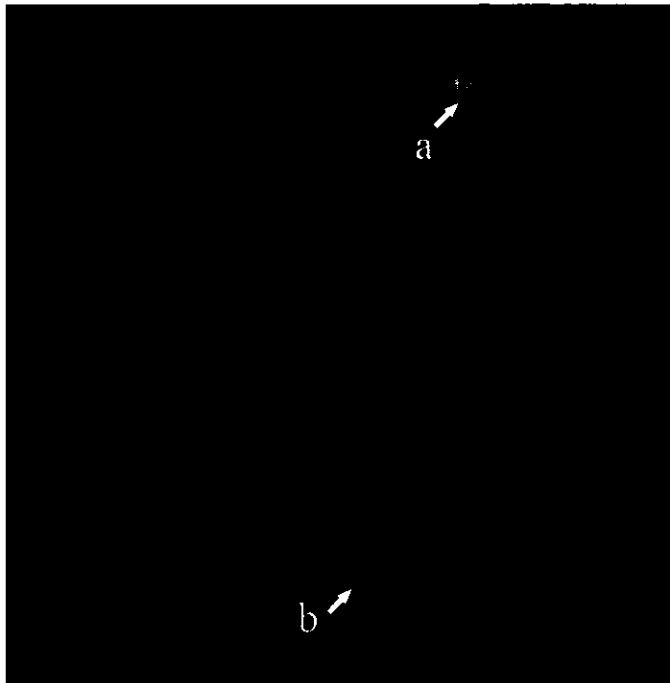
Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rerata persentase kapasitas, reaksi akrosom, *uptake* Ca²⁺ dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa *post-thawing* dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut ini :



Gambar 5.3 Rerata Selisih Kapasitas, Reaksi Akrosom, *Uptake* Ca²⁺ dan Ekspresi Sitokrom C Sitosolik Spermatozoa *post-thawing* Semen Kambing Peranakan Ettawa

Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda sangat nyata ($p < 0,05$).

Kapasitasi spermatozoa dapat diketahui dengan pewarnaan chlortetracycline (CTC) yang diamati dengan mikroskop fluorescence. Spermatozoa yang mengalami kapasitasi adalah spermatozoa yang berwarna kuning pada 2/3 bagian kepala spermatozoa (ditunjukkan pada Gambar 5.4).

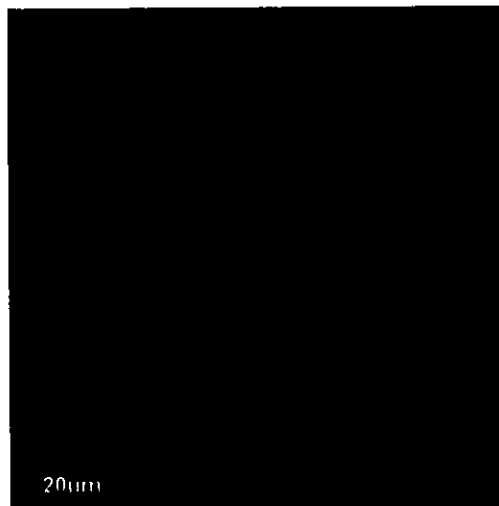


Gambar 5.4 Kapasitasi pada spermatozoa dengan pewarnaan CTC (pembesaran 1000, diambil dengan kamera Olympus). (A) Spermatozoa yang belum mengalami kapasitasi adalah kepala spermatozoa seluruhnya berfluoresen. (B) Spermatozoa yang mengalami kapasitasi adalah duapertiga bagian kepala spermatozoa berfluoresen.

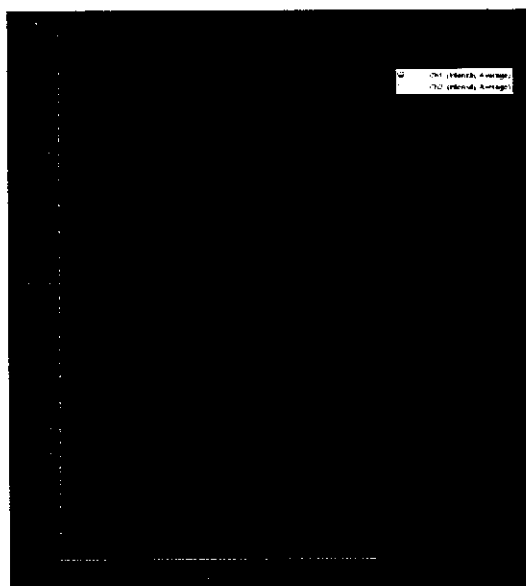
Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$). Urutan rata-rata kapasitasi spermatozoa kambing PE *post-thawing* dari

keempat macam perlakuan mulai yang tertinggi sampai yang terendah adalah P3 dengan nilai rata-rata sebesar $27,14 \pm 2,12$ (%), kemudian di urutan kedua adalah P2 dengan rata-rata nilai $23,57 \pm 0,98$ (%), kemudian di urutan ketiga adalah P1 dengan rata-rata nilai $19,29 \pm 0,76$ (%) dan yang berada di urutan terendah adalah P0 dengan nilai rata-rata sebesar $15,71 \pm 0,76$ (%) (Gambar 5.3).

Uptake Ca^{2+} dapat diketahui dengan pewarnaan Fluo-3 yang diamati dengan *Confocal Laser Scanning Microscope*. Spermatozoa yang mengalami kapasitas adalah spermatozoa yang $2/3$ bagian kepala berwarna hijau. Kemudian dari gambar tersebut dianalisis untuk mengetahui kadar kalsium intraseluler (Gambar 5.5). kemudian dari gambar tersebut dianalisis sehingga tampak gambaran histogram yang tampak pada Gambar 5.6.



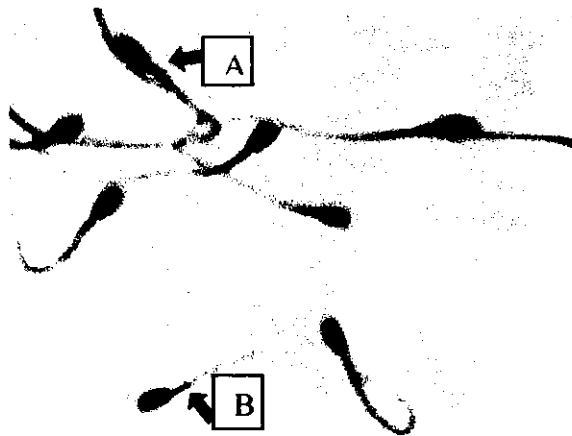
Gambar 5.5 *Uptake* Ca^{2+} pada spermatozoa dengan pewarnaan Fluo-3 (pembesaran 1000, diambil dengan kamera Olympus FX-1000). (A) Spermatozoa yang mengalami kapasitas adalah pada $2/3$ bagian kepala berwarna hijau.



Gambar 5.6 Histograf kadar Ca^{2+} intraseluler.

Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$). Urutan rata-rata *uptake* Ca^{2+} spermatozoa kambing PE *post-thawing* dari keempat macam perlakuan mulai yang tertinggi sampai yang terendah adalah P3 dengan nilai rata-rata sebesar $2812,71 \pm 186,14$ (intensitas / μm^2), kemudian di urutan kedua adalah P2 dengan rata-rata nilai $2018,73 \pm 158,12$ (intensitas / μm^2), kemudian di urutan ketiga adalah P1 dengan rata-rata nilai $1438,49 \pm 113,85$ (intensitas / μm^2) dan yang berada di urutan terendah adalah P0 dengan nilai rata-rata sebesar $1234,57 \pm 73,23$ (intensitas / μm^2) (Gambar 5.3).

Ekspresi sitokrom c sitosolik dapat diketahui dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan *Ultravision Detection System*, spermatozoa yang mengekspresikan sitokrom c sitosolik tampak berwarna coklat pada bagian leher yaitu daerah *interspace* (ditunjukkan pada gambar 5.7)



Gambar 5.7 Ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa dengan imunohistokimia (pembesaran 1000X, diambil dengan kamera Sony Cybershot zoom 1X). (A) Spermatozoa positif yang mengekspresikan sitokrom c sitosolik tampak berwarna coklat pada bagian leher yaitu daerah *interspace*, (B) spermatozoa negatif yang tidak mengekspresikan sitokrom c sitosolik.

Pengamatan ekspresi sitokrom c sitosolik pada setiap sampel, merupakan jumlah yang ditemukan pada 5 (lima) lapang pandang yang berbeda, pada perbesaran 1000X. Kemudian data ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa *post-thawing* dianalisa menggunakan *Multivariate Wilk's Lambda*.

Berdasarkan hasil analisis perhitungan *Multivariate Wilk's Lambda* terhadap keseluruhan perlakuan dalam penelitian didapatkan hasil yang berbeda ($p < 0,05$). Urutan rata-rata ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa kambing PE *post-thawing* dari keempat macam perlakuan mulai yang tertinggi sampai yang terendah adalah, P3 dengan nilai rata-rata sebesar $76,63 \pm 13,61$ (%) kemudian di urutan kedua adalah P2 dengan rata-rata nilai $48,97 \pm 3,50$ (%) kemudian di urutan ketiga adalah P1 dengan rata-rata nilai $41,00 \pm 9,78$ (%) dan yang berada di urutan terendah adalah P0 dengan nilai rata-rata sebesar $20,34 \pm 1,28$ (%) (Gambar 5.3).

Karena dari tiga perlakuan tersebut menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata maka dilakukan uji selanjutnya yaitu dibandingkan antar perlakuan dengan *Hotteling's Trace* (T) yang memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan P3 dengan kelompok perlakuan P2, P1 dan P0. Hasil yang diperoleh adalah P3 berbeda nyata dengan P2 ($p < 0,05$), P2 berbeda nyata dengan P1 ($p < 0,05$) dan P1 berbeda nyata dengan P0 ($p < 0,05$).

5.4 Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas, Kapasitas, *Uptake* Ca^{2+} dan Ekspresi Sitokrom c Sitosolik pada Spermatozoa *Post Thawing*

Korelasi antara motilitas, viabilitas, kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa kambing PE dapat diketahui dengan cara dilakukan uji korelasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Korelasi Antara Motilitas, Viabilitas, Kapasitas, *Uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik Pada Spermatozoa *Post-thawing*

	Motilitas	Viabilitas	Kapasitasi	<i>Uptake</i> Ca^{2+}	Sitokrom_c
Motilitas	1	0,838**	0,917**	0,898**	0,822**
Viabilitas	0,838**	1	0,906**	0,870**	0,823**
Kapasitasi	0,917**	0,906**	1	0,904**	0,827**
<i>Uptake</i> Ca^{2+}	0,898**	0,870**	0,904**	1	0,830**
Sitokrom_c	0,822**	0,823**	0,827**	0,830**	1

** . Korelasi berbeda sangat nyata $p < 0,01$

Analisis data menunjukkan uji korelasi, menunjukkan adanya korelasi positif antara viabilitas dan motilitas serta berkorelasi positif dengan kapasitas, *Uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa kambing PE dengan durasi *thawing* semen beku yang berbeda.

Hasil uji korelasi (Lampiran 4) menunjukkan bahwa motilitas, viabilitas kapasitasi, *Uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa kambing PE *post-thawing* dengan suhu 27°C selama 10 detik, suhu 37°C selama 10, 20 dan 30 detik saling berkorelasi positif

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Evaluasi Kualitas Semen Segar

Evaluasi semen setelah penampungan terdiri dari pemeriksaan mikroskopis dan makroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi : volume, konsistensi, warna dan pH,. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi: motilitas yang terdiri dari gerakan massa dan gerakan individu; konsentrasi.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui volume semen segar kambing PE yang digunakan dalam penelitian adalah 2 ml/ejakulat. Menurut Davendra dan Burn (1994) setiap melakukan ejakulasi rata-rata volume semen kambing di daerah tropis yaitu 0,5-1,0 ml. Volume semen bervariasi tergantung dari umur hewan, frekuensi pengambilan dan ketrampilan operator. Pada hewan muda volume yang didapatkan relatif sedikit demikian juga pengambilan yang sering juga menurunkan volume semen yang didapat (Dradjat, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui konsistensi semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah pekat. Hasil penelitian itu dikatakan baik dan normal. Konsistensi merupakan derajat kekentalan semen. Konsistensi dari semen dapat diperiksa dengan cara menggetar-getarkan tabung yang berisi semen. Semen yang baik mempunyai derajat kekentalan hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu, sedangkan yang jelek baik warna maupun kekentalan yang sama dengan air buah kelapa (Partodihardjo, 1992).

Warna semen segar yang digunakan dalam penelitian adalah putih susu. Warna semen segar bervariasi tergantung dari pejantan. Susilawati (2003) warna

semen kambing kebanyakan berwarna krem atau putih kekuningan. Derajat kekeruhan semen kambing yang lebih tinggi dikarenakan konsentrasi spermatozoa semen kambing lebih tinggi atau derajat kekeruhan tergantung pada spermatozoa terkandung. Warna semen yang semakin keruh mengindikasikan jumlah spermatozoa per ml semen semakin banyak (Partodiharjo, 1992).

Derajat keasaman (pH) semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6,8. Hasil tersebut dalam kisaran normal. Menurut Susilawati (2003) derajat keasaman (pH) semen kambing berkisar antara 6,38-7,22. Derajat keasaman semen yang baik cenderung lebih asam dikarenakan banyak spermatozoa yang masih aktif bergerak, yang dapat menghasilkan asam laktat. Keadaan asam pada waktu lama akan bersifat racun pada spermatozoa sehingga pada semen yang mempunyai pH rendah banyak didapatkan spermatozoa yang mati. Salisbury dan Van Denmark (1961) menambahkan variasi dari pH kambing dipengaruhi beberapa faktor antara lain adalah aktivitas spermatozoa menguraikan fruktosa, sehingga pH menjadi turun, kontaminasi dengan kuman sehingga pH naik dan terdapat perbedaan dan cara penampungan.

Pemeriksaan motilitas meliputi gerakan massa dan gerakan individu. Gerakan massa spermatozoa dalam semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah (+++). Hasil tersebut dalam kisaran normal. Dradjat (2002) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa dapat diamati menggunakan pengamatan gerak gelombang dan persentase bergerak. Motilitas massa dapat diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 100X. penilaian gerak massa (+++) yang berarti

sangat baik dengan terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif.

