

**SKRIPSI**

**PENGARUH PENAMBAHAN KAFEIN DALAM  
MEDIA PENCUCIAN TERHADAP PERSENTASE HIDUP  
DAN MOTILITAS SPERMATOZOA PADA DOMBA**



**OLEH:**

**MEILIA SUHARTATI**  
**SURABAYA - JAWA TIMUR**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2003**

**PENGARUH PENAMBAHAN KAFEIN DALAM MEDIA  
PENCUCIAN TERHADAP PERSENTASE HIDUP DAN  
MOTILITAS SPERMATOZOA PADA DOMBA**

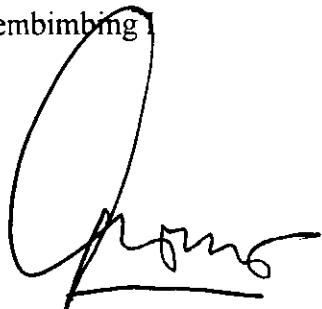
Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh :

Meilia Suhartati  
NIM. 069712386

Menyetujui  
Komisi pembimbing

Pembimbing I



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.  
NIP. 130687297.

Pembimbing II



Husni Anwar, Drh.  
NIP. 130687551

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh – sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **Sarjana Kedokteran Hewan**.

Menyetujui



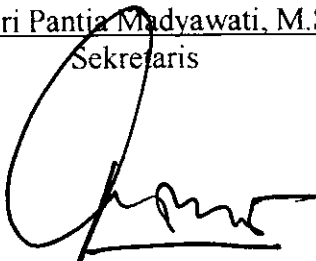
Sri Agus Sudjarwo, Ph.D., Drh.  
Ketua



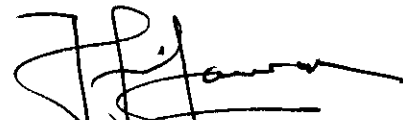
Rr. Sri Pantia Madyawati, M.Si., Drh.  
Sekretaris



Tatik Hernawati, M.Si., Drh.  
Anggota



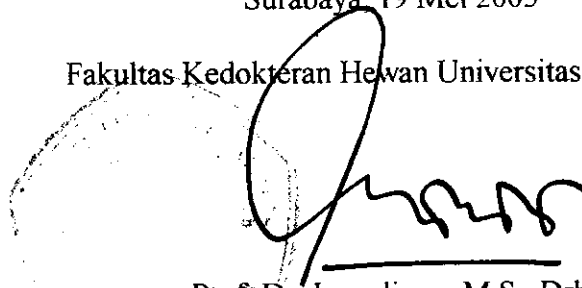
Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.  
Anggota



Husni Anwar, Drh.  
Anggota

Surabaya, 19 Mei 2003

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh.  
NIP. 130687297

# PENGARUH PENAMBAHAN KAFEIN DALAM MEDIA PENCUCIAN TERHADAP PERSENTASE HIDUP DAN MOTILITAS SPERMATOOZOA PADA DOMBA

Meilia Suhartati

## Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kafein dalam media pencucian terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa domba. Spermatozoa domba yang telah diencerkan dibagi dalam 4 tabung. Tabung pertama sebagai kontrol dan ketiga tabung lainnya ditambahkan media PBS dan kafein dengan konsentrasi yang berbeda-beda (3 mM, 6 mM, 12 mM). Keempat tabung disentrifugasi dan diulang dua kali. Sampel diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung motilitas dan persentase hidup spermatozoa. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Data penelitian berupa persentase ditransformasikan menggunakan transformasi sudut. Selanjutnya dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf nyata 5 % pada hasil yang berbeda nyata.

Peningkatan motilitas spermatozoa terbaik diperoleh pada penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM, sedangkan pada konsentrasi 12 mM hasil yang diperoleh sama dengan kontrol. Peningkatan persentase hidup spermatozoa terbaik diperoleh pada penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM dan 6 mM, sedangkan persentase terendah pada konsentrasi 12 mM.

Pencucian secara sentrifugasi bertujuan menghilangkan plasma semen dari spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro*. Kafein yang ditambahkan dalam media pencucian bertujuan untuk meningkatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba karena kafein mempunyai efek stimulan sehingga dapat meningkatkan jumlah energi dalam sel untuk pergerakan dan hidup spermatozoa domba.

## KATA PENGANTAR

Perhatian terhadap pengembangan dan perkembangbiakan ternak khususnya domba di Indonesia semakin meningkat. Hal ini merupakan reaksi yang wajar terhadap pemenuhan kebutuhan akan ternak dan hasilnya.

Dalam menghadapi kebutuhan ini berbagai usaha perlu dilakukan untuk meningkatkan jumlah dan mutu ternak. Salah satu usaha tersebut adalah teknologi di bidang reproduksi hewan berupa peningkatan kualitas spermatozoa untuk pelaksanaan *fertilisasi in vitro*. Kualitas spermatozoa dapat ditingkatkan dengan penambahan kafein.

Skripsi dengan judul “ Pengaruh Penambahan Kafein Dalam Media Pencucian Terhadap Persentase Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Pada Domba “ diharapkan dapat menambah usaha untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sehingga dapat memenuhi kebutuhan akan ternak dan hasilnya.

Pada kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih sebesar – besarnya kepada : Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh dan Husni Anwar, Drh selaku pembimbing atas segala saran dan petunjuknya. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh, Dr. Hardiyanto, M.S., Drh. dan Imiam Mustofa, M.S., Drh atas bantuannya. Mbak Surti dan Bapak Slamet yang membantu terlaksananya penelitian kami. Kedua orang tua, kakak – kakakku, Anna, Yoyo dan rekan – rekan angkatan '97 atas doa dan segala dukungan moral serta materinya.

Menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penyusun membuka diri terhadap segala saran dan kritik yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini bermanfaat sehingga dapat menjadi dharma bakti yang berarti bagi nusa dan agama. Amin.

Surabaya, Januari 2003

Penyusun

## Daftar Isi

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
 <b>BAB I Pendahuluan</b>	
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Landasan Teori.....	3
I.3. Perumusan Masalah.....	4
I.4. Tujuan Penelitian.....	5
I.5. Hipotesis.....	5
I.6. Manfaat Penelitian.....	5
 <b>BAB II Tinjauan Pustaka</b>	
II.1. Domba.....	6
II.2. Alat Kelamin Jantan.....	6
II.3. Spermatozoa.....	8
II.4. Spermatogenesis.....	9
II.5. Plasma Semen.....	12

II.6. Metabolisme Spermatozoa.....	14
II.7. Kafein.....	15
II.8. Efek Kafein pada Spermatozoa.....	16
II.9. Pencucian Spermatozoa.....	17
II.10. Motilitas Spermatozoa.....	18
II.11. Pemeriksaan Mikroskopis Sel Spermatozoa.....	19
<b>BAB III. Materi dan Metode Penelitian</b>	
III.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
III.2. Materi Penelitian.....	21
III.3. Metode Penelitian.....	22
<b>BAB IV. Hasil Penelitian</b>	
IV.1. Pemeriksaan Semen Domba Sebelum Perlakuan.....	27
IV.2. Pemeriksaan Terhadap Motilitas Spermatozoa.....	28
IV.3. Pemeriksaan Terhadap Hidup Mati.....	29
<b>BAB V. Pembahasan.....</b>	<b>31</b>
<b>BAB VI. Kesimpulan dan Saran.....</b>	<b>38</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>39</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>40</b>



**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Komposisi Plasma Semen Domba.....	13
2. Hasil Pemeriksaan Semen Domba Sebelum Perlakuan.....	27
3. Rata – rata dan Simpangan Baku Motilitas sperma (%) dalam Media PBS-Kafein.....	28
4. Rata – rata dan Simpangan Baku Hidup Sperma (%) dalam Media PBS-Kafein.....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline – Kafein.....	40
2. Motilitas Spermatozoa.....	42
3. Hasil Uji F (Sidik Ragam) dan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada motilitas permatozoa domba.....	43
4. Hidup Mati Spermatozoa.....	44
5. Hasil Uji F (Sidik Ragam) dan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada hidup mati spermatozoa domba.....	45
6. Gambar perbedaan spermatozoa hidup dan mati.....	51

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Perbedaan spermatozoa hidup dan spermatozoa mati.....	51

# **BAB I PENDAHULUAN**

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1.Latar Belakang

Produktivitas ternak dapat ditingkatkan melalui peningkatan tata laksana dan efisiensi reproduksinya (Hardjopranjoto, 1987). Ternak dengan kecepatan reproduksi tinggi, disertai seleksi yang baik dalam perkawinannya, dapat meningkatkan produksi hasil ternaknya. Salah satu ternak dengan tingkat reproduksi tinggi adalah domba, karena selain menghasilkan anak lebih dari satu ekor pada setiap kelahiran, juga masa kehamilan relatif pendek (Toelihere, 1981).

Menurut Triwulaningsih (1992) yang dikutip Hernawati (1998) menyatakan pembuahan secara *in vitro* adalah salah satu cara untuk memproduksi embrio secara buatan diluar tubuh ternak dengan cepat dan murah. Melalui teknik ini kita tidak perlu memelihara donor yang harganya mahal dan biaya pakan yang tinggi.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuahan *in vitro* adalah motilitas spermatozoa. Tingkat gerak maju spermatozoa yang tinggi tampaknya sangat diperlukan untuk penetrasi ke membran sel telur secara *in vitro* (Hunter, 1995).

