

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN)
TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG)
PADA FERTILISASI IN-VITRO**

TAHUN KE 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Oleh :

Dr. Budi Utomo, M. Si., drh. NIDN 0018055904
Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., drh. NIDN 0005025103

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Nomor : 7673/UN3/KR/2013, tanggal 2 Mei 2013

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER 2013

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN)
TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG)
PADA FERTILISASI IN-VITRO**

TAHUN KE 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Oleh :

Dr. Budi Utomo, M.Si., drh. NIDN 0018055904
Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phill., drh. NIDN 0005025103

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Nomor : 7673/UN3/KR/2013, tanggal 2 Mei 2013

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
JULI 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Pengaruh penambahan enzim *a serine protease* (akrosin) terhadap perolehan embrio domba ekor gemuk (EG) pada fertilisasi in-vitro

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Budi Utomo, M.Si., drh.

NIDN : 0018055904

Jabatan Fungsional : Lektor Kepala/IV-a

Program Studi : Kedokteran Hewanl

No. HP : 081553160631

Alamat e-mail : budi_reprovet@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Prof. H. Mas'ud Hariadi, Ph.D., M.Phil., drh.

NIDN : 0005025103

Perguruan Tinggi : Fak. Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Alamat Institusi : Fakultas Kedokteran Hewan Kampus C Unair

Telp/Fax/E-mail : 031-5992785 / 031-5993015 / fk@unair.ac.id

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,-

Biaya Keseluruhan : Rp. 100.000.000,-

Surabaya, 21 Oktober 2013

Ketua Peneliti,



Dr. Budi Utomo, MSi, drh.
NIP. 195905181987011002

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian & Pengabdian
Kepada Masyarakat Universitas Airlangga



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.
NIP. 195908051987011001

PENGARUH PENAMBAHAN ENZIM α SERINE PROTEASE (AKROSIN) TERHADAP PEROLEHAN EMBRIO DOMBA EKOR GEMUK (EG) PADA FERTILISASI IN-VITRO

RINGKASAN

Perkembangan populasi ternak di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan, bahkan di Jawa Timur pada tahun 2007 terjadi penurunan populasi beberapa jenis ternak yaitu domba sebesar 3,24 %, sedangkan ternak yang lain mengalami kenaikan yang masih jauh dari harapan. (Anonimous, 2007). Pemerintah melalui program inseminasi buatan berusaha mengatasi penurunan populasi ternak domba tersebut. Namun demikian sejauh ini usaha pemerintah tersebut belum membuahkan hasil yang optimal.

Salah satu faktor utama penyebab turunnya populasi ternak domba tersebut adalah adanya gangguan reproduksi, terutama gangguan fertilisasi yaitu gagalnya sel sperma untuk menembus sel telur. Kegagalan penetrasi sel sperma kedalam sel telur, disebabkan oleh berkurangnya potensi enzim yang ada pada spermatozoa tersebut, khususnya enzim akrosin yang berfungsi dalam penetrasi zona pelusida pada sel telur. Di Indonesia penelitian tentang peran dan fungsi akrosin dalam fertilisasi, khususnya penetrasi pada zona pelusida sel telur belum pernah dilaporkan.

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah mengetahui peran akrosin terhadap potensi dan kualitas spermatozoa serta peran akrosin terhadap penetrasi zona pelusida. Sedangkan tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah penyediaan protein spesifik berupa akrosin untuk perbaikan fertilitas ternak khususnya domba.

Penelitian ini terdiri dari dua bagian yaitu : penelitian pertama suplementasi akrosin sperma domba EG dosis 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μ g terhadap persentase motilitas, abnormalitas, viabilitas, integritas membran, kapasitasi dan reaksi akrosom. Penelitian kedua suplementasi akrosin sperma domba EG dosis 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μ g terhadap penetrasi zona pelusida. Hasilnya yaitu : suplementasi akrosin 4,5 μ g dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, kapasitasi dan reaksi akrosom. Suplementasi akrosin 6,0 μ g menurunkan motilitas spermatozoa. Kesimpulan : suplementasi akrosin dosis 4,5 μ g dapat untuk meningkatkan motilitas, viabilitas, kapasitasi maupun reaksi akrosom.

Kata kunci : akrosin, fertilitas ternak, zona pelusida, kapasitasi & reaksi akrosom

PRAKARTA

Pertama-tama kami panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan berkah, rahmad, taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan kemajuan penelitian ini. Shalawat dan salam selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing umat manusia dari kebodohan menuju kemuliaan.

Saya ucapkan terimakasih kepada Pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Nasional melalui Dit. Litabmas , Ditjen Dikti. Kemendikbud.

Dengan selesainya penulisan laporan kemajuan penelitian ini, perkenankan saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
4. Saya ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan bagian Ilmu Kemajiran Dr. Herry Agoes Hermadi, drh., M.Si.; Rimayanti, drh., M.Kes.; Indah Norma Triana, drh., M.Si.; Hermin Ratnani, drh., M.Kes.

Saya menyadari sepenuhnya "tiada gading yang tak retak", bahwa meskipun telah diusahakan disusun dengan sebaik-baiknya, namun diyakini masih banyak kekurangan pada laporan kemajuan penelitian ini. Untuk itu masukan, kritik dan saran untuk perbaikan sangat diharapkan. Semoga laporan kemajuan penelitian ini dapat bermanfaat bagi dunia ilmu pengetahuan maupun bagi masyarakat. Amien.....

**SISTEMATIKA LAPORAN KEMAJUAN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**

DAFTAR ISI

	Halaman
1. HALAMAN SAMPUL.....	0
2. HALAMAN PENGESAHAN.....	i
3. RINGKASAN.....	ii
4. PRAKAR I A.....	iii
5. DAFTAR ISI.....	iv
6. DAFTAR TABEL.....	v
7. DAFTAR GAMBAR.....	vi
9. DAFTAR SINGKATAN.....	viii
10. BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
11. BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
12. BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	11
12. BAB 4. METODE PENELITIAN.....	12
14. BAB 5. HASIL PENELITIAN.....	22
15. BAB 6. PEMBAHASAN.....	47
16. BAB 7. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	54
17. BAB 8. KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Karakteristik semen beku domba EG setelah dithawing.....	22
Tabel 5.2. Rerata Persentase Motilitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	24
Tabel 5.3. Rerata Persentase Viabilitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	27
Tabel 5.4. Rerata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	30
Tabel 5.5. Rerata Persentase Integritas Membran Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	33
Tabel 5.6. Rerata Persentase Status Kapasitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	36
Tabel 5.7. Rerata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	39
Tabel 5.8. Rerata Persentase Non Kapasitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1. Domba Ekor gemuk Jantan Dewasa.....	3
Gambar 2.1. Tiga enzim dominan yang ada pada spermatozoa.....	8
Gambar 5.1.1. Pemeriksaan semen beku Domba EG setelah dilakukan Thawing.....	23
Gambar 5.1.2. Suplementasi (penambahan) akrosin BM 43 kD pada spermatozoa dombaEG.....	23
Gambar 5.2.2. Grafik suplementasi akrosin terhadap motilitas spermatozoa.....	26
Gambar 5.2.4. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa domba PE dengan mikroskop cahaya phase kontras, keterangan : A. spermatozoa hidup (transparan) dan B. spermatozoa mati (warna ungu).....	28
Gambar 5.2.5. Grafik suplementasi akrosin terhadap viabilitas spermatozoa.....	29
Gambar 5.2.7. Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa domba PE dengan mikroskop cahaya, keterangan : A. Spermatozoa utuh (seluruh bagian tubuh spermatozoa sempurna dan berwarna transparan) dan B. spermatozoa abnormal (bagian tubuh tidak normal dengan formasi ekor tidak sempurna)	31
Gambar 5.2.8. Grafik suplementasi akrosin terhadap abnormalitas sperma	32
Gambar 5.2.10. Hasil pengamatan Integritas Membran spermatozoa domba PE dengan mikroskop cahaya, keterangan : A. spermatozoa dengan membran intak (ekor melingkar), dan B. spermatozoa dengan membran rusak (ekor lurus).....	34
Gambar 5.2.11. Grafik suplementasi akrosin terhadap integritas membran.....	35
Gambar 5.2.12. Hasil Pengamatan Status Kapasitasi Spermatozoa Domba EG Pada Pewarna CTC.....	36

Gambar 5.2.14. Grafik suplementasi akrosin terhadap Kapasitas	38.
Gambar 5.2.15. Spermatozoa dalam keadaan kapasitasi.....	39
Gambar 5.2.17. Grafik suplementasi akrosin terhadap akrosom	41
Gambar 5.2.18. Spermatozoa dalam keadaan reaksi akrosom	42.
Gambar 5.2.20. Grafik suplementasi akrosin terhadap kapasitasi	44
Gambar 5.2.21. Spermatozoa dalam keadaan non kapasitasi	45
Gambar 5.2.22. Ikatan antigen-antibodi akrosin	45

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Perkembangan populasi ternak di Jawa Timur belum mencapai keadaan yang menggembirakan, bahkan pada tahun 2007 terjadi penurunan populasi beberapa ternak yaitu domba & domba sebesar 2,24 %, sapi 1,86 % dan kerbau 3 % sedangkan ternak yang lain mengalami kenaikan yang masih jauh dari harapan (Anonymous, 2007). Program pemerintah untuk meningkatkan populasi ternak domba & domba yaitu melalui inseminasi buatan (IB) & kawin alam (KA)

Pada tahun 2007 secara nasional jumlah cembe (anak domba & domba) yg dilahirkan melalui Inseminasi Buatan (IB) maupun Kawin Alam (KA) masih dibawah satu juta ekor (Tjeppy Soedjana, 2008). Kendala yang sering dihadapi dalam peningkatan populasi ternak domba & domba adalah gangguan fertilisasi yang meliputi gagalnya sel sperma untuk menembus sel telur (Hafez, 2002)

Kegagalan penetrasi sel sperma terhadap zona pelusida sel telur adalah berkurangnya potensi enzim α *serine protease* (*akrosin*), kegagalannya mencapai 20-30% (Zalata, 2004; Hafez, 2002). *Akrosin* adalah enzim protease yang terdapat pada akrosomal sperma dan sangat penting untuk proses fertilisasi. *Akrosin* dikeluarkan selama reaksi akrosom, ini ditunjukkan dengan penetrasi spermatozoa kedalam zona pelusida ovum.