Gerakan individu spermatozoa dalam semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 75%. Hasil tersebut dalam kisaran normal. Susilawati (2003) menyatakan bahwa motilitas individu semen segar kambing 70%. Hal ini sependapat dengan Evan dan Maxwell (1987) bahwa semen segar dengan motilitas sangat baik (90% atau lebih) sampai baik (70-85%) dapat digunakan untuk IB. Gerakan individu spermatozoa yang baik adalah gerakan maju progresif atau gerak aktif maju kedepan.

Konsentrasi spermatozoa dalam semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2055×10^6 per ml. Penilaian konsentrasi atau jumlah spermatozoa per ml semen sangat penting, karena faktor inilah yang menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen. Menurut Evan dan Maxwell (1987) bahwa semen kambing yang memiliki kualitas baik dengan konsentrasi berkisar antara 2500-5000 juta/ml

6.2 Persentase Kualitas Mikroskopis Spermatozoa *Post-Post-thawing*

Motilitas adalah gerak maju ke depan dari spermatozoa secara progresif. Hal ini berarti spermatozoa secara progresif (maju ke depan) menjadi patokan yang mutlak diperhitungkan. Hal ini berarti spermatozoa yang bergerak berputar-putar atau bergerak di tempat apalagi yang tidak bergerak tidak dijadikan tolak ukur penilaian kualitas semen beku atau semen cair. Konsentrasi spermatozoa merupakan parameter utama dalam menilai kelayakan semen yang akan

digunakan dalam kegiatan IB (Solihati dan Kune, 2004). Cambell *et al.*, (2003) menyatakan bahwa persentase spermatozoa motil *post-thawing* minimal 30% untuk dapat diinseminasikan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa kambing PE dengan berbagai macam durasi *thawing* terlihat urutan tertinggi sampai terendah yaitu pada kelompok P3 di urutan pertama yaitu sebesar $50,00 \pm 4,08$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P2 sebesar $40,00 \pm 4,08$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P1 sebesar $30,71 \pm 3,45$ dan yang terendah adalah kelompok P0 sebesar $25,00 \pm 4,08$ (%). Hal ini sependapat dengan Tambing., dkk (1999) bahwa motilitas *post-thawing* semen kambing PE dengan air suhu 37°C selama 30 detik adalah $50,00 \pm 4,07$ (%). Motilitas *post-thawing* yang tinggi sangat diperlukan oleh spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina untuk dapat mencapai tempat fertilisasi.

Motilitas spermatozoa disebabkan karena pada fibril-fibril mikro bagian luar, pada ekor spermatozoa terdapat suatu protein yang disebut dynein. Protein ini memiliki fungsi sebagai enzim ATP-ase, sehingga mampu merubah ATP hasil metabolisme menjadi AMP dan dua ion P_i organik. Ion P_i organik memiliki energi yang tinggi sehingga menimbulkan kontraksi pada fibril-fibril mikro dan menghasilkan gerakan berpilin (Lehninger, 1994 dalam Herdis 2005).

Thawing semen harus melewati proses yang cepat karena dapat secara langsung mengembalikan kondisi normal komposisi ionik intraseluler sel (Arthur *et al.*, 1996). Namun apabila waktu *thawing* terlalu cepat akan mengakibatkan kerusakan membran yang mengakibatkan kematian. Hal ini diperkuat dengan

penelitian Al-Badry (2012), bahwa *thawing* yang terlalu cepat besar kemungkinan terjadi kristalisasi es ulang dalam sel-sel yang mengakibatkan kerusakan membran. Kerusakan pada membran akan menyebabkan permeabilitas membran spermatozoa menurun sehingga dapat mengganggu proses metabolisme sel yang mengakibatkan motilitas menurun serta tidak dapat membuahi sel telur bahkan mengakibatkan kematian (Setiadi dkk., 2006). Pada saat terjadi kerusakan membran akibat pencairan yang tidak sempurna mengakibatkan cairan dan komponen sitoplasma keluar sehingga tidak dapat menjalankan metabolisme sel. Menurut Rizal dan Herdis (2005) metabolisme akan berlangsung dengan baik apabila membran sel berada dalam keadaan utuh sehingga mampu mengatur lalu lintas keluar masuk sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Penilaian persentase viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung spermatozoa yang mati dan hidup berdasarkan pada afinitas zat warna antara sel-sel spermatozoa. Pada waktu semen dicampur dengan zat warna (eosin negrosi), sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap warna sedangkan sel-sel yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding sel meninggi sewaktu mati (Toelihere 1993; Evan dan Maxwell, 1987; Partodiharjo, 1992).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase viabilitas spermatozoa kambing PE dengan berbagai macam durasi *thawing* terlihat urutan tertinggi sampai terendah yaitu pada kelompok P3 di urutan pertama yaitu sebesar $61,57 \pm 3,95$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P2 sebesar $55,00 \pm 2,58$ (%)

kemudian dilanjutkan dengan kelompok P1 sebesar $45,00 \pm 2,58$ (%) dan yang terendah adalah kelompok P0 sebesar $35,00 \pm 5,77$ (%). Suindari (2013) menyarankan untuk proses *thawing* semen beku sebelum di inseminasikan pada domba betina, bahwa *thawing* dilakukan pada air bersuhu 37°C selama 20 detik. Berdasarkan penelitian tersebut memberikan angka viabilitas $62,33 \pm 3,20$ (%). Perbedaan kualitas semen beku *post-thawing* menunjukkan bahwa *thawing* pada durasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pula pada kualitas semen beku *post-thawing*. Bangsa dan spesies yang berbeda juga menghasilkan kualitas semen yang berbeda pula.

Durasi *thawing* yang singkat belum menyebabkan peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang berakibat menurunkan daya tahan hidup. Peningkatan aktivitas metabolisme menghasilkan asam lemak dan konsentrasi yang tinggi akibat peroksidasi lipid. Membran spermatozoa tersusun dari protein, lipid dan karbohidrat yang tersusun secara nonkovalen dan sangat sensitif terhadap faktor-faktor seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut (Park dan Graham, 1992). Fosfolipid merupakan komponen utama lipid membran spermatozoa yang secara struktural tersusun membentuk lapisan berganda. Kedua lapisan tersebut adalah fosfolipid hidrofilik membentuk permukaan membran bagian luar dan fosfolipid hidrofobik membentuk membran bagian dalam (Darnel *et al.*, 1990). Jika terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permeabilitas fosfolipid hidrofobik rusak menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa. Datta *et al.*, (2009), menyatakan bahwa lipidperoksidasi (LPO) dan kerusakan membran spermatozoa

disebabkan karena selama proses *thawing* terbentuk radikal bebas metabolit oksigen yang bersifat toxic pada tingkatan yang rendah di dalam spermatozoa bersamaan dengan suplai oksigen yang terbatas.

6.4 Persentase Kualitas Seluler Spermatozoa *Post-Thawing*

Kapasitasi terdiri dari sejumlah proses bertahap, meliputi : peningkatan fluiditas membran, influk kolesterol, aliran ion yang mengakibatkan perubahan potensial membran, peningkatan fosforilasi tirosin, induksi hiperaktivasi, reaksi akrosom, perubahan keadaan protein fosforilasi, peningkatan pH intraseluler dan level kalsium (Naz *et al.*, 2004).

Kapasitasi spermatozoa dievaluasi dengan menggunakan pewarnaan *chlortetracycline* (CTC). Pewarnaan CTC ini didasarkan pada influk kalsium yang apabila tidak terdapat tudung akrosom maka tidak berfluoresen. CTC ini akan terkait pada ion kalsium yang terdapat pada membran spermatozoa sehingga dapat mendeteksi distribusi ion kalsium yang terdapat pada membrane spermatozoa sehingga dapat mendeteksi distribusi ion kalsium karena terdapat pendaran fluoresen saat mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom. Pewarnaan ini memiliki prinsip jika terdapat lesitin yang mengikat glukosa atau D-fruktose yang terdapat pada *inner membrane* akrosom sehingga spermatozoa yang masih terdapat akrosom akan memancarkan fluoresen (Susilowati, 2000).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase kapasitasi spermatozoa kambing PE dengan berbagai macam durasi *thawing* terlihat urutan tertinggi sampai terendah yaitu pada kelompok P3 di urutan pertama yaitu sebesar $27,14 \pm$

2,12 (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P2 sebesar $23,57 \pm 0,98$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P1 sebesar $19,29 \pm 0,76$ (%) dan yang terendah adalah kelompok P0 sebesar $15,71 \pm 0,76$ (%). Hal ini sependapat dengan Suprayogi (2013) bahwa kapasitas spermatozoa sapi FH yang *dithawing* dengan suhu 37°C selama 15 detik yang ditambahkan dengan protein FAA $5\mu\text{g}$ adalah $27,23 \pm 3,76$ (%). Persentase kapasitas spermatozoa pada durasi *thawing* yang berbeda menunjukkan kenaikan. Hal ini disebabkan semakin panjang durasi *thawing* semakin tinggi permeabilitas membran sehingga tidak dapat mempertahankan kadar Ca^{2+} intraseluler pada level rendah yang mengakibatkan kejadian kapasitas tidak dapat dihindari.

Keadaan spermatozoa belum kapasitas adalah keadaan dimana Na rendah (14 mM) dan konsentrasi tinggi K (90-120 mM) Ca^{2+} intraseluler pada saat belum terjadi kapasitas adalah 0,1 M atau kurang. Hiperpolarisasi membrane diakibatkan peningkatan sebagai akibat dari penurunan modulasi hambatan channel K. saluran ini berperan dalam kapasitas yang disebabkan hiperpolarisasi membran.

Perpindahan HCO_3^- secara transmembran dikaitkan dengan peningkatan pH intraseluler selama kapasitas. Selain itu HCO_3^- dengan Ca^{2+} bertindak sebagai regulasi metabolisme cAMP melalui adenilat siklase. Adenilat siklase distimulasi oleh HCO_3^- anion. Aktifasi dari adenilat siklase menimbulkan peningkatan Camp intraseluler dan mengaktifkan PKA. PKA memfosforilasi berbagai protein yang dianggap memulai beberapa jalur sinyal. Pada sperma yang terpapar HCO_3^- menyebabkan peningkatan cAMP dalam waktu 60 detik dan dilanjutkan dengan

peningkatan fosforilasi PKA dependent dalam waktu 90 detik. Aktivasi PKA yang meningkat akan menggerakkan tirosin kinase dan akan terjadi fosforilasi tirosin. Jika fosforilasi tirosin meningkat akan menyebabkan kapasitas dan hiperaktivasi spermatozoa.

Spermatozoa yang mengalami kapasitas menginduksi GABA melalui jalur sinyal transduksi yang melibatkan Ca^{2+} , cAMP dan fosforilasi tirosin. Angiotensin II menstimulasi untuk memproduksi cAMP pada saat kapasitas dengan peningkatan fosforilasi protein tirosin. Peningkatan cAMP dan laju penggantian, akan menstimulasi protein kinase merubah struktur tersier dan kuartener selaput spermatozoa melalui fosforilasi, protein membran yang menghasilkan perubahan pada sifat fisik selaput. Perubahan ion intraseluler terjadi selama proses kapasitas dalam keadaan konsentrasi K^+ intraseluler dijaga tetap tinggi (90-120 mM) dan konsentrasi Na^+ intraseluler dijaga tetap rendah (14 mM). Keadaan tersebut diatur oleh ikatan Na^+ -K-ATPase yaitu pemompaan ion Na^+ keluar dan ion K^+ masuk ke dalam sel, serta Ca^{2+} -K-ATPase yang merupakan peristiwa pemompaan Ca^{2+} keluar. Selain itu, perubahan inti juga terjadi selama proses kapasitas dengan kehilangan ion Zn^{2+} dan peningkatan stabilitas membran yang mungkin disebabkan oleh oksidasi pada radikal SH^+ yang lepas pada ikatan sulfida (Visconti and Kopf, 1998, Naz dan Rajesh, 2004 dan Yanagimachi, 1994).

Uptake kalsium adalah komponen dari kapasitas yang berhubungan dengan perubahan membran untuk aktivasi motilitas spermatozoa dan reaksi akrosom (Landim-Alvarega *et al.*, 2004). Salah satu hasil kapasitas adalah

peningkatan permeabilitas membran kalsium, yang memungkinkan gerak cepat kalsium ke spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar Ca^{2+} intraseluler spermatozoa kambing PE dengan berbagai macam durasi *thawing* terlihat urutan tertinggi sampai terendah yaitu pada kelompok P3 di urutan pertama yaitu sebesar $2812,71 \pm 186,14$ (intensitas/ μm^2) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P2 sebesar $2018,73 \pm 158,12$ (intensitas/ μm^2) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P1 sebesar $1438,49 \pm 113,85$ (intensitas/ μm^2) dan yang terendah adalah kelompok P0 sebesar $1234,57 \pm 73,23$ (intensitas/ μm^2). Hal ini sependapat dengan Suprayogi (2013) bahwa intensitas Ca^{2+} intraseluler spermatozoa sapi FH yang *dithawing* dengan suhu $37^{\circ}C$ selama 15 detik tanpa penambahan protein FAA $5\mu g$ adalah $1469,10 \pm 289,53$ (intensitas/ μm^2). Hal ini membuktikan bahwa durasi *thawing* selama 30 detik memiliki kadar Ca^{2+} yang lebih besar daripada spermatozoa *post-thawing* dari kedua macam durasi *thawing* lain. Proses metabolisme spermatozoa yang kembali aktif saat proses *thawing* maka semakin panjang durasi *thawing* maka semakin banyak akumulasi Ca^{2+} sebagai inisiator pembentukan ATP untuk motilitas.

Salah satu perubahan penting yang terjadi pada spermatozoa dalam proses kapasitas adalah terdapat perubahan konsentrasi ion-ion Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , dan lain-lain. Hal ini akibat terdapat perubahan lingkungan mikro selama spermatozoa berada di dalam saluran reproduksi betina. Molekul energi ATP juga merupakan komponen penting untuk motilitas spermatozoa yang cepat dan progresif. Aliran keluar masuk ion-ion dan ATP yang keluar dari mitokondria dimungkinkan

karena terdapat kanal-kanal ion pada membran plasma spermatozoa. Perubahan konsentrasi ion-ion yang disertai molekul ATP yang siap digunakan oleh komponen aksonema; akan memicu proses-proses fisiologis spermatozoa (Asmarinah, 2010). Pemasukan kalsium melalui *calcium channel* pada membran sel, sehingga akan terjadi peningkatan aktivitas kalsium yang tergantung pada myosin ATP-ase. Hal ini berpengaruh terhadap peningkatan produksi energy yang tinggi hasil oksidasi fosfat (Tartaglione dan Ritta, 2004). Peningkatan influk kalsium intraseluler *post-thawing* sangat merugikan, merugikan, karena kapasitas terjadi setelah spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina.

