



**LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE-Like BATCH III**



Judul Penelitian

**PROFIL DNA SPERMATOZOA SAPI PERAH YANG
MENDAPAT PAPARAN RADIASI SINAR ULTRA VIOLET
DI INDONESIA**

**Sebagai Upaya Awal Pengembangan Sexing Kromosom Untuk
Memperoleh Keturunan Sesuai Harapan**

Oleh :

- ABDUL SAMIK, Drh., M.Si.

BUDI UTOMO, Drh., M.Si.

TJUK IMAM RESTIADI, M.Si., Drh.

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
JANUARI 2005**

**HALAMAN PENGESAHAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE-LIKE BACTH III**

Judul : Profil DNA Spermatozoa Sapi Perah Yang Mendapat Paparan Radiasi Sinar Ultra Violet, Sebagai Upaya Awal Pengembangan Sexing Kromosom Untuk Memperoleh Keturunan Sesuai Harapan

Ketua Peneliti

Nama lengkap : Abdul Samik, M.Si., Drh.
Jenis Kelamin : Laki-laki
Pangkat/Golongan : Penata Tk. I/III-d
NIP : 131 925 904
Jabatan : Lektor
Fakultas/Program Studi : Fakultas Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
Jangka Waktu Penelitian : 8 bulan
Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,00 (Tiga puluh juta rupiah)



Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Dr. Isnidiono, M.S., Drh.
NIP. 130 687 297

Surabaya, 18 Januari 2005
Ketua Peneliti

Abdul Samik, M.Si., Drh.
NIP. 131 925 904

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga

Tjitjik Srie Tjahjandari, Ph.D.
NIP. 131 801 627

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga penulisan laporan penelitian hibah proyek penelitian Proyek Due-Like Batch III dengan judul " Profil DNA spermatozoa sapi perah yang mendapat paparan radiasi sinar ultra violet, sebagai upaya awal pengembangan sexing kromosom untuk memperoleh keturunan sesuai harapan " ini dapat kami selesaikan.

Pada kesempatan ini kami juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Direktur Eksekutif LPIU Proyek Due-Like Batch III
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

Kami menyadari bahwa penulisan laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang sifatnya menyempurnakan sangat kami harapkan. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang bioteknologi reproduksi.

Surabaya, Januari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang Masalah.....	1
1.2. Subyek Penelitian	3
1.3. Lokasi Penelitian	4
1.4. Hasil Yang Diharapkan	4
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	5
2.1. Tujuan Penelitian	5
2.2. Manfaat Penelitian	6
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	8
3.1. Tinjauan tentang Spermatozoa	8
3.2. Spermatogenesis dan Kontrol Endokrin	9
3.3. Tinjauan tentang Kromosom Seks X dan Y	10
3.4. Tinjauan Struktur Molekuler Spermatozoa dan Enzim Restriksi	12
3.5. Tinjauan tentang Sinar Ultra Violet serta Efek Paparannya ...	15
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	21
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	21
4.3. Variabel Penelitian	22
4.4. Definisi Operasional Variabel	22

4.5.	Bahan dan Peralatan Penelitian	23
4.6.	Prosedur Penelitian	24
4.6.1.	Penelitian I	24
4.6.2.	Penelitian II	25
4.7.	Rancangan dan Analisis Statistik	27
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
5.1.	Motilitas Spermatozoa Sapi Perah	29
5.2.	Persentase Hidup Spermatozoa Sapi Perah	30
5.3.	Integritas membran Spermatozoa	31
5.4.	Ukuran Kepala Spermatozoa Kromosom Seks X dan Y.....	36
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	39
6.1.	Kesimpulan	39
6.2.	S a r a n	39
DAFTAR PUSTAKA	45

DAFTAR TABEL

Tabel		Hal
5.1.	Persentase Rataan dan Simpangan Baku Motilitas Spermatozoa Sapi Perah	29
5.2.	Persentase Hidup Spermatozoa Sapi perah	30
5.3.	Rataan dan Simpangan Baku Integritas Membran Spermatozoa setelah Dipapar Sinar Ultra Vuolet dengan Berbagai Jarak Paparan	32
5.4.	Persentase Rataan Ukuran Kepala Spermatozoa Kromosom X dan Y	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Hal
5.1.	Spermatozoa Sapi Perah yang Hidup	31
5.2.	Pengaruh Paparan Radiasi Sinar UV C dengan Panjang Gelombang 254 nm	33
5.3.	Gambaran Integritas Membran Spermatozoa dengan Uji HOST ..	36
5.4.	DNA Spermatozoa Setelah Dipapar Dengan Sinar UV	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Hal
1.	Data Persentase Hasil Pengamatan Integritas Membran Spermatozoa	45
2.	Analisis Statistik Hasil Pengamatan Integritas Membran Spermatozoa	46
3.	Komposisi Pembuatan Medium Hypoosmotic Swelling Test (HOST).....	47
4.	Komposisi Pembuatan Medium BO.....	48
5.	Komposisi Pembuatan Pewarna Eosin-Negrosin.....	49
6.	Prosedur Pemeriksaan Keutuhan Membran Spermatozoa	50
7.	Prosedur Pemeriksaan Persentase Hidup Abnormalitas Spermatozoa	51
8.	Prosedur Pengamatan Motilitas Spermatozoa	52
9.	Abstrak Penelitian Mahasiswa	53

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Bioknologi reproduksi ternak telah berkembang pesat dan pertama kali yang diterima dan dilaksanakan masyarakat peternak adalah teknologi inseminasi buatan. Teknologi ini telah terbukti manfaatnya untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak lokal, namun masih belum mampu memenuhi keinginan peternak untuk mendapatkan pedet yang berjenis kelamin sesuai harapan.

Untuk memenuhi keinginan peternak, telah dilakukan penelitian yang bersifat molekuler dibidang reproduksi yaitu teknik pemisahan spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y. Beberapa yang telah dilakukan adalah pemisahan spermatozoa dengan teknik elektroforesis, sedimentasi, filtrasi dengan sephadex maupun dengan kolom percoll (Mahaputra dkk.,1989; Nurul I.,1994)

Alternatif lain untuk pemisahan spermatozoa adalah melalui pemaparan radiasi sinar UV. Hal ini telah dilakukan oleh Ismudiono dkk. (2001) yang memapar semen beku sapi perah dengan radiasi sinar UV dengan berbagai konsentrasi.

Sampai saat ini masih terus dilakukan pengembangan dan pencarian metode yang lebih baik untuk pemisahan kromosom seks X dan Y dengan kaitannya untuk produksi semen beku yang berkualitas

sesuai harapan juga dimungkinkan untuk produksi embrio yang berjenis kelamin sesuai harapan. Dengan berkembangnya bidang bioteknologi reproduksi akhir-akhir ini maka konsep-konsep perbaikan genetik untuk mendapatkan kualitas ternak yang lebih baik menjadi trend penelitian di beberapa laboratorium. Peluang ini mendekati kenyataan setelah diketahui bahwa spermatozoa yang dipapar dengan sinar UV dapat menggeser rasio kromosom seks X lebih besar dibandingkan Y (Ismudiono,dkk,2001). Selain itu hasil penelitian Fatchiyah (1995) pada mencit tentang pengaruh radiasi sinar UV terhadap seks rasio anak mencit dinyatakan bahwa dengan konsentrasi pemaparan yang berbeda diperoleh rasio anak mencit jenis kelamin betina lebih besar daripada yang berjenis kelamin jantan. Penelitian ini dapat menjadi langkah awal untuk memperoleh pedet betina sesuai yang diharapkan peternak sapi perah, namun apakah hasil paparan optimum terhadap semen sapi perah dapat merusak DNA spermatozoa ?. Sehingga menjadi sangat penting untuk mempelajari konsentrasi minimum paparan sinar UV yang tidak merusak struktur biomolekul khususnya DNA spermatozoa.

Bertitik tolak dari permasalahan tersebut, maka tujuan jangka pendek dari serangkaian penelitian ini adalah mengembangkan bentuk-bentuk riset melalui kajian bioteknologi, meliputi aspek-aspek : karakterisasi fragmen DNA spermatozoa sapi perah setelah dipapar dengan sinar UV, karakterisasi tingkat kerusakan fragmen DNA spermatozoa. Penelitian yang telah dilakukan oleh Ismudiono, dkk (2001)

tentang pemisahan kromosom spermatozoa sapi perah menggunakan sinar UV didapatkan data bahwa rasio kromosom sex X lebih besar dibandingkan Y berdasarkan diameter ukuran kepala spermatozoa. Namun masih belum dikaji sejauh mana konsentrasi paparan sinar UV dapat merusak struktur biomolekul dari spermatozoa yang berupa protein maupun asam nukleat, sehingga melalui penelitian yang diajukan ini dapat mengetahui konsentrasi paparan sinar UV minimum yang tidak mengganggu kualitas biomolekul spermatozoa dikaitkan dengan hasil penelitian terdahulu. Sedangkan tujuan jangka panjangnya adalah memproduksi semen beku yang mengandung spermatozoa berkromosom seks X dan Y untuk mendukung program perbaikan mutu genetik serta peningkatan produktivitas ternak melalui teknologi inseminasi buatan dan transfer embrio.

1.2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah radiasi sinar ultra violet sebagai bahan pemapar dan profil DNA dari kromosom seks X dan Y spermatozoa yang berasal dari semen sapi perah. Spermatozoa sapi perah yang berasal dari semen beku mendapat paparan sinar UV dengan panjang gelombang 360 nm dengan konsentrasi yang berbeda. Karakterisasi fragmen DNA spermatozoa sapi perah hasil paparan Sinar UV.