Bertitik tolak dari permasalahan tersebut, maka tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah uji potensi biologis protein spesifik (*akrosin*) yang terdapat pada akrosom spermatozoa domba EG dan suplementasi dari *akrosin* sebagai bahan *bioaktif* untuk perbaikan fertilitas ternak, yaitu dengan fertilisasi in-vitro. Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah penyediaan protein spesifik dari *akrosin* dalam perbaikan fertilitas ternak terutama untuk keperluan *embrio transfer*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Domba Ekor Gemuk (EG)

Sejarah mencatat bahwa domba ekor gemuk yang ada di Indonesia kemungkinan berasal dari Afrika yang dibawa oleh pedagang Arab, Spanyol pada abad ke 17, serta dibawa oleh pemerintah Hindia Belanda di abad ke 18. Banyak yang menganggap bahwa domba ekor gemuk merupakan domba asli Indonesia yang berasal dari Jawa Timur. Karakteristik Domba Ekor Gemuk

- Berukuran sedikit lebih besar dibandingkan dengan domba lokal,
- Memiliki pola warna tubuh putih, wool kasar tetapi rapi, kepala ringan dengan bentuk muka melengkung (*concaf*), tipe telinga kecil dengan arah menyamping dan mendatar,
- Kebanyakan Pejantannya tidak bertanduk dan hanya sedikit yang mempunyai tanduk kecil, sedangkan betinanya tidak bertanduk.
- Memiliki ekor dengan ukuran yang tebal dan lebar.
- Domba ini merupakan *domba pedaging* atau *domba potong* , berat jantan dewasa antara 40–60 kg, sedangkan berat badan betina dewasa 25–35 kg.
- Tinggi badan pada jantan dewasa antara 60 – 65 cm, sedangkan pada betina dewasa 52 – 60 cm.

Domba Ekor Gemuk ini mampu beradaptasi pada kondisi kering dan panas dimana penyimpanan cadangan makanan dalam tubuh dilakukan dibagian ekor dan dimanfaatkan apabila diperlukan. Di daerah seperti Sumenep, Pamekasan, Situbondo, Probolinggo, dan Pasuruan. Wilayah penyebaran tersebut merupakan daerah pantai dengan curah hujan yang relatif kurang. Lahan-lahan dengan tanaman rumput yang berukuran pendek yang menjadi kesukaan domba masih cukup banyak.



Gambar 1.1. Domba Ekor Gemuk Jantan Dewasa

Masa pubertas Domba EG dimulai pada umur 7 bulan. Masa pubertas ini umumnya dipengaruhi oleh faktor keturunan, iklim dan makanan. Walaupun domba EG jantan sudah mencapai pubertas pada umur 6-8 bulan, namun menurut Sarwono (2002) sebaiknya perkawinan dilakukan setelah mencapai umur 10-18 bulan.

2.2. Tinjauan Tentang Spermatozoa

Spermatozoa terbentuk sebagai hasil transformasi spermatid yang /haploid. Selama proses spermatogenesis, materi nukleus spermatid didapatkan membentuk kepala spermatozoa. Sedangkan sitoplasmanya direduksi dan berubah menjadi bagian tengah dan ekor. Organel sel kompleks *golgi* membentuk kap (*tudung*) diatas nukleus dan dinamakan akrosom.

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma (Polakoski dan Zeneveld, 1996). Bila terjadi reaksi akrosom membran plasma lepas dan hilang dari permukaan anterior kromosom. Kejadian tersebut diikuti dengan pelepasan enzim di akrosom sedikit demi sedikit (Garner and Hafez, 2000).

Akrosom mempunyai peranan yang sangat penting, karena mengandung enzim yang esensial untuk proses fertilisasi. Enzim-enzim tersebut antara lain : *hialuronidase*, *akrosin*, *enzim penetrasi korona (CPE)*, *neuromidase*, *ATP-ase*, *fosfatase*, *asparatil amidase* dan *glukoronidase* (Polakoski and Zeneveld, 1996). *Hialuronidase*, berfungsi untuk mendispersikan kumulus ooforus (lapisan terluar

dari ovum), enzim *penetrasi korona (CPE)*, berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada korona radiata, sehingga korona radiata akan hancur. *Akrosin* berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa melalui zona pelusida, *ATP-ase* mempengaruhi akrosom untuk mengadakan kapasitas, *Glukoronidase*, berfungsi untuk memecah tetrasakarida yang dihasilkan oleh enzim hialuronidase dari asam hialuronat. Enzim *fosfatase* dan *amidase* belum diketahui fungsinya. Dari ke tujuh enzim tersebut maka yang mempunyai fungsi penting dalam menembus lapisan yang ada di ovum adalah : *hialuronidase, CPE dan akrosin* (Hafez 2002). Pada proses pembekuan spermatozoa ketiga enzim tersebut mengalami gangguan atau kerusakan dan menjadi tidak aktif, menurut Chang et al (2002) gangguan akibat proses pembekuan tersebut dapat mencapai 45-55%. *Kerusakan tersebut terutama dialami oleh akrosin dalam menembus zona pelusida dari sel telur.*

2.3. Fungsi Spermatozoa

Dalam hal kemampuan spermatozoa pada proses fertilisasi maka spermatozoa pada dasarnya mempunyai beberapa fungsi yang harus dipenuhi, antara lain : *migrasi, pengikatan dan penetrasi*. Pertama tentang migrasi, spermatozoa mulai bergerak didalam epididimis, selama transportasi spermatozoa dengan menggunakan ATP sebagai sumber utama untuk bergerak maupun keperluan biosintesis. Energi spermatozoa terutama berasal dari proses glikolisis. ATP merupakan energi utama untuk menggerakkan flagella spermatozoa dan telah dibuktikan adanya korelasi, antara prosentase spermatozoa yang mempunyai motilitas sangat baik dengan konsentrasi ATP. Dalam perjalanan spermatozoa memperlihatkan berbagai sifat pergerakan, sehubungan dengan media lingkungan yang dilewati. Spermatozoa dalam tubuli seminiferi tidak menunjukkan pergerakan, baru dalam epididimis ini spermatozoa akan mengalami pematangan dan mampu bergerak sendiri.

Spermatozoa dalam vagina dihadapkan kemungkinan-kemungkinan yang lebih membahayakan untuk kehidupan dan pergerakannya. Terutama oleh karena pH yang asam di vagina (pH 3-4). Pada masa birahi lendir serviks mempunyai pH

7-7,8 yang sesuai untuk spermatozoa, sehingga penetrasi ke dalam lendir serviks cepat terjadi. Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa, yaitu 1) kualitas sperma yang ditentukan oleh morfologi spermatozoa, pH dan viskositas, 2) waktu, frekuensi antar ejakulasi, 3) suhu dan 4) radiasi elektromagnetik (Salisbury, 1996). Transport spermatozoa dalam saluran reproduksi hewan betina meliputi 3 jenis : a) *rapid and short term*, b) *colonization* dan c) *slow release transportation*. Kedua, pengikatan merupakan proses ikatan membran spermatozoa yang terdiri dari lipida.

Kelompok sulfidril pada membran memegang peranan penting, karena perubahan menjadi disulfida berkaitan dengan maturasi spermatozoa. Perubahan reaksi antara SH dan S-S berpengaruh pada motilitas, metabolisme dan daya tahan hidup spermatozoa. Lipida pada plasma membran atau plasmalema berkaitan pula transmisi reseptor biokimia dari luar ke dalam sel spermatozoa. Selanjutnya plasma membran mengandung (Na^+ , K^+) ATP-ase yang berfungsi untuk keseimbangan fungsi pompa Na dan K. ATP-ase mempunyai kriteria untuk ikatan reseptor, hal ini untuk fasilitas kontak antara spermatozoa dengan bahan luar. Ketiga, dalam fertilisasi setelah penembusan spermatozoa dalam sitoplasma sel telur pada akhirnya akan terjadi bentukan metafase dan diawali pembelahan zigot. Kejadian genetik dari kromosom haploid hewan jantan berpasangan dengan kromosom haploid hewan betina, membentuk kromosom diploid tunggal.

Pada penetrasi di kumulus ooforus diperlukan fasilitas dengan melepaskan hialuronidase. Hialuronidase efektif menghidrolisis kumulus ooforus. Selanjutnya zona pelusida hanya dapat dihidrolisa oleh enzim proteolitik, yaitu akrosin dan tidak dapat dengan hialuronidase. Lapisan zona pelusida mempunyai dinding yang lebih tebal dibandingkan dengan lapisan kumulus ooforus, sehingga diperlukan daya penetrasi yang lebih kuat. Sedangkan enzim akrosin yang berfungsi untuk menembus zona pelusida sudah banyak mengalami kerusakan akibat proses pembekuan. Spermatozoa mencapai zona pelusida awalnya dengan bagian kepala spermatozoa pada permukaan sel telur, selanjutnya dengan posisi parallel. Selama penetrasi di seluruh zona pelusida dan masuk ke subzona (*perivitelina*) dalam waktu beberapa menit.

2.4. Tinjauan Tentang Akrosin

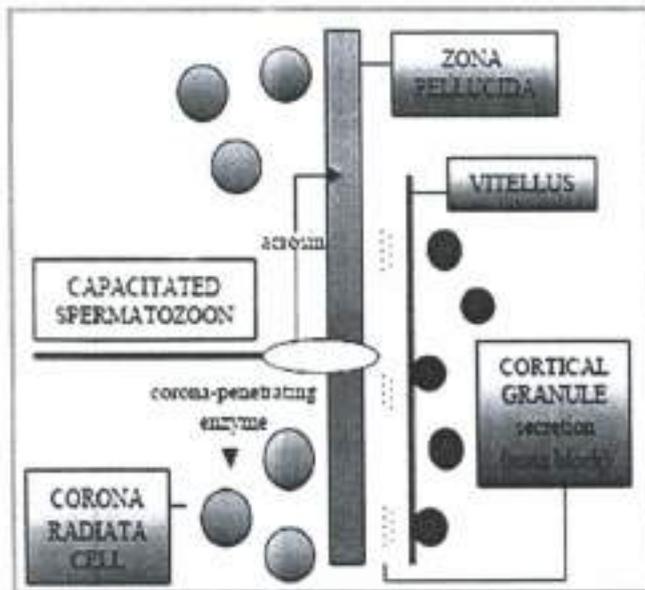
Pada testis mamalia (termasuk domba) terdapat spermatozoa yg mengandung beberapa sistem enzim, salah satu satunya adalah proakrosin yg berfungsi mengaktifkan akrosin dan memegang peranan penting dalam fertilisasi terutama dalam penetrasi zona pelusida sel telur. Akrosin disebut juga enzim *proteinase* didapatkan pada akrosom dari spermatozoa. Enzim ini sangat penting untuk proses hidrolisa zona pelusida (ZP) (Adel A. Zalata, *et al.* 2004). Adanya *Oxidative stress* (OS) menyebabkan terjadinya penurunan aktifitas akrosin. Enzim ini berasal dari proakrosin dan menjadi akrosin dengan bantuan α *serine* *proteinase* sehingga menjadi enzim yg aktif dan berfungsi dalam penetrasi zona pelusida (ZP) pada sel telur (ovum) saat terjadinya fertilisasi pada makhluk hidup (hewan). Kehadiran *inhibitor* akrosin mengindikasikan fungsi penting dari akrosin dalam interaksi *sperm-egg* pada penetrasi zona pelusida (ZP), dan ini bersifat spesies spesifik (Aditi, *et al.* 2000). Pada ovum terdapat 3 lapisan yaitu : kumulus oophorus, korona radiata dan zona pelusida. Enzim akrosin yang terdapat pada akrosomal sperma sangat penting untuk proses fertilisasi, hal ini ditunjukkan dengan penetrasi sperma ke dalam zona pelusida (ZP) dari ovum saat terjadinya fertilisasi. Peran karbohidrat sebagai signals dalam pertemuan sel sperma dengan sel telur, disamping itu untuk mengetahui sperma yang terkapasitasi maupun tidak terkapasitasi dalam menembus zona pelusida (ZP) secara *in-vitro*. Fungsi akrosin, proakrosin dan akrosin inhibitor dalam penembusan zona pelusida sel telur terjadi saat reaksi kapasitasi. Akrosin yg disebut juga *acrosomal serine protease* disintesa dari proakrosin dan menjadi enzim yang aktif dalam proses fertilisasi (Edda, TP. 1999).