Kerusakan membran plasma karena proses *thawing* menyebabkan perubahan potensial membran spermatozoa (Aires *et al.*, 2003), sehingga aliran cairan dan beberapa ion, antara lain terjadi pertukaran ion Na^+ atau K^+ keluar sel, dengan diikuti Ca^{2+} ekstraseluler masuk secara pasif ke dalam membran (Akao *et al.*, 2001). Kemudian akan mempengaruhi sinyal transduksi dan diikuti beberapa reaksi kimia baik dalam membran plasma, yang berakibat penimbunan Ca^{2+} secara berlebihan dalam sitoplasma (Breitbart dan Naor, 1999), dengan kadar Ca^{2+} intraseluler yang tinggi ini apabila dilakukan pewarnaan dengan fluo-3, maka terjadi peningkatan densitas pula. Sedangkan pada spermatozoa yang memiliki membran stabil, influk Ca^{2+} intraseluler dalam jumlah sedikit.

Pada penelitian Suprayogi (2012), bahwa level kalsium intraseluler pada spermatozoa yang dikriopreservasi berhubungan berkebalikan dengan fertilitas sapi *in vivo*. Hasil ini menunjukkan bahwa setelah pembekuan atau pencairan

kembali, spermatozoa dari sapi yang fertilitas rendah tidak dapat mengatur level kalsium intraseluler sebaik spermatozoa dari sapi yang fertilitas tinggi.

Telah ditunjukkan bahwa level kalsium setelah krioproservasi meningkat (Bailey and Buhr, 1994). Spermatozoa sapi yang dibekukan dan dicairkan kembali mengakumulasi kalsium lebih banyak daripada spermatozoa segar, karena membran plasma berubah diinduksi selama proses krioproservasi (Buhr *et al.*, 1989; de Leeuw *et al.*, 1991; Park and Graham, 1992). Sehingga level kalsium spermatozoa berkorelasi negatif dengan fertilitas semen yang dibekukan-pencairan kembali, level kalsium yang rendah diperlukan untuk fertilisasi *in vivo*.

Ca^{2+} mitokondria yang berlebihan mempromosikan pembukaan pori-pori (*PT pore*). Hal ini meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dalam menyebabkan pembengkakan, matriks dan membran luar mitokondria pecah dan pelepasan sitokrom c (Liu, X. *et al.*, 1996; Narita, M., *et al.*, 1998, dan Li. P, *et al.*, 1997. Martin *et al.*, 2007 membuktikan bahwa peningkatan kadar sitokrom c, *Apoptic Inducing Factor* (AIF), dan caspase-9 selama proses krioproservasi dan *thawing* semen sapi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa kambing PE dengan berbagai macam durasi *post-thawing* terlihat urutan tertinggi sampai terendah yaitu pada kelompok P3 di urutan pertama yaitu sebesar $76,63 \pm 13,61$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P2 sebesar $48,97 \pm 3,50$ (%) kemudian dilanjutkan dengan kelompok P1 sebesar $41,00 \pm 9,78$ (%) dan yang terendah adalah kelompok P0 sebesar $20,34 \pm 1,28$ (%). Hal ini berbeda dengan Suindarti (2013) bahwa ekspresi sitokrom c sitosolik domba ekor

gemuk yang *dithawing* dengan suhu 37°C selama 20 adalah $1,25 \pm 1,07$ (%). Hal ini membuktikan bahwa durasi *thawing* selama 30 detik memiliki persentase sitokrom c sitosolik yang lebih besar daripada spermatozoa *post-thawing* dari kedua macam durasi *thawing* lain.

Hal ini dikarenakan proses pembentukan energi berupa ATP menghasilkan produk sampingan yaitu radikal bebas. Hasil dari proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik tersebut, ternyata mempunyai efek samping berupa pembentukan senyawa-senyawa radikal bebas. Halliwell and Gutteridge (1999) menyatakan bila molekul dioksidasi dengan oksigen, maka oksigen itu sendiri akan mengalami reduksi dengan membentuk berbagai bentuk intermediet. Produksi energi yang dihasilkan oleh metabolisme dari sumber energi yang teroksidasi. Mereka melepaskan elektron yang diterima oleh pengangkut elektron seperti *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD⁺), *Flavin Mono Nucleotide* (FMN) dan *Flavin Adenine Dinucleotide* (FAD) yang direduksi menjadi NADH, FMNH₂ dan FADH₂. Hasil reduksi dari NAD (NADH) dan reduksi flavin (FMNH₂ dan FADH₂) dioksidasi kembali oleh O₂ dalam mitokondria menghasilkan sejumlah ATP. Pada proses oksidasi ini dilakukan dalam beberapa langkah, sehingga energi dilepaskan secara berangsur-angsur. Hal ini diatur oleh sistem rantai transport elektron terdapat di membran interna mitokondria seperti sitokrom oksidase (Halliwell and Gutteridge, 1999). Pada proses pembentukan energi diperlukan rantai transpor elektron yang terdiri atas kompleks I, kompleks II, kompleks III, dan kompleks IV. Kompleks I, III, dan IV berfungsi untuk memompa elektron. Kompleks I terdiri dari NADH

dehidrogenase dan pusat sulfur. Kompleks II terdiri atas suksinat dehidrogenase dan pusat sulfur. Kompleks III terdiri dari sitokrom d dan c_1 . Kompleks IV terdiri dari sitokrom a dan a_3 . Sitokrom c merupakan rantai penghubung di antara kompleks III dan IV (Campbell *et al.*, 2010). Hasil dari proses oksidasi yang terjadi pada proses transformasi energi metabolik tersebut, ternyata mempunyai efek samping berupa pembentukan senyawa-senyawa radikal bebas.

Reduksi oksigen menjadi H_2O dalam proses fosforilasi oksidatif memerlukan pengalihan 4 elektron, dimana pengalihan ke 4 elektron tersebut tidak dapat terjadi sekaligus, tetapi terjadi dalam 4 tahapan, setiap tahap hanya melibatkan pengalihan satu electron. Bila pengalihan tersebut tidak berlangsung secara sempurna maka akan menyebabkan pembentukan senyawa-senyawa oksigen reaktif seperti radikal superoksida anion ($O_2^{\circ-}$), radikal peroksil (DOH), hydrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH°) (Halliwell, 1993). Setiap pengalihan elektron kepada molekul oksigen akan menghasilkan senyawa oksigen reaktif. Penambahan satu electron pertama pada molekul O_2 akan menyebabkan pembentukan radikal superoksida anion, electron kedua akan menghasilkan hydrogen peroksida dan electron ketiga akan menghasilkan radikal hidroksil (OH°). Dalam keadaan normal peningkatan $O_2^{\circ-}$ ini akan dinetralisir oleh enzim superoksida dismutase menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2), kemudian H_2O_2 oleh enzim katalase atau glutathion peroksidase dinetralisir menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2). Namun bila enzim antioksidan pada spermatozoa rendah dan tidak mampu menetralkan peningkatan radikal superoksida anion ataupun H_2O_2 menjadi

air, maka radikal superoksid anion akan bereaksi dengan hydrogen peroksida dan bantuan indicator Fe^{2+} dan Cu^{2+} membentuk senyawa radikal hidroksil (OH^{\cdot}).

Peningkatan kadar kalsium intraseluler akan mengubah sejumlah aktivitas enzim yang berpotensi merusak sel, seperti phospholipase (menurunkan produksi phospholipide dan berpotensi merusak membrane), protease (memecah protein membrane dan sitoskeleton), ATP-ase (menurunkan jumlah ATP) dan endonuclease (menyebabkan fragmentasi kromatin) (Cotran *et al.*, 1999).

Keberadaan kalsium intraseluler juga diketahui dapat mengaktivasi phospholipase untuk membebaskan arachidonic acid dari phospholipide membran sel. *Arachidonic acid* adalah satu asam lemak poli-tidak jenuh yang terdapat dalam jumlah cukup banyak sebagai phospholipide membran sel. Metabolisme *arachidonic acid* berlangsung melalui dua jalur utama sesuai dengan enzim yang mencetuskan reaksi. Aktivasi enzim cyclooxygenase akan menghasilkan prostaglandin dan aktivitas enzim lipooxygenase akan menghasilkan leukotriene (Cotran *et al.*, 1999).

Cascade arachidonic acid menjadi prostaglandin dan prostasiklin melalui aktivitas enzim cyclooxygenase akan meningkatkan produksi superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dan hydrogen peroksida (H_2O_2). Kedua senyawa tersebut termasuk senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* = ROS) yang bersifat radikal untuk superoksida dan non radikal untuk hydrogen peroksida (Halliwell and Gutteridge, 1999).

ROS dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi protein seperti enzim, reseptor, jalur transduksi sinyal, transport protein dan enzim yang

memerlukan konsentrasi ion Ca^{2+} bebas yang rendah intraseluler, karena ROS dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino penyusun protein. Diantara asam-asam amino yang paling rawan terhadap oksidasi radikal oksigen adalah sistein, karena sistein mengandung gugusan sulfhidril (-SH) yang sangat peka terhadap ROS atau dapat bereaksi langsung dengan ion logam transisi, sehingga membentuk thyl radicals.

Kerusakan protein oleh serangan ROS, bukan saja merusak fungsi enzim, tetapi juga mengganggu fungsi reseptor (seperti β adeno reseptor dan α_1 adenergenik reseptor) dan transportasi oleh protein. Kerusakan dapat terjadi pada protein yang terlibat di dalam mempertahankan keseimbangan ion intraseluler seperti Ca^{2+} -ATPase dan sistem keseimbangan pertukaran Ca^{2+} dan Na^+ yang menjaga Ca^{2+} intraseluler tetap rendah dari ekstraseluler (Halliwell and Gutteridge, 1999). System Na^+ , K^+ -ATPase di dalam membran plasma penting untuk menjaga konsentrasi K^+ intraseluler tetap tinggi dan Na^+ intraseluler tetap rendah dibandingkan ekstraseluler. Ca^{2+} -ATPase dan Na^+ , K^+ -ATPase mengandung gugus sulfhidril (-SH) yang sangat rawan terhadap serangan radikal hidroksil. Suryodhono (2000) menyatakan bahwa kerusakan gugus SH oleh radikal hidroksil akan menyebabkan gangguan permeabilitas membrane sel, sehingga terjadi ketidakseimbangan ion intraseluler yang akan mempengaruhi fungsi sel (Phelp *et al.*, 1999).

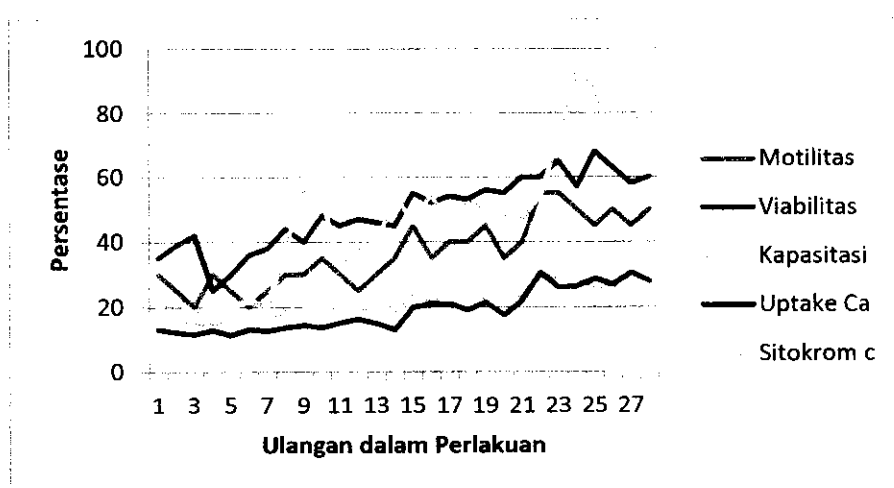
Pelepasan sitokrom c dari mitokondria akibat ROS akan berikatan dengan APAF-1. Kemudian akan mengaktifasi caspase-9 sebagai initiator caspases. Sekali caspase-9 teraktivasi, ia akan memecah dan mengaktifkan efeksrta caspase

yang diperlukan untuk kelangsungan program kematian secara enzimatik (Bossy and Grenn, 1995 ; Cotran *et al.*, 1999)

6.4 Korelasi Kualitas Mikroskopis dan Kualitas Seluler Spermatozoa *Post-Thawing*

Analisis data menggunakan uji korelasi, menunjukkan terdapat korelasi positif antara motilitas, viabilitas, kapasitas, uptake Ca dan ekspresi sitokrom c sitosolik spermatozoa kambing PE *post-thawing* tercantum pada Gambar 6.1.

Pada proses *thawing* terjadi peningkatan permeabilitas membran yang mengakibatkan Ca^{2+} masuk secara pasif ke dalam membran yang berakibat penimbunan Ca^{2+} secara berlebihan dalam sitoplasma. Akumulasi Ca^{2+} diketahui sebagai inisiator pembentukan ATP untuk motilitas. Peningkatan Ca^{2+} secara berlebih dapat menyebabkan kerusakan pada mitokondria akibat ikatan Ca^{2+} kalmodulin dependent protein kinase. Kerusakan mitokondria akan mengakibatkan pelepasan sitokrom c dalam sitoplasma sebagai pencetus apoptosis



Gambar 6.1 Grafik Peningkatan Motilitas Seiring dengan Peningkatan Viabilitas, Kapasitas, Reaksi Akrosom, Uptake Ca^{2+} dan Ekspresi Sitokrom C Sitosolik

Selain durasi *thawing*, aktivitas metabolisme sangat dipengaruhi oleh suhu. Proses metabolisme dipengaruhi oleh daya kerja enzim yang bekerja pada suhu optimal antara 35°C dan 40°C. Pada suhu di atas dan di bawah optimalnya, aktivitas enzim berkurang. Di atas suhu 50°C enzim secara bertahap menjadi inaktif karena protein terdenaturasi. Pada suhu 100°C semua enzim rusak. Pada suhu yang sangat rendah, enzim tidak benar-benar rusak tetapi aktivitasnya sangat banyak berkurang (Gaman & Sherrington, 1994). Enzim memiliki suhu optimum yaitu sekitar 18⁰-23⁰C atau maksimal 40⁰C karena pada suhu 45⁰C enzim akan terdenaturasi karena merupakan salah satu bentuk protein. (Tranggono & Setiadji, 1989). Suhu yang tinggi akan menaikkan aktivitas enzim namun sebaliknya juga akan mendenaturasi enzim (Martoharsono, 1994). Peningkatan temperatur dapat meningkatkan kecepatan reaksi karena molekul atom mempunyai energi yang lebih besar dan mempunyai kecenderungan untuk berpindah. Ketika temperatur meningkat, proses denaturasi juga mulai berlangsung dan menghancurkan aktivitas molekul enzim. Hal ini dikarenakan adanya rantai protein yang tidak terlipat setelah pemutusan ikatan yang lemah sehingga secara keseluruhan kecepatan reaksi akan menurun (Lee, 1992).