Penelitian ini meliputi aspek :

- a. Karakterisasi fragmen DNA spermatozoa sapi perah

- b. Karakterisasi tingkat kerusakan fragmen DNA spermatozoa sapi perah
- c. Penentuan spermatozoa berkromosom seks X dan Y sapi perah
- d. Produksi semen beku pilih kelamin

1.3. Lokasi Penelitian

1. Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Di Kedamean Gresik untuk memperoleh semen sapi perah, melakukan pemaparan dengan sinar UV, pemeriksaan integritad membran dengan media Host
2. Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Unair untuk karakterisasi fragmen DNA spermatozoa

1.4. Hasil yang Diharapkan

- Waktu terpendek yang masih dapat menggeser rasio kromosom seks X dan Y spermatozoa sapi perah
- Produksi semen beku pilih kelamin pada sapi perah
- Peningkatan populasi sapi perah yang berjenis kelamin tertentu sesuai harapan petemak

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut :

Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah

- Untuk mengetahui apakah paparan sinar UV pada semen sapi perah mampu menggeser rasio kromosom seks X dan Y
- Untuk mengetahui konsentrasi minimum paparan sinar UV pada semen sapi perah yang masih mampu menggeser rasio kromosom seks X dan Y
- Untuk mengetahui konsentrasi minimum paparan sinar UV pada spermatozoa terhadap kualitas struktur biomolekuler berdasarkan fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi.

Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah

- Memproduksi semen beku yang mengandung spermatozoa pembawa kromosom seks tertentu sesuai harapan

- Mendukung program perbaikan mutu genetik dan peningkatan produktivitas ternak melalui teknik inseminasi buatan dan transfer embrio.

2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi :

- Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji peran sinar ultra violet dalam menggeser rasio kromosom seks X dan Y, isolasi dan karakterisasi fragmen DNA spermatozoa setelah mendapat paparan sinar UV, penentuan spermatozoa berkromosom seks X dan Y.
- Peternak sapi, sebagai bahan informasi tentang penggunaan semen beku yang mengandung spermatozoa pembawa kromosom seks tertentu dalam usaha meningkatkan kualitas dan kuantitas sapi perah
- Pemerintah, sebagai bahan pertimbangan dalam pengembangan inseminasi buatan dan transfer embrio, terutama pemakaian semen beku yang mengandung spermatozoa pembawa kromosom seks tertentu sehingga dimasa mendatang dapat memproduksi embrio dengan jenis kelamin tertentu.

- Instansi Penyuluhan, sebagai masukan dan bahan tambahan informasi dalam materi penyuluhan khususnya dalam memasyarakatkan program inseminasi buatan.
- Pengelola Proyek Pembangunan Pertanian/Peternakan, sebagai bahan informasi yang dapat digunakan untuk mendukung implementasi kebijakan yang telah ada.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Tinjauan Tentang Spermatozoa

Semen terdiri dari bagian yang padat dan bagian yang cair. Bagian yang padat mengandung banyak sel spermatozoa sedang bagian cair sebagian besar berasal dari kelenjar asesoris. (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994)

Spermatozoa merupakan sel yang sudah sangat terspesialisasi serta tidak mengalami pertumbuhan lagi. Morfologi spermatozoa normal menurut Partodihardjo (1992) adalah kepala lonjong dengan batas teratur dan topi akrosom yang menutup lebih dari 1/3 permukaan kepala. Panjang kepala 8 – 9 mikron serta lebar berkisar antara 2 – 3 mikron. Ukuran lebar harus antara $\frac{1}{2}$ dari $\frac{2}{3}$ ukuran panjang. Bagian tengahnya berbentuk ramping dan berukuran kurang dari 1/3 lebar kepala dan batasnya teratur. Bagian tengah terletak pada satu sumbu dengan poros panjang kepala, berukuran antara 11 – 12 mikron. Ekor spermatozoa berbentuk ramping, tidak tergulung dan batasnya teratur. Panjang ekor kira-kira 45 – 50 mikron.

Kepala spermatozoa berbentuk lonjong terutama dibentuk oleh adanya nucleus, pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom yaitu merupakan suatu struktur yang berbentuk topi yang menutupi dua pertiga bagian anterior kepala spermatozoa. Bagian

akrosom mengandung beberapa enzim hidrolitik antara lain hialuronidase, akrosin, coronary penetrating enzyme (CPE) yang penting untuk penembusan telur pada proses fertilisasi. (Hafez, 1993).

3.2. Spermatogenesis

Testis merupakan bagian dari alat reproduksi jantan yang mempunyai dua fungsi yaitu memproduksi sel spermatozoa dan memproduksi hormon kelamin jantan yaitu testoteron, yang berperan penting dalam sistem reproduksi jantan. Semen adalah cairan atau suspensi semigelatin selular yang mengandung gamet jantan (spermatozoa) dan sekresi dari organ asesori saluran reproduksi jantan (seminal plasma). Spermatozoa dihasilkan dari tubulus seminiferus dalam testis (Hafez, 2000).

Spermatogenesis adalah proses di mana sel spermatozoa dibentuk. Proses ini terjadi di tubulus seminiferus. Spermatogenesis dapat dibagi menjadi dua fase. Pertama, spermatositogenesis merupakan serangkaian perubahan spermatogonia menjadi spermatid. Kedua, spermiogenesis adalah fase dimana spermatid mengalami metamorfosis menjadi spermatozoa lengkap mulai dari bagian akrosom, kepala, leher sampai bagian ekor. Setelah dibentuk di tubulus seminiferus, spermatozoa akan diperkuat melalui rete testis dan vas efferens lalu masuk ke epididimis (*epididymal maturation*), dan selama proses perjalanannya tersebut spermatozoa mengalami perubahan kapasitas sehingga mampu

melakukan fertilisasi (Bearden and Fuquay, 1992). Spermatozoa yang dihasilkan terbagi menjadi dua macam kromosom seks yaitu spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y. Spermatozoa pembawa kromosom X akan menghasilkan betina sedangkan spermatozoa pembawa kromosom Y akan menghasilkan pejantan (Hafez, 2000).

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 sedang LH merangsang pembentukan hormon testosteron oleh sel Leydig. Testosteron berperan merangsang spermatogenesis pada tahap akhir (Bearden dan Fuquay, 1992).

3.3. Tinjauan tentang Kromosom Sex X dan Y

Kromosom pertama kali ditemukan oleh Waldeyer tahun 1888 dan dideskripsikan sebagai benang – benang yang ada di dalam nukleus (inti). Kromosom berasal dari bahasa Latin yang berarti suatu benda yang dapat mengikat zat warna. Bahan yang menyusun kromosom adalah kromatin. Jumlah kromosom yang dimiliki oleh tiap – tiap spesies adalah tetap. Oleh karena itu, susunan kromosom mempunyai arti penting dalam penentuan filogeni dan taksonomi suatu spesies. (Emery dan Mueller, 1988; Suryo, 1990).

Kromosom seks (kromosom kelamin) pada spermatozoa berasal dari pembelahan meiosis spermatogenesis. Pada mammalia setengah

dari jumlah spermatozoa mempunyai kromosom seks X dan setengahnya lagi mempunyai kromosom seks Y (Nalbandov, 1990).

Hewan betina mempunyai dua kromosom seks yang sama yaitu X dan X sedangkan pejantan mempunyai dua kromosom seks yang berbeda yaitu kromosom X dan yang lebih kecil adalah kromosom Y (Hafez, 2000).

Semua oosit membawa kromosom X karena kromosom seks betina hanya kromosom X. Tetapi tiap sel spermatozoa membawa salah satu dari dua kromosom yaitu kromosom X atau kromosom Y, karena pejantan mempunyai satu dari masing-masing kromosom dan salah satu dari keduanya berkesempatan menembus sel telur sehingga dapat ditunjukkan rasio jantan dan betina dalam musim kawin harus 1 : 1.

Pada testis sapi, spermatozoa pembawa kromosom X dan Y diproduksi dalam jumlah yang sama. Spermatozoa pembawa kromosom X akan menghasilkan betina sedangkan spermatozoa pembawa kromosom Y akan menghasilkan pejantan (Hafez, 2000). Sel spermatozoa pembawa kromosom seks Y lebih kecil daripada spermatozoa pembawa kromosom seks X (Gordon, 1994).

Secara normal kromosom seks bertanggung jawab terhadap penentuan jenis kelamin anak yang dihasilkan dari proses fertilisasi antara kromosom haploid (n) sel spermatozoa dan kromosom haploid (n) sel telur, yang melebur membentuk kromosom diploid ($2n$). Sapi memiliki 30 pasang (60 buah) kromosom yang terdiri dari 29 pasang (58 buah) merupakan autosom (kromosom tubuh) dan satu pasang (2 buah)

genosom (kromosom kelamin). Bagian nukleus kepala sel spermatozoa terisi oleh benang – benang kromatin, yang merupakan bagian yang bertanggung jawab terhadap sifat kebakaan, mengandung 43 % DNA dan 57 % arginin (protein) (Salisbury, 1985).

Kesamaan gen yang dimiliki oleh masing – masing kromosom X dan kromosom Y sebanyak 19 gen. Kesamaan dari 19 gen tersebut pada masing – masing kromosom X dan kromosom Y, salah satunya disebabkan oleh posisi geografis gen yang sama pada kromosom (Page and Lahn, 1999) .

Statistik kelahiran sedikit menunjukkan hasil yang berbeda dari yang diperkirakan, dengan 106 pejantan lahir dari setiap 100 betina. Dari hal tersebut dapat disimpulkan bahwa kelahiran pejantan lebih banyak karena spermatozoa pembawa kromosom Y dapat mencapai oosit terlebih dahulu karena mereka tidak harus membawa kromosom X yang besar dan berat (Martini, 2001). Secara teori, 50% dari hasil ejakulasi spermatozoa mengandung kromosom X dan 50% mengandung kromosom Y, pada dasar populasi akan mengakibatkan jumlah yang sama dari musim kawin antara pejantan dan betina (Bearden dan Fuquay, 1992).

3.4. Tinjauan Struktur Molekuler Spermatozoa serta Enzim Restriksi

Untuk memproduksi embrio, sangat dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa dan sel telur, sedangkan penentuan kualitas seks sangat ditentukan oleh spermatozoa (Greve *et al.*,1987; Gordon,1994; Hyttel *et*

al.,1997). Didalam inti spermatozoa terkandung kromosom yang diantaranya terdiri protein dan asam nukleat. Salah satu jenis asam nukleat yang berperan sebagai materi genetik yang menurunkan sifat tertentu dari satu generasi ke generasi turunannya disebut Deoksiribonucleic Acid (DNA). Unit penyusun DNA adalah nukleotida yang tersusun dari gugus fosfat, basa nitrogen dan gula pentosa. Basa nitrogen berasal dari kelompok purin, adenin dan guanin serta pirimidin, sitosin dan timin (Suryo,1995; Toha, 2001).