Akrosin yg dihasilkan oleh akrosom dari spermatozoa sangat berpengaruh terhadap penetrasi spermatozoa pada zona pelusida (ZP) dari sel telur atau (ovum). Aktivasi akrosin dan *plasminogen* sebagai enzim *proteolitik* pada spermatozoa domba sangat penting untuk menginduksi reaksi akrosom serta penetrasi spermatozoa ke dalam sel telur (oosit). Vitamin A juga merupakan aktifator dari aktifitas akrosin dan plasminogen. Kejadian reaksi akrosom dari masing-masing daerah epididymis setelah kapasitasi bertujuan untuk penetrasi

sel telur (ovum) pada domba (Zervos *et al.* 2005). Faktor-faktor yang berhubungan dengan aktifitas akrosin pada spermatozoa dapat dipakai untuk evaluasi kesuburan pada hewan jantan. Pada proses kapasitasi menyebabkan terjadinya reaksi akrosom yang merupakan perubahan struktur yang luar biasa pada bagian anterior dari kepala spermatozoa yang nampaknya perlu bagi fertilisasi pada hewan mamalia (termasuk domba). Hal ini memungkinkan pelepasan enzim akrosin dari organel seperti kantong sehingga dapat membantu penetrasi khususnya pada zona pelusida (ZP) dari sel telur.

Inhibitor akrosin yg disebut juga proteinase inhibitor dapat diisolasi dari seminal plasma. Kecepatan aktivasi akrosin secara alamiah dipengaruhi oleh keberadaan inhibitor pada reaksi akrosomal. Disamping itu Oxidative Stress (OS) menyebabkan terjadinya imbalance antara Reactive Oxygen Spesies (ROS) dengan antioxidant. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan aktifitas akrosin. Akrosin berperan sangat penting pada penembusan lapisan ketiga dari dinding sel telur (ovum). Lapisan ini disebut zona pelusida dan merupakan lapisan yang paling tebal dan kuat di banding kedua lapisan yang lain yaitu kumulus oophorus dan korona radiata (Adel *et al.* 2004).

Kadar yang rendah dari akrosin akan menyebabkan subfertilitas dan infertilitas pada ternak. Spermatozoa yang terkapasitasi mempunyai daya tembus terhadap zona pelusida (ZP) lebih baik dari pada yg tidak terkapasitasi pada saat fertilisasi. Aktivitas pelepasan akrosin dari proakrosin pada sperma membutuhkan waktu inkubasi 2-4 jam yang ditandai dengan pematangan sel sperma atau disebut reaksi kapasitasi (William *et al.* 2001). Aktifitas akrosin dipengaruhi oleh konsentrasi sperma, motilitas sperma dan morfologi sperma. enzim akrosin menyebabkan terjadinya fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisa lapisan yg menyelimuti ovum (sel telur). Kapasitasi merupakan perubahan fisiologi yang dapat meningkatkan motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk melepaskan enzim akrosin dari bagian akrosom di kepalanya sehingga mampu menembus dinding sel telur yaitu zona pelusida (ZP) (Rosatti *et al.* 2003).



2.5. Uraian Tentang Fertilisasi

Fertilisasi merupakan persatuan gamet jantan (spermatozoa) dengan gamet betina (ovum) yang akan membentuk zigot (Gilbert, 1998, Hafez, 2002). Spermatozoa mamalia secara alami dapat membuahi ovum atau sel telur apabila telah berada dalam traktus genitalis selama beberapa saat, hal tersebut diperlukan karena di sini spermatozoa mengalami reaksi kapasitasi. Proses kapasitasi tersebut terjadi di dalam uterus dan tahap kedua berlangsung di tuba falopii. Para ahli menduga bahwa proses tersebut berlangsung karena terjadi kontak spermatozoa dengan cairan folikel yang dikeluarkan pada saat ovulasi dan adanya cAMP (Suhana, dkk. 2002). Terdapat 4 kegiatan selama fertilisasi antara lain : 1) kontak, pengenalan spermatozoa dan sel telur merupakan kontrol kualitas (spesies yang sama), 2) regulasi penetrasi spermatozoa pada sel telur merupakan kontrol kuantitas (hanya 1 sel spermatozoa), 3) fusi material genetik spermatozoa dan sel telur, dan 4) aktivasi metabolisme sel telur, awal mulai membelah (Gilbert, 1998).

Pada spermatozoa mamalia reaksi akrosom didahului oleh reaksi kapasitasi. Dalam proses kapasitasi terjadi pelepasan inhibitor proteinase dan proses ini

merupakan hal yang penting sekali karena inhibitor tersebut bila tidak dilepaskan akan menghambat kerja enzim proteinase yang terdapat didalam akrosom. Dari penelitian yang telah dilakukan pada babi, diduga bahwa permukaan ovum diselimuti oleh reseptor yang konfigurasiya berkomples dengan molekul yang menyelimuti permukaan membran spermatozoa. Keduanya diberi nama fertilisin dan antifertilisin, penelitian berikutnya menduga bahwa bahan ini diketemukan dalam beberapa filum.

Reaksi *fertilisin-antifertilisin* merupakan tahap penting dalam proses fertilisasi. Reaksi tersebut diduga merupakan proses pendahuluan dari reaksi akrosom dan berfungsi untuk menempelkan kepala spermatozoa pada permukaan ovum supaya reaksi selanjutnya dapat terjadi (Suhana *dkk.* 2002). Menurut beberapa ahli reaksi akrosom terjadi sebelum atau segera setelah kepala spermatozoa menempel pada ovum. Pada reaksi ini terjadi fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori, dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisis lapisan-lapisan yang menyelimuti ovum.

2.6. Kapasitasi dan Reaksi Akrosom

Kapasitasi dan reaksi akrosom adalah dua proses yang sangat fundamental dalam proses fertilisasi. Secara fisiologis kapasitasi dan reaksi akrosom terjadi didalam saluran kelamin betina (Baldi *et al*, 2000) dan pada saat ini peristiwa kapasitasi dan reaksi akrosom dapat dilakukan dalam sistem kultur *in vitro* dengan cara inkubasi dengan medium yang spesifik (Harrison and Gadella, 2002; Gordon, 2000). Kapasitasi adalah suatu komplek reaksi biokimia dan fisiologis. Selama kapasitasi terjadi modifikasi dan karakterisasi membran, aktivitas enzim dan sifat motilitas spermatozoa (Baldi *et al*, 2000), terjadi perubahan pola motilitas yaitu hiperraktivasi dari spermatozoa (Gordon, 2000). Pada saat kapasitasi secara molekuler terjadi modifikasi kalsium ion intraseluler dan ion-ion lainnya, perubahan lipid dan fosfolipid membran, perubahan fosforilasi protein dan aktivitas proteinkinase. Terjadi perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid

sehingga meningkatkan fluiditas membran, merubah struktur dan komposisi membran plasma sehingga terjadi perubahan ratio kolesterol dan fosfolipid.

Salah satu tahap awal pada kapasitasi spermatozoa adalah hilangnya kolesterol dari membran plasma. Keluarnya kolesterol merangsang perubahan susunan lipid membran yang pada akhirnya meningkatkan permeabilitas membran terhadap Ca^{2+} , HCO_2^- , K^+ . Tingginya konsentrasi ion-ion intraseluler akan merangsang terjadinya reaksi akrosom. Komponen yang dapat merangsang kapasitasi adalah bicarbonat (CO_2) yang akan berperan dalam pembentukan adenyl cyclase yang akan menambah konsentrasi c-AMP mengaktifkan protein kinase A-dependent protein phosphorylasi cascade yang dapat mengubah susunan lipid pada membran plasma spermatozoa (Harrison and Gadella, 2002).

Reaksi akrosom secara fisiologis tergantung dari interaksi spermatozoa dengan protein dari zona pelusida yaitu ZP_3 . Proses ini diikuti dengan pelepasan beberapa enzim akrosom dan bahan-bahan lain yang memberi fasilitas penting untuk terjadinya penetrasi spermatozoa dalam zona pelusida dan berpindahnya molekul-molekul pada segmen equatorial spermatozoa yang diikuti dengan fusi dari membran spermatozoa dengan oolema dari oosit. Mekanisme berpindahnya molekul-molekul tersebut dan sinyal transduksi mendorong terjadinya proses kapasitasi dan reaksi akrosom dan adanya perubahan kadar kalsium ion intraseluler dan ion-ion lain serta adanya transfer lipid dan fosfolipid. Serta aktivasi fosfolipase, aktivasi fosforilasi protein dan aktivasi protein kinase (Baldi *et al*, 2000).

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui suplementasi enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG (Ekor Gemuk) terhadap peningkatan kualitas dan potensi spermatozoa.
2. Untuk mengetahui pengaruh suplementasi enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG terhadap peningkatan fertilisasi in-vitro.

3.2. Manfaat Penelitian

1. Memanfaatkan enzim α *serine protease* (*akrosin*) pada spermatozoa domba EG sebagai *media kapasitasi* spermatozoa pada proses *fertilisasi*
2. Enzim α *serine protease* (*akrosin*) dapat mempertahankan kualitas spermatozoa domba EG sehingga dapat digunakan untuk *meningkatkan kualitas dan potensi spermatozoa*
3. Enzim α *serine protease* (*akrosin*) yang diisolasi sebagai bahan (produk) *bioaktif* dapat digunakan untuk perbaikan fertilitas ternak domba *sehingga dapat meningkatkan populasi* melalui *transfer embrio*.