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan Khusus

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Perlakuan dengan durasi *thawing* suhu 27°C selama 10 detik menunjukkan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa terendah.
2. Perlakuan dengan durasi *thawing* suhu 27°C selama 10 detik menunjukkan persentase kapasitas spermatozoa terendah.
3. Perlakuan dengan durasi *thawing* suhu 27°C selama 10 detik menunjukkan intensitas Ca^{2+} intraseluler spermatozoa terendah.
4. Perlakuan dengan durasi *thawing* suhu 27°C selama 10 detik menunjukkan persentase sitokrom c sitosolik spermatozoa terendah.
5. Terdapat korelasi positif antara kualitas mikroskopis dan kualitas seluler spermatozoa yang *dithawing* dengan waktu yang berbeda.

7.1.2 Kesimpulan Umum

1. Semakin tinggi persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa maka semakin tinggi persentase kapasitas, *uptake* Ca^{2+} dan ekspresi sitokrom c sitosolik pada spermatozoa kambing Peranakan Ettawa dalam durasi *thawing* suhu 37°C 30 detik.

6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah :

1. Durasi *thawing* selama 10 detik dapat digunakan sebagai pedoman dalam proses *thawing* semen beku sebelum di inseminasikan pada kambing Peranakan Ettawa betina.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Achlis, R. 2011. Kualitas Semen Beku Kambing peranakan Etawa dalam Berbagai Macam Pengencer (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Aires, V.A., E. Hinsch and K. D. Hinc. 2003. Effect of Ginestein Upon Capacitation of Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *J. Andrologia* 2003, 35: 2.
- Al-BADry, K. I. 2012. Effect of Various Thawing Times and Temperatures on Frozen Semen Quality Friesian Bulls in Iraq. *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 4(6): 384-388.
- Akao, M., A. Ohler, B. O'Rourke and E. Marban. 2001. Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channels Inhibit Apoptosis Induced by Oxydative Stress I Cardiac Cell. *Circ res* 88, 1267-1275.
- Anderson, G. B. 1977. Fertilization, early development, and embryo transfer. In *Reproduction in domestic animal*. 3th. Academic Press New York San Fransisco London.
- Anonimus. 2013. Cytochrome C. Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/cytochrome-c.html>. Diakses 1 Desember 2013.
- Anonimus. 2013. Anatomy and Physiology of The Male Reproductive System. OpenStax Collage. <http://cnx.org/content/m46400/1.3/>. Diakses 1 April 2014.
- Arthur, G.H., D. E. Noakes., P. Harrold and T.J. Parkinson. 1996. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Seventh Edition. W. B. Saunders Company Ltd. London, England.
- Asmarinah. 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Majalah Kedokteran Iondonesia*. 60: 374-381.
- Bailey, L and B.T. Storey. 1994. Calcium Influx Into Mouse Spermatozoa Activated by Solubilized Mouse Zona Pellucida, Monitored with the Calcium Fluorescent Indicator, fluo-3. Inhibition of The Influx by three Inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: typhostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Molecular Reproduction Development* 39: 297-308.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz and G. Forti. 1996. Human Sperm Activation During Capacitation and Acrosome Reaction: Role of Calcium.

- Protein Phosphorilation and Lipid Remodeling Pathways. *Frontiers in Bioscience* 1.
- Batistatou A., D. E. Merry, S. J. Korsmeyer and L. A. Greene. 1993. Bcl-2 Affects Survival But Not Neuronal Differentiation Of Pc12 Cells. *J Neurosci* 13:4433-4428. Brooks SF, Gibson LA, Rubin.
- Bearden, J. H and J. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction* 3rd Edition. Prentice hall. Englewood Cliffs. New Jersey. 136-137, 141.
- Bearden, H. J., Fuquay, J. W. and S. T. Willard. 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6th ed. Mississippi State University. USA.
- Blandau, R. J. 1980. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*. Vol. 33: 3-11.
- Blanco, F. J., R. L. Ochs, F. Rosen and M. Lotz. 1995. Chondrocyte apoptosis induces by nitric oxide. *Am J Pathol* 146: 75-85.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen. 2003. Mechanisme of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15 : 725 – 731.
- Bossy, W. E. and D. R. Grenn. 1995. Apoptosis : check point at the mitochondrial frontier. *Mutant Res* : 424 (3) ; 243 – 251.
- Boventre, J. V. 1992. Cellular Calcium Transport System in Membrane transport in Biology. Vol. 6. Ed by Shafer J.A., Usiing H.H., Kristensen P., Giebisch G.H.P. 262-316.
- Buhr, M. M., E. F. Curtis and N. S. Kakuda. 1994. Composition and behaviour of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31 224–238.
- Campbell, J. R., K. L. Campbell and M. D. Kenealy. 2003. Artificial insemination. In: *Animal Sciences* 4th ed. New York, Mc Graw-Hill.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. L Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky and R. B. Jackson. 2010. *Biologi Edisis Delapan Jilid Satu*. Penetbit Erlangga: Jakarta.
- Correa, J. R., M. C. Rodriguez, D. J. Patterson and P. M. Zavos. 1996. “Thawing and Processing of Cryopreserved Bovine Spermatozoa at Various Temperatures and Their Effects on Sperm Viability, Osmotic Shock and Sperm Membran Functional Integrity”. *Theriogenology*. 46: 421-427.

- Cotran R. S., K. Vinary and C. Tucker. 1999. Cellular pathology I : cell injury and cell death. In pathologic basic of disease, 6th Ed, Philadelphia : WB saunders co, p 18-25.
- Curry, M. R., F. W. Kleinhans and P. F. Watson. 2000. Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentrationdependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiol.* 41:167-173.
- Darnel, J., H. Lodish, and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology* 2nd ed. Sci. Am. Book.
- Datta, U., M. C. Sekar, M. L. Hembram and R. Dasgupta. 2009. Development of a new Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10°C *Proceedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences. Kolkata West Bengal.India.*
- De Leeuw, F. E., H. C. Chen, B. Colenbrander and A. J. Verkleij. 1990. Coldinduced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes *Cryobiology* 27: 171–183.
- Devendra, C. dan M. Burn. 1994. *Produksi Kambing di Daerah Tropis.* ITB. Bandung.
- Direktorat Jendral Produksi Peternakan. 2000. *Prosedur Tetap (Protap) Produksi dan Distribusi Semen Beku.* Departemen Pertanian Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta.
- Direktorat Jendral Produksi Peternakan. 2007. *Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku.* Departemen Pertanian Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta.
- Djuwita, I. A., Boediono dan K. Mohammad. 2000. *Embriologi.* Laboratorium Embriologi-Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan-Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dradjat, S. 2002. *Teknologi Reproduksi Ternak.* Mataram University Press. Mataram.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.* Butterworths Pty Limited. Australia. 17-23, 79-107.
- Feradis. 1999. *Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St.Croix.* [disertasi]. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Fernandez, L. G., J. M. Morrell, F. J. Pena and B.M. Garcia. 2012. Osmotic Shock Induces Structural Damage On Equine Spermatozoa Plasmalemma And Mitochondria. *Theriogenology* 78 (2012) 415-422.
- Fuller, S. J. and D. G. Whittingham. 1996. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 108: 145-149.
- Gaetz, J. and T. M. Kapoor. 2004. Dynein/Dynactin Regulate Metaphase Spindle Length By Targeting Depolymerizing Activities To Spindle Poles. *The Journal of Cell Biology* 166 465-471.
- Gaman, P. M dan K. B. Sherrington. 1994. Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi. Universitas Gadjah Mada press. Yogyakarta.
- Garner, D. I. and Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma Edited by Hafez, E. S. E., *Reproduction in Farm Animal* 6th edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Gillan L., G. Evans and W. Maxwell. 2005. Flow Cytometric Evaluation Of Sperm Parameters In Relation To Fertility Potential. *Theriogenology* 63: 445-57.
- Gadella, B. M. and P. E. Visconti. 2006. Regulation of Capacitation. In *The Sperm Cell Reproduction, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Edited by De Jonge, C. and Barratt. Cambridge University Press. UK.
- Halliwell, B. 1993. Free radicals and vascular disease; how much do we know? *Brit Med, J*, 307; 885.
- Halliwell, B. and J. M. C., Gutteridge. 1999. Free radical, other reactive species and disease. In *free radical in biology medicine*. New York : Oxford University pp 267-276.
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito dan T. W. Suprayogi. 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Asisted Reproductive Technology : Ovulation Manipulation, In Vitro Fertilization/Embryo Transfer (IVF/ET) in Reproduction in Farm Animal*. Awollers Kluwer Company. Philadelphia.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal*, 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. South Carolina.
- Hardjopranjoto, S. 1987. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga University Press. H: 55-69.
- Hill, M. 2013. Spermatozoa Development. UNSW Embryology. http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Spermatozoa_Development. Diakses 30 November 2013.
- Hinting, A. 1989. Assessment of Human Sperm Fertilizing Ability, Tesis Submitted in fulfillment of requirements for the Degree of Special Doctor in Reproduction Medicine. Rijksuniversiteit. Gent. Belgium. P: 166-170.
- Hunter, R. H. F. 1981. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung. hal 13 -26, 41-45, 74-104.
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, S.P. Madyawati, A. Samik dan E. Safitri. 2010. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Jamieson, B. G. M. 1991. Fish Evolution and Systematic: Evidence from Spermatozoa. 1st edition. Cambridge University Press. New York. 319 pp.
- Kartasudjana. 2001. Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak. Departemen Pendidikan Nasional. 2000.
- Kohler, C., T. Merkle, D. Roby and G. Neuhaus. 2001. Developmentally Regulated Expression Of A Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel From *Arabidopsis* Indicates Its Involvement In Programmed Cell Death. *Planta* 213, 327-332.
- Lamb, T. D., H. R. Matthews and V. Torre. 1986. Incorporation Of Calcium Buffers Into Salamander Retinal Rods: A Rejection Of The Calcium Hypothesis Of Phototransduction. *Journal of Physiology* 372, 315-349.
- Landim-Alvarenga, F. C., J. K. Graham, M. A. Alvarenga and E.L. Squires. 2004. Calcium Influx Into Equine and Bovine Spermatozoa During In Vitro Capacitation. *Journal Animal Reproductive* 1(1):96-105.
- Lee, J. M. 1992. Biochemical Engineering. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Lehninger, A. L. 1994. Dasar-Dasar Biokimia, Thenawidjaja, penerjemah. Jakarta: Erlangga.
- Leite-Browning, M. L. 2009. Biology of Reproduction of Goat. Extension Animal Scientist. Alabama A&M University

- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, Vol. 91: 479–489.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang. 1996. Induction of Apoptotic Programin Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*, Vol. 86: 147–157.
- Lubart, R., H. Friedmann, M. Sinyakov, N. Cohen and H. Breitbart. 1997. Changes in Calcium Transport in Mammalian Sperm Mitochondria and Plasma Membranes Caused by 780nm Irradiation. Department of Physics and Chemistry, Bar-Nan University, Israel. *Lasers in Surgery and Medicine* 21: 493–499.
- Lukitasari, A. 2006. Peran N-Asetil Sistein Dalam Menghambat Kerusakan Lensa Mata Diabetik (Disertasi). Program Pascasarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Lumongga, F. 2008. Apoptosis. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Margoliash. 1963. Primary Structure and Evolution of Cytochrome C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 50: 672–679.
- Martoharsono, S. 1994. Biokimia jilid 1. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Mulyono, S. 2003. Teknik Pembibitan Kambing dan Domba. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Narita, M., S. Shimizu., T. Ito., T. Chittenden., R. J. Lutz., H. Matsuda and Y. Tsujimoto. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, pp. 14681–14686.
- Naz, R. K. and B. R. Preeti. 2004. Review Role of Tyrosine Phosphorilation in Sperm Capacitation / acrosome reaction. *J. Reproductive Biology and Endrocynology* 2004, 2: 75.
- Naz, R.K. and P. B. Rajesh. 2004. Role of Tyrosine Phosphorilation in Sperm Capacitation / Acrosome Reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Vol. 2: 75-86.

- Norberg, E., S. Orrenius and B. Zhivotovsky. 2010. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 95–100.
- Park, J. E. and J. K. K. Graham. 1992. Effects of Cryopreservation Procedures On Sperm Membrane. *J. Theriogenology. Iranian Journal Reproductive*, 8, 3 : 119-124.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jurusan Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Pasaribu, F.H. dan S. Imam. 1992. Invitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Pineda, M. H. and M. P. Dooley. 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Iowa State Press America. Iowa.
- Prabowo, A. 2010. Budidaya Ternak Kambing (Materi Pelatihan Agribisnis bagi KMPH). Dinas Kehutanan Kabupaten Musi Banyuasin. Sumatera Selatan.
- Renehan, A. G., C. Booth and C. D., Potten. 2001. What is Apoptosis and Why is It Important. *BMJ*; 322; 1536-1538.
- Riadi. 2004. Perubahan Karakter Ejakulat dan Aktivitas Antioksidan pada Masa Reproduksi Kambing Kacang dan Kambing Peranakan Ettawa. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rizal, M. 2005. Fertilisasi Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rizal, M dan Herdis. 2005. Daya Hidup Spermatozoa Epididmid Domba Garut yang Dikriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris. *Jurnal Hayati* ISSN 0854-8587. Hal 62-66.
- Robens. 2001. Apoptosis. [URI]. [http://www. Geocities.com / collegePark / lab / bcl-2.htm](http://www.Geocities.com/collegePark/lab/bcl-2.htm).2000. Diakses 28 Desember 2001.
- Sahara S., M. Aoto, M. Eguchi, M. Imamoto, Y. Yoneda and Y. Tsujimoto. 1999. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptic chromatin condensation. *Nature* 401 ; 168 -173.