Secara umum struktur DNA mempunyai bagian yang disebut gen struktural yaitu rangkaian nukleotida yang menyusun spesifikasi urutan asam amino pada polipeptida. Peran dan fungsi DNA terutama ditentukan oleh gen-gen pada kromosom, partikel DNA yang berasosiasi dengan protein histon yang terdapat didalam inti (Noor,2000).

Pembelahan meiosis selama proses spermatogenesis akan menghasilkan sel spermatozoa haploid artinya mengandung setengah jumlah DNA pada sel-sel somatik. Sel spermatozoa yang terbentuk terbagi menjadi dua macam kromosom seks yaitu spermatozoa dengan kromosom seks X dan kromosom seks Y. Spermatozoa pembawa kromosom seks X akan menghasilkan individu betina sedang pembawa kromosom seks Y akan menghasilkan individu jantan (Noor, 2000; Toha,2001).

Untuk mengetahui adanya kerusakan di tingkat DNA spermatozoa maka dapat dilakukan pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Enzim

restriksi ini berfungsi untuk menghidrolisis ikatan antara nukleotida pada DNA. Spesifisitas kemampuan hidrolisis nuclease pada posisi internal untaian dinamakan endonuklease dimana dihasilkan oligonukleotida, sedang yang melakukan hidrolisis hanya pada ikatan nukleotida yang berada pada ujung 5 dan 3, enzim ini disebut eksonuklease yang dapat menghasilkan mononukleotida (Adam, *et al.*1992).

Penanda genetic dapat terletak pada setiap tempat pada gen dan terdapat variasi dalam sekuen DNA yang dapat dideteksi sebagai perbedaan antara individu. Jika perbedaan itu jarang disebut dengan mutasi. Pada saat mutasi akan merubah sekuen nukleotida dalam tempat pembelahan enzim restriksi sehingga enzim tersebut tidak dapat mengenali lagi tempat pembelahannya, selain itu mutasi memungkinkan terbentuknya tempat pembelahan baru.

Mutasi ini dihasilkan secara beragam dalam panjang fragmen DNA yang diproduksi oleh bermacam enzim restriksi. Enzim restriksi ini dapat memotong DNA dupleks pada tempat yang spesifik. Setiap enzim restriksi memiliki target tertentu biasanya sekuen spesifik dengan panjang antara 4 – 6 pasangan basa. Enzim restriksi mempunyai tiga tipe yang berlainan. Tipe pertama dapat berinteraksi dengan urutan rekognisi yang tidak termodifikasi pada DNA dupleks, kemudian terdeteksi bersama molekul DNA setelah berjalan melalui suatu jarak dengan 1000 dan 5000 nukleotida. Tipe kedua mengenali urutan sasaran khusus dalam molekul DNA dupleks dan mematahkan rantai polinukleotida di dalam. Tipe ketiga

memiliki aktivitas restriksi dan modifikasi yang diekspresikan secara simultan, aksinya membutuhkan ATP saat terikat di tempatnya pada DNA (Aulanni'am,2004).

Restriction Fragment Length Polymorphism atau RFLP dipetakan seperti penanda genetic lainnya yang mensegregasi sebagai penanda genetic kodominan. RFLP dapat divisualisaikan secara langsung saat fragmen dalam DNA dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa dengan pewarnaan ethidium bromida dan dilihat dengan UV transiluminator. Metode RFLP ini memiliki beberapa keuntungan yaitu : 1. RFLP dapat dikenali pada keadaan homosigot atau heterosigot pada keadaan kodominan.2. Pola RFLP tidak dipengaruhi oleh keragaman lingkungan.3. RFLP diidentifikasi pada semua jaringan di berbagai tingkat pertumbuhan. 4. hanya membutuhkan sedikit jaringan (Aulanni'am,2004).

3.5. Tinjauan Tentang Sinar Ultra Violet Serta Efek Paparannya

Sinar ultra violet merupakan suatu gelombang elektromagnet dan termasuk salah satu spektrum dari cahaya polikromatis yang dipancarkan oleh sinar matahari, sebagai sumber utama radiasi, dengan rentang panjang gelombang 100 nm – 400 nm dan frekuensi 8×10^{14} – $3,4 \times 10^{16}$ Hz (Hecht, 1990). Sinar ultra violet dapat ditahan oleh atmosfer bumi pada 2 lapisan yaitu : stratospheric dan tropospheric (Longstreth, 1991). Kedua lapisan tersebut mengandung lapisan ozon (O_3) yang berguna sebagai anti radiasi sinar ultra violet.

Kekuatan radiasi sinar UV ditentukan dengan panjang gelombang dan frekuensi yang dimiliki. Dengan semakin bertambahnya tingkat radiasi sinar UV terhadap lapisan ozon, menjadi perhatian serius terhadap kehidupan makhluk hidup. Penurunan sebesar 10% terhadap lapisan ozon akan mengakibatkan peningkatan sebesar 15 – 20% masuknya radiasi sinar UV (WHO *Environmental Health Criteria*, 1994). Radiasi yang dikeluarkan oleh sinar UV adalah jenis radiasi non – ionisasi (*non – ionizing radiation*), energi foton yang dimiliki diperkirakan 3,2 – 100 elektronvolt (eV) dengan rata-rata 12 eV dalam rentang panjang gelombang tersebut diatas.

Berdasarkan rentang panjang gelombangnya, maka sinar UV ini ada di bawah panjang gelombang *visible light* (cahaya tampak), tetapi masih diatas panjang gelombang *X – ray* (sinar X) (Beehler, 1992).

Sinar ultra violet menurut Beehler (1992) terbagi atas tiga bagian panjang gelombang, antara lain :

1. *Long wave* (panjang gelombang panjang) = **UV A**

Mempunyai panjang gelombang antara 320 – 400 nm, dengan puncak 365 nm. Disebut juga sinar UV 365 nm. Daerah spectrum A termasuk sebagian besar dari radiasi UV, sering disebut *black light*. Spektrum gelombang ini sama sekali tidak terserap oleh ozon.

2. *Medium wave* (panjang gelombang menengah) = **UV B**

Mempunyai panjang gelombang antara 280 – 320 nm, dengan puncak 312 nm. Disebut juga sinar UV 312 nm. Karakteristiknya menyebabkan efek erythema atau pelepuhan.

3. *Short wave* (panjang gelombang pendek) = UV C

Mempunyai panjang gelombang antara 180 – 280 nm, dengan puncak 254 nm. Disebut juga sinar UV 254 nm. Karakteristiknya mempunyai efek bakterisidal sangat tinggi sehingga sering digunakan untuk sterilisasi, tetapi sangat berbahaya bagi mata dan kulit. Spektrum gelombang ini terserap sempurna oleh ozon.

Sumber sinar ultraviolet buatan biasa digunakan pada bidang kedokteran, industri, perdagangan, dan penelitian, bahkan beberapa diantaranya berakibat radiasi lebih besar pada manusia dibandingkan sumber dari matahari. Beberapa contoh sumber sinar ultraviolet buatan tersebut antara lain : lampu merkuri, lampu xenon, lampu hydrogen dan deuterium, lampu fluoresen, dan laser. Pada beberapa sumber radiasi sinar ultraviolet buatan, kecuali pada laser, menghasilkan spektrum UV yang mempunyai karakteristik tertentu, yaitu panjang gelombang yang digunakan adalah puncaknya, sehingga terkadang dapat dianggap cahaya monokromatis (WHO *Environmental Health Criteria*, 1994).

Peranan biologis radiasi sinar ultra violet sukar diperkirakan. Spektrum elektromagnetik matahari mengandung sejumlah energi penting dalam rentang pita ini. Para ahli Biologi mengemukakan bahwa radiasi sinar ultra violet dipermukaan bumi ini berperan menghasilkan senyawa

organik yang pertama di danau – danau primitif dan daerah pasang surut. Penembusan cahaya ultra violet dalam atmosfer awal disebabkan oleh adanya ozon (O₃) (Ackerman dkk., 1988).

Protein dan asam – asam nukleat juga merupakan penyerap cahaya ultra violet yang kuat, terutama terhadap cahaya ultraviolet dengan panjang gelombang pendek. Penyerapan ini begitu karakteristik sehingga dapat digunakan untuk menentukan dengan cermat adanya berbagai makromolekul spesifik (Ackerman dkk., 1988).

Sinar ultra violet adalah salah satu dari jutaan penyebab terjadinya perubahan yang ada di muka bumi. Ini berkaitan dengan mudahnya sinar ultra violet diserap oleh sel tubuh sehingga mampu membuat sel tubuh berubah. Radiasi sinar ultra violet secara luas telah digunakan dalam berbagai penelitian terutama tentang mutasi gen dan kanker (Darnell dkk., 1990).

Asam–asam nukleat juga merupakan penyerap sinar ultra violet yang kuat, sehingga memudahkan terjadinya mutasi genetik yang diakibatkan radiasi sinar ultraviolet. Mutasi gen pada gen dominan akan menyebabkan perubahan pada individu dan keturunannya. Sedang bila mutasi terjadi pada gen resesif, gen mutan pada generasi berikutnya tersembunyi (Pai, 1992).

Pada studi eksperimental efek paparan radiasi sinar ultraviolet terhadap hewan coba, ternyata menyebabkan efek kronis seperti kanker dan erythema pada kulit, katarak, fotokeratitis, rusaknya epitel kornea, dan

bermacam – macam efek pada retina sedangkan efek sistem imun yaitu menghambat terbentuknya proteksi imunitas terhadap beberapa macam infeksi. Pengamatan lebih lanjut yang tampak setelah percobaan pemaparan radiasi sinar ultraviolet terhadap sel prokaryotik dan sel eukaryotik adalah adanya kematian sel, perubahan kromosom, mutasi, dan tranformasi morfologi. Beberapa gen yang berbeda dan virus – virus (termasuk HIV) dapat teraktivasi akibat radiasi sinar UV. Tetapi gen – gen yang teraktivasi oleh UV–B dan UV–C berbeda dengan yang teraktivasi oleh UV–A (WHO *Environmental Health Criteria*, 1994).