3.3. Luaran

Penelitian ini diharapkan dipublikasikan pada Jurnal Ilmiah Nasional serta sebagai Bahan Ajar bagi mahasiswa semester VII Fakultas Kedokteran Hewan Unair

BAB IV METODE PENELITIAN

Pada penelitian suplementasi akrosin spermatozoa domba ekor gemuk terhadap potensi biologis spermatozoa hasil sentrifugasi, dilakukan pemeriksaan terhadap spermatozoa yang meliputi : motilitas, viabilitas, membran plasma utuh spermatozoa (MPU), tudung akrosom utuh (TAU) (penelitian tahun pertama), kapasitasasi dan reaksi akrosom. Fertilisasi in-vitro dilakukan dengan spermatozoa yang sudah disuplementasi *akrosin* maupun tanpa *akrosin* dan dilihat angka keberhasilan fertilisasinya (penelitian tahun kedua).

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung 2 bulan, dan dilakukan di 3 tempat, yaitu aplikasi isolat akrosin pada potensi biologis spermatozoa domba hasil sentrifugasi dilakukan di laboratorium kemajiran FKH Unair. Fertilisasi in-vitro dilakukan di Laboratorium In-Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Unair, pemeriksaan kapasitasasi dan reaksi akrosom di lab. Intstitut Tropical Disease (ITD) Unair.

3.2. Penelitian suplementasi akrosin terhadap potensi dan kualitas spermatozoa dilanjutkan dengan fertilisasi in-vitro

Pada penelitian suplementasi akrosin terhadap potensi biologis spermatozoa adalah untuk mengetahui peran akrosin pada spermatozoa domba ekor gemuk terhadap persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), kapasitasasi, reaksi akrosom spermatozoa hasil sentrifugasi. Fertilisasi in-vitro dilakukan dengan dan tanpa suplementasi akrosin kemudian dilihat angka keberhasilan fertilisasinya.

3.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorik. Suplementasi enzim *proteinase* (*akrosin*) dan waktu inkubasi dengan menggunakan faktorial 4 x 2. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 faktor yaitu :

pemberian medium dan waktu inkubasi. Faktor pemberian medium (A) terdiri dari 4 taraf yaitu pemberian medium BO, akrosin 3,0 µgram, 4,5 µgram dan 6,0 µgram. Sedangkan faktor inkubasi (B) terdiri dari 2 taraf yaitu waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit. Masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ulangan.

Skema rancangan penelitian: peran enzim α serine protease (akrosin) pada spermatozoa domba ekor gemuk terhadap *potensi biologis* spermatozoa dan *fertilisasi in-vitro*

Perlakuan Sperma	Media	Hasil pengamatan potensi spermatozoa dan fertilisasi in vitro	
		30 menit	60 menit
Sentrifugasi	Spz + BO
	Spz+BO+ Akr 3,0 µg
	Spz +BO+ Akr 4,5 µg
	Spz +BO+ Akr 6,0 µg

Keterangan :

- Spz : Spermatozoa
- BO : Brackett and Olliphant
- Akr : Enzim α serine proteinase/akrosin

3.2.2. Bahan Dan Alat Penelitian

3.2.2.1. Bahan Penelitian

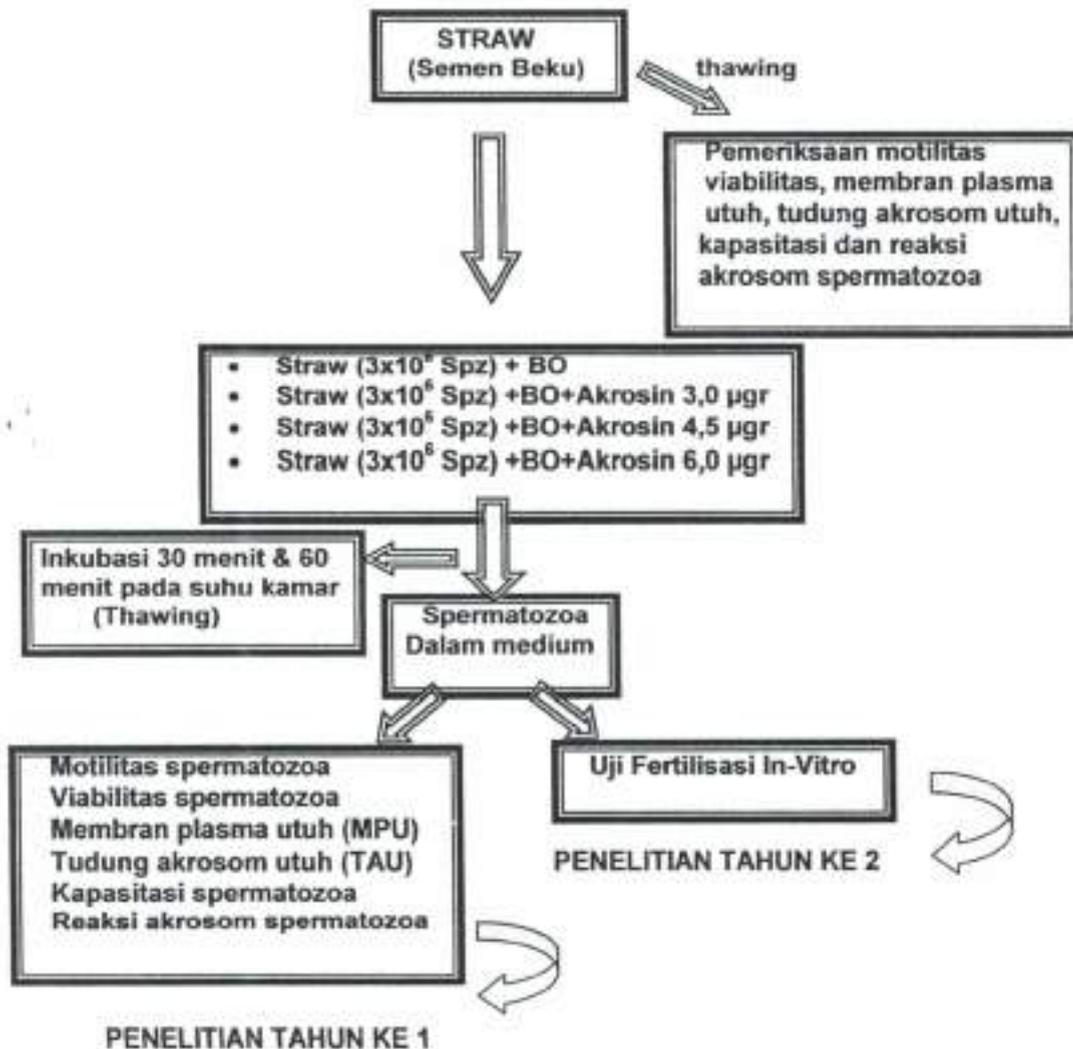
Bahan yang digunakan adalah enzim akrosin dari spermatozoa domba ekor gemuk (EG) hasil elusi, semen domba yang ditampung dari domba EG dalam kondisi sehat dan mempunyai libido tinggi, larutan hipoosmotik 0,032 M (7,35 g Natrium sitrat 2H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan ke dalam 1 liter akuades), formalin, eosin negrosin, NaCl 3%, NaCl fisiologis, pewarnaan Chlortetracyclin (CTC) terdiri dari : (CTC Fixative, DABCO, asam trikloroasetat 20%, HCl 1N, Natrium thiobarbiturat 1%), nitrogen cair, egg yolk sitrat, pewarnaan FITC (Fluorescen Iso Thio Cyanate) , media maturasi (TCM₁₉₉=Culture Tissue Medium +SE=Serum Estrus), media fertilisasi(TCM₁₉₉=Tissue Culture Medium+FCS=Foetal Calf Serum), media BO

(Brackett and Olliphant), media pencuci oosit (OWS= Oocyte Washing Solution) dan media kapasitas spermatozoa (EBSS = Early Balanced Salt Solution)

3.2.2.2. Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah tabung berskala, tabung sentrifus, alat sentrifus, gelas objek, gelas penutup, inkubator anaerob, mikroskop fase kontras, mikroskop epifluoresen, spektrofotometer, container straw, straw domba EG, cawan petri, spuit dan jarum suntik 18G, laminar floor, lemari es, water bath, timbangan analitik, pH meter, pengaduk magnetik, eppendorf, pipet eppendorf, foto digital.

3.2.3. Kerangka Operasional Penelitian : Uji akrosin terhadap kualitas dan potensi biologis spermatozoa hasil sentrifugasi serta fertilisasi in-vitro



3.2.4. Tahapan Penelitian

3.2.4.1. Penampungan semen

Semen dari domba EG pejantan ditampung dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan disiapkan dengan memasang kedua selubung dan alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air hangat yang bersuhu 45°C dengan tujuan memberi

suhu terhadap selubung dalam sebesar 42-43°C dan sepertiga bagian depan selubung dalam vagina buatan diolesi vaselin. Selanjutnya pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium untuk diperiksa.

3.2.4.2. Pemeriksaan kualitas semen segar dan pemeriksaan semen setelah sentrifugasi yang akan digunakan untuk suplementasi

Pemeriksaan kualitas semen segar dilakukan secepat mungkin setelah penampungan. Pemeriksaan kualitas semen segar terdiri dari pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi : volume, warna, pH, bau dan konsistensi. Pemeriksaan mikroskopis meliputi : konsentrasi spermatozoa, persentase motilitas spermatozoa yang progresif, motilitas massa, persentase viabilitas spermatozoa, membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU), kapasitasi dan reaksi akrosom. Pemeriksaan kualitas semen setelah sentrifugasi meliputi persentase motilitas spermatozoa yang progresif, viabilitas spermatozoa, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), kapasitasi dan reaksi akrosom.

3.2.4.3. Perlakuan Semen Setelah Sentrifugasi

Semen yang berkualitas baik, sebanyak 0,5 ml kemudian ditambah medium BO sebanyak 1 ml dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Endapan (pellet) diambil dengan spuit, dimasukkan ke dalam tabung, kemudian dihitung sebanyak 3×10^6 spermatozoa untuk diberi perlakuan. Spermatozoa hasil sentrifugasi masing-masing dibagi 4 yaitu tabung I diisi dengan spermatozoa dan medium BO, tabung II diisi dengan spermatozoa, medium BO dan akrosin 3,0 µg, tabung III diisi dengan spermatozoa, medium BO dan akrosin 4,5 µg, tabung IV diisi dengan spermatozoa, medium BO dan akrosin 6,0 µg. Selanjutnya dilakukan inkubasi 30 menit dan 60 menit pada suhu kamar. Suspensi spermatozoa diambil dengan spuit kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa, viabilitas

spermatozoa dan membran plasma utuh spermatozoa, tudung akrosom utuh, kapasitasi dan fertilisasi in-vitro.