Fertilitas pejantan meliputi pemeriksaan fisik pejantan dan keadaan spermanya. Evaluasi semen harus dilakukan untuk menentukan pergerakan (motilitas) dan daya hidup (viabilitas) sperma yang diejakulasikan, meskipun

keadaan fisik pejantan itu memperlihatkan kelemahan atau kekurangan tertentu (Blakely dan Bade, 1985).

Plasma semen mengandung bahan-bahan atau faktor-faktor yang dapat merusak daya pembuahan sel spermatozoa. Faktor-faktor ini tampaknya mengganggu reaksi dan pola pergerakan akrosom serta mencegah proses penempelan sel mani ke zona pelusida. Sel mani harus mengalami perubahan fisiologik lebih lanjut sebelum mempunyai kemampuan menembus lapisan pembungkus sel telur (Hinting, 1989).

Pemisahan sel spermatozoa dari plasma semen dapat dilakukan dengan pencucian spermatozoa (*washing spermatozoa*). Teknik pencucian spermatozoa telah digunakan untuk mempelajari proses biologi pada spermatozoa mamalia dan unggas. Pelepasan plasma semen dengan pencucian spermatozoa dapat mengurangi kontaminasi spermatozoa dari urin dan feses (Harrison dan White, 1972).

Menurut Chang (1971) yang dikutip oleh Sexton (1973) bahwa plasma semen tidak berperan penting sebagai bahan kapasitas fertilisasi spermatozoa secara *in vitro*.

Parameter penilaian kualitas semen ini yang terpenting adalah motilitas spermatozoa (Suhadi, 1978). Motilitas yang kurang memenuhi syarat akan menyebabkan gagalnya proses fertilisasi (Satmoko dan Soeradi, 1992).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gerak spermatozoa dapat di stimulasi dengan pemberian zat kimia, misalnya kafein (Hinting dan Marlinata, 1981). Berdasarkan penelitian yang ada, diketahui bahwa kafein mempunyai

pengaruh stimulasi pada tubuh antara lain pada fungsi reproduksi (Baker, 2000). Selain meningkatkan motilitas, kafein juga diketahui dapat memperpanjang umur spermatozoa manusia (Suhadi, 1978).

Kafein adalah derivat methylxanthine dan memiliki efek stimulan yang kuat dibandingkan derivat methylxanthine yang lain yaitu theophylline dan theobromine (Mutscher, 1991). Penelitian tentang kafein untuk meningkatkan motilitas spermatozoa selama ini masih terbatas pada manusia, sedangkan penelitian pada ternak belum banyak dilaporkan sehingga perlu dilakukan penelitian. Oleh karena itu penelitian ini dirancang untuk mengetahui pengaruh penambahan kafein dalam media pencucian terhadap motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba.

## **I.2. Landasan Teori**

Semen yang dipancarkan hewan terdiri dari bagian padat yang mengandung spermatozoa dan cairan semen yang berasal dari kelenjar aksesoris. Komponen terpenting dari semen adalah spermatozoa (Hardijanto dan Hardjoprano, 1994). Pemisahan plasma semen dari spermatozoa biasa dilakukan sebelum proses fertilisasi secara *in vitro*.

Pencucian spermatozoa biasanya dilakukan di laboratorium menggunakan media fisiologis dengan pH netral. Pencucian semen bertujuan untuk memisahkan spermatozoa dengan plasma semen. Pencucian sperma secara umum dapat mengurangi kontaminasi spermatozoa dari urin dan feses saat dilakukan proses fertilisasi *in vitro* (Harrison dan White, 1972).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gerak spermatozoa dapat di stimulasi dengan pemberian zat kimia misalnya kafein. Kafein dapat meningkatkan motilitas dan dapat memperpanjang umur spermatozoa (Rees dkk, 1990).

Kafein adalah derivat methylxanthine dan memiliki efek stimulan yang kuat dibandingkan derivat methylxanthine yang lain yaitu theophylline dan theobromine (Mutscher, 1991). Menurut Fischel dan Symond (1986) kafein banyak digunakan secara klinis. Penggunaan klinis kafein banyak diteliti untuk meningkatkan potensi fertilisasi *in vitro*. Analisa *in vitro* mekanisme kerja kafein menunjukkan bahwa ikatan kafein dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

### **I.3. Perumusan Masalah**

Bertitik tolak dari permasalahan diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui

1. Apakah penambahan kafein dalam media pencucian dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba.
2. Apakah penambahan kafein dalam media pencucian dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa domba.



#### **I.4. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan kafein dalam media pencucian terhadap motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba sebelum dilakukan fertilisasi *in vitro*.

#### **I.5. Hipotesis**

Hipotesis yang dilakukan dalam penelitian ini adalah :

1. Penambahan kafein dalam media pencucian dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba.
2. Penambahan kafein dalam media pencucian dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa domba.

#### **I.6. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberi masukan yang positif tentang penambahan kafein dalam media pencucian untuk meningkatkan kualitas spermatozoa domba sehingga dapat membantu terlaksananya fertilisasi secara *in vitro*.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1. Domba

Indonesia sudah mengenal ternak domba, walau keberadaannya kurang begitu populer dibanding ternak kambing. Domba yang ditenakkan di Indonesia fungsinya hampir tidak berbeda dengan kambing yaitu untuk dimanfaatkan dagingnya. Sementara peternakan domba untuk tujuan penghasil wol, seperti yang dilakukan di negara subtropis, masih kurang menarik (Devendra dan Burns, 1994).

Untuk memilih domba pejantan diperlukan beberapa syarat antara lain harus berbadan besar, tegap dan kuat. Jika berjalan domba pejantan tersebut mengangkat kaki tinggi-tinggi. Kakinya kuat, kukunya baik dan gerak-geriknya aktif. Pejantan yang baik harus mempunyai alat kelamin yang baik. Tandanya antara lain mempunyai dua buah testis yang sama besar dan menggantung panjang (Suharno dan Nazarudin, 1994).

#### II.2. Alat Kelamin Jantan

Alat kelamin jantan pada ternak umumnya mempunyai bentuk yang hampir sama, terdiri dari testis yang terletak di dalam skrotum, saluran-saluran alat kelamin, penis, dan kelenjar asesoris (Hardjopranjoto, 1995).

Berdasarkan fungsinya alat kelamin hewan jantan dibedakan menjadi alat kelamin primer berupa testis adalah suatu organ yang menghasilkan bibit pejantan

dalam hal ini adalah sel spermatozoa dan hormon kelamin jantan berupa androgen. Alat kelamin sekunder berupa pembuluh atau saluran reproduksi yang menghubungkan antara testis dengan dunia luar yaitu vas efferent, epididimis, vas defferent, urethra dan penis yang digunakan untuk menyalurkan semen, cairan asesoris dari kelenjar asesoris dan urin melalui urethra (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Testis berjumlah dua buah dan secara normal terbungkus oleh suatu kantong skrotum, yang berfungsi melindungi testis terhadap gangguan dari luar berupa panas dan dingin serta gangguan mekanis lainnya. Suhu testis lebih rendah dari suhu badan, hal ini berperan untuk proses spermatogenesis normal yang terjadi di dalam testes (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Testis sebagai alat kelamin primer mempunyai dua fungsi yaitu memproduksi spermatozoa dan memproduksi hormon jantan. Spermatozoa dihasilkan di dalam tubuli seminiferus oleh pengaruh hormon yaitu *Follicle Stimulating Hormone (FSH)*. Sedangkan hormon jantan dihasilkan oleh sel-sel interstitial atau sel leydig akibat pengaruh *Interstitial Cell Stimulating Hormone (ICSH)*. Salah satunya adalah testoteron yang sangat berpengaruh terhadap sifat jantan (Hardjopranjoto, 1995).

Epididimis adalah jaringan di luar testis yang di dalamnya terdapat juga saluran kecil dan berkelok-kelok yang nantinya berlanjut membentuk satu saluran vas defferent dan bermuara di dalam saluran urethra. Disekitar muara tersebut terdapat kelenjar kelamin tambahan. Pada saat kopulasi sel spermatozoa yang terkumpul diujung vas deferens diejakulasikan bersamaan dengan keluarnya

cairan dari beberapa kelenjar asesoris yang akan mengencerkannya. Campuran tersebut sering disebut sebagai air mani atau semen yang terdiri dari sel spermatozoa dan plasma semen. Alat kopulasi yang menyalurkan bibit hewan jantan atau spermatozoa masuk ke dalam alat kelamin betina disebut penis (Hardijanto dan Harjopranjoto, 1994).