- Said, T.M., A. Gaglani and A. Agarwal. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine* 21: 456-462.
- Salisbury, G. H. dan N. I. Van Denmark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Alih Bahasa oleh Januar, R. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sarwono, B. 2001. *Beternak Kambing Unggul*. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta. 4, 21, 64.
- Setiadi, M. A., Suprayogi dan Yulnawati. 2006. Viabilitas dan Integritas Mmembran Plasma Spermatozoa Epididimis Anjing Selama Penyimpanan dan Pengenceran yang Berbeda. *Media Kedokteran Hewan*. 22(2): 6.
- Setiawan, T dan A. Tanius. 2005. *Beternak Kambing Perah Peranakan Ettawa*. Penerbit Swadaya hal 2-4.
- Shizoki, E.N. and Y. Shi. 2004. Caspase, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisme from structural biology. *Trends in Biochemical Science* Vol. 39 No. 9. Department of Molecular Biology, Princeton University, USA.
- Sikdar. R., U. Ganguly, S. Chandra, G. Adhikary and P.C. Sen. 1993. Calcium uptake and Ca^{2+} ATPase activity in goat spermatozoa membrane vesicles do not require Mg^{2+} . Department of Chemistry, Bose Institute, India. *J. Biosci.*, Vol. 18, pp 73–82.
- Sodiq, A. and M. Y. Sumaryadi. 2002. Reproductive performance of Goat nut and Ettawa Crossbreed Goat in Indonesia. *J. Anim. Prod* 4 : 52-59.
- Sodiq, A. dan Z. Abidin. 2008. Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Etawa. *Agromedia Pustaka*. Jakarta. 7-15, 82-83.
- Solihati, N. dan P. Kune. 2008. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental (http://pustaka.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2009/03/pengaruh_jenis_pengencer_terhadap_motilitas.pdf) . Diakses 6 Maret 2013.
- Sonjaya, H., Sutomo dan Hastuti. 2005. Pengaruh Penambahan Calcium Ionosphere Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boar Hasil Seksing. *J. Sains & Teknologi*.
- Souhoka, D. F., M. J. Matatula, W. M. Mesang-Nalley dan M. Rizal. 2009. Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *Jurnal Veteriner* Vol. 10 No. 3 : 135-142.

- Subartha, I.M. 1998. Pemberian Fosfolipid Essensial dan Antioksidan (Vit E) Meningkatkan Integritas Membran Spermatozoa. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suindarti, R.D. 2013. Fragmentasi DNA dan Ekspresi Sitokrom C Sebagai Indikator Apoptosis Serta Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Pada Semen Beku Domba Ekor Gemuk Dengan Durasi Thawing yang Berbeda (Tesis). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Suprayogi, T.W. 1996. Pemanfaatan Organ Kelenjar Asesoris Kelamin Sapi Jantan Dari Rumah Potong Hewan (RPH) Untuk Perbaikan Mutu Semen Beku Sapi. Universitas Airlangga.
- Suprayogi, T.W. 2012. Peran *Fertility Associated Antigen* (FAA) Dalam Proses Pembekuan Semen Sapi Untuk Mencegah Terjadinya Kapasitasi, Reaksi Akrosom dan Influx Ca Intraseluler Secara Dini. Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012.
- Suprayogi., T.W. 2013. Potensi *Fertility Associated Antigen* (FAA) Plasma Semen Sapi Sebagai Triger Kesuburan Semen Beku (Disertasi). Program Pascasarjana. Universitas Airlangga Surabaya.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pasca Sarjana Unair Surabaya.
- Susilawati, T. 2003. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradient Konsentrasi Putih Telur. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Jurnal 'PROTEIN'. No. 20 ISSN : 1410-3281. Juli-Desember 2003.
- Susilowati, S., Hardijanto, T.W. Suprayogi, T. Sardjito dan T. Hernawati. 2010. Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Airlangga University Press. Surabaya.
- Tambing, S. N. , M. R. Toelihere, L. Tuty dan K. Utama. 1999. Motilitas, Daya Hidup dan Tudung Akrosom Utuh Semen Kambing Peranakan Etawah pada Berbagai Suhu *Thawing*. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner.
- Tantral, L., K. Malathi, S. Kohyama, M. Silane, A. Berenstein and T. Jayaraman. 2003. Intracelluler calcium release is required for caspase-3 and 9 activation. *Cell Biochemistry and Function*. 22: 35-40.

- Tartaglione, C. M. and M. N. Ritta. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62(7):1245-52.
- Tauhid, N.A., I. Wijaya dan A. Zulfa. 2000. Dasar Biologi Molekuler. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa. Penerbit Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Tranggono, B. S. 1989. Petunjuk Laboratorium Biokimia Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Yogyakarta.
- Tsoneva, I., B. Nikolova, M. Georgieva, T. Tomov, M. P. Rols and M.R. Berger. 2005. Induction of apoptosis by electrotransfer of positively charged proteins as Cytochrome C and Histone H1 into cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721: 55– 64.
- Vijayaraghavan, S., A. Bhattacharyya and D. D. Hoskins. 1989. Calcium Uptake by Bovine Epididymal Spermatozoa Is Regulated by the Redox State of the Mitochondrial Pyridine Nucleotides. *Oregon Regional Primate Research Center Oregon. Biology Of Reproduction* 40: 744-751.
- Visconti, P.E. and G. S. Kopf. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation During Sperm Capacitation. *Biol. Of Reprod.* Vol. 59 : 1-6.
- Wardhani, A. C. 2011. Uji Mutu Semen Beku Kambing Peranakan Etawa (PE) dalam Tiga Macam Pengencer Semen yang Berbeda dengan pemeriksaan Water Incubator(Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Wodzicka, M. dan Tomaszewska. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. Trj. I Ketut Utama, I Gede Putu, T.D. Chaniago. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama, 8-9, 146-147, 161.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In E. Knobil and J. D. Neill (eds.) *The Physiology of Reproduction*, 2nd Ed. Raven Press. New York.
- Yusuf, T.I., R.I. Arifianti dan N. Rahmiwati. 2005. Daya Tahan Semen Cair Kambing Peranakan Etawah Dalam Pengencer Kuning Telur Dengan Kemasan dan Konsentrasi Spermatozoa yang Berbeda. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Lampiran 1. Proses Pembuatan Semen Beku

Penampungan dan Pemeriksaan Semen

Penampungan semen kambing dilakukan dengan menggunakan vagina buatan. Pertama-tama kambing jantan pemancing dipersiapkan terlebih dahulu kemudian kambing jantan yang akan ditampung semennya didekatkan pada jantan pemancing. Rangsangan dilakukan sebanyak 2-3 kali dengan cara mendekat dan menjauhkan pejantan dari pejantan pemancing. Kemudian vagina buatan dipersiapkan dengan suhu $\pm 42-45^{\circ}\text{C}$, pada bagian luar corong vagina buatan diolesi vaselin sebagai pelicin. Ambil posisi di belakang sebelah kanan jantan pemancing, ketika pejantan naik dan melakukan gerakan ejakulasi pegang preputium sapi tepat di pangkal penis dengan tangan kiri dan arahkan masuk ke dalam vagina buatan. Lepaskan tabung gelas penampung dari corong karet vagina buatan. Lepaskan tabung gelas penampung dari corong karet vagina buatan dan simpan. Semen yang ditampung dalam tabung berskala dihindarkan dari sinar matahari langsung untuk menjaga kualitas tetap baik.

Pembuatan Bahan Pengencer Andromed[®]

Bahan pengencer yang digunakan adalah Andromed[®]. Andromed[®] adalah media konsentrat steril untuk diluter tanpa kuning telur untuk ejakulat ternak. Andromed[®] digunakan untuk perlakuan pada semn kambing, caprine dan rusa. Antibiotika yang terkandung sudah sesuai dengan standar EU: EC *directive* 88/407. Andromed[®] mempunyai komposisi yaitu Phopholipids, Tris, Asam Sitrat, Gula, Antioksidan, *Buffer*, Gliserol, Antibiotik dan Air. Tiap 100 cc dari diluter

siap pakai mengandung unit *Tylosin* 5 mg, *Gentamycin* 25 mg, *Spectinomycin* 30 mg dan *Lincomycin* 15 mg.

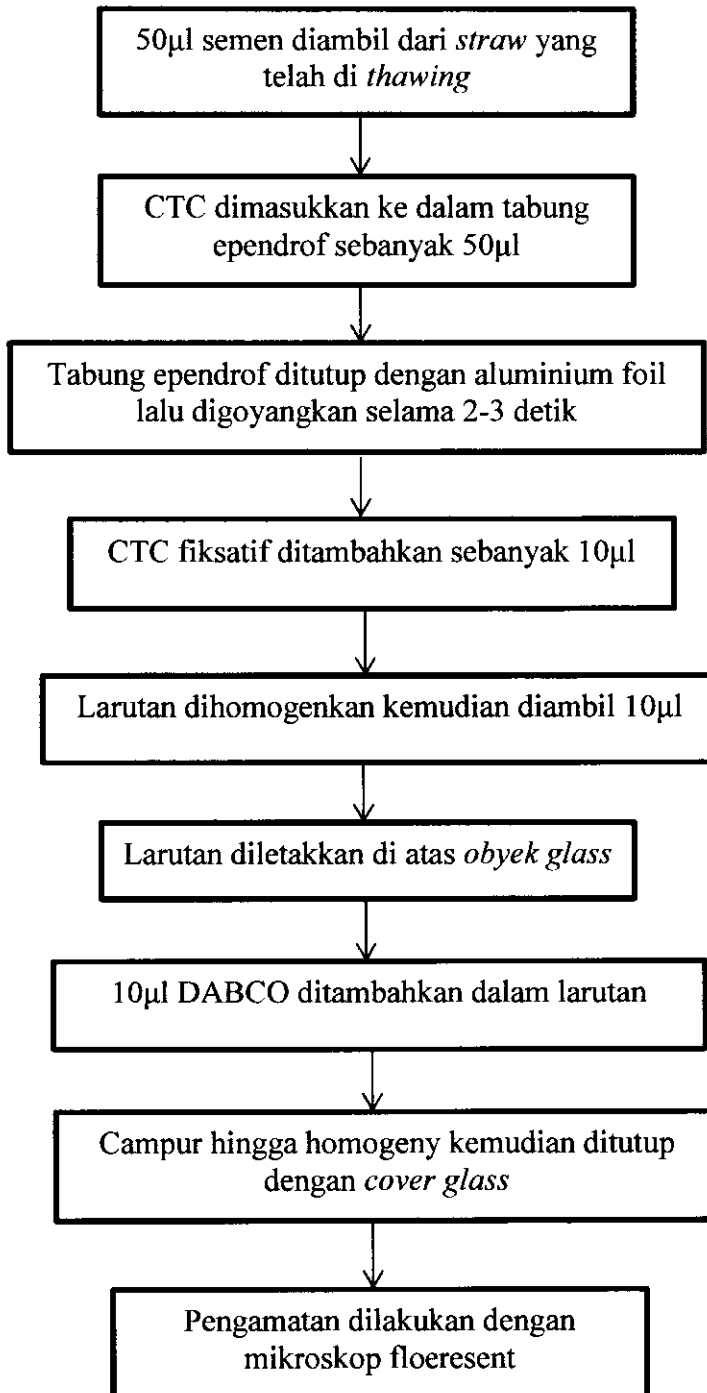
Persiapan pembuatan diluter *Andromed*[®] yaitu hangatkan isi dari satu botol *Andromed*[®] (200 cc) dalam *waterbath* dengan suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Lalu hangatkan 800cc air steril pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dan masukkan ke dalam konsentrat. Amati rasio diluter (1 bagian konsentrat + 4 bagian air). Proses yang harus diikuti: (1) hangatkan konsentrat *Andromed*[®] sebanyak yang dikehendaki pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dalam *waterbath* dan masukkan ke dalam silinder steril atau tabung *volumetric* yang sesuai ukuran, (2) hangatkan air sebanyak yang dikehendaki pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dan masukkan ke dalam konsentrat, (3) campur dengan baik dengan mengaduk atau menggunakan pengaduk magnet. Untuk mendapatkan diluter *Andromed*[®] yang optimal, sangat penting untuk memasukkan air dalam jumlah yang tepat ke dalam konsentrat.

Pencampuran Semen Dengan Bahan Pengencer

Semen segar dalam tabung pengukur dimasukkan dalam gelas beaker yang berisi air (sebagai *water jacket*), kemudian ditambah diluter *Andromed*[®] secara perlahan-lahan melalui dinding-dinding tabung erlenmeyer. Setelah itu langsung dimasukkan dalam *cool top* hingga mencapai suhu $3-5^{\circ}\text{C}$. Mengetahui berapa banyak volume total, diperoleh dari hasil pemeriksaan mikroskopis,

Kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa sebelum pembekuan dengan hasil minimal 65%. Kemudian dilanjutkan dengan proses *filling* dan *sealing*, dibiarkan selama 1 jam. Proses *prefreezing*, yaitu *straw*

ditempatkan dalam rak dan ditaruh di atas permukaan nitrogen cair (1-2 cm di atas permukaan) dengan suhu -140°C selama 9 menit. Kemudian dicelupkan dalam nitrogen cair dengan suhu -196°C .

Lampiran 2. Alur Pemeriksaan Kapasitasi

Lampiran 3. Komposisi dan Pembuatan Reagen Pewarnaan CTC

Chlortetracyclin (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 ml PBS *dubecco'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 0,7952 gram NaCl dilarutkan kedalam 100 ml *Diionized water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam *refrigerator*.

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

1. 6,057 gram Tris dilarutkan dalam 50 ml *Diionized water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam *refrigerator*.