3.2.4.4. Metode Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Spermatozoa

a. Pemeriksaan Makroskopis meliputi :

1. **Volume** : volume semen yang tertampung dapat dibaca langsung pada tabung penampung yang berskala
2. **Warna** : warna semen diperiksa dengan pengamatan secara langsung sesaat setelah penampungan
3. **Bau** : bau semen tergantung dari jenis hewannya (spesifik)
4. **Konsistensi** : konsistensi atau derajat kekentalan diperiksa dengan menggoyangkan atau memiringkan tabung yang berisi semen secara perlahan-lahan sehingga terlihat gerakan di dalam tabung, apabila gerakan lambat diartikan sebagai semen yang mempunyai konsistensi kental, sedangkan jika gerakan cepat diartikan semen mempunyai konsistensi encer.
5. **pH (Derajat Keasaman)** : pengukuran pH semen dilakukan dengan menggunakan kertas lakmus segera setelah penampungan dan dicocokkan dengan standar yang ada

b. Pemeriksaan Mikroskopis meliputi :

1. **Motilitas Spermatozoa**

Sebanyak 10 μ l suspensi semen, diencerkan dengan Na Cl fisiologis kemudian ditetaskan pada gelas obyek yang terdapat lekukan ditengahnya, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati berapa banyak spermatozoa yang bergerak progresif (maju ke depan) dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar agar spermatozoa mempunyai pergerakan yang optimal. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa yang motil (progresif) dan non motil sampai sebanyak 100 spermatozoa. Motilitas spermatozoa dibagi menjadi 4 kriteria yaitu :

bergerak maju kedepan, bergerak mundur, bergerak berputar atau ditempat dan tidak bergerak.

2. Motilitas Massa

Sebanyak 10 μ l suspensi semen diteteskan pada gelas obyek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar agar spermatozoa mempunyai pergerakan yang optimal. motilitas massa diamati berdasarkan gerakan spermatozoa dalam suatu kelompok yang mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersama-sama ke satu arah yang merupakan gelombang-gelombang yang tebal dan tipis, bergerak cepat atau lambat tergantung dari konsentrasi dan aktifitas hidup di dalamnya. Penilaian motilitas massa dibagi menjadi 4 kriteria yaitu :

- a. Sangat baik (+++) : merupakan gelombang kecil sampai besar yang tebal dan gelap dalam jumlah banyak dan bergerak cepat
- b. Baik (++) : merupakan gelombang tipis, jarang dan gerakannya lamban
- c. Sedang (+) : tidak terlihat gelombang, spermatozoa sendiri-sendiri
- d. Buruk (0) atau N : hanya sedikit atau tidak ada sama sekali gerakan individu

3. Konsentrasi

Penentuan konsentrasi spermatozoa diukur dengan menggunakan Haemocytometer Thoma dengan cara kerja sebagai berikut :

Pipet eritrosit diisi dengan cairan semen sampai tanda 0,5 NaCl 3% yang ditambah eosin dihisap sampai tanda 101 pada pipet. Kemudian dikocok sampai homogen dan beberapa tetes dibuang. Satu tetes ditempatkan pada cover thoma, dihitung jumlah spermatozoa dalam 4 kotak besar yang membentuk diagonal dan satu kotak yang lain.

4. Viabilitas Spermatozoa

Spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, sehingga spermatozoa yang mati akan menyerap warna dari zat warna yang dipakai, sedang spermatozoa yang hidup tetap jernih. Semen segar diteteskan pada gelas obyek ditambahkan eosin negrosin dicampur sampai homogen dan dibuat preparat ulas, dikeringkan diatas nyala api dengan cepat. Hasil ulasan diamati dengan mikroskop fase kontras pembesaran 400x. Dihitung jumlah spermatozoa yang mati dan yang hidup dalam 3 kali perhitungan dalam 100 spermatozoa.

5. Pengujian Membran Plasma Spermatozoa dengan *Hypoosmotic Swelling Test (HOST)*

Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi dengan baik dalam penyerapan air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus. Sebanyak 1 ml larutan hypoosmotic (7,35 gram Na sitrat 2 H₂O, 13,52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml akuades) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit diamati dengan perbesaran 400x.

6. Pengujian Keutuhan Tudung Akrosom Spermatozoa

Sebanyak 0,9 gram NaCl dilarutkan dengan aquabidestilata sampai 100 ml. Kemudian 1 ml formalin ditambahkan ke dalam 99 ml larutan NaCl fisiologis dan dikocok sampai homogen. Satu bagian semen dicampurkan dengan tiga bagian campuran larutan NaCl fisiologis dan formalin dan didiamkan sekitar 3 menit. Selanjutnya dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan ditutup gelas penutup. Spermatozoa di periksa dibawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 400x. Penilaian dilakukan dengan menghitung proporsi spermatozoa dengan tudung akrosom utuh

dalam 100 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai oleh adanya tudung akrosom yang berwarna hitam.

7. Pengujian Terhadap Kapasitas dan Reaksi Akrosom

Pengamatan kapasitas dan reaksi akrosom dengan pewarnaan *Chlor Tetracycline* (CTC). Sebanyak 45 µl larutan pewarna CTC dimasukkan dalam tabung eppendorf kapasitas 1,5 ml yang ditutup dengan aluminium foil, digoyang 2-3 detik lalu ditambah 8 µl CTC fiksatif dan dilakukan homogenasi selama 10 detik, larutan tersebut diambil 10 µl dan ditempatkan pada gelas obyek, kemudian ditambahkan 10 µl DABCO, dicampur kemudian ditutup dengan gelas penutup, selanjutnya ditutup dengan kertas tissue yang tebal dan ditekan secara hati-hati, selanjutnya tepi gelas penutup ditutup dengan cutex. Preparat diperiksa dengan mikroskop fluoresen dengan perbesaran 1000x. Gambaran yang tampak adalah :

- e. Kepala spermatozoa seluruhnya berfluoresen adalah spermatozoa yang tidak mengalami kapasitas
- f. Kepala spermatozoa separuh bagian atas berfluoresen adalah spermatozoa yang mengalami kapasitas
- g. Kepala spermatozoa tidak berfluoresen dan hanya bagian equatorial yang berfluoresen adalah spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom

3.2.5. Variabel Penelitian

Variabel bebas : lama inkubasi, dosis akrosin

Variabel tergantung : persentase motilitas spermatozoa yang progresif, viabilitas spermatozoa, membran plasma utuh (MPU) spermatozoa, tudung akrosom utuh (TAU), kapasitas, reaksi akrosom, dan angka fertilisasi in-vitro.

Variabel kendali : kecepatan dan lama sentrifugasi, medium, kualitas semen

3.2.6. Definisi Operasional Penelitian :

- a. Motilitas spermatozoa : spermatozoa yang bergerak aktif ke depan dalam satu lapang pandang
- b. Viabilitas spermatozoa : spermatozoa yang hidup pada bagian kepala spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin akan berwarna jernih
- c. Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa : persentase jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh yang ditandai dengan adanya pembengkakan pada kepala spermatozoa dan adanya ekor yang melingkar yang diuji dengan teknik *Hypoosmotik Swelling Test* (HOST)
- d. Tudung akrosom utuh (TAU) : tudung akrosom utuh pada spermatozoa ditandai dengan adanya bagian tudung berwarna hitam
- e. Kapasitas spermatozoa : perubahan membran spermatozoa melibatkan perubahan metabolisme dan influk Ca^{2+} dan mempersiapkan terjadinya reaksi akrosom. Spermatozoa yang terkapasitas ditandai dengan bagian akrosom berfluoresen
- f. Reaksi akrosom : perubahan yang melibatkan fusi antara membran plasma dan membran akrosom luar spermatozoa dan pelepasan enzim hyaluronidase dan akrosin sehingga membran spermatozoa menjadi tidak stabil dan tidak ada Ca^{2+} . Spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom ditandai dengan bagian equatorial berfluoresen

3.2.7. Analisa Data

Data persentase motilitas, viabilitas, persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa, tudung akrosom utuh (TAU), kapasitas, reaksi akrosom dan angka keberhasilan fertilisasi diuji dengan Anava pada tingkat kepercayaan 5%, bilamana terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan Uji BNJ (Beda Nyata Jujur)

BAB V HASIL PENELITIAN

Semen beku yang dijadikan sebagai sampel penelitian untuk disuplementasi akrosin memiliki kriteria sebagaimana semen yang layak untuk dipakai sebagai inseminasi buatan pada domba EG yang diproduksi oleh BIB Singosari, yaitu berwarna putih kekuningan, pH 6-7, motilitas massa 2⁺ sampai dengan 3⁺, motilitas individu spermatozoa \geq 65% (BIB Singosari 2009). Data selengkapnya tertera pada Tabel 5.1 di bawah ini :

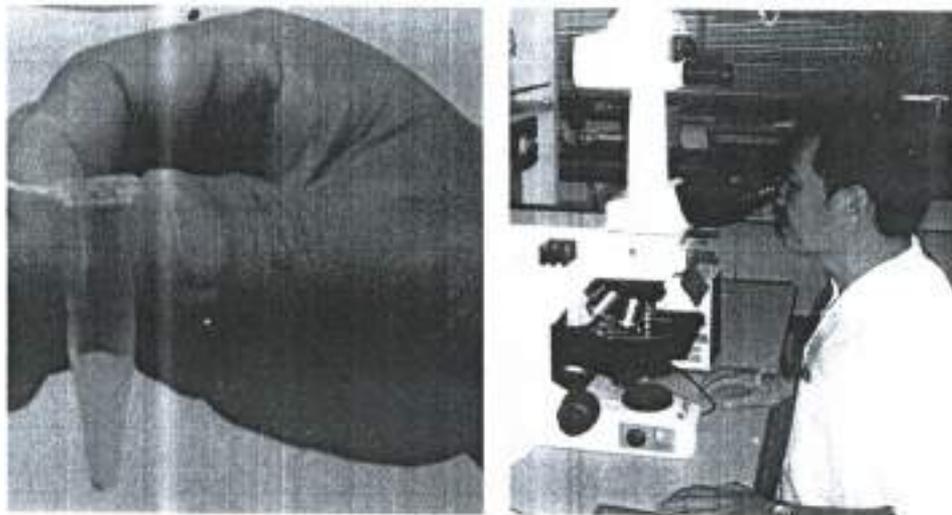
Tabel 5.1. Karakteristik semen beku Domba EG setelah dithawing

Jenis domba : Domba (EG) Kode produksi : H055/2011
 Nama domba : Raihan Asal semen beku : BIB Singosari Malang

Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis pada semen beku Domba EG setelah dithawing

Parameter	Rata-rata \pm SD
Warna	Putih kekuningan
Konsistensi	Sedang
Ph	6,56
Volume (ml)	0,25
Motilitas Massa	2 ⁺ - 3 ⁺
Motilitas Individu (%)	68,43 \pm 4,68
Viabilitas (%)	75,21 \pm 4,11
Abnormal (%)	9,74 \pm 1,13
Integritas Membran	45,87 \pm 6,56
Status Kapasitasi	79,10 \pm 7,55
Reaksi Akrosom	10,05 \pm 2,95
Non Kapasitasi	20,89 \pm 7,55

Derajat keasaman (pH) berperan menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Rataan pH semen segar domba yang diperoleh dari penelitian ini adalah 6,56. Nilai pH tersebut berada dalam kisaran pH normal, seperti dinyatakan oleh Garner dan Hafez (2000) bahwa domba memiliki pH berkisar antara 5,9 – 7,3.