### **II.3. Spermatozoa**

Semen yang dipancarkan oleh berbagai macam hewan terdiri dari dua bagian yaitu: bagian yang padat banyak mengandung sel spermatozoa dan bagian cairan semen yang sebagian besar berasal dari kelenjar aksesoris (Hardijanto dan Harjopranjoto, 1994). Komponen yang terpenting dari air mani adalah spermatozoa yang berfungsi untuk membuahi ovum. Plasma air mani tidak memiliki sifat-sifat penting dalam proses reproduksi hewan jantan (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Spermatozoa merupakan subjek penelitian yang berkesinambungan sejak ditemukan mikroskop, dan penelitian mengenai kerangka spermatozoa secara mendalam dan sekecil-kecilnya dapat dilaksanakan setelah penemuan dan pengembangan mikroskop elektron. Kepala spermatozoa berisi bahan khromatin, permukaan depan sebagian dibungkus akrosom yang kadang-kadang terlepas sebelum diejakulasikan atau pada penyimpanan air mani. Pelepasan akrosom mungkin merupakan proses yang sangat penting dalam peristiwa pembuahan. Bagian leher mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian

badan banyak mengandung enzim dan bahan lipid (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Bagian tengah spermatozoa terdapat mitokondria sebagai tempat berlangsungnya proses-proses metabolisme spermatozoa dalam menghasilkan energi bagi kehidupan dan pergerakan spermatozoa (Dieleman dkk, 1992). Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus krebs dan transport elektron serta fosforilasi oksidatif yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Triphosphate (ATP)* untuk menggerakkan spermatozoa (Hinting dan Marlinata, 1981).

Menurut Toelihere (1981) sekurang-kurangnya empat bahan organik di dalam air mani yang dapat direaksikan langsung atau tidak langsung. Sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitasnya, bahan tersebut adalah fruktosa, sorbitol, *glycerylphosphorylcholine (GPC)*, plasmogen.

#### **II.4. Spermatogenesis**

Spermatozoa dihasilkan di dalam tubuli seminiferi. Mereka berasal dari spermatogonia epitel geminalis yang terdapat di lapisan luar tubuli. Pertumbuhan sel-sel ini dengan suatu seri pembelahan sel yang berurutan diikuti berpindahannya sel tersebut ke arah lumen tubuli. Sel spermatogonia akan melepaskan diri dari sekitarnya dan berubah bentuk dan ciri-cirinya. Beberapa waktu kemudian setelah sel ini melekat pada sel induk yang disebut sel sertoli. Spermatozoa akan melepaskan diri dari sel induk tadi dan bebas berada dalam saluran tubuli menuju

kesaluran-saluran pengumpul. Keseluruhan proses pembentukan spermatozoa disebut *spermatogenesis* (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Spermatogenesis terdiri dari dua fase utama. Fase pertama meliputi perkembangan awal sel spermatogonia secara pembelahan mitosis, disusul dengan pembelahan meiosis yang menjadikan jumlah kromosom menjadi separuhnya yaitu dari diploid menjadi haploid. Kemudian dilanjutkan dengan pembelahan mitosis dari jumlah sel menjadi dua kali. Tingkatan spermatogenesis ini disebut *spermatocytogenesis*. Peristiwa ini berakhir dengan pembentukan spermatid dan menjadi perhatian utama bagi para ahli genetika. Pada waktu pembelahan meiosis, alela dari gen-gen menentukan sifat yang diturunkannya yang terdapat di dalam kromosom dan terbagi secara acak diantara spermatozoa. Peristiwa pembelahan meiosis terjadi serupa pada pembentukan ovum, karena itu bila dua sel haploid yaitu satu sel spermatozoa dan satu sel telur bersatu pada waktu fertilisasi, terbentuklah kembali sel diploid yang membawa sifat jenis hewan yang bersangkutan (Partodihardjo, 1982).

Fase kedua spermatogenesis adalah *spermiogenesis*. Fase ini mendapat perhatian oleh para ahli bidang fisiologi reproduksi. Spermatid mengalami metamorphosis dan berubah bentuk dan menghasilkan spermatozoa yang sempurna. Perubahan ini termasuk pembentukan akrosom kepala, bagian tengah, ekor spermatozoa dan bagian-bagiannya dari berbagai materi seluler. Pada proses pembentukan, sebagian sitoplasma spermatid dikeluarkan dari bentuk terakhir spermatozoa, dan terjadi butir-butir sitoplasma yang menggambarkan bentuk-bentuk spermatozoa yang belum dewasa. Selama pendewasaan, sel spermatozoa

melekat pada sel sertoli atau disebut juga sel induk yang terbentuk dari membrana basalis tubuli seminiferi dan selama pertautannya spermatozoa menerima makanan dari sel tersebut sampai spermatozoa dilepaskan dan masuk dalam lumen tubuli dan memulai perjalanannya melalui saluran pengeluaran (Partodihardjo, 1982).

Proses spermatogenesis ini dipengaruhi secara langsung oleh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan secara tidak langsung oleh *Luteinizing Hormone* (LH). FSH berfungsi merangsang sel germinatif dari tubulus seminiferus testis, sedangkan LH merangsang pembentukan hormon androgen oleh sel leydig. Androgen (testosteron) berperan merangsang spermatogenesis pada tahap akhir (Bearden dan Fuguay, 1992).

Dari dalam tubuli seminiferus, spermatozoa berpindah ke rete testes dan vasa efferens karena desakan spermatozoa yang terbentuk di dalam tubuli ke arah epididimis. Di dalam rongga epididimis, sel spermatozoa akan mengalami pendewasaan diri. Selanjutnya karena kontraksi dari dinding epididimis, spermatozoa akan berpindah ke bagian ekor epididimis dan disinilah spermatozoa akan bergerak sendiri dan mempunyai daya untuk membuahi di ovum. Di dalam epididimis spermatozoa tetap dalam keadaan subur untuk jangka waktu yang cukup lama bila dibandingkan dengan jangka waktu kesuburan spermatozoa di dalam alat kelamin betina. Spermatozoa diejakulasikan karena kontraksi urat daging dinding saluran alat kelamin jantan, diawali dari vas eferens yang di ikuti oleh saluran-saluran yang menuju keluar dari kelenjar pelengkap (Ismudiono, 1999).



## II.5. Plasma Semen

Sebagian besar dari volume semen terdiri dari plasma semen. Fungsi utama plasma semen adalah sebagai suatu media pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat dijalankan karena plasma semen mengandung bahan penyanggah dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Ismudiono, 1999).

Menurut Hafez (1993) plasma semen mengandung nutrisi dan sebagai buffer untuk kapasitas yang berperan sebagai cairan pembawa untuk perjalanan spermatozoa dari alat kelamin jantan ke alat kelamin betina. Seminal plasma mengandung bahan pengencer yang sangat berfungsi untuk motilitas dan metabolisme spermatozoa dalam epididimis dan juga sebagai bahan pelindung pada kapasitas melawan keadaan asam dalam vagina. Plasma semen juga mengandung larutan-larutan penyanggah (buffer) seperti sitrat dan bikarbonat.

Plasma semen mengandung bermacam-macam zat organik, inorganik dan air. Zat organik yang terdapat dalam plasma semen relatif lebih banyak dibandingkan dengan yang terdapat dibagian lain dalam tubuh, unsur-unsur itu adalah phosphoril koline, glycerylphosphorylcholine, asam sitrat, fruktosa, inositol, sorbitol, ergothionine dan spermine. Zat-zat anorganiknya adalah K, Ca, dan bikarbonat yang relatif tinggi kadarnya dibanding dengan yang terdapat di tempat lain dalam tubuh (Partodihardjo, 1982).

Pada domba, sapi, babi dan kuda, fruktosa, sorbitol, asam sitrat dan inositol di hasilkan oleh kelenjar-kelenjar vesikularis. Walaupun pada tingkat

berbeda, fruktosa merupakan gula yang di temukan di dalam semen sapi, domba dan babi yang berasal dan glukosa darah. Konsentrasi fruktosa dalam semen sapi dan domba sangat tinggi dan merupakan makanan utama bagi spermatozoa. Sorbitol dioksidasi menjadi fruktosa oleh sel-sel spermatozoa untuk di konsumsi kemudian. Asam sitrat tidak dipakai sebagai sumber energi oleh spermatozoa. Asam sitrat dan inositol tidak dimetabolisir oleh spermatozoa. *Glycerolphosphorylcholine* (GPC) merupakan sumber energi bagi spermatozoa di dalam alat kelamin betina (Ismudiono, 1999).

Komposisi plasma semen domba secara lengkap dapat dilihat dalam tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Plasma Semen Domba

Bahan	Konsentrasi (mg/100 ml)
Air, g/100 ml	85
Fruktosa	250
Sorbitol	72
Glycerolphosphorylcholine	1650
Inositol	12
Asam sitrat	140
Ergothionin	0
Plasmalogen	380
Natrium	190
Kalium	90
Klorida	86
Kalsium	11
Magnesium	8

Sumber: Bearden dan Fuguay (1992)

## II.6. Metabolisme Spermatozoa

Energi untuk motilitas dan daya hidup spermatozoa berasal dari gula khususnya fruktosa dalam seminal plasma. Glukosa juga dimetabolisme oleh spermatozoa sehingga kadang-kadang digunakan sebagai bagian dari bahan pengencer (Evans dan Maxwell, 1987).

Energi yang digunakan untuk motilitas spermatozoa berasal dari perombakan ATP di dalam selubung mitokondria melalui reaksi penguraiannya menjadi *Adenosin Diphosphat* (ADP) dan *Adenosin Monophosphat* (AMP). Kelangsungan pergerakan spermatozoa ini mengharuskan dibangunnya kembali ADP dari ATP (reaksi berlangsung bolak-balik). Usaha yang dilakukan untuk membangun kembali ATP dari ADP maupun ADP dari AMP adalah dengan penambahan gugus phosphoril yang dapat diperoleh dari karbohidrat dan lemak (Toelihere, 1981).