UV–B dengan panjang gelombang 280–320 nm, diserap kuat oleh DNA dan menyebabkan kerusakan sebagian genetik (Joux, 1999). UV–A dengan panjang gelombang 320–400 nm, secara tidak langsung menyebabkan sedikit kerusakan rantai DNA, lipids, dan protein (Joux, 1999), tetapi sangat penting dalam perbaikan DNA selular dan fungsi biologis untuk membantu menggerakkan dan memperbaiki kasus kerusakan yang disebabkan oleh radiasi sinar UV–B (Kaiser & Herndl, 1997). UV–C dengan panjang gelombang 180–280 nm paling efektif diserap oleh DNA dan telah ditemukan tidak menunjukkan efek kerusakan pada DNA.

Sinar ultraviolet membuat efek teratogen yang mampu merubah susunan kimia maupun susunan biologi sel–sel penyusun tubuh makhluk hidup (Feldman, 1997). Radiasi sinar UV–B, sebagaimana telah diketahui, merupakan penyebab efek *skin carcinogen*, yang kemudian

mempengaruhi sistem imunitas tubuh (Kraemer *et al.*, 1984). Efek pada umumnya terjadi pada kulit dan mata, sebab kedua organ tersebut mampu menyerap sempurna radiasi sinar ultra violet yang secara langsung maupun tidak langsung mengenai kedua organ tersebut. (Curtis, 1999).

Telah diutarakan bahwa radiasi mempunyai sifat merusak. Paparan radiasi sinar UV-A selama 2 menit pada spermatozoa manusia dapat menyebabkan paralysis sel dan selama 7 menit menyebabkan kematian sel (Konig *et al.*, 1996). Dalam penelitiannya, Bordignon dan Smith (1999) mendapatkan efek dari paparan sinar UV selain dapat menyebabkan kerusakan pada kromatin juga pada komponen – komponen sperma yang lain, seperti mitokondria dan integritas membran. Sedangkan menurut Cozzi *et al.* (2001), akibat dari adanya *heat shock* pada suhu 56° C selama 30 menit pada spermatozoa tikus dapat menyebabkan perubahan akut pada membran plasma dan akrosom.

Radiasi sinar ultra violet pada spermatozoa akan mampu merusak gen-gen yang melingkupi spermatozoa dan dikatakan pula bahwa spermatozoa yang terkena radiasi ultra violet masih mampu mengaktifkan dan membentuk pronuklei jantan serta mensintesis DNA akan tetapi tidak dapat mendukung pembelahan dan perkembangan embrio secara *in vitro* (Hughes *et al.*, 1995). Selanjutnya berdasarkan penelitian Rooij *et al.* (2002) tentang kera rhesus jantan belum dewasa yang mendapat radiasi dengan dosis 4 – 8,5 Gy pada bagian testes dan epididimis menunjukkan kerusakan hampir pada semua sel germinal.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Penelitian pertama, pengambilan semen, pemaparan semen dengan berbagai jarak menggunakan sinar UV dilakukan di laboratorium semen beku di Taman Ternak Pendidikan Kedamean Gresik, Karakterisasi fragmen DNA spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y serta karakterisasi tingkat kerusakan fragmen DNA spermatozoa dengan menggunakan enzim restriksi dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Unair . Penelitian kedua, produksi semen beku sapi perah yang berkualitas yang mengandung spermatozoa seks X dan Y dilakukan di laboratorium semen beku di Taman Ternak Pendidikan.

Penelitian ini dilakukan selama enam bulan, dimulai pada bulan Juli sampai dengan bulan Desember 2004.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian tahap pertama adalah sapi perah jantan dari Taman ternak Pendidikan Kedamean Gresik untuk penyediaan semen sedangkan sampel penelitian nya adalah semen sapi perah .

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1 Penelitian I

Variabel Bebas (independent variable)

- berbagai jarak pemaparan sinar UV
- berbagai lama waktu pemaparan sinar UV

Variabel tergantung (dependent variable)

- rasio kromosom seks x dan y
- tingkat kerusakan DNA spermatozoa

Variabel kendali

- umur sapi perah,

4.3.2 Penelitian II

Variabel bebas (independent Variable)

- berbagai konsentrasi spermatozoa hasil seksing

Variabel tergantung (dependent variable)

- ratio spermatozoa kromosom seks X dan Y post thawing

Variabel kendali

- bahan pengencer dan suhu

4.4. Definisi Operasional Variabel

- a. Hioosmotic swelling test (HOST) adalah uji yang digunakan untuk melihat keutuhan membran spermatozoa berdasarkan jumlah spermatozoa yang menggembung dibagi dengan total spermatozoa dikalikan 100%

- b. Sinar Ultra Violet adalah gelombang elektromagnetik yang termasuk salah satu spectrum cahaya polikromatis yang menimbulkan radiasi non ionisasi, mempunyai rentang panjang gelombang 100 – 400 nm.
- c. Sinar UV gelombang pendek adalah pancaran sinar uv dengan panjang gelombang antara 180 – 280 nm dengan puncaknya 254 nm yang mempunyai efek paling kecil, efektif diserap oleh DNA dan tidak menunjukkan efek kerusakan pada DNA
- d. Jarak paparan UV adalah berbagai jarak pemaparan sinar UV yang diamati yang diharapkan dapat memisahkan spermatozoa kromosom seks X dan Y tanpa menimbulkan efek kerusakan DNA.

4.5. Bahan dan Peralatan Penelitian

Bahan dan reagen yang dipakai pada penelitian pertama antara lain adalah semen segar sapi perah , medium bracket and Oliphant (BO), kafein, sodium benzoat, gentamycin sulfat, fructose, Na sitrat, aquabidest steril, eosin-negrosin,

Bahan yang digunakan pada penelitian kedua adalah spermatozoa hasil paparan pembawa kromosom seks, , TBE (Tris buffer EDTA), Agarose, TEN (Tris RDTA NaCl), EtbR (Ethidium Bromida), Loading Dye, enzim restriksi (EcoR1, Pst1,dan Ava II) , ethanol, Marker DNA . Peralatan yang digunakan pada penelitian pertama adalah incubator CO2, mikroskop inverted, mikroskop cahaya, refrigerator, lamonar flow,

obyek glass, cover glass, gelas ukur, ktabung gelas berskala, sentrifuse, beker gelas, Erlenmeyer, mikropipet otomatis, vagina buatan sapi, spuit disposibel, glove.

Alat yang dipakai pada penelitian kedua adalah seperangkat alat gelas, centrifuge dingin, microtube, mikro pipet, dialisis tabung, kolom kromatografi, Mini-Gel Biorad elektroforesis horizontal app., spektrofotometer, Biorad Gen Cyclor, Trans illuminator UV, vortex, stirrer dan inkubator.

4.6. Prosedur penelitian

4.6.1. Penelitian I

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

- Pemaparan semen sapi perah dengan berbagai konsentrasi sinar UV.
- Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dengan media HOST

Pemaparan semen serta pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dengan HOST

Semen segar sapi perah yang diperoleh dengan vagina buatan sebanyak 4 cc diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis setelah itu dibagi secara acak menjadi 4 perlakuan berdasarkan jarak pemaparan. Kelompok I dipapar dengan sinar UV dengan jarak 15 cm, Kelompok II dipapar sinar UV dengan jarak 20 cm dan kelompok

III dipapar sinar UV dengan jarak 25 cm pada semua perlakuan disinari selama 5 menit. Selanjutnya semen dicuci dengan media BO, sebanyak 3 cc, sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Kemudian dilakukan pemeriksaan integritas membran menggunakan media HOST. Selanjutnya semua semen hasil pemaparan sinar UV dengan berbagai jarak dilakukan penyaringan dengan sephadex G-75 kemudian dilakukan karakterisasi fragmen DNA spermatozoa.

4.6.2 Penelitian II adalah :

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

- Isolasi dan Karakterisasi DNA Spermatozoa Pembawa Kromosom Seks Hasil Paparan sinar beberapa variasi konsentrasi sinar UV
- Produksi semen beku sapi perah yang berkualitas yang mengandung spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y sesuai harapan

Isolasi dan Karakterisasi Fragment DNA Spermatozoa

- Semen segar sapi perah sebanyak 1 cc + PBS 1 cc ditambahkan secara perlahan ficoll histopaque sampai membentuk lapisan selanjutnya sentrifus 1500 rpm selama 20 menit

- Lapisan yang mengandung spermatozoa dipipet perlahan ditambah dengan PBS (pH 7,4) kemudian sentrifus 1500 rpm selama 20 menit
- Endapan yang timbul divortex dan disentrifus 1500 rpm selama 20 menit
- Endapan yang terbentuk ditambah dengan K-buffer dan diinkubasi pada suhu 56°C selama 45 menit
- Selanjutnya ditambah etanol : kloroform (2 : 48 ml), kemudian divortex
- Lapisan atas yang terbentuk adalah lapisan DNA ditambah dengan etanol dingin 2 kali volume lapisan atas, sentrifus 2000 rpm selama 5 menit, simpan dalam lemari es semalam bila belum terlihat endapan etanol dibuang lalu ditambahkan Tris EDTA
- Selanjutnya simpan dalam freezer dan digunakan untuk proses karakterisasi menggunakan gel agarose
- Larutan agarose (bubuk agarose + TBE) dituangkan dalam bak elektroforesis diamkan sampai terbentuk gel. Dinding kaca dan sisir dicabut lalu tuangkan TBE sampai agar terendam
- Injeksikan campuran 5 ul sampel DNA dengan loading dye, selanjutnya di running pada 80 volt dan 40 mA selama 65 menit, kemudian rendam agar direndam dalam propidium promide selama 20 menit, cuci dengan air kran mengalir