Gambar 5.1.1. Pemeriksaan semen beku domba setelah dilakukan thawing (pencairan)

Rataan persentase motilitas spermatozoa Domba EG dari penelitian ini adalah $68,43 \pm 4,68$. Motilitas spermatozoa ini menunjukkan lebih tinggi dibandingkan yang dilaporkan Tambing, dkk.(2000) bahwa motilitas spermatozoa Domba EG adalah $64,29 \pm 2,70$ %, akan tetapi sedikit lebih rendah dari yang dilaporkan Wicaksono (1999) bahwa motilitas spermatozoa domba adalah $77,88 \pm 2,61$ %.



Gambar 5.1.2. Suplementasi (penambahan) akrosin BM 43 kD pada spermatozoa domba

Rataan persentase integritas membran spermatozoa domba dari penelitian ini adalah $45,87 \pm 6,56$ %. Hasil ini lebih rendah dibandingkan yang dilaporkan Isnaini

(2006) bahwa integritas membran Domba EG adalah $62,33 \pm 3,66$ %. Penurunan kualitas spermatozoa dapat terjadi karena faktor biologi maupun karena pengaruh faktor prosesi semen.

Hasil penelitian kapasitas, reaksi akrosom dan non kapasitas spermatozoa semen beku setelah dithawing masing-masing adalah $79,10 \pm 7,55$ %, $10,05 \pm 2,95$ % dan $20,99 \pm 2,89$ %. Hasil ini sedikit lebih baik dari yang dilaporkan oleh Zamanti (2003) bahwa kapasitas yaitu $24,25 \pm 0,10$ %, reaksi akrosom yaitu $9,83 \pm 0,14$ % dan non kapasitas yaitu $64,23 \pm 0,21$ %, sedangkan Isnaini (2006) menyatakan bahwa kapasitas yaitu $43,75 \pm 5,25$ %, reaksi akrosom yaitu $39,57 \pm 5,89$ % dan non kapasitas yaitu $16,74 \pm 1,63$ %.

5.2.1. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Motilitas Spermatozoa Domba EG

Pengaruh suplementasi akrosin dosis 0; 3,0; 4,5 serta 6,0 μg dan lama inkubasi 30 serta 60 menit terhadap persentase motilitas spermatozoa Domba EG dapat dilihat pada tabel 5.2. dibawah ini.

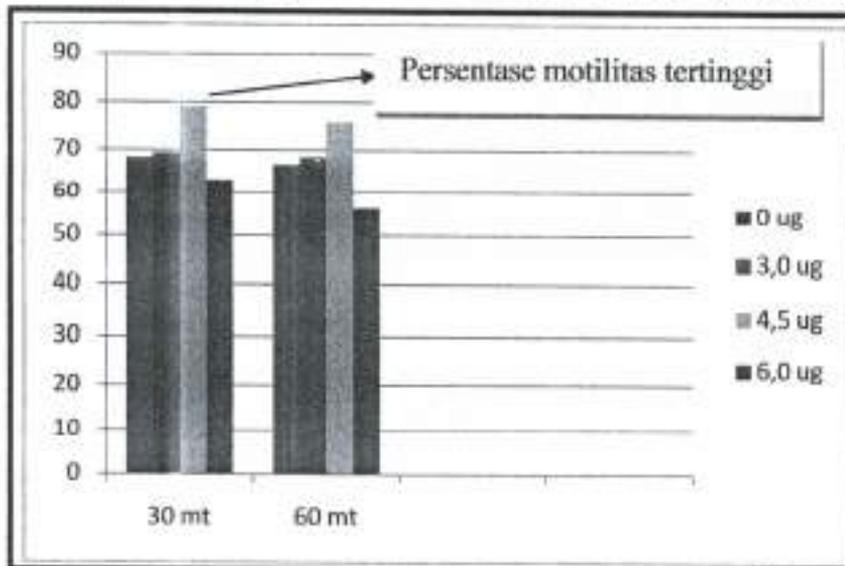
Tabel 5.2. Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Motilitas Spermatozoa Domba (%)	Anova
0	30	$68,43 \pm 4,68^a$	$F_w : 2,807$ $p : 0,098$
	60	$66,75 \pm 6,22^a$	
3,0	30	$69,38 \pm 3,57^a$	$F_{ak} : 20,105$ $p : 0,000$
	60	$68,59 \pm 8,47^a$	
4,5	30	$79,12 \pm 5,62^b$	$F_{w*ak} : 0,595$ $p : 0,662$
	60	$76,16 \pm 3,92^b$	
6,0	30	$62,92 \pm 11,17^c$	
	60	$56,19 \pm 12,54^c$	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

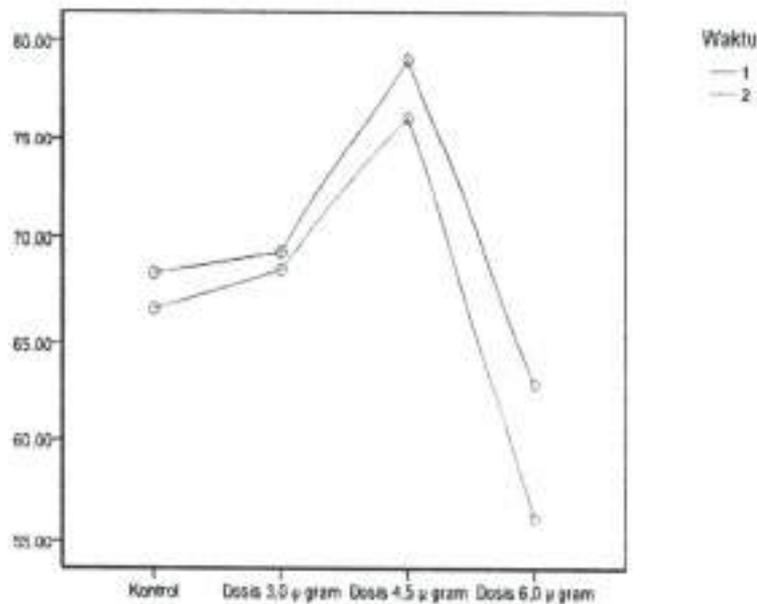
Tabel 5.2. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa Domba EG berkisar antara 56,19 – 79,12 %.

Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg masing-masing menghasilkan rata-ran persentase motilitas berkisar antara 66,75 – 68,43; 68,59 – 69,38%; 76,16 – 79,12% dan 56,19 – 62,92%. Hubungan antara suplementasi akrosin dan motilitas pada berbagai level inkubasi tertera pada gambar 5.2.1.



Gambar 5.2.1. Rataan persentase motilitas spermatozoa Domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-ran persentase motilitas spermatozoa Domba EG. Efek interaksi antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi (keduanya) menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-ran persentase motilitas spermatozoa (lampiran 1).



Gambar 5.2.2. Grafik suplementasi akrosin terhadap motilitas spermatozoa

Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase motilitas spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau(—) : pemeriksaan 60 menit

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase motilitas spermatozoa domba dilanjutkan dengan uji Honestly Significant Different (HSD) metode Tukey hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa akrosin dan perlakuan dengan akrosin 3,0 µgram pada berbagai level lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase motilitas spermatozoa Domba EG. Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 4,5 dan 6,0 µg pada berbagai lama inkubasi menunjukkan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase motilitas spermatozoa Domba EG (lampiran 1).

5.2.2. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Viabilitas Spermatozoa Domba EG

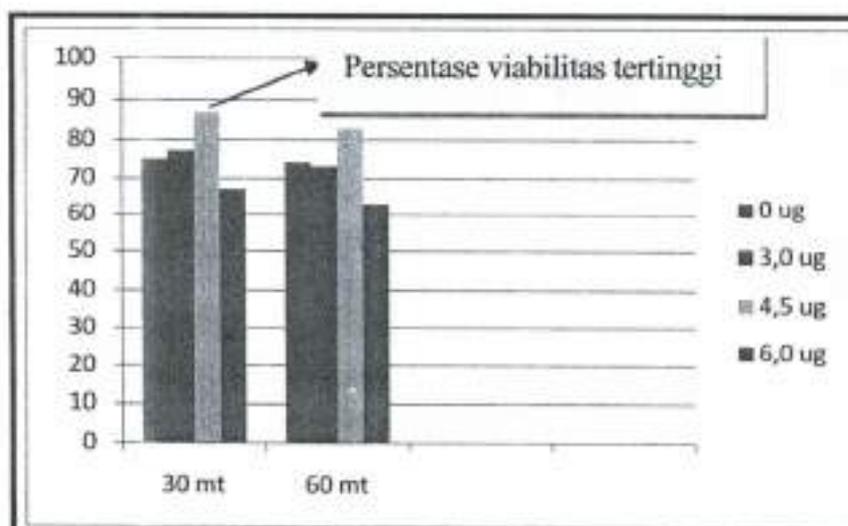
Pengaruh suplementasi akrosin dosis 0; 3,0; 4,5 serta 6,0 µg dan lama inkubasi 30 serta 60 menit terhadap persentase viabilitas spermatozoa Domba EG dapat dilihat pada tabel 5.3. dibawah ini.