Kehidupan sel spermatozoa di dalam semen sangat bergantung pada besarnya kadar fruktosa sebagai sumber energi yang utama. Dalam keadaan anaerobik, sel spermatozoa memakai karbohidrat sebagai sumber energi. Bila sel spermatozoa di simpan dalam keadaan anaerobik, maka kadar fruktosa dalam semen akan berkurang sedang asam laktatnya akan bertambah. Sel spermatozoa pada mamalia sanggup mencerna beberapa zat yang ada di dalam cairan asesoris atau cairan yang ada di dalam alat kelamin betina dan yang ada di dalam cairan media bahan pengencer. Dalam keadaan aerobik sumber energi sel spermatozoa dapat juga diperoleh dengan jalan mengadakan oksidasi asam laktat menjadi  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Pemecahan ATP berguna sebagai sumber energi untuk kontraksi fibril-fibril sel spermatozoa. ATP dalam spermatozoa berhubungan dengan metabolisme sel spermatozoa. Jika sel spermatozoa di simpan di dalam keadaan anaerobik dan tidak ada persediaan gula maka pergerakan sel spermatozoa menjadi lambat. Pergerakan tersebut kembali normal dengan penambahan fruktosa atau beberapa gula lain dalam semen (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

Ada korelasi positif antara motilitas spermatozoa dan kecepatan sel spermatozoa dipisah dari plasma semen dengan pemusingan atau mencuci dengan cairan fisiologis, ternyata proses fruktolisis secara anaerobik tidak terjadi. Fruktolisis akan terjadi lagi bila ditambah cairan asesoris atau zat gula (fruktosa, glukosa dan manosa) ke dalam sel spermatozoa tersebut (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).

## **II.7. Kafein**

Kafein pertama kali di temukan oleh Runge pada tahun 1820. Kemudian pada tahun 1837 Medicus mengidentifikasi struktur kimianya sehingga diketahui rumus molekul kafein yaitu  $C_8H_{10}N_4O_2$  dengan berat molekul 194,19 (Clark dan Macrae, 1993). Kafein (1,3,7 trimetil xantin) merupakan suatu derivat xantin yang mengandung gugus metil. Xantin merupakan dioksimurin yang mempunyai struktur mirip asam urat. Terdapat tiga macam xantin yang sering digunakan dalam dunia farmasi ; theophiline, theobromine, kafein (Krantz dan Jelleff, 1969).

Kafein disebut juga tein, merupakan kristal putih yang larut dalam air. Kafein-Na benzoat dan kafein-sitrat berupa senyawa putih, agak pahit, larut dalam air. Kafein banyak ditemukan dalam kopi, teh dan kakau. Penelitian membuktikan bahwa kafein berefek pada stimulasi (Ganiswhara, 1995). Efek farmakologi kafein pada saraf seluler dapat terjadi melalui peningkatan akumulasi senyawa nukleotid siklik, terutama siklik *adenosinmonophosphat* (cAMP) dan melalui blokade adenosin (Fischel dan Symond, 1986).

Menurut Mutschler (1991) kafein memiliki kerja stimulan yang paling kuat dibanding theophillin dan theobromine.

Kafein merupakan suatu zat yang mempunyai sifat sebagai inhibitor fosfodiesterase (Suhadi, 1978). Hal ini menyebabkan kerja enzim fosfodiesterase yang berfungsi untuk menguraikan cAMP menjadi 5'AMP terhambat. Penghambatan ini menyebabkan konsentrasi cAMP dalam sel meningkat. Penumpukan cAMP ini dapat memacu motilitas spermatozoa, namun mekanismenya sampai sekarang belum jelas (Ganiswhara, 1995). Kafein juga mempunyai efek pada metabolisme dengan merangsang glikogenolisis dan lipolisis (Mutschler, 1991).

## **II.8. Efek kafein pada spermatozoa**

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh adanya cAMP dalam sel. Bila cAMP dalam sel spermatozoa meningkat maka motilitas spermatozoa juga akan meningkat (Suhadi 1978).

Kafein merupakan zat yang berfungsi untuk menghambat kerja enzim fosfodiesterase sehingga kerja enzim fosfodiesterase yang berfungsi untuk menguraikan cAMP menjadi 5AMP juga terhambat. Penghambatan ini menyebabkan konsentrasi cAMP di dalam sel meningkat. Peningkatan cAMP dalam sel spermatozoa dapat memacu motilitas spermatozoa ( Ganiswara, 1995 ).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gerak spermatozoa dapat di stimulasi dengan pemberian zat kimia, misalnya kafein (Hinting dan Marlinata, 1981). Berdasarkan penelitian yang ada, diketahui bahwa kafein mempunyai pengaruh stimulasi pada tubuh antara lain pada fungsi reproduksi (Baker, 2000). Selain meningkatkan motilitas, kafein juga diketahui dapat memperpanjang umur spermatozoa manusia (Suhadi, 1978).

Penggunaan klinis kafein banyak diteliti untuk meningkatkan potensi pergerakan spermatozoa khususnya manusia. Analisa *in vitro* menunjukkan bahwa ikatan kafein dapat meningkatkan motilitas spermatozoa ( Fischel dan Symond, 1986 ).

## **II. 9. Pencucian Spermatozoa (*Washing Spermatozoa*)**

Menurut Steptoe dan Edward (1978) yang dikutip Hinting (1989) keberhasilan pembuahan *in vitro* tergantung sepenuhnya pada inseminasi oosit dengan spermatozoa yang telah tercuci. Lebih lanjut Berger dkk (1989), Cohen dkk (1985) seperti yang dikutip Hinting (1989) menyatakan bahwa plasma semen memuat bahan-bahan atau faktor-faktor yang dapat merusak daya pembuahan

spermatozoa. Plasma semen dapat juga mengandung mikroorganisme yang mencemari sistem kultur dan juga limfosit yang menghasilkan sekresi beracun yang menghambat pembuahan.

Pencucian spermatozoa dilakukan pada suhu kamar dalam media fisiologis. Media fisiologis adalah media yang mempunyai sifat sebagai buffer dan mengandung bahan sumber energi yang baik untuk metabolisme spermatozoa, misalnya Phosphate Buffer Saline (PBS) atau NaCl fisiologis (Harrison dan White, 1972).

Metode pencucian dengan sentrifugasi yang biasa digunakan sebagai prosedur baku dalam program pembuahan *in vitro* terdiri atas pengenceran cairan semen 0,5 ml dengan 5 ml media fisiologis. Suspensi berupa cairan semen dan media fisiologis tersebut disentrifus pada 1800 rpm selama 10 menit dalam suhu ruangan. Selanjutnya supernatan di pisahkan dan proses ini diulangi sekali lagi dengan media fisiologis. Setelah sentrifuse kedua, sedimen terakhir di lapisi dengan 1 - 2 ml media fisiologis dan lapisan atas dipisahkan setelah 30-60 menit di inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>, 5% dalam campuran gas dengan suhu 37<sup>0</sup> C (Hinting, 1989).

Pencucian secara sentrifugasi sendiri penting untuk menghasilkan sedimen yang mengandung spermatozoa dengan motilitas yang tinggi (Harrison dan White, 1972). Tujuan dilakukan sentrifugasi adalah membuang elemen plasma semen dari permukaan spermatozoa dan pada waktunya, memungkinkan terjadinya pembentukan vesikulasi pada membran kepala spermatozoa yang menghasilkan reaksi akrosom (Hunter, 1995).

## **II.10. Motilitas Spermatozoa**

Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya geraknya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan (Toelihere, 1981)

Motilitas telah sejak lama di kenal sebagai alat untuk memindahkan spermatozoa melalui saluran reproduksi hewan betina. Meskipun sejumlah laporan mengenai kebuntingan dan kelahiran normal antara sapi betina berasal dari hasil inseminasi dengan sapi yang tidak motil, tapi tidak terbukti bahwa spermatozoa tidak motil tidak dirangsang untuk menjadi motil kembali karena pengaruh lingkungan produk sekresi saluran alat kelamin betina (Salisbury dan Vandemark, 1985)

Seekor pejantan normal mampu men ejakulasikan semen dengan sejumlah spermatozoa yang motil sebanyak 70% sampai dengan 90% dan hanya 5% sampai dengan 25% spermatozoa yang abnormal (Bearden dan Fuguay, 1992).

## **II.11. Pemeriksaan Mikroskopik Sel Spermatozoa**

### **1. Pergerakan dalam persen ( % )**

Jumlah spermatozoa yang bergerak di taksir dan dinyatakan dalam persen di bandingkan dengan yang tidak bergerak. Dalam hal ini penaksiran setiap individu berbeda dengan individu lain, tetapi yang benar akan di kuatkan oleh



penaksiran hidup mati sel spermatozoa setelah sel spermatozoa itu di warnai (Partodihardjo, 1982).