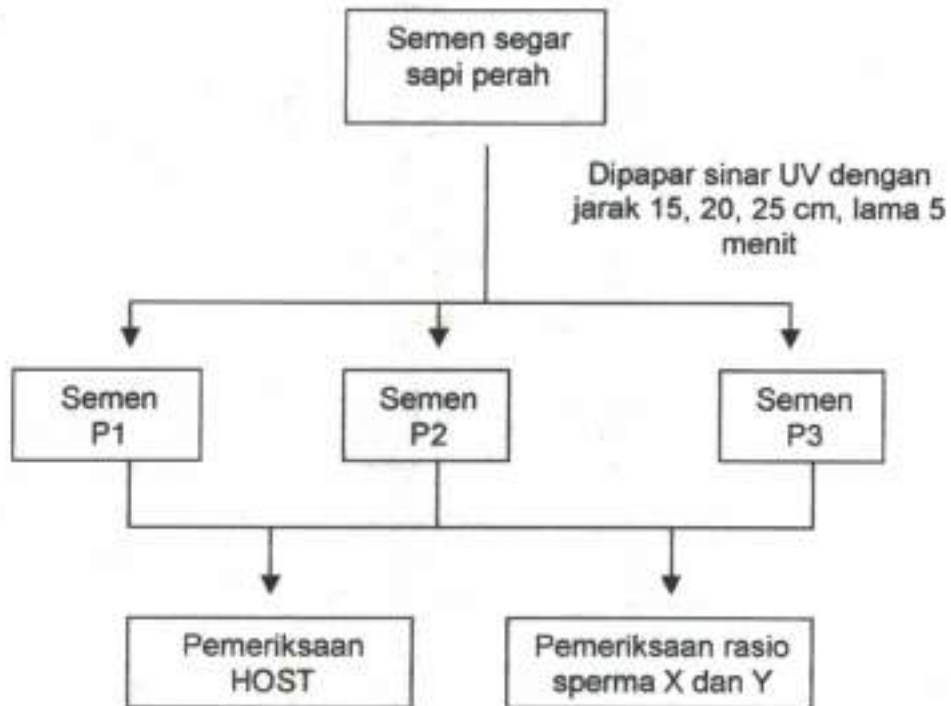
- Gel agarose hasil running diletakkan diatas trans iluminator UV dan difoto polaroid.bandingkan harga RF nya denga RF marker DNA (modifikasi metode Muladno,2000)

4.7. Rancangan dan Analisis Statistik

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap sedang analisis datanya menggunakan Anova satu arah (Sarmanu,1990)

Kerangka Penelitian

Tahap I



Tahap II



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5. 1. Motilitas Spermatozoa Sapi Perah

Rataan motilitas spermatozoa pada Perlakuan 2, Perlakuan 3 setelah dipapar dengan sinar UV panjang gelombang pendek dengan jarak paparan 15, 20 dan 25 cm dapat dilihat data selengkapnya pada tabel 5.1. dibawah ini.

Tabel 5.1. Persentase rataan dan simpangan baku motilitas spermatozoa sapi perah

Jarak paparan sinar UV	Rataan dan simpangan baku motilitas spermatozoa
Kontrol (P0)	59,44 ^a ± 3,64
15 cm (P1)	52,02 ^b ± 4,94
20 cm (P2)	54,38 ^a ± 3,29
25 cm (P3)	56,91 ^a ± 4,48

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Berdasarkan perhitungan rata-rata dan simpangan baku dari motilitas spermatozoa dengan taraf signifikansi 5% menunjukkan persentase rataan motilitas spermatozoa setelah menerima radiasi dari proses pemaparan dengan sinar UV tidak terdapat perbedaan nyata antara kelompok kontrol dengan P2 dan P3 tetapi berbeda nyata antara kelompok kontrol dengan P1.

Salah satu faktor keberhasilan dalam fertilisasi in vitro adalah motilitas spermatozoa . metode visual dapat digunakan untuk menilai

motilitas spermatozoa yang tersebar diseluruh sampel semen (Salisbury, 1985). Menurut Irawan (2000) kriteria penilaian tingkat motilitas adalah 80 – 100% : baik sekali, 60 – 80% : baik, 40 – 60% : cukup baik dan 20 – 40% : jelek. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin dekat jarak subyek dengan sumber radiasi maka akan menurunkan motilitas spermatozoa ini dapat dilihat pada kelompok kontrol ($59,44 \pm 3,64$) yang berbeda nyata dengan P1 ($52,02 \pm 4,94$).

5.2. Persentase Hidup Spermatozoa Sapi Perah

Persentase rataan daya hidup spermatozoa menunjukkan perbedaan nyata antara perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III dengan kelompok kontrol . hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 5.2.

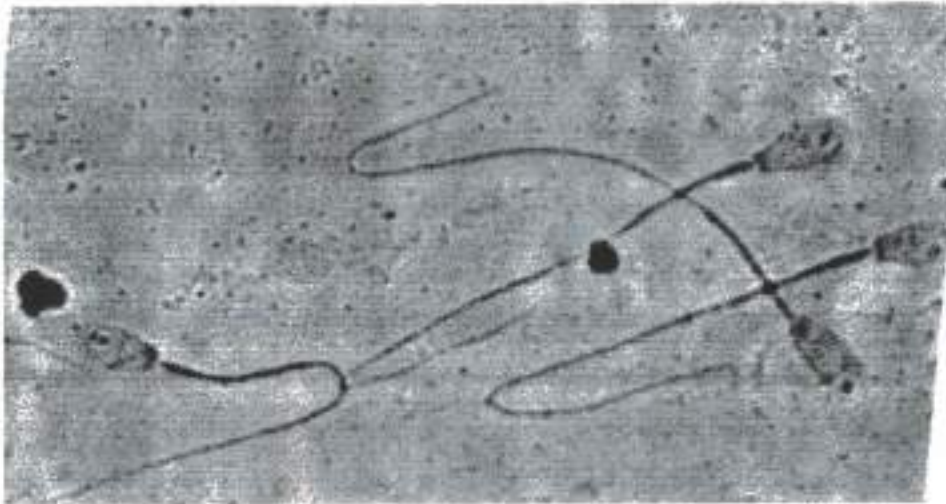
Tabel 5.2. Persentase Hidup Spermatozoa Sapi Perah

Jarak paparan sinar UV	Rataan dan simpangan baku Persentase Hidup Spermatozoa
Kontrol (P0)	75,68 ^a ± 3,64
15 cm (P1)	55,22 ^b ± 2,94
20 cm (P2)	63,78 ^c ± 2,41
25 cm (P3)	71,23 ^d ± 1,70

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Setelah dilakukan uji statistik dengan rataan persentase hidup spermatozoa dan simpangan baku terjadi penurunan rataan persentase hidup spermatozoa. Semakin dekat jarak paparan radiasi sinar UV panjang gelombang pendek semakin rendah daya hidupnya.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan P1, P2 dan P3 ($p < 0,05$). Dapat dikatakan bahwa semakin dekatnya jarak radiasi terhadap sumber radiasi. Maka semakin menurun daya hidup spermatozoa.



Gambar 5.1. Spermatozoa Sapi Perah yang Hidup
(Pembesaran 1000X)

5.3. Integritas Membran Spermatozoa

Data hasil rataan persentase integritas membran spermatozoa yang terpapar radiasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm menunjukkan bahwa adanya penurunan integritas membran spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma utuh dan hidup terlihat adanya pembekaan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang, spermatozoa dengan membran plasma mengalami kerusakan dan hidup ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak terjadi pembekaan kepala dengan pancaran warna terang sedangkan spermatozoa dengan membran plasma rusak dan mati

terang sedangkan spermatozoa dengan membran plasma rusak dan mati ditandai dengan ekor lurus tanpa adanya pembengkaan kepala dengan pancaran warna gelap atau merah.

Pada tabel 5.3. dapat dilihat rata-rata dan simpangan baku integritas membran spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV dengan berbagai jarak paparan

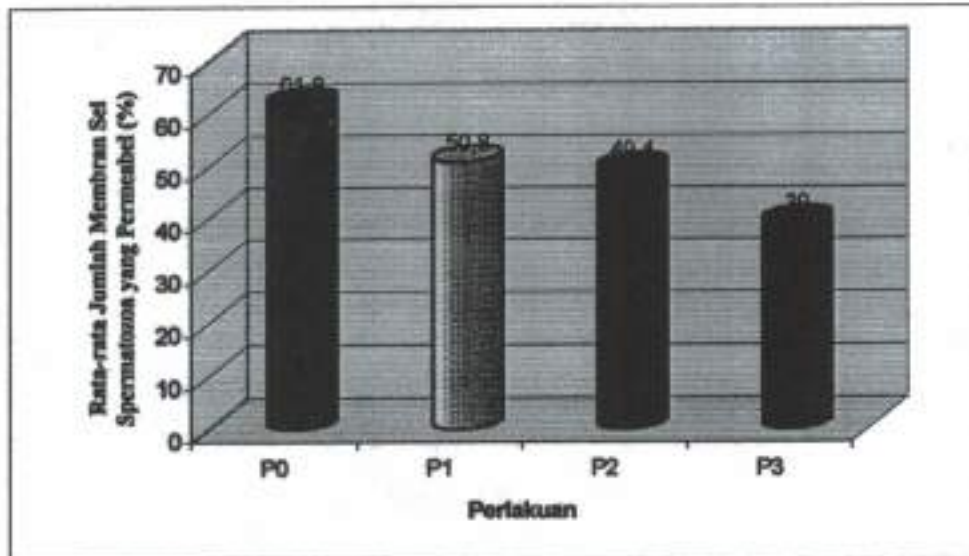
Tabel 5.3. . Rataan dan simpangan baku integritas membran spermatozoa Setelah dipapar dengan sinar UV dengan berbagai jarak paparan

PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD (\%)$
Kontrol (P0)	$61,80^a \pm 4,49$
15 cm (P1)	$50,80^b \pm 7,19$
20 cm (P2)	$49,40^b \pm 7,16$
25 cm (P3)	$39,0^c \pm 7,96$

Keterangan: superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Analisis data menggunakan anova satu arah dan diteruskan dengan uji LSD ternyata menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) antara kelompok P3 ($39,0 \pm 7,96$) terhadap kelompok P0 ($61,80 \pm 4,49$), kelompok P1 ($50,80 \pm 7,19$), dan kelompok P2 ($49,40 \pm 7,16$). Antara kelompok P2 ($49,40 \pm 7,16$) terhadap kelompok P0 ($61,80 \pm 4,494$), dan kelompok P3 ($39,0 \pm 7,96$). Antara kelompok P1 ($50,80 \pm 7,19$) terhadap kelompok P0 ($61,80 \pm 4,49$), dan kelompok P3 ($39,0 \pm 7,96$). Dan antara kelompok P0 ($61,80 \pm 4,494$) terhadap kelompok P1 ($50,80 \pm 7,190$), kelompok P2 ($49,40 \pm 7,162$), dan kelompok P3 ($39,0 \pm 7,969$). Tetapi

jumlah persentase integritas membran lebih mudahnya dapat dilihat pada gambar 5.3. dan bentuk spermatozoa yang mempunyai membran yang utuh ditunjukkan pada gambar 5.4



Gambar 5.3.: Pengaruh paparan radiasi ultra violet C panjang gelombang 254 nm dengan jarak paparan yang berbeda terhadap integritas membran spermatozoa.