Tabel 5.3. Rataan Persentase Viabilitas Spermatozoa Domba EG setelah Supplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

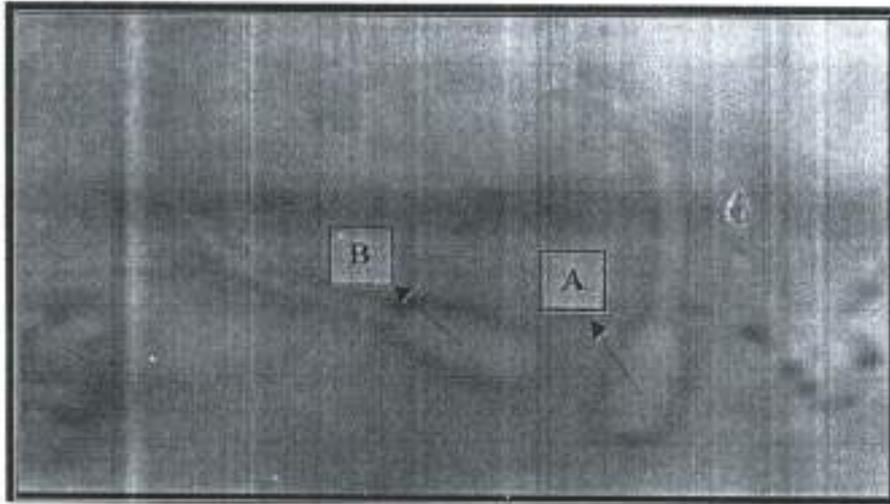
Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Viabilitas Spermatozoa Domba (%)	Anova
0	30	$75,21 \pm 4,11^a$	$F_w : 3,968$ $p : 0,054$
	60	$74,36 \pm 4,25^a$	
3,0	30	$77,44 \pm 3,51^a$	$F_A : 32,660$ $p : 0,000$
	60	$73,40 \pm 4,58^a$	
4,5	30	$87,02 \pm 5,20^b$	$F_{w^*Ak} : 0,243$ $p : 0,866$
	60	$83,05 \pm 5,63^b$	
6,0	30	$67,15 \pm 11,27^c$	
	60	$62,92 \pm 11,17^c$	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.3. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG berkisar antara 62,92 – 87,02%. Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg masing-masing menghasilkan rataan persentase motilitas berkisar antara 74,36 – 75,21%; 73,40 – 77,44%; 83,05 – 87,02 dan 62,92 – 67,15%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa penambahan akrosin sampai 3,0 μg dapat menaikkan rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG tertera pada gambar 5.2.3.



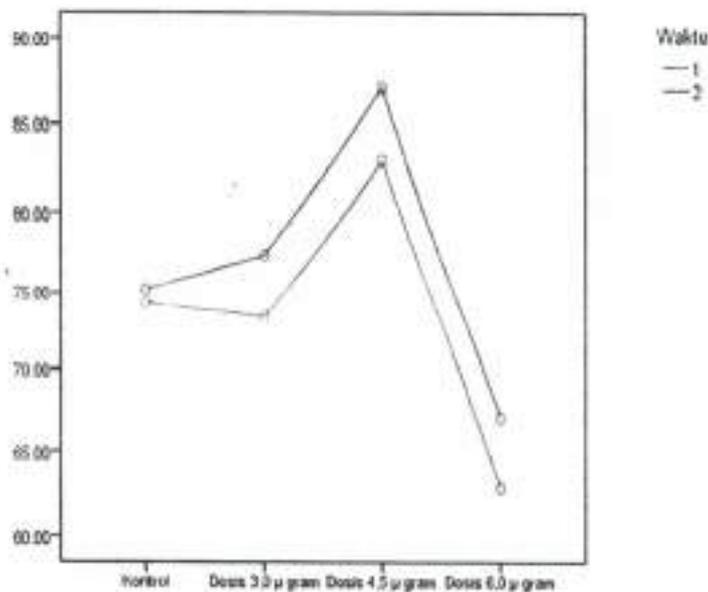
Gambar 5.2.3. Rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda



Gambar 5.2.4. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa Domba EG dengan mikroskop cahaya *phase kontras*, keterangan : A. spermatozoa hidup (transparan) dan B. spermatozoa mati (warna ungu)

Spermatozoa yang hidup memiliki membran yang intak (Gambar 5.2.4A), menyebabkan zat warna eosin negrosin tidak dapat masuk melewati membran.

Membran berfungsi melindungi organ dalam sel dan sebagai filter pada permukaan intraseluler dan ekstraseluler. Spermatozoa yang mati (gambar 5.2.4B) menunjukkan membran plasmanya rusak. Keadaan ini menyebabkan proses metabolisme sel terganggu dan permeabilitas membran menjadi sangat tinggi sehingga zat warna eosin negrosin dapat melewati membran dan berakibat fatal bagi spermatozoa (Saili, 1999).



Gambar 5.2.5. Grafik suplementasi akrosin terhadap viabilitas spermatozoa

Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase viabilitas spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau (—) : pemeriksaan 60 menit

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa Domba EG. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi serta interaksi keduanya berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG (lampiran 2).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap viabilitas spermatozoa Domba EG dilanjutkan dengan uji HSD (Tukey). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa akrosin dan perlakuan dengan akrosin 3,0 µgram pada berbagai level lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG. Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 4,5 dan 6,0 µg pada berbagai lama inkubasi menunjukkan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa Domba EG (lampiran 2).

Hasil penelitian rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG tertera pada tabel 5.4.

5.2.3. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Abnormalitas Spermatozoa Domba EG

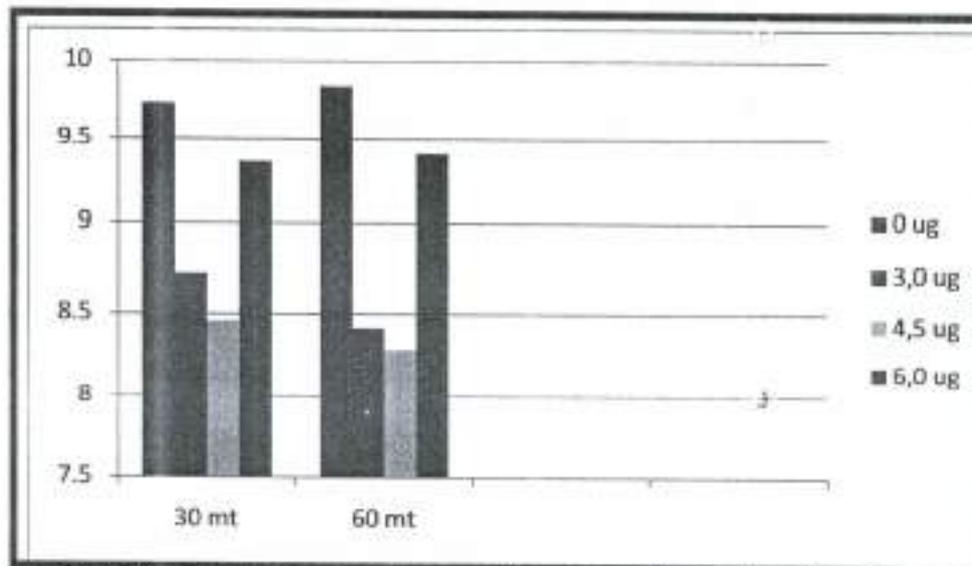
Pengaruh suplementasi akrosin dosis 0; 3,0; 4,5 serta 6,0 μg dan lama inkubasi 30 serta 60 menit terhadap persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG dapat dilihat pada tabel 5.4. dibawah ini.

Tabel 5.4. Rataan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Abnormalitas Spermatozoa Domba (%)	Anova
0	30	$9,74 \pm 1,13^a$	$F_w : 0,028$ $p : 0,868$
	60	$9,85 \pm 1,54^a$	
3,0	30	$8,73 \pm 2,30^{ab}$	$F_{ak} : 3,977$ $p : 0,015$
	60	$8,42 \pm 1,63^{ab}$	
4,5	30	$8,46 \pm 1,94^b$	$F_{w*ak} : 0,044$ $p : 0,987$
	60	$8,29 \pm 1,47^b$	
6,0	30	$9,36 \pm 2,25^{ab}$	
	60	$9,41 \pm 1,81^{ab}$	

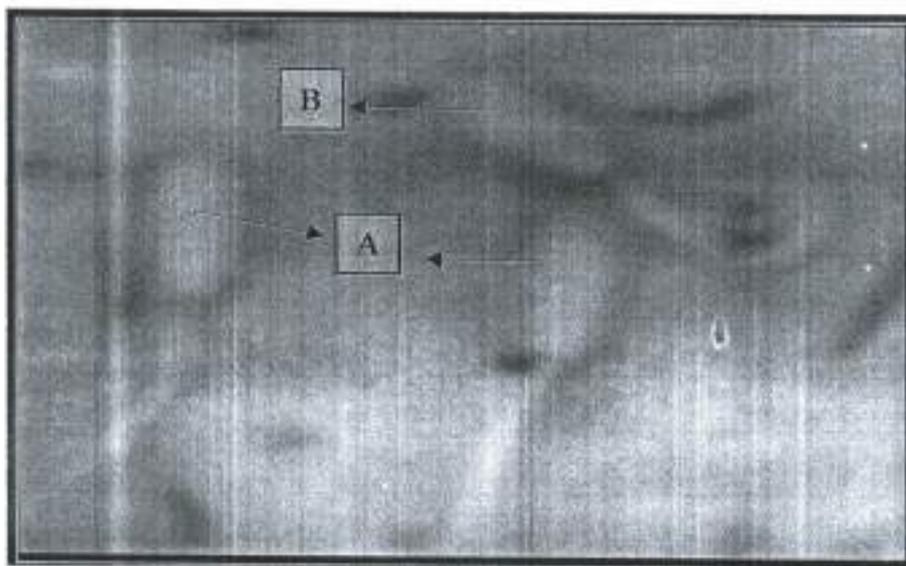
Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.4. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG berkisar antara 8,29 – 9,85%. Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 masing-masing menghasilkan rataan persentase motilitas berkisar antara 9,74 – 9,85%; 8,42 – 8,73%; 8,29 – 8,46 dan 9,36 – 9,41%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa penambahan akrosin sampai 3,0 μg dapat menurunkan rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG tertera pada gambar 5.6



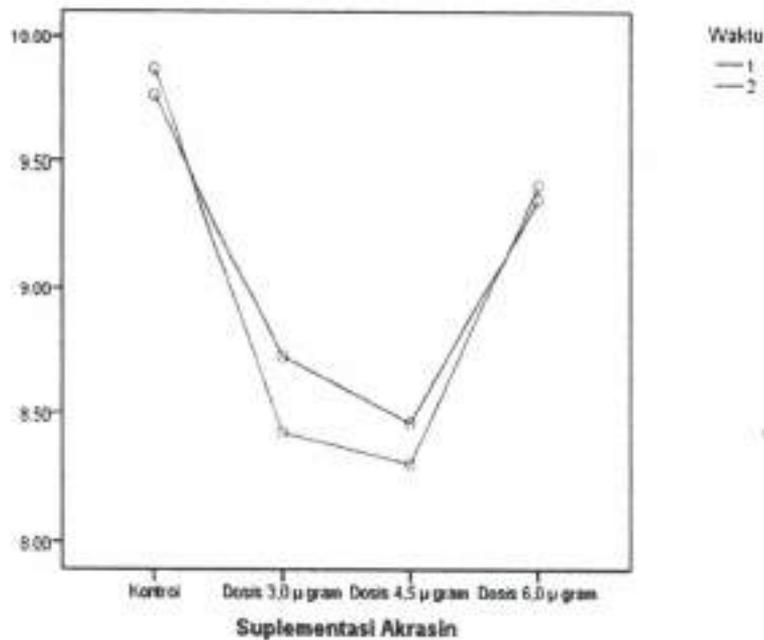
Gambar 5.2.6. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama yang berbeda

Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa Domba EG dengan pewarnaan eosin negrosin yang diamati pada mikroskop phase kontras pembesaran 1000 kali tertera pada gambar 5.2.7.