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

1. 12,5 gram *paraformaldehyde* dilarutkan dalam 50 ml *Diionized water* yang dikerjakan di ruang asam (lemari uap).
2. Larutan dipanaskan sambil distirer sampai berwarna putih susu (5 sampai 10 menit) dan ditambahkan 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 dalam tabung yang dibungkus dengan aluminium foil ditambahkan 0,0044 gram *L-Systein (Hydrochloride Monohydrate)* dan ditambahkan 5 ml CTC *Buffer* (Langkah 2).
2. pH diatur sampai 7,8 dengan 0,2 M HCl secara hati-hati.

Lampiran 4. Prosedur Pewarnaan Ekspresi Sitokrom c sitosolik dengan Teknik Immunohistokimia

Semen sebanyak satu tetes diletakkan di *slide*, kemudian diulas dengan obyek glass. Setelah mongering, difiksasi dengan methanol hingga kering dengan cara diangin-anginkan. Slide preparat ditetesi dengan *Hydrogen Peroxyde Block* selama lima menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama lima menit sebanyak dua kali. Preparat ditetesi dengan Trypsin 0,025% dalam inkubator dengan temperatur 37°C selama 15 menit. Setelah itu *slide* preparat dicuci dengan PBS selama lima menit diulang sebanyak dua kali. Lalu dilanjutkan dengan menetesi slide preparat dengan *Ultra V Block* selama lima menit. Kemudian bilas dengan PBS dan langsung dilanjut AB.

Pemberian Antibodi primer (5% diencerkan dengan *diluent*) selama 60 menit, kemudian bilas dengan PBS selama 5 menit sebanyak dua kali. Lalu dilanjutkan dengan pemberian *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent* selama 30 menit. Setelah itu slide preparat dicuci dengan PBS selama lima menit sebanyak dua kali pengulangan. *Slide* preparat kemudian ditetesi dengan *Streptavidin Peroxidase* dan didiamkan selama 30 menit, kemudian cuci lagi dengan PBS selama lima menit sebanyak dua kali bilas. Slide preparat kemudian ditetesi dengan DAB (*Diaminobenzidine*) Plus *Chromogen* diencerkan dengan 2% DAB Plus Substrate diamkan selama sepuluh menit. Lalu *slide* preparat dicuci dengan PBS didiamkan selama lima menit sebanyak dua kali, dan kemudian direndam dalam aquades selama lima menit. Kemudian dilanjutkan dengan tahapan *counterstrain* dengan *Hematoxilin* inkubasi selama lima menit, lalu cuci dengan air mengalir selama lima menit, dilanjutkan dengan inkubasi dalam amoniak air

selama tiga menit. Setelah itu *slide* parat direndam dalam aquades selama lima menit. Tahap terakhir dikeringkan dan dilakukan *mounting* dengan diberi centelan kemudian ditutup dengan *cover slide*.

Lampiran 5. Pengolahan Data Statistik**Case Processing Summary^a**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Motilitas * Perlakuan	28	100.0%	0	0.0%	28	100.0%
Viabilitas * Perlakuan	28	100.0%	0	0.0%	28	100.0%
Kapasitasi * Perlakuan	28	100.0%	0	0.0%	28	100.0%
Uptake_Ca * Perlakuan	28	100.0%	0	0.0%	28	100.0%
Sitokrom c * Perlakuan	28	100.0%	0	0.0%	28	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		Motilitas	Viabilitas	Kapasitasi	Uptake_Ca	Sitokro m c	
P0	1	30.00	35.00	15.00	1304.72	20.18	
	2	25.00	39.00	16.00	1210.12	22.14	
	3	20.00	42.00	15.00	1152.84	18.32	
	4	30.00	25.00	15.00	1278.54	19.54	
	5	25.00	30.00	16.00	1127.14	20.38	
	6	20.00	36.00	17.00	1312.18	21.69	
	7	25.00	38.00	16.00	1256.43	20.13	
		N	7	7	7	7	7
	Total	Mean	25.0000	35.0000	15.7143	1234.5671	20.3400
		Std. Deviation	4.08248	5.77350	.75593	73.22836	1.28155
P1	1	30.00	44.00	19.00	1365.25	38.89	
	2	30.00	40.00	19.00	1433.77	55.47	
	3	35.00	48.00	20.00	1356.87	53.68	
	4	30.00	45.00	20.00	1513.24	32.38	
	5	25.00	47.00	19.00	1624.32	37.46	
	6	30.00	46.00	20.00	1489.26	38.34	
	7	35.00	45.00	18.00	1286.75	54.67	
		N	7	7	7	7	7
	Total	Mean	30.7143	45.0000	19.2857	1438.4943	44.4129
		Std. Deviation	3.45033	2.58199	.75593	113.85017	9.77976
Perlakuan	1	45.00	55.00	24.00	1986.35	46.15	
	2	35.00	52.00	22.00	2086.34	54.49	
	3	40.00	54.00	24.00	2097.19	44.89	
	4	40.00	53.00	24.00	1899.23	51.95	
	5	45.00	56.00	23.00	2139.56	50.86	
	6	35.00	55.00	25.00	1734.57	47.63	
	7	40.00	60.00	23.00	2187.85	46.85	
		N	7	7	7	7	7
	Total	Mean	40.0000	55.0000	23.5714	2018.7271	48.9743
		Std. Deviation	4.08248	2.58199	.97590	158.11608	3.50741
P3	1	55.00	60.00	30.00	3043.27	54.29	
	2	55.00	65.00	29.00	2593.46	71.05	
	3	50.00	57.00	29.00	2637.48	92.70	
	4	45.00	68.00	26.00	2879.35	88.00	
	5	50.00	63.00	26.00	2697.47	70.45	
	6	45.00	58.00	25.00	3052.48	71.83	
	7	50.00	60.00	25.00	2785.47	88.12	
		N	7	7	7	7	7
	Total	Mean	50.0000	61.5714	27.1429	2812.7114	76.6343
		Std. Deviation	4.08248	3.95209	2.11570	186.13922	13.60751
Total	N	28	28	28	28	28	
	Mean	36.4286	49.1429	21.4286	1876.1250	47.5904	
	Std. Deviation	10.35098	10.91283	4.55768	637.48240	21.90511	

a. Limited to first 100 cases.

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	0	P0	7
	1	P1	7
	2	P2	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P0	25.0000	4.08248	7
	P1	30.7143	3.45033	7
	P2	40.0000	4.08248	7
	P3	50.0000	4.08248	7
	Total	36.4286	10.35098	28
Viabilitas	P0	35.0000	5.77350	7
	P1	45.0000	2.58199	7
	P2	55.0000	2.58199	7
	P3	61.5714	3.95209	7
	Total	49.1429	10.91283	28

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	8.789
F	.828
df1	9
df2	6600.849
Sig.	.590

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.997	3952.183 ^b	2.000	23.000	.000
	Wilks' Lambda	.003	3952.183 ^b	2.000	23.000	.000
	Hotelling's Trace	343.668	3952.183 ^b	2.000	23.000	.000
	Roy's Largest Root	343.668	3952.183 ^b	2.000	23.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	1.052	8.877	6.000	48.000	.000
	Wilks' Lambda	.048	27.249 ^b	6.000	46.000	.000
	Hotelling's Trace	17.663	64.763	6.000	44.000	.000
	Roy's Largest Root	17.544	140.354 ^c	3.000	24.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.044	3	24	.987
Viabilitas	2.018	3	24	.138

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	2521.429 ^a	3	840.476	54.308	.000
	Viabilitas	2841.714 ^b	3	947.238	60.832	.000
Intercept	Motilitas	37157.143	1	37157.143	2400.923	.000
	Viabilitas	67620.571	1	67620.571	4342.606	.000
Perlakuan	Motilitas	2521.429	3	840.476	54.308	.000
	Viabilitas	2841.714	3	947.238	60.832	.000
Error	Motilitas	371.429	24	15.476		
	Viabilitas	373.714	24	15.571		
Total	Motilitas	40050.000	28			
	Viabilitas	70836.000	28			
Corrected Total	Motilitas	2892.857	27			
	Viabilitas	3215.429	27			

a. R Squared = .872 (Adjusted R Squared = .856)

b. R Squared = .884 (Adjusted R Squared = .869)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	36.429	.743	34.894	37.963
Viabilitas	49.143	.746	47.604	50.682

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P0	25.000	1.487	21.931	28.069
	P1	30.714	1.487	27.645	33.783
	P2	40.000	1.487	36.931	43.069
	P3	50.000	1.487	46.931	53.069
Viabilitas	P0	35.000	1.491	31.922	38.078
	P1	45.000	1.491	41.922	48.078
	P2	55.000	1.491	51.922	58.078
	P3	61.571	1.491	58.493	64.650

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	0	P0	7
	1	P1	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P0	25.0000	4.08248	7
	P1	30.7143	3.45033	7
	Total	27.8571	4.68807	14
Viabilitas	P0	35.0000	5.77350	7
	P1	45.0000	2.58199	7
	Total	40.0000	6.73681	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	4.546
F	1.242
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.293

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.996	1475.531 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.004	1475.531 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	268.278	1475.531 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	268.278	1475.531 ^b	2.000	11.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.782	19.690 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.218	19.690 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	3.580	19.690 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	3.580	19.690 ^b	2.000	11.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.097	1	12	.761
Viabilitas	3.057	1	12	.106

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	114.286 ^a	1	114.286	8.000	.015
	Viabilitas	350.000 ^b	1	350.000	17.500	.001
Intercept	Motilitas	10864.286	1	10864.286	760.500	.000
	Viabilitas	22400.000	1	22400.000	1120.000	.000
Perlakuan	Motilitas	114.286	1	114.286	8.000	.015
	Viabilitas	350.000	1	350.000	17.500	.001
Error	Motilitas	171.429	12	14.286		
	Viabilitas	240.000	12	20.000		
Total	Motilitas	11150.000	14			
	Viabilitas	22990.000	14			
Corrected Total	Motilitas	285.714	13			
	Viabilitas	590.000	13			

a. R Squared = .400 (Adjusted R Squared = .350)

b. R Squared = .593 (Adjusted R Squared = .559)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	27.857	1.010	25.656	30.058
Viabilitas	40.000	1.195	37.396	42.604

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P0	25.000	1.429	21.887	28.113
	P1	30.714	1.429	27.602	33.827
Viabilitas	P0	35.000	1.690	31.317	38.683
	P1	45.000	1.690	41.317	48.683

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	0	P0	7
	2	P2	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P0	25.0000	4.08248	7
	P2	40.0000	4.08248	7
	Total	32.5000	8.71559	14
Viabilitas	P0	35.0000	5.77350	7
	P2	55.0000	2.58199	7
	Total	45.0000	11.23182	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	5.982
F	1.634
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.179

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.996	1542.233 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.004	1542.233 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	280.406	1542.233 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	280.406	1542.233 ^b	2.000	11.000	.000
	Pillai's Trace	.935	78.608 ^b	2.000	11.000	.000
Perlakuan	Wilks' Lambda	.065	78.608 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	14.292	78.608 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	14.292	78.608 ^b	2.000	11.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.000	1	12	1.000
Viabilitas	3.057	1	12	.106

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	787.500 ^a	1	787.500	47.250	.000
	Viabilitas	1400.000 ^b	1	1400.000	70.000	.000
Intercept	Motilitas	14787.500	1	14787.500	887.250	.000
	Viabilitas	28350.000	1	28350.000	1417.500	.000
Perlakuan	Motilitas	787.500	1	787.500	47.250	.000
	Viabilitas	1400.000	1	1400.000	70.000	.000
Error	Motilitas	200.000	12	16.667		
	Viabilitas	240.000	12	20.000		
Total	Motilitas	15775.000	14			
	Viabilitas	29990.000	14			
Corrected Total	Motilitas	987.500	13			
	Viabilitas	1640.000	13			

a. R Squared = .797 (Adjusted R Squared = .781)

b. R Squared = .854 (Adjusted R Squared = .841)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	32.500	1.091	30.123	34.877
Viabilitas	45.000	1.195	42.396	47.604

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P0	25.000	1.543	21.638	28.362
	P2	40.000	1.543	36.638	43.362
Viabilitas	P0	35.000	1.690	31.317	38.683
	P2	55.000	1.690	51.317	58.683

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	0	P0	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P0	25.0000	4.08248	7
	P3	50.0000	4.08248	7
	Total	37.5000	13.55189	14
Viabilitas	P0	35.0000	5.77350	7
	P3	61.5714	3.95209	7
	Total	48.2857	14.58360	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	1.972
F	.538
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.656

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.997	1894.687 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.003	1894.687 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	344.488	1894.687 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	344.488	1894.687 ^b	2.000	11.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.969	174.618 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.031	174.618 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	31.749	174.618 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	31.749	174.618 ^b	2.000	11.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.000	1	12	1.000
Viabilitas	.512	1	12	.488

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	2187.500 ^a	1	2187.500	131.250	.000
	Viabilitas	2471.143 ^b	1	2471.143	100.961	.000
Intercept	Motilitas	19687.500	1	19687.500	1181.250	.000
	Viabilitas	32641.143	1	32641.143	1333.588	.000
Perlakuan	Motilitas	2187.500	1	2187.500	131.250	.000
	Viabilitas	2471.143	1	2471.143	100.961	.000
Error	Motilitas	200.000	12	16.667		
	Viabilitas	293.714	12	24.476		
Total	Motilitas	22075.000	14			
	Viabilitas	35406.000	14			
Corrected Total	Motilitas	2387.500	13			
	Viabilitas	2764.857	13			

a. R Squared = .916 (Adjusted R Squared = .909)

b. R Squared = .894 (Adjusted R Squared = .885)

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P0	25.000	1.543	21.638	28.362
	P3	50.000	1.543	46.638	53.362
Viabilitas	P0	35.000	1.870	30.926	39.074
	P3	61.571	1.870	57.497	65.646

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	P1	7
	2	P2	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P1	30.7143	3.45033	7
	P2	40.0000	4.08248	7
	Total	35.3571	6.03333	14
Viabilitas	P1	45.0000	2.58199	7
	P2	55.0000	2.58199	7
	Total	50.0000	5.75125	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	.294
F	.080
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.971