Sinar ultra violet mempunyai peran penting dalam unsur biologis tetapi unsur tersebut sulit diperhitungkan karena spectrum elektromagnetiknya mengandung berbagai energi penting. Menurut Ackerman (1988) dimana sinar ultra violet mampu diserap oleh protein dan asam-asam nukleat. Termasuk sel spermatozoa yang mengandung kedua hal diatas.

Integritas membran spermatozoa dapat diamati dengan melihat reaksi sel spermatozoa dalam kondisi hipoosmotik. Metode HOS test yang digunakan dapat berfungsi untuk menguji keutuhan membran spermatozoa yang masih aktif, dimana dalam kondisi yang hipoosmotik

HOS test yang digunakan dapat berfungsi untuk menguji keutuhan membran spermatozoa yang masih aktif, dimana dalam kondisi yang hiposmotik tersebut menyebabkan nilai permeabel membran meningkat, disebabkan karena adanya pergerakan transport air yang masuk kedalam membran spermatozoa, sehingga menyebabkan membran spermatozoa membengkak. Spermatozoa yang mengalami kerusakan pada membran tidak dapat menyesuaikan tekanan osmose sehingga membran tidak mengembang. Menurut Jeyendran *et al.* (1984) tes HOS dilakukan untuk memudahkan mengamati daya hidup sel spermatozoa yang ditandai dengan pemutaran ekor.

Menurut WHO laboratory. (1992) menyebutkan bahwa jumlah sel spermatozoa normal, mengalami penggembungan ekor lebih besar dari 60%. Jika jumlah penggembungan ekor spermatozoa kurang dari 50% maka spermatozoa tidak normal. Jumlah ini dapat dilihat dengan bantuan HOS (*Hypo Osmotic Swelling*) Test, dengan mengamati perubahan dari ekor sel spermatozoa. Dimana sel spermatozoa yang hidup akan menyerap media HOS sehingga membran sel spermatozoa berisi cairan media HOS yang menyebabkan ekor sel spermatozoa memutar kearah kepala spermatozoa. Sebaliknya sel spermatozoa yang telah mati dan permeabilitas membrannya menurun tidak dapat menyerap media HOS sehingga tidak mengalami pemutaran ekor.

Daya permeabilitas membran memberikan suatu korelasi atau hubungan yang nyata dengan inseminasi buatan. Sebagai indikatornya yaitu infertilitas pada manusia ditentukan apabila jumlah keutuhan membran spermatozoa kurang dari angka 50% (Revell and Mrode, 1994). Dan pada kelompok P2 dan P3, spermatozoa mengalami penurunan daya fertilitas, sehingga pada kelompok tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan utama dalam pembuatan semen beku.

Pemaparan dengan menggunakan radiasi sinar UV membuktikan bahwa semakin pendek jarak sumber radiasi terhadap sel yang terpapar maka akan terjadi gangguan keseimbangan protein dan fosfolipid baik yang ada di dalam membran ataupun yang ada di dalam sel spermatozoa. Mengingat membran bagian kepala sebagai alat penetrasi sedangkan membran bagian ekor berfungsi mendapatkan substrat untuk energi yang digunakan sebagai alat gerak (Zeneveld, 1985).



Gambar 5.4 : Gambaran integritas membran spermatozoa yang diuji dengan HOS test dan ditandai adanya pemutaran ekor spermatozoa (ekor yang menggembung) dengan pembesaran 1000x (tanda panah).

5.4. Ukuran Kepala Spermatozoa Kromosom seks X dan Y

Perbandingan persentase rataan panjang x lebar kepala spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y dapat dilihat pada tabel 5.3. dibawah ini

Tabel 5.3. Persentase Rataan ukuran kepala spermatozoa kromosom X dan Y

Jarak Paparan Radiasi Sinar UV	Rataan dan Simpangan Baku Kromosom X	Rataan dan Simpangan Baku Kromosom Y
Kontrol (P0)	45,11 ^a ± 0,47	41,66 ^a ± 0,48
15 cm (P1)	39,45 ^b ± 1,52	31,28 ^b ± 1,78
20 cm (P2)	42,47 ^c ± 1,19	36,14 ^c ± 0,78
25 cm (P3)	44,42 ^a ± 0,70	39,58 ^d ± 0,66

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

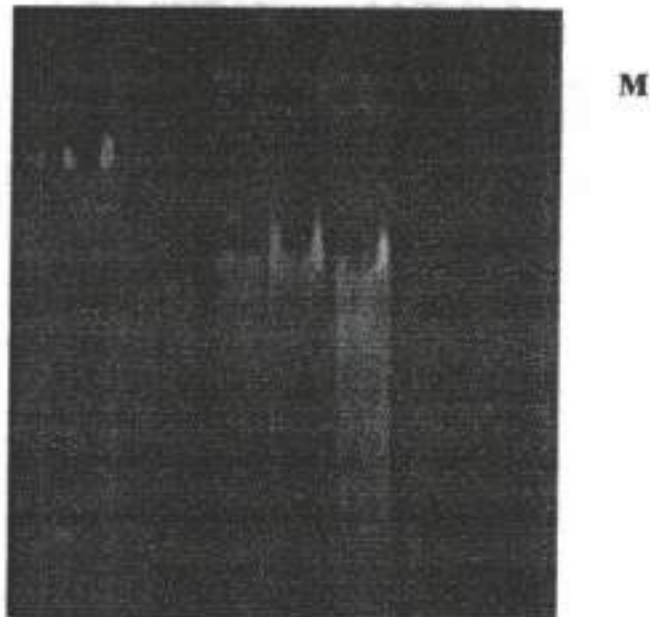
Berdasarkan uji Anova dengan taraf signifikansi 5% maka dapat diketahui bahwa semakin dekat jarak paparan dari sinar UV maka semakin rasio spermatozoa berkromosom X lebih besar dibandingkan spermatozoa berkromosom Y. Hal ini bisa disebabkan karena perbedaan luas permukaan

semakin rasio spermatozoa berkromosom X lebih besar dibandingkan spermatozoa berkromosom Y. Hal ini bisa disebabkan karena perbedaan luas permukaan yang teradiasi. Spermatozoa berkromosom X mempunyai ukuran kepala lebih besar 7% daripada spermatozoa berkromosom Y sehingga permukaannya menjadi lebih luas. Didalam kepala Spermatozoa berkromosom X juga mengandung benang-benang kromatin yang lebih memadat dengan materi DNA yang lebih banyak sehingga lebih tahan terhadap efek heat shock paparan sinar UV. Sedangkan pada spermatozoa berkromosom Y cenderung lebih peka terhadap efek heat shock. Paparan sinar UV.

Menurut Paul (1998) menyatakan bahwa ukuran spermatozoa mempengaruhi proses yang berhubungan dengan kompetisi antara sel spermatozoa yang satu dengan lainnya. Spermatozoa dengan ukuran yang lebih besar menunjukkan keberhasilan kompetisi lebih baik. hal ini memungkinkan rasio kromosom X yang menghasilkan individu betina dan kromosom Y yang menghasilkan individu jantan tidak selalu 50 : 50.

Sinar ultra violet dapat menyebabkan kerusakan, tingkat kerusakannya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis sumber radiasi, lama penyinaran, jarak sumber dengan obyek, ada/tidak adanya penghalang antara sumber dengan obyek. Dapat disimpulkan bahwa semakin dekat jarak antara sumber radiasi dengan subyek semakin parah tingkat kerusakan yang terjadi (Sassung dkk.1996).

pemotongan DNA dengan enzim restriksi.. Gambaran DNA spermatozoa dapat dilihat secara jelas pada gambar 5.2.



Gambar 5.2. DNA spermatozoa Setelah dipapar dengan sinar UV

Enzim restriksi dapat menghasilkan pemotongan sederhana pada pita ganda di bagian tengah daerah pemotongan yang dikenali menghasilkan ujung pemotongan tumpul (blund end) dan enzim restriksi lainnya tidak memotong DNA pita ganda pada posisi ditengah sehingga menghasilkan fragmen DNA dengan ujung yang menggantung, disebut ujung cohesive (sticky end).

Hasil resktriksi dapat ditentukan berdasarkan kesamaan genotipe untuk menganalisa panjang fragmen DNA yang terpotong dari masing-masing enzim resktriksi (Aulanni'am.2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan maka dapat dibuat kesimpulan sebagai berikut :

1. Paparan sinar UV dengan panjang gelombang pendek menyebabkan rasio spermatozoa pembawa kromosom seks X lebih besar dibandingkan spermatozoa pembawa kromosom seks Y dengan jarak paparan optimum adalah 25 cm
2. Semakin dekat jarak sinar UV terhadap obyek (semen sapi perah) maka semakin menurun motilitas dan daya hidup spermatozoa serta semakin tinggi tingkat kerusakan fragmen DNA

6.2. Saran

Dengan mengetahui jarak dan lama paparan sinar UV yang masih dalam batas aman maka dapat digunakan sebagai alternatif cara pemisahan spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y. yang selanjutnya untuk memproduksi semen beku pilih kelamin.