## **2. Menghitung sel Spermatozoa yang hidup dan yang mati dengan pewarnaan**

Pada penaksiran mikroskopik yang dilakukan pada semen segar, didasarkan atas jumlah spermatozoa yang bergerak dibandingkan dengan yang tidak bergerak. Menurut banyak pendapat cara yang demikian itu sangat subjektif. Perbedaan afinitas menghisap zat warna antar sel spermatozoa mati dan hidup dapat di gunakan untuk menentukan jumlah sel spermatozoa yang hidup lebih objektif. Pada waktu semen segar tersebut dicampur dengan zat pewarna tertentu misalnya eosin negrosin, maka spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna sedikitpun. Berbeda dengan sel spermatozoa yang mati, sel spermatozoa tersebut dapat menyerap zat warna sehingga di bawah pemeriksaan mikroskop terlihat jelas perbedaannya dengan sel spermatozoa yang hidup. Sel spermatozoa yang hidup akan berwarna jernih atau tidak berwarna. Sedangkan sel spermatozoa yang mati menyerap zat warna sehingga terlihat sangat kontras sesuai dengan zat warna yang diberikan (Partodihardjo, 1982).

Sel spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna karena lapisan lipid pada sel spermatozoa dapat melindungi zat warna masuk dalam spermatozoa. Sedangkan pada sel spermatozoa yang telah mati karena rusak atau hilangnya lapisan lipid pada dinding sel spermatozoa maka zat pewarna sangat mudah menembus masuk ke dalam sel spermatozoa (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994)

# **BAB III**

## **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **III.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya mulai tanggal 25 Juli sampai dengan 23 Agustus 2002.

#### **III.2. Materi Penelitian**

##### **III.2.1. Bahan Percobaan**

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini adalah PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 300 ml (Sigma, USA). Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar domba (domba umur  $\pm$  2 tahun), pewarna eosin negrosin, antibiotik sulfanilamid dan penisilin, dan serbuk kafein sebanyak 4 gram (berasal dari laboratorium Bioanalitika), alkohol 70 %, vaselin dan air hangat.

##### **III.2.2. Alat Percobaan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan lengkap untuk domba serta gelas berskala untuk menampung semen, tabung erlenmeyer 100 ml, timbangan mikro (Sartorius 0,0001), spatel, saringan millipore (Sartorius minisart), sentrifuse (Hettirch EBA 3S), tabung sentrifuse, mikroskop,

pipet Pasteur, pipet Eppendorf, object glass, cover glass, gelas ukur, bunsen, pengaduk (magnetik stirrer), dan inkubator.

### III.3. Metoda Penelitian

#### III.3.1. Persiapan Alat dan Bahan

Hal yang pertama di lakukan sebelum penelitian adalah penyediaan alat - alat dan bahan, persiapan vagina buatan dan pembuatan media fisiologis Phosphat Buffer Saline (PBS)-kafein.

Sebelum penampungan semen, satu set vagina buatan yang terdiri dari selongsong karet tebal yang di dalamnya terdapat karet tipis (*inner liner*), corong karet (*rubber funnel*) dan tabung penampung air mani berskala di bersihkan dengan air bersih. Bagian-bagian vagina buatan setelah di bersihkan kemudian di pasang dan suhu di dalamnya diatur hingga mencapai suhu  $\pm 45^{\circ}$  C. Selanjutnya bagian dalam dari vagina buatan di olesi vaselin sebagai pelicin sejauh  $\pm 5$  cm dari ujung depan vagina buatan.

Pembuatan larutan kafein dan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) di lakukan sebelum pengambilan semen. Kedua larutan kemudian di simpan dalam suhu  $4^{\circ}$ - $5^{\circ}$  C agar tidak rusak. Cara membuat larutan kafein dan larutan Phosphat Buffer Saline (PBS) beserta komposisi PBS dapat di lihat pada lampiran 1.

### III.3.2. Metode Pengumpulan Semen

Penampungan semen di lakukan pada pagi hari antara pukul 08.00-09.00 WIB. Frekuensi pengambilan semen di lakukan dua kali seminggu agar diperoleh semen yang baik (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Penampungan air mani menggunakan vagina buatan. Sebelum ditampung semennya, pejantan dipersiapkan dulu dengan mencukur bulu dan mencuci daerah sekitar preputium agar semen terhindar dari kontaminasi kuman. Setelah itu pejantan dirangsang dengan berjalan-jalan mengelilingi hewan betina pemancing beberapa kali, agar menambah libidonya. Pejantan akan menaiki betina pemancing dan akan berejakulasi pada saat penis di masukkan ke dalam vagina buatan untuk ditampung semennya. Semen yang ditampung pada tabung berskala dihindarkan dari sinar matahari langsung untuk menjaga kualitasnya supaya tetap baik. Keuntungan pengumpulan semen dengan vagina buatan adalah keadaannya cukup bersih dan ejakulatnya normal (Salisbury dan Vandemark, 1985).

### III.3.3. Perlakuan terhadap Semen Domba.

Setelah semen terkumpul dilakukan pemeriksaan air mani secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis yaitu pemeriksaan volume, konsistensi air mani, bau, dan warna. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis yaitu pemeriksaan gerakan massa, motilitas dan persentase hidup.

Semen yang telah ditampung diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis, kemudian diencerkan dengan media PBS. Setelah dilakukan pengenceran, dibagi ke dalam empat tabung reaksi yang masing-masing telah

diberi label P0, P1, P2, P3. Pada tabung P0 ditambahkan PBS, sedangkan pada tabung P1, P2, dan P3 ditambahkan PBS-kafein dengan konsentrasi berbeda dan dilakukan pencucian pada semua tabung.

P0 : 0,25 ml semen + 3 ml PBS tanpa kafein (kontrol) dengan pencucian

P1 : 0,25 ml semen + 3 ml PBS-kafein (3 mM) dengan pencucian

P2 : 0,25 ml semen + 3 ml PBS-kafein (6 mM) dengan pencucian

P3 : 0,25 ml semen + 3 ml PBS-kafein (12 mM) dengan pencucian

Tabung-tabung tersebut dibiarkan selama  $\pm 15$  menit supaya larutan dapat tercampur secara homogen. Semua perlakuan di ulang sebanyak 6 kali dari semen domba yang sama.

#### **III.3.4. Metoda Pencucian Spermatozoa (*Washing Spermatozoa*)**

Media *Phosphate Buffer Saline* (PBS)-kafein sebanyak 3 ml ditambah dengan 0,25 ml semen. Bahan disentrifuse dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Supernatan dibuang, sisakan  $\pm 0,1$  ml sedimen yang ada di lapisan bawah dari media tersebut. Setelah itu di tambahkan lagi media perlakuan sebanyak 3 ml, disentrifuse lagi dan didiamkan selama  $\pm 15$  menit. Sampel diambil satu tetes dan letakkan pada gelas obyek dan sampel diperiksa di bawah mikroskop untuk menghitung persentase motilitasnya. Kemudian di buat preparat ulas untuk dihitung presentase hidupnya.

### III.3.5. Peubah yang diamati setelah perlakuan

#### Pemeriksaan Motilitas

Cara pemeriksaan motilitas adalah dengan meneteskan semen domba di atas gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup. Preparat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Penilaian dilakukan berdasarkan persentase gerakan spermatozoa aktif (bergerak *progresif*) dibanding dengan seluruh spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang (Djanuar. dkk, 1990).

#### Pemeriksaan terhadap persentase hidup Spermatozoa

Cara pemeriksaan hidup mati adalah meneteskan satu tetes zat warna berupa eosin negrosin dan satu tetes semen domba dari masing-masing tabung di atas gelas objek yang bersih. Secepatnya kedua larutan dicampurkan hingga homogen kemudian dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan di atas nyala api. Pengerjaan maksimal dilakukan dalam detik dan kemudian dilakukan pemeriksaan dibawah miskroskop dengan perbesaran 400 kali. Cara penilaian adalah membandingkan spermatozoa yang berwarna merah (mati) dan yang tidak berwarna (hidup) (Djanuar. dkk, 1990) .

### III.3.6. Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data penelitian berupa persentase ditransformaikan menggunakan transformasi sudut dan data yang diperoleh dianalisis berdasar uji-F. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata

Terkecil) dengan tingkat signifikansi 5% untuk mengetahui perlakuan yang terbaik (Kusriningrum, 1989).



## **BAB IV HASIL PENELITIAN**

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### IV.1. Pemeriksaan Semen Domba Sebelum Perlakuan

Semen domba sebelum diencerkan, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan tersebut meliputi volume, warna, konsistensi, gerakan massa, motilitas, dan persentase hidup. Hasil pemeriksaan semen domba sebelum pengenceran dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Semen Domba Sebelum Perlakuan

Penampungan	Volume ( ml )	Warna	Konsistensi	Gerakan Massa	Motilitas ( % )	Hidup ( % )
1	1,0	Putih	Pekat	+++	70	80
2	0,9	Putih	Pekat	+++	70	82
3	0,9	Putih	Pekat	+++	70	84
4	0,5	Putih	Pekat	+++	80	90
5	1,5	Putih	Pekat	+++	70	91
6	0,6	Putih	Pekat	+++	70	88

Pemeriksaan gerakan massa spermatozoa domba dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Penilaian positif tiga pada kolom gerakan massa artinya spermatozoa yang digunakan sangat baik, merupakan gambaran gelombang kecil sampai besar yang tebal dan gelap dalam jumlah banyak dan bergerak cepat (Hardijanto dkk, 1999). Tingginya angka persentase hidup dan motilitas spermatozoa dikarenakan masih pekatnya spermatozoa yang belum diencerkan sehingga belum efektif bila digunakan untuk fertilisasi *in vitro*.