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.998	2589.487 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.002	2589.487 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	470.816	2589.487 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	470.816	2589.487 ^b	2.000	11.000	.000
	Pillai's Trace	.838	28.528 ^b	2.000	11.000	.000
Perlakuan	Wilks' Lambda	.162	28.528 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	5.187	28.528 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	5.187	28.528 ^b	2.000	11.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.097	1	12	.761
Viabilitas	.000	1	12	1.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	301.786 ^a	1	301.786	21.125	.001
	Viabilitas	350.000 ^b	1	350.000	52.500	.000
Intercept	Motilitas	17501.786	1	17501.786	1225.125	.000
	Viabilitas	35000.000	1	35000.000	5250.000	.000
Perlakuan	Motilitas	301.786	1	301.786	21.125	.001
	Viabilitas	350.000	1	350.000	52.500	.000
Error	Motilitas	171.429	12	14.286		
	Viabilitas	80.000	12	6.667		
Total	Motilitas	17975.000	14			
	Viabilitas	35430.000	14			
Corrected Total	Motilitas	473.214	13			
	Viabilitas	430.000	13			

a. R Squared = .638 (Adjusted R Squared = .608)

b. R Squared = .814 (Adjusted R Squared = .798)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	35.357	1.010	33.156	37.558
Viabilitas	50.000	.690	48.496	51.504

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P1	30.714	1.429	27.602	33.827
	P2	40.000	1.429	36.887	43.113
Viabilitas	P1	45.000	.976	42.874	47.126
	P2	55.000	.976	52.874	57.126

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	P1	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P1	30.7143	3.45033	7
	P3	50.0000	4.08248	7
	Total	40.3571	10.64538	14
Viabilitas	P1	45.0000	2.58199	7
	P3	61.5714	3.95209	7
	Total	53.2857	9.17713	14

**Box's Test of Equality
of Covariance
Matrices^a**

Box's M	1.294
F	.353
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.787

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.998	2366.620 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.002	2366.620 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	430.295	2366.620 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	430.295	2366.620 ^b	2.000	11.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.937	81.300 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.063	81.300 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	14.782	81.300 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	14.782	81.300 ^b	2.000	11.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.097	1	12	.761
Viabilitas	2.373	1	12	.149

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	1301.786 ^a	1	1301.786	91.125	.000
	Viabilitas	961.143 ^b	1	961.143	86.256	.000
Intercept	Motilitas	22801.786	1	22801.786	1596.125	.000
	Viabilitas	39751.143	1	39751.143	3567.410	.000
Perlakuan	Motilitas	1301.786	1	1301.786	91.125	.000
	Viabilitas	961.143	1	961.143	86.256	.000
Error	Motilitas	171.429	12	14.286		
	Viabilitas	133.714	12	11.143		
Total	Motilitas	24275.000	14			
	Viabilitas	40846.000	14			
Corrected Total	Motilitas	1473.214	13			
	Viabilitas	1094.857	13			

a. R Squared = .884 (Adjusted R Squared = .874)

b. R Squared = .878 (Adjusted R Squared = .868)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	40.357	1.010	38.156	42.558
Viabilitas	53.286	.892	51.342	55.230

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P1	30.714	1.429	27.602	33.827
	P3	50.000	1.429	46.887	53.113
Viabilitas	P1	45.000	1.262	42.251	47.749
	P3	61.571	1.262	58.822	64.320

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	2	P2	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Motilitas	P2	40.0000	4.08248	7
	P3	50.0000	4.08248	7
	Total	45.0000	6.50444	14
Viabilitas	P2	55.0000	2.58199	7
	P3	61.5714	3.95209	7
	Total	58.2857	4.68103	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	1.603
F	.438
df1	3
df2	25920.000
Sig.	.726

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.998	2530.667 ^b	2.000	11.000	.000
	Wilks' Lambda	.002	2530.667 ^b	2.000	11.000	.000
	Hotelling's Trace	460.121	2530.667 ^b	2.000	11.000	.000
	Roy's Largest Root	460.121	2530.667 ^b	2.000	11.000	.000
	Pillai's Trace	.726	14.545 ^b	2.000	11.000	.001
Perlakuan	Wilks' Lambda	.274	14.545 ^b	2.000	11.000	.001
	Hotelling's Trace	2.645	14.545 ^b	2.000	11.000	.001
	Roy's Largest Root	2.645	14.545 ^b	2.000	11.000	.001

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Motilitas	.000	1	12	1.000
Viabilitas	2.373	1	12	.149

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Motilitas	350.000 ^a	1	350.000	21.000	.001
	Viabilitas	151.143 ^b	1	151.143	13.564	.003
Intercept	Motilitas	28350.000	1	28350.000	1701.000	.000
	Viabilitas	47561.143	1	47561.143	4268.308	.000
Perlakuan	Motilitas	350.000	1	350.000	21.000	.001
	Viabilitas	151.143	1	151.143	13.564	.003
Error	Motilitas	200.000	12	16.667		
	Viabilitas	133.714	12	11.143		
Total	Motilitas	28900.000	14			
	Viabilitas	47846.000	14			
Corrected Total	Motilitas	550.000	13			
	Viabilitas	284.857	13			

a. R Squared = .636 (Adjusted R Squared = .606)

b. R Squared = .531 (Adjusted R Squared = .491)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	45.000	1.091	42.623	47.377
Viabilitas	58.286	.892	56.342	60.230

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Motilitas	P2	40.000	1.543	36.638	43.362
	P3	50.000	1.543	46.638	53.362
Viabilitas	P2	55.000	1.262	52.251	57.749
	P3	61.571	1.262	58.822	64.320

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	0	P0	7
	1	P1	7
	2	P2	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P0	15.7143	.75593	7
	P1	19.2857	.75593	7
	P2	23.5714	.97590	7
	P3	27.1429	2.11570	7
	Total	21.4286	4.55768	28
Uptake_Ca	P0	1234.5671	73.22836	7
	P1	1438.4943	113.85017	7
	P2	2018.7271	158.11608	7
	P3	2812.7114	186.13922	7
	Total	1876.1250	637.48240	28
Sitokrom_c	P0	20.3400	1.28155	7
	P1	44.4129	9.77976	7
	P2	48.9743	3.50741	7
	P3	76.6343	13.60751	7
	Total	47.5904	21.90511	28

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	60.030
F	2.553
df1	18
df2	2035.436
Sig.	.000

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	9989.247 ^b	3.000	22.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	9989.247 ^b	3.000	22.000	.000
	Hotelling's Trace	1362.170	9989.247 ^b	3.000	22.000	.000
	Roy's Largest Root	1362.170	9989.247 ^b	3.000	22.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	1.521	8.233	9.000	72.000	.000
	Wilks' Lambda	.005	46.575	9.000	53.693	.000
	Hotelling's Trace	106.283	244.056	9.000	62.000	.000
	Roy's Largest Root	105.535	844.276 ^c	3.000	24.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

- b. Exact statistic
- c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Kapasitasi	11.819	3	24	.000
Uptake_Ca	2.430	3	24	.090
Sitokrom_c	12.785	3	24	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	521.429 ^a	3	173.810	105.797	.000
	Uptake_Ca	10504526.448 ^b	3	3501508.816	179.627	.000
	Sitokrom_c	11187.005 ^c	3	3729.002	50.605	.000
Intercept	Kapasitasi	12857.143	1	12857.143	7826.087	.000
	Uptake_Ca	98555660.438	1	98555660.438	5055.902	.000
	Sitokrom_c	63415.579	1	63415.579	860.594	.000
Perlakuan	Kapasitasi	521.429	3	173.810	105.797	.000
	Uptake_Ca	10504526.448	3	3501508.816	179.627	.000
	Sitokrom_c	11187.005	3	3729.002	50.605	.000
Error	Kapasitasi	39.429	24	1.643		
	Uptake_Ca	467836.541	24	19493.189		
	Sitokrom_c	1768.515	24	73.688		
Total	Kapasitasi	13418.000	28			
	Uptake_Ca	109528023.427	28			
	Sitokrom_c	76371.098	28			
Corrected Total	Kapasitasi	560.857	27			
	Uptake_Ca	10972362.990	27			
	Sitokrom_c	12955.519	27			

- a. R Squared = .930 (Adjusted R Squared = .921)
- b. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .952)
- c. R Squared = .863 (Adjusted R Squared = .846)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	21.429	.242	20.929	21.929
Uptake_Ca	1876.125	26.385	1821.668	1930.582
Sitokrom_c	47.590	1.622	44.242	50.939

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P0	15.714	.484	14.714	16.714
	P1	19.286	.484	18.286	20.286
	P2	23.571	.484	22.572	24.571
	P3	27.143	.484	26.143	28.143
Uptake_Ca	P0	1234.567	52.771	1125.654	1343.480
	P1	1438.494	52.771	1329.581	1547.408
	P2	2018.727	52.771	1909.814	2127.640
	P3	2812.711	52.771	2703.798	2921.625
Sitokrom_c	P0	20.340	3.245	13.644	27.036
	P1	44.413	3.245	37.717	51.109
	P2	48.974	3.245	42.278	55.671
	P3	76.634	3.245	69.938	83.331

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	0	P0	7
	1	P1	7

Descriptive Statistics

		Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P0		15.7143	.75593	7
	P1		19.2857	.75593	7
	Total		17.5000	1.99036	14
Uptake_Ca	P0		1234.5671	73.22836	7
	P1		1438.4943	113.85017	7
	Total		1336.5307	140.19149	14
Sitokrom_c	P0		20.3400	1.28155	7
	P1		44.4129	9.77976	7
	Total		32.3764	14.17467	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	22.696
F	2.736
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.012

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	3387.556 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	3387.556 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	1016.267	3387.556 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	1016.267	3387.556 ^b	3.000	10.000	.000
	Pillai's Trace	.944	56.484 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Wilks' Lambda	.056	56.484 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	16.945	56.484 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	16.945	56.484 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	44.643 ^a	1	44.643	78.125	.000
	Uptake_Ca	145551.979 ^b	1	145551.979	15.886	.000
	Sitokrom_c	2028.259 ^c	1	2028.259	41.697	.000
Intercept	Kapasitasi	4287.500	1	4287.500	7503.125	.000
	Uptake_Ca	25008400.903	1	25008400.903	2729.541	.000
	Sitokrom_c	14675.264	1	14675.264	301.693	.000
Perlakuan	Kapasitasi	44.643	1	44.643	78.125	.000
	Uptake_Ca	145551.979	1	145551.979	15.886	.000
	Sitokrom_c	2028.259	1	2028.259	41.697	.000
Error	Kapasitasi	6.857	12	.571		
	Uptake_Ca	109945.528	12	9162.127		
	Sitokrom_c	583.717	12	48.643		
Total	Kapasitasi	4339.000	14			
	Uptake_Ca	25263898.409	14			
	Sitokrom_c	17287.239	14			
Corrected Total	Kapasitasi	51.500	13			
	Uptake_Ca	255497.506	13			
	Sitokrom_c	2611.976	13			

a. R Squared = .867 (Adjusted R Squared = .856)

b. R Squared = .570 (Adjusted R Squared = .534)

c. R Squared = .777 (Adjusted R Squared = .758)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	17.500	.202	17.060	17.940
Uptake_Ca	1336.531	25.582	1280.792	1392.269
Sitokrom_c	32.376	1.864	28.315	36.438

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P0	15.714	.286	15.092	16.337
	P1	19.286	.286	18.663	19.908
Uptake_Ca	P0	1234.567	36.178	1155.741	1313.393
	P1	1438.494	36.178	1359.668	1517.320
Sitokrom_c	P0	20.340	2.636	14.596	26.084
	P1	44.413	2.636	38.669	50.156

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Perlakuan	0 P0	7
	2 P2	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P0	15.7143	.75593	7
	P2	23.5714	.97590	7
	Total	19.6429	4.16223	14
Uptake_Ca	P0	1234.5671	73.22836	7
	P2	2018.7271	158.11608	7
	Total	1626.6471	423.75180	14
Sitokrom_c	P0	20.3400	1.28155	7
	P2	48.9743	3.50741	7
	Total	34.6571	15.07263	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	25.230
F	3.042
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.006

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	7396.653 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	7396.653 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	2218.996	7396.653 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	2218.996	7396.653 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.993	471.566 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.007	471.566 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	141.470	471.566 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	141.470	471.566 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	216.071 ^a	1	216.071	283.594	.000
	Uptake_Ca	2152174.170 ^b	1	2152174.170	141.763	.000
	Sitokrom_c	2869.728 ^c	1	2869.728	411.599	.000
Intercept	Kapasitasi	5401.786	1	5401.786	7089.844	.000
	Uptake_Ca	37043732.983	1	37043732.983	2440.051	.000
	Sitokrom_c	16815.646	1	16815.646	2411.832	.000
Perlakuan	Kapasitasi	216.071	1	216.071	283.594	.000
	Uptake_Ca	2152174.170	1	2152174.170	141.763	.000
	Sitokrom_c	2869.728	1	2869.728	411.599	.000
Error	Kapasitasi	9.143	12	.762		
	Uptake_Ca	182178.522	12	15181.544		
	Sitokrom_c	83.666	12	6.972		
Total	Kapasitasi	5627.000	14			
	Uptake_Ca	39378085.675	14			
	Sitokrom_c	19769.040	14			
Corrected Total	Kapasitasi	225.214	13			
	Uptake_Ca	2334352.692	13			
	Sitokrom_c	2953.394	13			

a. R Squared = .959 (Adjusted R Squared = .956)

b. R Squared = .922 (Adjusted R Squared = .915)

c. R Squared = .972 (Adjusted R Squared = .969)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	19.643	.233	19.135	20.151
Uptake_Ca	1626.647	32.930	1554.898	1698.396
Sitokrom_c	34.657	.706	33.120	36.195

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P0	15.714	.330	14.995	16.433
	P2	23.571	.330	22.853	24.290
Uptake_Ca	P0	1234.567	46.570	1133.099	1336.035
	P2	2018.727	46.570	1917.259	2120.195
Sitokrom_c	P0	20.340	.998	18.166	22.514
	P2	48.974	.998	46.800	51.149

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	0	P0	7
	3	P3	7

Descriptive Statistics

		Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P0		15.7143	.75593	7
	P3		27.1429	2.11570	7
	Total		21.4286	6.12328	14
Uptake_Ca	P0		1234.5671	73.22836	7
	P3		2812.7114	186.13922	7
	Total		2023.6393	830.05788	14
Sitokrom_c	P0		20.3400	1.28155	7
	P3		76.6343	13.60751	7
	Total		48.4871	30.65001	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	34.403
F	4.148
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.000