DAFTAR PUSTAKA

- Ackerman, E., L.B.M. Ellis, dan L.E. William. 1988. Ilmu Biofisika. Terjemahan. Redjani dan A. Basir. Airlangga University Press. Surabaya p. 283-286.
- Amron, D.M., and R.L. Moy. 1991. Stratospheric Ozone Depletion and Its Relationship to Skin Cancer. *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* 17: 370-372.
- Aurich, J.E, V. Schonheer, H. Hoppe, and N.C. Aurich. 1997. Effect of Antioxidants on Motility and Membrane Integrity of Chilled – Stored Stallion Semen. *J. Theriogenology* 48: 185 – 192.
- Bender, K., C. Blattner, A. Knebel, M. Lordanov, P. Herrlich, and H.J. Rahmsdorf. 1997. UV Induced Signal Transduction. *JOURNAL Of Photochemistry and Photobiology B* 37: 1-17.
- Caldwell, M.M., and S.D. Flint. 1997. Uses of Biological Spectral Weighting Function and The Need for Scalling for The Ozone Reduction Problem. *Plant Ecology* 128: 66-76.
- Crowder, L.V. 1988. Plant Genetics. Terjemahan L. Kusdiarto. Gajah Mada University Press. Yogyakarta p. 322-356.
- Darnel, J.H. Lodish dan Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books Inc. New York.
- Diffey, B.L. 1991. Solar Ultraviolet Radiation Effects on Biological Systems. *Review in Physics in Medicine and Biology* 36: 299-328.
- El-Saifi, A, and Z.A.M. El-Khayat. 1996. Effect of Ultra Violet Exposure on Kidney Function in Rats. *J. Union Arab Biol. Cairo.* 6: 79-89.
- Flechon, J. E. and E. S. E. Hafez, 1976. Scanning Electron Microscopy of Human Spermatozoa in : E. S. E. Hafez, Human Semen and Fertility Regulation in Men. Chapter 8. C. V. Mosby Company. St. Louis. London p. 78.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Terjemahan B. Srigandono dan Koen Praseno. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. hal. 781-791.

- Gottlieb, W., and S. Meizel. 1987. Biochemical Studies of Metalloendoproteinase Activity in The Spermatozoa of Three Mammalian Species. *J Androl*; 8: 14-24.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction In Farm Animal*. 6th Edition ed. E.S.E Hafez (Editor). Lea Febiger, Philadelphia p. 440-456.
- Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati, T.W. Suprayogi. 2000. *Penuntun Praktikum Teknik Reproduksi*. Hal: 13.
- Hardjopranjoto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Edisi I. Airlangga University Press. Surabaya. hal. 61-78.
- Ismudiono, P. Srianto, S.P. Madyawati. 2001. *Penyinaran Dengan Sinar Ultra Violet Pada Semen Beku Sapi perah Setelah Thawing Sebagai Upaya Pemisahan Kromosom Seks X dan Y*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jeyendran, R.S. 1984. Development of an Assay to Assess The Functional Integrity of The Human Sperm Membran and its Relationship to The Other Sperm Characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70:219-28.
- Joe, F.J., T.H Wise, and D.D. Lunstra. 2002. *Sertoli Cells in The Boar Testis : Changes During Development and Compensat Ory Hypertrophy After Hemicastration at Different Ages*. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture.
- Joux, F, W.H Jeffrey, P Lebaron, and D.L Mitchell. 1999. *Marine Bacterial Isolates Display Diverse Response to UV-B Radiation*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3820-3827.
- Kaiser, E., and G.E Herndl. 1997. *Rapid Recovery of Marine Bacterioplankton Activity After Inhibition by UV Radiation in Coastal Water*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4026-4038.
- Karu, T. 2000. *Mechanisms of Low Power Laser Light Action on Celluler Level*. Laser Technology Research Center of Russian Acad. Sci. Troitsk. Moscow Region. Russian Federation.
- Kraemer, K.H., M.M. Lee, and J. Scotto. 1984. *DNA Repair Protects Against Cutaneous and Internal Neoplasia : Evidence From Xeroderma Pigmentosum Carcinogenesis*. 5: 511-514.
- Liu and Baker, 1992. *Test of Human Sperm Function and Fertilization In Vitro*, in *J. Fertility and Sterility*. 82: 472-473.

- Longstreth, J.D. 1991. Anticipated Public Health Consequences of Global Climate Change. *Environmental Health Perspectives* 96 : 139-144.
- Lyons, M.M., P. Aas, J. D. Pakulski, L. Van Waasbergen, R.V. Miller, D. L. Mitchell, and W. H. Jeffrey. 1998. DNA Damage Induced by Ultra Violet Radiation in Coral-Reef Microbial Communities. *Marine Biology*. 130: 537-543.
- Mahaputra, L., Wurlina, T.D., Sulistiyati dan S. Mulyati. 1989. Pemisahan Sel Spermatozoa Domba dengan Sephadex Colum G-200. *Media Kedokteran Hewan* 5: no. 1. ISSN 2015-8930.
- McDonald, J.K, J.T. Culbertson, and N.O. Owen. 1993. Identification and Localization of a Novel Cathepsin S-like Proteinase in Guinea Pig Spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*; 305: 1-8.
- McDonald, J.K and M.C. Emerick. 1995. Purification and Characterization of Procathepsin L, a Self Processing Zymogen of Guinea Pig Spermatozoa That Acts on Cathepsin D Assay Substrate. *Arch Biochem Biophys*; 323: 409-422.
- McDonald, J.K., and S. Kadkhodayan. 1988. Cathepsin L, a Latent Proteinase in Guinea Pig Sperm. *Biochem Biophys Res Commun*; 151: 827-835.
- Nakao, H., and N. Nakasuji. 1990. Effect of Co-Culture, Medium Componen and Gas Phase on In Vitro Culture of on Matured and In Vitro Bovine Embryos. *J. Theriogenology*. 33 : 591-600.
- Noiles, E.E., K.A. Thompson, and B.T. Storey. 1997. Water Permeability, L.P, of The Mouse Sperm Plasma Membrane and its Activation Energy are Strongly Dependent on Interaction of The plasma Membrane With The Sperm Cytoskeleton. *J. Cryobiology* 35: 79 – 92..
- Partodihardjo. S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. P.T. Mutiara Sumber Widya. Jakarta p. 519-543.
- Polakoski, K.L., and L.J.D. Zanesveld, 1976. Biochemistry of Human Spermatozoa. In E.S.E Hafez (ed) *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Chapter 15. C.V. Mosby Company. St. Louis. London P.78.
- Polakoski, K.L., R.A. McRorie, W.L. Williams. 1973. Boar Acrosin. I. Purification and Preliminary Characterization of a Proteinase From Boar Sperm Acrosomes. *J Biol Chem*; 248: 8178-8182.

- Puruhito, S. B, M. Laloraya and G. P. Kumar. 1999. Role of Ions and Ion Channels in Capacitation of Spermatozoa. *J. Androl.* 1: 95-107.
- Revell S.G and R.A. Mrode. 1994. An Osmotik Resistanel Test for Bovine Semen. *J. Aniem. Reprod. Sci.* 36: 77 – 86.
- Salisbury, G.W., dan N.L. Van Demark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta p. 1-22.
- Schollmeyer, J.E. 1986. Identification of Calpain II in Porcine Sperm. *Biol Reprod*; 34: 721-731.
- Scott R.P., V. Ninjoor, and P.N. Srivastava. 1987. Isolation and Characterization of Cathepsin B From Rabbits Testis. *J Reprod Fertil*; 79: 67-74.
- Singgih, S. 2001. *Statistic Product and Services Solution*. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Srivastava, P.N, and V. Ninjoor. 1982. Isolation of Rabbit Testicular Cathepsin D and its Role in The Activation of Proacrosin. *Biochem Biophys Res Commun*; 109: 63-69.
- Suares, S.S. 1998. The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals Mechanism of Formation. *J. Biol. Reprod.* 58: 1105-1107.
- Talbot, P and G. DiCarlantonio. 1985. Cytochemical Localization of Dipetidyl Peptidase II (DPP-II) in Mature Guinea Pig Sperm. *J Histochem Cytochem*; 33: 1169-1172.
- Tesarik, J., J. Drahorad, and J. Peknicova. 1988. Subcellular Immunochemical Localization of Acrosin in Human Spermatozoa During The Acrosome Reaction and Zona Pellucida Penetration. *Fertile Steril*; 50: 133-141.
- Tevini, M., ed. 1993. *UV-B Radiation and Ozone Depletion : Effects on Human, Animals, Plants, Microorganisms and Material*. Lewis Pub. Boca Raton.
- Tulsiani, D.R.P., A. Abou-Halla, C.R. Loeser, and B.M.J. Pereira. 1998. The Biological and Functional Significance of The Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Exp Cell Res*; 240: 151-164.
- Van Der Leun, J.C., and F.R. de Gruijl. 1993. Influences of Ozone Depletion on Human and Animal Health. Chapter 4 in *UV-B*

Radiation and Ozone Depletion: Effects on Humans, Animal, Plants, Microorganisms, and Materials, ed. M. Tevini, 95-123. Ann Arbor. Lewis Publishers.

Wayne, R.P. 1991. Chemistry of The Atmospheres 2nd ed. Oxford. 118: 143-144.

Who Laboratory Manual For The Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press. 1992. pp. 107.

Wodzicka, M., Tomaszewska, I Ketut Sutama, I Gede Putu, dan D. C. Thamrin. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku, dan Produksi Temak di Indonesia. P.T Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. hal. 11-18.

Wong, C.F., A.V. Parisi, and G.I. Moore. 1997. Assessment of The Exposure to Biologically Effective UV Radiation Using a Dosimetric Technique to Evaluate The Solar Spectrum. Phys Med Biol. 42, 77-78.

Zaneveld, L.J.D., and C.J. Jonge. 1991. Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and The Acrosome Reaction. In : Dunbar B, O'Rand M (eds.). A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. New York : Plenum.

Zaneveld, L.J.D. 1985. The Biology of Spermatozoa. Presented in: Kongres Nasional III Pandi. Jakarta. P: 15-39.

LAMPIRAN 1. Data persentase hasil pengamatan permeabilitas membran spermatozoa yang tanpa dan dengan pemaparan radiasi UV-C.

Nomor Sampel	P0	P1	P2	P3
1.	57	47	41	31
2.	68	44	43	42
3.	62	46	53	47
4.	58	60	58	45
5.	64	57	52	30

LAMPIRAN 2. Analisa Statistik Hasil Pengamatan Integritas Membran Spermatozoa

ANOVA

Permeabilitas membran spermatozoa (%)

	Jumlah Kuadrat	df	Kuadrat Tengah	F	Sig.
Perlakuan	1304,950	3	434,983	9,319	,001
Sisa	746,800	16	46,675		
Total	2051,750	19			

Keterangan: Sig. 0,001 menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata.