#### IV.2. Pemeriksaan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Setelah semen domba di encerkan dan dilakukan pencucian dengan media PBS – kafein, maka segera dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa. Data penelitian berupa persentase ditransformasikan menggunakan transformasi sudut dan data yang diperoleh dianalisa berdasar uji-F.

Hasil pemeriksaan terhadap motilitas domba setelah pencucian dengan media PBS – kafein dapat dilihat pada tabel 3. dibawah ini.

**Tabel 3.** Rataan persentase motilitas spermatozoa domba dalam media PBS – kafein (3 mM), PBS – kafein (6 mM) dan PBS – kafein (12 mM)

Perlakuan	N	Motilitas (%)
		Rataan $\pm$ SD
P1	6	51,77 $\pm$ 2,46 <sup>a</sup>
P2	6	45 $\pm$ 3,65 <sup>b</sup>
P0	6	42,11 $\pm$ 3,16 <sup>b</sup>
P3	6	42,07 $\pm$ 6,12 <sup>b</sup>

a,b : Superskrips yang berbeda dalam kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata (  $p < 0,01$  ).

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa penambahan kafein pada konsentrasi tertentu dalam media PBS dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba (  $p < 0,01$  ) setelah mengalami pencucian. Seperti yang terlihat pada lampiran 2

Untuk melihat perbedaan pada tiap perlakuan dilanjutkan dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil ( BNT ) 5%. Seperti yang terlihat dalam lampiran 3. Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM (P1) menunjukkan peningkatan motilitas yang tertinggi ( $p < 0,01$ ) dibanding perlakuan lainnya. Sedangkan antara penambahan kafein dengan konsentrasi 6 mM (P2), 12 mM (P3) dan kontrol (P0) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dalam meningkatkan motilitas spermatozoa.

#### IV. 3. Pemeriksaan Terhadap Hidup Mati

Pemeriksaan hidup mati spermatozoa setelah dilakukan pencucian dengan media PBS – kafein. Data penelitian berupa persentase ditransformasikan menggunakan transformasi sudut dan data yang diperoleh dianalisis berdasar uji-F. Hasil pemeriksaan terhadap hidup mati domba setelah pencucian dengan media PBS – kafein dapat dilihat pada tabel 4 dibawah ini.

**Tabel 4.** Rataan persentase hidup spermatozoa domba dalam media PBS – kafein (3 mM), PBS – kafein (6 mM) dan PBS – kafein (12 mM)

Perlakuan	N	Persentase hidup
		Rataan $\pm$ SD
P1	6	62,21 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup>
P2	6	57,78 $\pm$ 4,96 <sup>a,b</sup>
P0	6	56,65 $\pm$ 4,93 <sup>b</sup>
P3	6	53,35 $\pm$ 2,32 <sup>b</sup>

a,b : Superskrips yang berbeda dalam kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ).

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa penambahan kafein pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan persentase hidup mati spermatozoa domba ( $p < 0,01$ ). Untuk melihat perbedaan pada tiap perlakuan dilanjutkan dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5 %. Seperti terlihat pada lampiran 4 dan 5.

Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM (P1) menunjukkan peningkatan persentase hidup spermatozoa yang tinggi ( $p < 0,01$ ) bila dibandingkan dengan penambahan kafein dengan konsentrasi 12 mM (P3) dan kontrol (P0). Tetapi antara penambahan kafein dengan konsentrasi 6 mM (P2) dan P1 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dalam meningkatkan persentase hidup spermatozoa domba. Hal yang sama juga terjadi antara perlakuan P2, P3 dan P0.

## **BAB V PEMBAHASAN**

## BAB V

### PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bahan berupa air mani segar domba yang mengalami pencucian dalam media PBS – kafein dengan konsentrasi yang berbeda – beda.

Penentuan kualitas air mani sangat perlu diperhatikan dalam proses pembuahan. Pada penelitian dengan menggunakan air mani segar perlu diperhatikan frekuensi pengambilan air mani, jarak waktu antara pengambilan air mani dengan pemeriksaan kualitas semen yang meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis sebelum dilakukan proses pencucian.

Secara *in vivo* daya tahan hidup spermatozoa di dalam alat reproduksi betina merupakan modal dasar yang utama untuk terjadinya proses fertilisasi yang baik. Begitu juga pada pembuahan secara *in vitro*, daya tahan hidup spermatozoa dalam media biakan merupakan faktor yang penting untuk keberhasilan suatu pembuahan, sedangkan motilitas spermatozoa merupakan ciri utama dalam penilaian air mani ternak (Hernawati, 1998).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel spermatozoa yang motil dan jumlah sel spermatozoa yang hidup pada masing – masing perlakuan. Semen dengan kualitas yang baik akan di dapatkan pergerakan yang cepat dalam bentuk gelombang dan gelombang ini akan hilang dengan cepat. Menurut Partodihardjo (1982) perbedaan afinitas menghisap zat warna antara sel

spermatozoa yang mati dan yang hidup memberi kemungkinan untuk menaksirkan jumlah spermatozoa yang hidup lebih objektif.

Hasil penelitian ini memberikan gambaran bahwa air mani segar domba yang dipergunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas baik (sel spermatozoa motil sebesar  $57,89 \pm 2,71$  % dan sel spermatozoa hidup sebesar  $68,09 \pm 3,72$  % ) sebelum pengenceran. Pemeriksaan spermatozoa sebelum perlakuan menunjukkan hasil yang lebih baik bila di bandingkan setelah perlakuan karena pemeriksaan spermatozoa dilakukan sebelum sperma tersebut diencerkan, sehingga konsentrasi spermatozoa masih sangat pekat. Konsentrasi spermatozoa yang terlalu pekat tidak efektif digunakan untuk fertilisasi *in vitro*. Tujuan pemeriksaan spermatozoa yang belum diencerkan untuk mengetahui kualitas spermatozoa domba yang di gunakan dalam penelitian ini.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Phospat Buffer Saline (PBS). Media ini selain banyak mengandung kalsium dan magnesium, juga mengandung glukosa sebagai bahan nutrisi spermatozoa serta asam amino yang sangat dibutuhkan bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Disamping itu media PBS dapat bertindak sebagai media buffer / keseimbangan sehingga spermatozoa mampu bertahan hidup lebih lama. Glukosa dalam media PBS sebagai sumber energi melalui proses *glikolisis* yang akan dipakai untuk pergerakan ( motilitas ) serta metabolisme sel (Rimayanti, 1998).

Pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi pada penelitian ini bertujuan untuk membuang elemen plasma semen dari permukaan spermatozoa sehingga pada waktunya memungkinkan terjadinya pembentukan vesikula pada bagian



anterior dari bagian kepala spermatozoa yang menghasilkan reaksi akrosome ( Hunter, 1995 ). Menurut Hinting yang dikutip Hernawati (1998) spermatozoa perlu dipisahkan dari plasma semen, karena plasma semen mengandung bahan yang dapat menghambat proses fertilisasi *in vitro*, dan juga karena dalam plasma semen banyak mengandung bakteri, leukosit dan toksin. Sentrifuse sendiri penting untuk menghasilkan sedimen yang mengandung spermatozoa dengan motilitas yang tinggi ( Harrison dan White, 1972 ). Menurut Hardjopranjoto (1987) cairan plasma perlu di buang karena cairan ini dapat mengganggu terhadap kemampuan sel mani untuk membuahi. Spermatozoa yang di cuci bersih secara sentrifugasi dari plasma semen akan mati dengan cepat kecuali terdapat glukosa dalam media pengencer. Dengan adanya glukosa maka pergerakan spermatozoa menjadi lebih baik (Salisbury dan Vandemark, 1985). Oleh karena itu proses pencucian dalam penelitian ini menggunakan media PBS yang mengandung glukosa.

Penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM dalam media pencucian dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba dari  $42,11 \pm 3,16$  % (P0) menjadi  $51,77 \pm 2,46$  % (P1) dibanding perlakuan lainnya dalam penelitian ini. Pada konsentrasi 6 mM mengalami sedikit peningkatan menjadi  $45 \pm 3,65$  % (P2), sedangkan pada konsentrasi 12 mM, motilitas spermatozoa yang diperoleh sama dengan kontrol (P0) yaitu  $42,07 \pm 6,12$  % (P3). Tetapi antara P2, P3 dan P0 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Pengamatan terhadap persentase hidup spermatozoa mengalami peningkatan pada penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM dan 6 mM dari  $56,65 \pm 4,93$  % (P0) menjadi  $62,21 \pm 2,47$  % (P1) dan  $57,78 \pm 4,96$  (P2).

Sedangkan pada penambahan kafein dengan konsentrasi 12 mM mengalami penurunan menjadi  $53,35 \pm 2,32$  % (P3). Antara perlakuan P1 dan P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, begitu juga antara perlakuan P2, P0 dan P3. Tetapi perlakuan P1 menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan P0 dan P3.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sinha dan Singh (2000) penambahan kafein dengan konsentrasi 2 mM memberikan peningkatan motilitas spermatozoa yang efektif. Lopez (2000) juga menyatakan penambahan kafein dengan konsentrasi 1–5 mM pada spermatozoa dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, karena pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa.

Diantara ketiga derivat methylxanthine, hanya kafein yang memiliki efek stimulan yang paling kuat dibanding theophyllin dan theobromine (Mutscher, 1991). Menurut Sinha dan Singh (2000) penambahan derivat methylxanthine diantaranya kafein mempunyai efek stimulan pada spermatozoa. Meningkatnya motilitas dan persentase hidup berhubungan erat dengan peningkatan jumlah energi yang dihasilkan spermatozoa.