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	3445.258 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	3445.258 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	1033.577	3445.258 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	1033.577	3445.258 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.993	475.733 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.007	475.733 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	142.720	475.733 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	142.720	475.733 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Kapasitasi	22.523	1	12	.000
Uptake_Ca	7.283	1	12	.019
Sitokrom_c	17.535	1	12	.001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	457.143 ^a	1	457.143	181.132	.00
	Uptake_Ca	8716887.853 ^b	1	8716887.853	435.733	.00
	Sitokrom_c	11091.663 ^c	1	11091.663	118.750	.00
Intercept	Kapasitasi	6428.571	1	6428.571	2547.170	.00
	Uptake_Ca	57331623.422	1	57331623.422	2865.850	.00
Perlakuan	Sitokrom_c	32914.042	1	32914.042	352.386	.00
	Kapasitasi	457.143	1	457.143	181.132	.00
Error	Uptake_Ca	8716887.853	1	8716887.853	435.733	.00
	Sitokrom_c	11091.663	1	11091.663	118.750	.00
	Kapasitasi	30.286	12	2.524		
Total	Uptake_Ca	240061.202	12	20005.100		
	Sitokrom_c	1120.840	12	93.403		
	Kapasitasi	6916.000	14			
Corrected Total	Uptake_Ca	66288572.477	14			
	Sitokrom_c	45126.546	14			
	Kapasitasi	487.429	13			
Corrected Total	Uptake_Ca	8956949.055	13			
	Sitokrom_c	12212.503	13			

a. R Squared = .938 (Adjusted R Squared = .933)

b. R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .971)

c. R Squared = .908 (Adjusted R Squared = .901)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	21.429	.425	20.503	22.354
Uptake_Ca	2023.639	37.801	1941.277	2106.001
Sitokrom_c	48.487	2.583	42.859	54.115

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P0	15.714	.600	14.406	17.023
	P3	27.143	.600	25.835	28.451
Uptake_Ca	P0	1234.567	53.459	1118.090	1351.044
	P3	2812.711	53.459	2696.234	2929.189
Sitokrom_c	P0	20.340	3.653	12.381	28.299
	P3	76.634	3.653	68.675	84.593

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
Perlakuan	1	P1	7
	2	P2	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P1	19.2857	.75593	7
	P2	23.5714	.97590	7
	Total	21.4286	2.37663	14
Uptake_Ca	P1	1438.4943	113.85017	7
	P2	2018.7271	158.11608	7
	Total	1728.6107	328.88166	14
Sitokrom_c	P1	44.4129	9.77976	7
	P2	48.9743	3.50741	7
	Total	46.6936	7.44465	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	17.914
F	2.160
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.045

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	10308.546 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	10308.546 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	3092.564	10308.546 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	3092.564	10308.546 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.975	129.716 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.025	129.716 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	38.915	129.716 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	38.915	129.716 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Kapasitasi	.485	1	12	.499
Uptake_Ca	.836	1	12	.378
Sitokrom_c	27.058	1	12	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	64.286 ^a	1	64.286	84.375	.000
	Uptake_Ca	1178345.590 ^b	1	1178345.590	62.079	.000
	Sitokrom_c	72.823 ^c	1	72.823	1.349	.268
Intercept	Kapasitasi	6428.571	1	6428.571	8437.500	.000
	Uptake_Ca	4183330.022	1	4183330.022	2203.926	.000
	Sitokrom_c	30524.055	1	30524.055	565.545	.000
Perlakuan	Kapasitasi	64.286	1	64.286	84.375	.000
	Uptake_Ca	1178345.590	1	1178345.590	62.079	.000
	Sitokrom_c	72.823	1	72.823	1.349	.268
Error	Kapasitasi	9.143	12	.762		
	Uptake_Ca	227775.339	12	18981.278		
	Sitokrom_c	647.674	12	53.973		
Total	Kapasitasi	6502.000	14			
	Uptake_Ca	43239450.951	14			
	Sitokrom_c	31244.552	14			
Corrected Total	Kapasitasi	73.429	13			
	Uptake_Ca	1406120.929	13			
	Sitokrom_c	720.498	13			

a. R Squared = .875 (Adjusted R Squared = .865)

b. R Squared = .838 (Adjusted R Squared = .825)

c. R Squared = .101 (Adjusted R Squared = .026)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	21.429	.233	20.920	21.937
Uptake_Ca	1728.611	36.821	1648.384	1808.837
Sitokrom_c	46.694	1.963	42.416	50.972

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P1	19.286	.330	18.567	20.005
	P2	23.571	.330	22.853	24.290
Uptake_Ca	P1	1438.494	52.073	1325.037	1551.952
	P2	2018.727	52.073	1905.270	2132.185
Sitokrom_c	P1	44.413	2.777	38.363	50.463
	P2	48.974	2.777	42.924	55.024

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Perlakuan	1 P1	7
	3 P3	7

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P1	19.2857	.75593	7
	P3	27.1429	2.11570	7
	Total	23.2143	4.35322	14
Uptake_Ca	P1	1438.4943	113.85017	7
	P3	2812.7114	186.13922	7
	Total	2125.6029	728.29161	14
Sitokrom_c	P1	44.4129	9.77976	7
	P3	76.6343	13.60751	7
	Total	60.5236	20.22683	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	8.895
F	1.073
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.377

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	4192.791 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	4192.791 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	1257.837	4192.791 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	1257.837	4192.791 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.988	273.010 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.012	273.010 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	81.903	273.010 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	81.903	273.010 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Kapasitasi	22.523	1	12	.000
Uptake_Ca	2.664	1	12	.129
Sitokrom c	.836	1	12	.379

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	216.071 ^a	1	216.071	85.613	.000
	Uptake_Ca	6609654.645 ^b	1	6609654.645	277.660	.000
	Sitokrom_c	3633.772 ^c	1	3633.772	25.881	.000
Intercept	Kapasitasi	7544.643	1	7544.643	2989.387	.000
	Uptake_Ca	63254625.088	1	63254625.088	2657.218	.000
	Sitokrom_c	51283.438	1	51283.438	365.256	.000
Perlakuan	Kapasitasi	216.071	1	216.071	85.613	.000
	Uptake_Ca	6609654.645	1	6609654.645	277.660	.000
	Sitokrom_c	3633.772	1	3633.772	25.881	.000
Error	Kapasitasi	30.286	12	2.524		
	Uptake_Ca	285658.019	12	23804.835		
	Sitokrom_c	1684.849	12	140.404		
Total	Kapasitasi	7791.000	14			
	Uptake_Ca	70149937.752	14			
	Sitokrom_c	56602.058	14			
Corrected Total	Kapasitasi	246.357	13			
	Uptake_Ca	6895312.664	13			
	Sitokrom_c	5318.621	13			

a. R Squared = .877 (Adjusted R Squared = .867)

b. R Squared = .959 (Adjusted R Squared = .955)

c. R Squared = .683 (Adjusted R Squared = .657)

Descriptive Statistics

	Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Kapasitasi	P2	23.5714	.97590	7
	P3	27.1429	2.11570	7
	Total	25.3571	2.43712	14
Uptake_Ca	P2	2018.7271	158.11608	7
	P3	2812.7114	186.13922	7
	Total	2415.7193	444.13526	14
Sitokrom_c	P2	48.9743	3.50741	7
	P3	76.6343	13.60751	7
	Total	62.8043	17.23717	14

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

Box's M	23.742
F	2.863
df1	6
df2	1043.321
Sig.	.009

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	5804.386 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	5804.386 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	1741.316	5804.386 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	1741.316	5804.386 ^b	3.000	10.000	.000
Perlakuan	Pillai's Trace	.969	102.508 ^b	3.000	10.000	.000
	Wilks' Lambda	.031	102.508 ^b	3.000	10.000	.000
	Hotelling's Trace	30.752	102.508 ^b	3.000	10.000	.000
	Roy's Largest Root	30.752	102.508 ^b	3.000	10.000	.000

a. Design: Intercept + Perlakuan

b. Exact statistic

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Kapasitasi	13.842	1	12	.003
Uptake_Ca	.413	1	12	.532
Sitokrom c	10.832	1	12	.006

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kapasitasi	44.643 ^a	1	44.643	16.447	.002
	Uptake_Ca	2206438.661 ^b	1	2206438.661	73.981	.000
	Sitokrom_c	2677.765 ^c	1	2677.765	27.121	.000
Intercept	Kapasitasi	9001.786	1	9001.786	3316.447	.000
	Uptake_Ca	81699795.343	1	81699795.343	2739.375	.000
	Sitokrom_c	55221.296	1	55221.296	559.298	.000
Perlakuan	Kapasitasi	44.643	1	44.643	16.447	.002
	Uptake_Ca	2206438.661	1	2206438.661	73.981	.000
	Sitokrom_c	2677.765	1	2677.765	27.121	.000
Error	Kapasitasi	32.571	12	2.714		
	Uptake_Ca	357891.014	12	29824.251		
	Sitokrom_c	1184.798	12	98.733		
Total	Kapasitasi	9079.000	14			
	Uptake_Ca	84264125.018	14			
	Sitokrom_c	59083.859	14			
Corrected Total	Kapasitasi	77.214	13			
	Uptake_Ca	2564329.674	13			
	Sitokrom_c	3862.562	13			

a. R Squared = .578 (Adjusted R Squared = .543)

b. R Squared = .860 (Adjusted R Squared = .849)

c. R Squared = .693 (Adjusted R Squared = .668)

1. Grand Mean

Dependent Variable	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	25.357	.440	24.398	26.317
Uptake_Ca	2415.719	46.155	2315.156	2516.283
Sitokrom_c	62.804	2.656	57.018	68.590

2. Perlakuan

Dependent Variable	Perlakuan	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Kapasitasi	P2	23.571	.623	22.215	24.928
	P3	27.143	.623	25.786	28.500
Uptake_Ca	P2	2018.727	65.273	1876.509	2160.946
	P3	2812.711	65.273	2670.493	2954.930
Sitokrom_c	P2	48.974	3.756	40.791	57.157
	P3	76.634	3.756	68.451	84.817

Correlations

		Motilitas	Viabilitas	Kapasitasi	Uptake Ca	Sitokrom c
Motilitas	Pearson Correlation	1	.838**	.917**	.898**	.822**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000	.000
	N	28	28	28	28	28
Viabilitas	Pearson Correlation	.838**	1	.906**	.870**	.823**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000	.000
	N	28	28	28	28	28
Kapasitasi	Pearson Correlation	.917**	.906**	1	.904**	.827**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000	.000
	N	28	28	28	28	28
Uptake_Ca	Pearson Correlation	.898**	.870**	.904**	1	.830**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000		.000
	N	28	28	28	28	28
Sitokrom_c	Pearson Correlation	.822**	.823**	.827**	.830**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	
	N	28	28	28	28	28

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

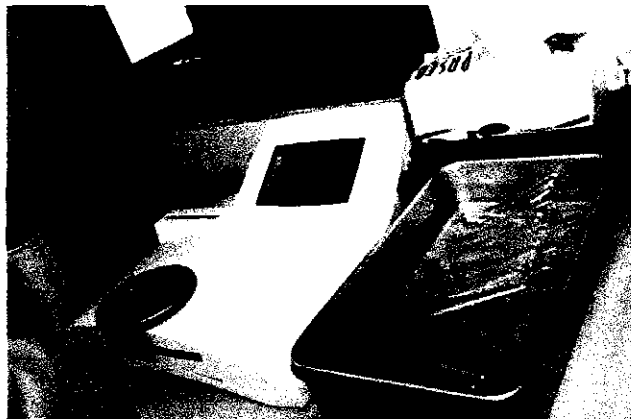
Lampiran 6. Foto Penelitian



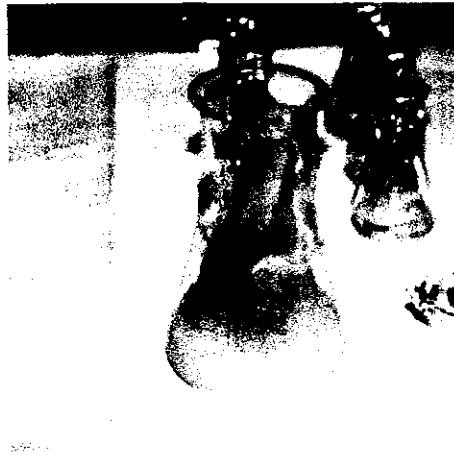
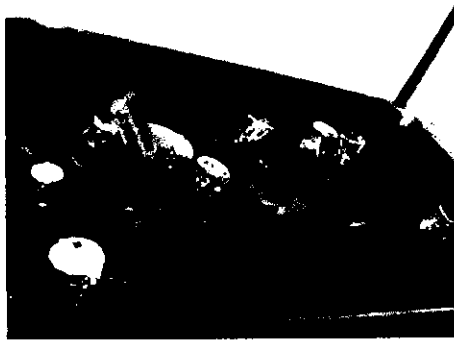
Pengambilan Semen Kambing PE dengan vagina buatan



Pengencer Andromed



Spektrofotometer



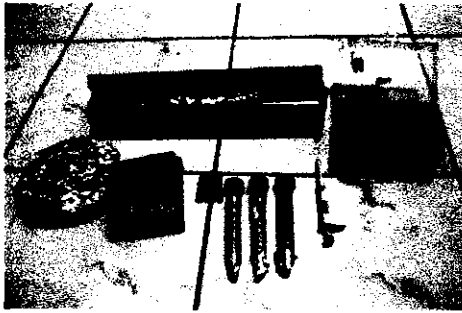
Proses Pembuatan Semen Beku



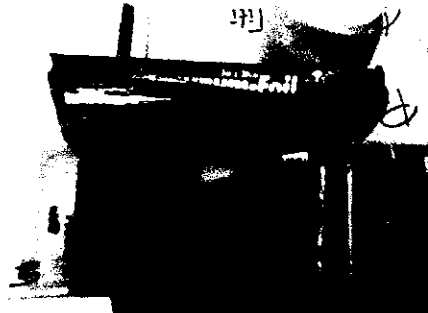
Waterbath



Alat-alat untuk pemeriksaan motilitas dan viabilitas



**Alat-alat untuk
pemeriksaan kapasitasi**



**Alat-alat untuk
pemeriksaan uptake Ca²⁺**



Confocal Laser Scanning Microscope



Proses Pewarnaan Imunohistokimia