UJI BNT 5%

Antar perlakuan: permeabilitas membran spermatozoa (%)

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Perbedaan rata-rata (I-J)	Std. Error	Sig.	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas bawah	Batas atas
P0	P1	11,00*	4,321	,022	1,84	20,16
	P2	12,40*	4,321	,011	3,24	21,56
	P3	22,80*	4,321	,000	13,64	31,96
P1	P0	-11,00*	4,321	,022	-20,16	-1,84
	P2	1,40	4,321	,750	-7,76	10,56
	P3	11,80*	4,321	,015	2,64	20,96
P2	P0	-12,40*	4,321	,011	-21,56	-3,24
	P1	-	4,321	,750	-10,56	7,76
	P3	1,40	4,321	,029	1,24	19,56
P3	P0	-22,80*	4,321	,000	-31,96	-13,64
	P1	-11,80*	4,321	,015	-20,96	-2,64
	P2	-10,40*	4,321	,029	-19,56	-1,24

Keterangan :

- ♦ * . menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

**LAMPIRAN 3. Komposisi Pembuatan Medium Hypo Osmotik Swelling
(HOS) Test.**

Sodium Sitrat Dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,735 g.
Fruktosa	1,351 g.
Aquabidest ad	100 ml.

Sumber : WHO Laboratory (1992).

LAMPIRAN 4. Komposisi Pembuatan Medium Brackett and Oliphant (BO).

Medium Stok A (500 ml)

NaCl	4,3092 g
KCl	0,1972 g
CaCl 2.2 H ₂ O	0,2117 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,840 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,06497 g
Phenol red 0,5%	0,1 ml
Distilled water	200 ml

Medium Stok B (200 ml)

NaHCO ₃	2,5873 g
Phenol red	0,04 ml
Distilled water	200 ml

Medium BO

Medium stok A	76 g
Medium stok B	24 ml
Glukosa	0,15 g
Sodium Pyruvate	0,0137 g
Gentamycin	

Sumber : Nakao dan Nakasuji (1990).

LAMPIRAN 5. Komposisi Pembuatan Pewarna Eosin Negrosin.

Larutan A (negrosin sol.)

Negrosin	20 g
Aqua ad.	100 ml (diaduk dan dipanaskan)

Larutan B (stok buffer)

- Larutan a 200 ml

Na₂HPO₄·2H₂O 21,628 g

Aqua ad 500 ml

- Larutan b 80 ml

KH₂PO₄ 22,254 g

Aqua ad. 500 ml

Larutan C (stok glukosa sol.)

Glukosa 43,3 g

Aqua ad. 500 ml

Larutan Pewarna Eosin Negrosin (dengan pemanasan)

Larutan A 150 ml

Larutan B 30 ml

Larutan C 20 ml

Eosin Yellow 5 g

Aqua ad. 300 ml

Sumber : Hardijanto dkk.(2000).

LAMPIRAN 6. Prosedur Pemeriksaan Keutuhan Membran Spermatozoa dengan Metode HOS Test.

Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dapat dilakukan tahap-tahap sebagai berikut :

- Sebanyak 0,5 ml semen dari masing-masing kelompok perlakuan dilarutkan dengan 4,5 ml larutan hypoosmotik menurut metode jayendra dan zeneveld yang terdiri dari natrium sitrat, fruktosa, dan aquabides.
- Campuran larutan selanjutnya di inkubasi pada incubator CO₂ selama 45 menit dengan suhu 37°C dan kelembaban jenuh relatif 100%.
- Setelah dilakukan inkubasi, 0,5 ml larutan diteteskan pada *object glass* dan selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop inverted.
- Di hitung jumlah spermatozoa yang menggembung dan yang tidak menggembung sebanyak 10x lapangan pandang.
- Perhitungan dilakukan dengan rumus :

Spermatozoa normal :

$\frac{\text{jumlah spermatozoa menggembung}}{\text{jumlah spermatozoa total}} \times 100\%$

LAMPIRAN 7. Prosedur Pemeriksaan Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa.

Spermatozoa yang mati, permeabilitas membran selnya meningkat, terutama didaerah post-nuclear cups. Sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna dari zat warna yang dipakai. Sedang sel spermatozoa yang hidup akan tetap jernih.

Cara pemeriksaan :

- Letakkan satu tetes zat warna dan satu titik semen di atas *object glass* yang bersih.
- Secepat mungkin campurkan kedua larutan tersebut hingga homogen kemudian buat preparat ulas setipis mungkin dan panaskan diatas nyala api. Pengerjaan ini harus selesai maksimal dalam 15 detik.
- Lakukan pemeriksaan dan penghitungan memakai mikroskop dengan pembesaran 400X

Penilaian :

- Sel spermatozoa yang mati kepalanya berwarna merah, sedangkan yang hidup tidak berwarna.
- Hitung jumlah prosentase sel spermatozoa yang mati dan yang hidup dalam 2x perhitungan 100 ekor.
- Hal yang sama dilakukan untuk penghitungan persentase abnormalitas spermatozoa.

LAMPIRAN 8. Prosedur Pengamatan Motilitas (gerak progresif) Spermatozoa.

Pemeriksaan motilitas (gerak progresif) spermatozoa dilakukan dengan :

- a. Semen yang telah dicuci dengan medium BO dan berbentuk pellet ditambahkan medium HOS sebanyak 5 cc.
- b. Pelet spermatozoa yang ditambahkan medium HOS, diaduk pelan-pelan hingga homogen.
- c. Ambil satu tetes campuran dari masing-masing kelompok perlakuan termasuk kontrol, teteskan pada gelas obyek yang berpermukaan cekung.
- d. Tutup sediaan dengan gelas obyek dan periksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.
- e. Menghitung persentase motilitas spermatozoa yang ditandai dengan pergerakan progresif atau gerak maju dengan menggunakan sistem skor. Rentang skor mulai 0% (tidak ada pergerakan spermatozoa) hingga 100% (seluruh spermatozoa bergerak maju).
- f. Pengamatan dilakukan pada 5 kali lapangan pandang.

Lampiran 9. Abstrak Penelitian Mahasiswa

PEMISAHAN KROMOSOM SEKS SPERMATOZOA SAPI PERAH SETELAH DIPAPAR DENGAN SINAR UV

Ahmad Wahyudin

ABSTRAK

Teknik pemisahan spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu pemisahan spermatozoa dengan teknik elektroforesis, sedimentasi, filtrasi dengan sephadex maupun dengan kolom percoll dan alternatif lain untuk pemisahan spermatozoa adalah melalui paparan radiasi sinar UV.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa jauh pemisahan kromosom seks sapi perah setelah mendapat paparan sinar UV. Kromosom seks ditentukan berdasarkan besarnya ukuran kepala spermatozoa.

Penelitian ini dibagi menjadi empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan mendapat ulangan sebanyak enam kali. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dan data yang diperoleh diuji dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji BNT.

Rataan jumlah kromosom seks spermatozoa X dan Y pada keempat perlakuan adalah $45,11 \pm 0,47$ dan $41,66 \pm 0,48$ (kontrol); $39,45 \pm 1,52$ dan $31,28 \pm 1,78$ (P1); $42,47 \pm 1,19$ dan $36,14 \pm 0,78$ (P2); $44,42 \pm 0,70$ dan $39,58 \pm 0,66$ (P3). Hasil ini menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil di atas membuktikan bahwa paparan sinar UV dapat merubah komposisi perbandingan kromosom seks spermatozoa X dan Y sapi perah.

Mengetahui
Komisi Pembimbing



Herry Agoes Hermadi, M.Si., Drh.
Pembimbing I



Sri Mulyati, M.Kes., Drh.
Pembimbing II

**KUALITAS SPERMATOZOA SAPI PERAH SETELAH MENDAPAT
PAPARAN SINAR UV PANJANG GELOMBANG 365 nm**

Dita Khrisnamurti

ABSTRAK

Teknik pemisahan spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu pemisahan spermatozoa dengan teknik elektroforesis, sedimentasi, filtrasi dengan sephadex maupun dengan kolom percoll dan alternatif lain untuk pemisahan spermatozoa adalah melalui paparan radiasi sinar UV.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa jauh pengaruh paparan sinar UV gelombang 365 nm terhadap kualitas spermatozoa sapi perah dengan melihat motilitas dan daya hidup spermatozoa.

Penelitian ini dibagi menjadi empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan mendapat ulangan sebanyak enam kali. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dan data yang diperoleh diuji dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji BNT.

Rataan persentase motilitas sperma adalah $59,44 \pm 3,64$ (kontrol); $52,02 \pm 4,94$ (P1); $54,38 \pm 3,29$ (P2) dan $56,91 \pm 4,48$ (P3). Sedangkan rata-rata persentase hidup spermatozoa adalah $75,68 \pm 3,64$ (kontrol); $55,22 \pm 2,94$ (P1); $63,78 \pm 2,41$ (P2) dan $71,23 \pm 1,70$ (P3). Hasil ini tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Berdasarkan hasil di atas membuktikan bahwa paparan sinar UV tidak merubah kualitas spermatozoa sehingga dapat digunakan untuk pemisahan kromosom seks spermatozoa.

Mengetahui
Komisi Pembimbing



Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.
Pembimbing I



Yola Rahmahani, M.Kes., Drh.
Pembimbing II

INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA YANG TELAH DIPAPAR DENGAN SINAR UV MENGGUNAKAN METODE HOST

Hardany Primarizky

ABSTRAK

Teknik pemisahan spermatozoa pembawa kromosom seks X dan Y dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu pemisahan spermatozoa dengan teknik elektroforesis, sedimentasi, filtrasi dengan sephadex maupun dengan kolom percoll dan alternatif lain untuk pemisahan spermatozoa adalah melalui paparan radiasi sinar UV.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa jauh pengaruh paparan sinar UV gelombang 365 nm terhadap integritas membran spermatozoa sapi perah.

Penelitian ini dibagi menjadi empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan mendapat ulangan sebanyak enam kali. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dan data yang diperoleh diuji dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji BNT.

Rataan integritas membran spermatozoa setelah dipapar dengan sinar UV adalah $61,80 \pm 4,49$ (kontrol); $50,80 \pm 7,19$ (P1); $49,40 \pm 7,16$ (P2) dan $39,0 \pm 7,96$ (P3). Hasil ini menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil di atas membuktikan bahwa paparan sinar UV dapat merubah kualitas spermatozoa dengan melihat keutuhan atau integritas membran spermatozoa, semakin dekat jarak paparan semakin banyak membran spermatozoa yang rusak.

Mengetahui
Komisi Pembimbing



Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh.
Pembimbing I

Arimbi, M.Si., Drh.
Pembimbing II