Kafein merupakan zat yang bekerja sebagai inhibitor adenosin dan fosfodiesterase (Harper dkk, 1984). Penghambatan adenosin tersebut akan menyebabkan penumpukan adenil siklase. Adenil siklase merupakan enzim yang bekerja merangsang pembentukan cAMP dari ATP, sehingga apabila adenil siklase yang terbentuk semakin banyak maka ATP yang diubah menjadi cAMP akan lebih banyak. Selain itu kafein juga menghambat kerja enzim

fosfodiesterase, yang berfungsi mengubah cAMP menjadi 5'AMP. Sehingga cAMP yang seharusnya diubah menjadi 5'AMP oleh enzim fosfodiesterase tidak dapat berlangsung. Kedua proses diatas akan menyebabkan konsentrasi cAMP di dalam sel meningkat. Peningkatan cAMP ini akan merangsang proses produksi energi. Dengan demikian ATP akan dihasilkan dalam jumlah yang banyak (Katzung, 1995).

ATP ini merupakan sumber energi bagi kelangsungan hidup spermatozoa, sehingga semakin banyak ATP yang terbentuk maka energi yang tersedia untuk pergerakan atau motilitas spermatozoa juga akan meningkat (Satmoko dan Soeradi, 1992).

Selain itu kafein juga memiliki efek pada metabolisme, sehingga apabila kafein ditambahkan pada spermatozoa akan menyebabkan peningkatan jumlah energi untuk pergerakan spermatozoa (Mutschler, 1991).

Penambahan kafein berkonsentrasi rendah dalam media PBS akan menyebabkan suasana alkali dalam pengencer. Hal ini disebabkan oleh sifat basa kafein. Penambahan kafein akan menyebabkan sejumlah besar asam laktat yang merupakan sisa metabolisme sel di rubah menjadi piruvat dan dekarboksilasi menjadi asetat ( Rees dkk, 1990 ). Hal ini yang diduga sebagai penyebab hidup spermatozoa domba dalam media PBS yang ditambah kafein lebih baik dibandingkan dengan yang tidak ditambah kafein.

Pada media PBS yang di tambah kafein dapat meningkatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba ( $p < 0,01$ ). Motilitas terbaik diperoleh

pada penambahan kafein sebesar 3 mM ( P1 ) sedangkan persentase hidup terbaik diperoleh pada penambahan kafein sebesar 3 mM (P1) dan 6 mM ( P2 ) bila dibandingkan dengan kafein sebesar 12 mM (P3) atau kontrol (P0). Hal ini berarti bahwa kafein dengan konsentrasi yang lebih rendah bila ditambahkan pada media PBS dapat meningkatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa domba. Ini menunjukkan bahwa kafein dalam media PBS dengan konsentrasi 3 mM sampai 6 mM merupakan konsentrasi yang efektif bila ditambahkan dalam semen domba.

Selain itu Abeydeera dan Day (1997) juga menyatakan bahwa kafein dengan konsentrasi 1–5 mM yang ditambahkan pada media fisiologis lebih meningkatkan pergerakan spermatozoa dibandingkan dengan pemberian kafein secara langsung tanpa dicampur dengan media fisiologis.

Media PBS yang ditambahkan kafein ternyata dipengaruhi oleh konsentrasi kafein itu sendiri. Konsentrasi kafein berpengaruh pada motilitas dan hidup spermatozoa domba. Semakin rendah konsentrasi kafein dalam media PBS, pengaruhnya pada spermatozoa lebih baik dari pada konsentrasi kafein yang tinggi. Hal ini mungkin disebabkan kedua bahan yang digunakan yaitu kafein dan PBS sama – sama bersifat alkali sehingga pada konsentrasi kafein yang tinggi, suasana dalam media menjadi terlalu basa bagi spermatozoa. Menurut Toelihere (1981) spermatozoa sapi dan domba akan mempunyai daya hidup yang akan meningkat apabila mediumnya sedikit alkali.

Menurut Baker (2000), kafein tidak sesuai bila dicampur dengan larutan yang bersifat alkalis kuat. Bearden dan Fuguay (1992) juga menyatakan bahwa

perlakuan yang menyebabkan pH semen berubah menjadi terlalu asam ataupun terlalu basa menyebabkan tingkat metabolisme spermatozoa akan menurun sehingga daya hidup spermatozoa akan menurun juga.

## **BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### VI. 1. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM dalam media pencucian dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba lebih baik bila dibandingkan dengan penambahan kafein pada konsentrasi 6 mM, 12 mM ataupun tanpa penambahan kafein.
2. Penambahan kafein dengan konsentrasi 3 mM dan 6 mM dalam media pencucian dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa domba lebih baik bila dibandingkan dengan penambahan kafein pada konsentrasi 12 mM ataupun tanpa penambahan kafein.

#### VI. 2. SARAN

Perlu diadakan penelitian untuk mengetahui penambahan kafein secara langsung dalam spermatozoa tanpa dilakukan pencucian atau sentrifugasi untuk tujuan fertilisasi secara *in vitro*.

# RINGKASAN



## RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan mencari konsentrasi kafein yang tepat untuk meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa domba melalui teknik pencucian dengan sentrifugasi.

Penelitian ini menggunakan Phosphate Buffer Saline sebagai media untuk pengenceran dan pencucian. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (*Complate Random Design*). Konsentrasi kafein yang digunakan adalah 3 mM, 6 mM dan 12 mM, sedangkan pencucian dilakukan melalui teknik sentrifugasi sebesar 1800 rpm selama 10 menit.

Parameter yang diamati adalah persentase hidup dan motilitas spermatozoa. Data penelitian berupa persentase ditransformasikan menggunakan transformasi sudut dan data yang diperoleh dianalisis berdasar uji-F. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan tingkat signifikansi 5% untuk mengetahui perlakuan yang terbaik

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini kafein dapat meningkatkan motilitas spermatozoa pada konsentrasi kafein 3 mM sedangkan pada konsentrasi kafein 12 mM hasilnya sama dengan kontrol. Kafein dapat meningkatkan persentase hidup pada konsentrasi 3 mM dan 6 mM, dan mengalami penurunan pada konsentrasi kafein 12 mM.

Penambahan kafein dalam media pencucian bertujuan untuk meningkatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro*. Hal ini disebabkan kafein mempunyai efek stimulan sehingga energi yang dihasilkan dalam sel meningkat untuk pergerakan dan daya hidup spermatozoa.

## DAFTAR PUSTAKA

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abeydeera, L.R, Day, B.N. 1997. *In vitro* Penetration of Pig Oocytes in a Modified Tris-Buffered Medium: Caffeine and Calcium. Department of Animal Sciences University of Missouri Columbia.
- Baker, J. T. 2000. *Caffeine: The Truth About Caffeine*. Elsevier Applied Science.
- Bearden, J.H. and Fuguay, J. 1992. *Applied Animal Reproduction*. Prentice – Hall Company. Reston. Virginia. 63.
- Blakely, J. and D. H. Bade. 1985. *The Science of Animal Husbandry*. 6<sup>th</sup> ed. Prentice Hall Career and Technology, Englewood Cliffs. New Jersey.
- Clark, R.J.. and Macrae, R. 1993. *Coffee*. Volume 3. Elsevier Applied Science. London dan New York.
- Dieleman, S. J., Brander, B.C. and Booman, P. 1992. *Clinical Trends and Basic Research in Animal Reproduction*. Elsevier. Amsterdam, London, New York, Tokyo.
- Djanuar, R. Haryati. Rachmawati, C. Tagama, Taswin R. 1990. *Dasar –Dasar Inseminasi Buatan Pada Ternak Sapi*.
- Devendra, C. Burns, M. 1994. *Produksi Kambing Didaerah Tropis*. ITB Bandung dan Universitas Udayana.
- Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths. Sydney, Boston, London, Durban, Singapore, Wellington.
- Fischel, S. Symond, E.M. 1986. *In vitro Fertilisation Past Present Future*. IRL press Oxford. Washington D.C.

- Ganiswarna, S. G. 1995. Farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animal. 6<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia
- Hardijanto dan Harjopranto. 1994, Ilmu Inseminasi Buatan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto. Sardjito, T. Hernawati, T. Susilowati, S. Suprayogi, T.W. 1999. Penuntun Praktikum Inseminai Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Hardjopranto. S. 1987. Pembuahan In Vitro dan Transfer Embrio. Pidato Pengukuhan Pada Peresmian Penerimaan Jabatan Guru Besar dalam mata kuliah Ilmu Reproduksi Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Hardjopranto. S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press.
- Harper, H. A., Murray. R. K., Granner. D. K, Mayes, P. A, Rodwell, V. M. 1995. Biokimia Harper. 22<sup>nd</sup> ed. Diterjemahkan oleh Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran. ECG. Jakarta.
- Harrison, R. A. P and White, I.G. 1972. Some Method for Washing Spermatozoa from Bull Boar and Ram ; A Comparison Using Biochemical and Other Criteria. Journal Reproduction Fertilitas, Vol 29. 271 -284.
- Hernawati, T. 1998. Peranan Heparin dan Hipotaurin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Hidup dan Motilitas Spermatozoa dan Pembuahan Invitro Pada Sapi Perah. Tesis. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Hinting, A. 1989. Assessment of Human Sperm Fertilizing Ability. Teses submitted in fullfilment of the requirements for the degree of special doctor in reproduction medicine. Rijksuniversiteit Gent. Belgium.

- Hinting, A. dan Marlinata, A. 1981. Beberapa Obat Yang Meningkatkan Energi Spermatozoa. Editor Arsyad, K.M. Prosiding Seminar Spermatogenesis. Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi Indonesia. Surabaya.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Institut Teknologi Bandung, Universitas Udayana.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi ke 2. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Katzung, G. B. 1995. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi ke 6. Alih bahasa Azwar Agoes. Penerbit Buku Kedokteran ECG.
- Krantz, J. C. Jr. and Jellef, C. 1969. Pharmacologic Principles of Medical Practice. 7<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- Kusriningrum, R.S. 1989. Rancangan Acak Lengkap, Diktat Kuliah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lopez, F..J. 2000. Effect of Added Caffeine on Results Following Artificial Insemination With Fresh and Refrigerated Rabbit Semen. Department Production Animal. Madrid. Spain.
- Mutschler, E. 1991. Dinamika Obat. Edisi ke 5. Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Partodihardjo, S. 1982. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara. Jakarta.
- Rees, J. M., Ford, W. J. and Hull, M. G. 1990. Effect of Caffeine and Pentoxifylline on the Motility and Metabolism of Human Spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 90 : 147-156.
- Rimayanti. 1998. Pengaruh Pengenceran Media EBSS dan BO Pada Semen Beku Kambing Etawa Terhadap Kejadian Kebuntingan Kambing Lokal. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Salisbury, G.W. and Vandemark, N.L. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Januar, R. Gajah Mada University Press. Jakarta.
- Satmoko dan Soeradi, O. 1992. Studi Kafein terhadap Kualitas Spermatozoa Manusia In-vitro. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Sinha, M.P. Singh, B.K. 2000. Effect of Methylxanthine on Motility and Fertility of Frozen-Thawed Goat Semen. Department of Gynaecology Ranchi Veterinary College. Bihar. India
- Suhadi, K. 1978. Spermatozoa. Perkumpulan Ahli Andrologi Indonesia. Jakarta.
- Suharno. B. Nazarudin. 1994. Ternak Komersial. Penebar Swadaya.
- Sexton, T.J. 1973. Effect of Centrifugation and Repeated Washing on the Fertilizing Capacity of Fowl Spermatozoa. Journal Reproduction Fertilization. Vol 32. 101 – 104.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.

## Lampiran 1. Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline ( PBS ) – kafein

### I. Pembuatan larutan PBS

Pembuatan larutan PBS terdiri dari dua tahap :

Tahap 1 :  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  66 mg = 0,066 gr

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  60,5 mg = 0,0605 gr

Kedua bahan diatas dicampur dalam 100 ml aquadest, kemudian diaduk disaring dan disimpan dalam pendingin.

Tahap 2 : NaCl 4000 mg = 4 gr

Kcl 100 mg = 0,1 gr

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  575 mg = 0,575 gr

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mg = 0,1 gr

Glukosa 500 mg = 5 gr

Na Pyruvat 18 mg = 0,018 gr

Strep. Sulfat 25 gr = 0,025 gr

Na Penicilin 30,5 mg = 0,0305 gr

Semua bahan dicampur dalam 400 ml aquadest, diaduk dan disaring kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

Semua bahan ( tahap 1 dan tahap 2 ) dicampur dan diaduk jika akan digunakan.

## II. Pembuatan Larutan Kafein 36 mM

Serbuk kafein sebanyak 70 mg dilarutkan dalam pengencer sebanyak 10 ml ( Satmoko, 1992 ). Larutan disimpan di dalam lemari es pada suhu sekitar 5<sup>0</sup> C. Bila larutan akan digunakan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 10 menit.

## III. Pembuatan PBS – Kafein

Larutan kafein 36 mM diencerkan dengan PBS. Pengenceran dilakukan dengan menghitung perbandingan antara larutan PBS dengan kafein 36 mM. Untuk perhitungannya digunakan rumus :

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

Keterangan : M<sub>1</sub> : konsentrasi awal larutan kafein 36 mM

V<sub>1</sub> : volume kafein yang dicari

M<sub>2</sub> : konsentrasi akhir yang diinginkan ( 3 mM, 6 mM, 12 mM )

V<sub>2</sub> : volume larutan yang diinginkan



**Lampiran 2. MOTILITAS SPERMATOZOA.**

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa domba (%) dalam media PBS – kafein.

ulangan	Motilitas Spermatozoa (%)			
	P0	P1	P2	P3
1	50	70	60	40
2	40	60	50	60
3	50	60	40	50
4	40	60	50	50
5	50	60	50	30
6	40	60	50	40

Dari data persentase diatas ditransformasikan :

Ulangan	Motilitas Spermatozoa (%)			
	P0	P1	P2	P3
1	45	56,79	50,77	39,23
2	39,23	50,77	45	50,77
3	45	50,77	39,23	45
4	39,23	50,77	45	45
5	45	50,77	45	33,21
6	39,23	50,77	45	39,23
Jumlah	252,69	310,64	270	252,44
Rata – rata	42,11	51,77	45	42,07
SD	3,16	2,46	3,65	6,12

$$JKT = 709,43$$

$$JKP = 375,21$$

$$JKS = 334,22$$

$$KTP = 125,07$$

$$KTS = 16,71$$

$$F_{\text{HITUNG}} = 7,48$$

### Lampiran 3.

Tabel Analisis Ragam (ANOVA)

SK	Db	JK	KT	F <sub>HITUNG</sub>	F <sub>TABEL</sub>	
					0,05	0,01
Perlakuan	3	375,21	125,07	7,48**	3,10	4,94
Sisa	20	334,22	16,71			
Total	23	709,43				

$$BNT_{\alpha} = \alpha (dbs) \times \sqrt{2KTS \setminus n}$$

$$= t_{5\%} (20) \times \sqrt{2 \times 16,71 \setminus 6}$$

$$= 2,086 \times 2,36 = 4,92$$

Perlakuan	$\bar{x}$	$\bar{x} - P3$	$\bar{x} - P0$	$\bar{x} - P2$	BNT
P1	51,77 <sup>a</sup>	9,7*	9,66*	6,77*	4,92
P2	45 <sup>b</sup>	2,93	2,88		
P0	42,11 <sup>b</sup>	0,04			
P3	42,07 <sup>b</sup>				

Jadi perlakuan P1 menghasilkan motilitas spermatozoa tertinggi yang berbeda sangat nyata dengan perlakuan P2, P0 dan P3. Sedangkan antara perlakuan P2, P0 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata

#### Lampiran 4. HIDUP MATI SPERMATOZOA

Ulangan	Hidup Mati Spermatozoa ( % )			
	P0	P1	P2	P3
1	60	78	73	59
2	67	77	63	63
3	67	76	60	61
4	70	80	76	68
5	83	74	77	68
6	70	84	79	67

Dari data persentase diatas ditransformasikan :

Ulangan	Hidup Mati Spermatozoa ( % )			
	P0	P1	P2	P3
1	50,77	62,03	58,69	50,18
2	54,94	61,34	52,53	52,35
3	54,94	60,67	50,77	51,35
4	56,79	63,44	60,67	55,55
5	65,65	59,34	61,34	55,55
6	56,79	66,42	62,72	54,94
Jumlah	339,88	373,24	346,72	320,1
Rata – rata	56,65	62,21	57,78	53,35
SD	4,93	2,47	4,96	2,32

$$JKT = 543,09$$

$$JKP = 241,11$$

$$JKS = 301,98$$

$$KTP = 80,37$$

$$KTS = 15,09$$

$$F_{\text{HITUNG}} = \frac{KTP}{KTS}$$

$$F_{\text{HITUNG}} = 5,32$$

### Lampiran 5.

Tabel Analisis Ragam (ANOVA)

SK	Db	JK	KT	F <sub>HITUNG</sub>	F <sub>TABEL</sub>	
					0,05	0,01
perlakuan	3	241,11	80,37	5,32**	3,10	4,94
sisa	20	301,98	15,09			
total	23	543,09				

$$\begin{aligned} BNT_{\alpha} &= \alpha (dbs) \times \sqrt{2KTS \setminus n} \\ &= t_{5\%} (20) \times \sqrt{2 \times 15,09 \setminus 6} \\ &= 2,086 \times 2,24 = 4,67 \end{aligned}$$

perlakuan	$\bar{x}$	$\bar{x} - P3$	$\bar{x} - P0$	$\bar{x} - P2$	BNT
P1	62,21 <sup>a</sup>	8,86*	5,56*	4,43	4,67
P2	57,78 <sup>ab</sup>	4,43	1,13		
P0	56,65 <sup>b</sup>	3,3			
P3	53,35 <sup>b</sup>				

Jadi perlakuan P1 menghasilkan persentase hidup spermatozoa tertinggi yang berbeda nyata dengan perlakuan P0, dan P3, tetapi antara perlakuan P1 dan P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Sedangkan antara perlakuan P2 dengan P0 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata.

**Gambar 1. Perbedaan spermatozoa hidup dengan spermatozoa mati**