Gambar 5.2.7. Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa Domba EG dengan mikroskop cahaya, keterangan : A. Spermatozoa utuh (seluruh-bagian tubuh spermatozoa sempurna dan berwarna transparan) dan B. spermatozoa abnormal (bagian tubuh tidak normal dengan formasi ekor tidak sempurna)

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin menunjukkan berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG, sedangkan lama inkubasi serta interaksi keduanya berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rataan persentase abnormalitas Domba EG (lampiran 3)



Gambar 5.2.8. Grafik suplementasi akrosin terhadap abnormalitas spermatozoa

Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase abnormalitas spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau (—) : pemeriksaan 60 menit

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap abnormalitas spermatozoa Domba EG dilanjutkan dengan uji HSD (Tukey). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan dengan suplementasi akrosin dosis 3,0 dan 6,0 µg pada berbagai lama inkubasi berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG, sedangkan suplementasi akrosin dosis 4,5 µg pada

berbagai lama inkubasi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase abnormalitas spermatozoa Domba EG (lampiran 3).

5.2.4. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Domba EG

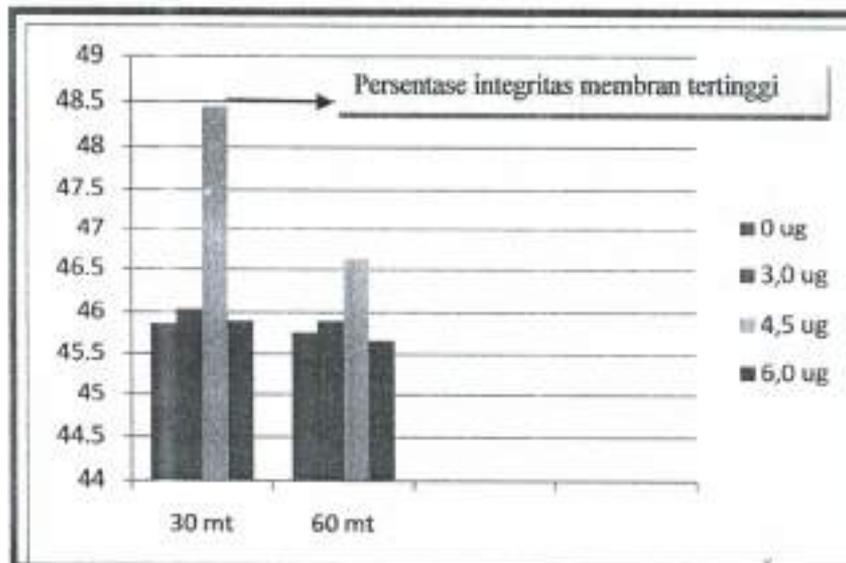
Integritas membran spermatozoa diamati dengan uji *Hipo-Osmotic Swelling* (HOS) tes. Hasil penelitian rataan persentase integritas membran spermatozoa Domba EG tertera pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Rataan Persentase Integritas Membran Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

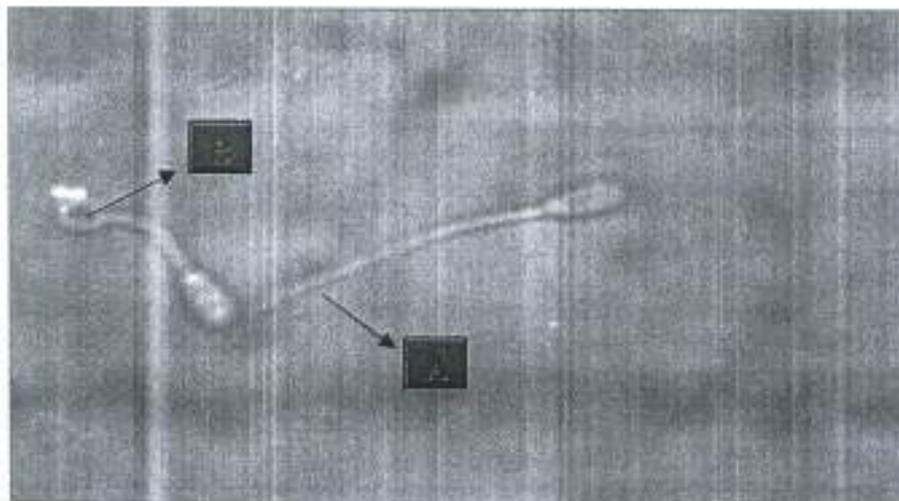
Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rerata Integritas Membran Spermatzoa Domba (%)	Anova
0	30	$45,87 \pm 6,56^a$	$F_w : 0,139$ $p : 0,711$
	60	$45,77 \pm 6,03^a$	
3,0	30	$46,04 \pm 5,85^a$	$F_{Ak} : 0,267$ $p : 0,849$
	60	$45,90 \pm 8,26^a$	
4,5	30	$48,45 \pm 8,12^a$	$F_{W^*Ak} : 0,074$ $p : 0,974$
	60	$46,63 \pm 6,75^a$	
6,0	30	$45,90 \pm 8,26^a$	
	60	$45,67 \pm 6,25^a$	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.5. menunjukkan bahwa perlakuan suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase integritas membran spermatozoa domba berkisar antara 45,77 – 48,45%. Suplementasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg masing-masing menghasilkan rataan persentase integritas membran berkisar antara 45,77-45,87%; 45,90-46,04%; 46,63-48,45% dan 45,67-45,90%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 0,30 dan 4,5 μg dapat meningkatkan rataan persentase integritas membran spermatozoa Domba EG. Hubungan suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase integritas membran spermatozoa Domba EG tertera pada gambar 5.2.9.

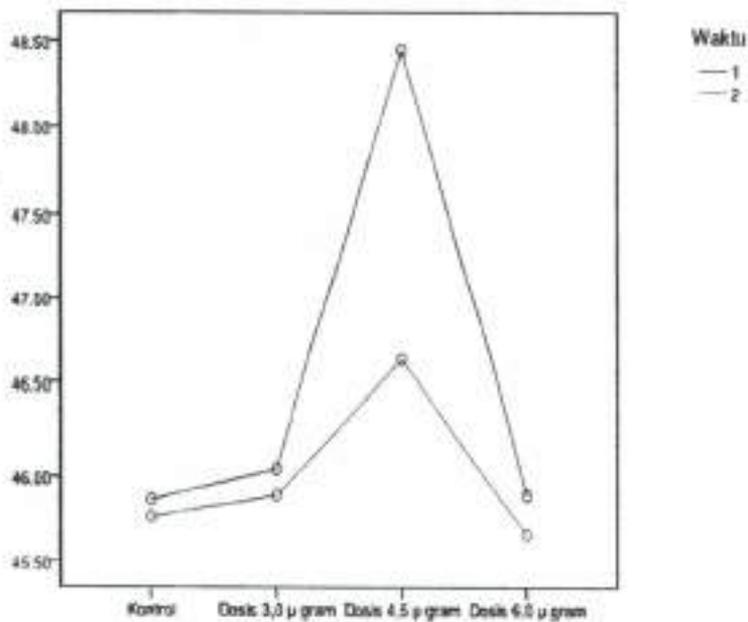


Gambar 5.2.9. Rataan persentase Integritas Membran spermatozoa Domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda



Gambar 5.2.10. Hasil pengamatan Integritas Membran spermatozoa Domba EG dengan mikroskop cahaya, keterangan : A. spermatozoa dengan membran intak (ekor melingkar), dan B. spermatozoa dengan membran spermatozoa rusak (ekor lurus).

Hasil pengamatan integritas membran spermatozoa domba dengan uji HOS tes dan diamati pada mikroskop cahaya tertera pada gambar 5.2.10 menunjukkan bahwa spermatozoa yang membrannya utuh memperlihatkan ekornya melingkar sebagai akibat masih berfungsi membran dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik (gambar 5.2.10B), sedangkan spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus (gambar 5.2.10 A).



Gambar 5.2.11. Grafik suplementasi akrosin terhadap integritas membran
Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase integritas membran spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau(—) : pemeriksaan 60 menit

Kombinasi suplementasi akrosin dan lama inkubasi berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap integritas membran spermatozoa Domba EG. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi serta interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase integritas membran spermatozoa Domba EG (lampiran 4).

5.2.5. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Status Kapasitas Spermatozoa Domba EG

Hasil penelitian rataan persentase status kapasitas spermatozoa domba EG tertera pada tabel 5.6.

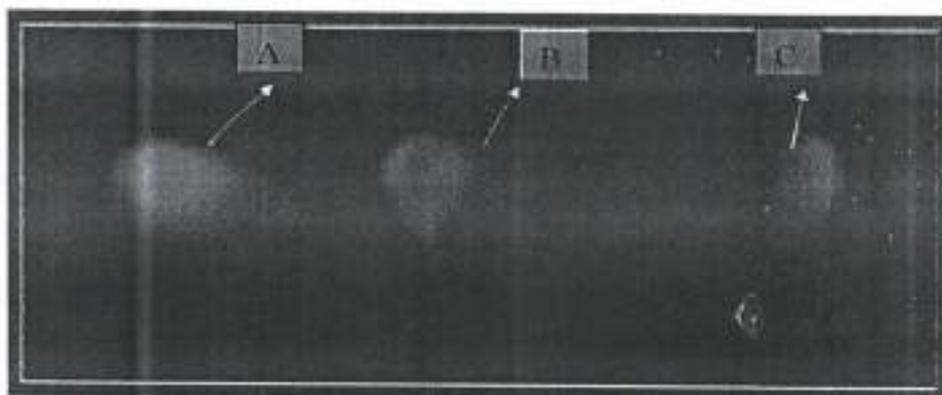
Tabel 5.6. Rataan Persentase Status Kapasitas Spermatozoa Domba EG setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Status Kapasitas Spermatzoa Domba (%)	Anova
0	30	79,10 \pm 7,55 ^a	F _w : 1,484 p : 0,231
	60	82,21 \pm 5,57 ^a	
3,0	30	76,42 \pm 8,59 ^a	F _{ak} : 22,115 p : 0,000
	60	80,23 \pm 8,50 ^a	
4,5	30	86,76 \pm 3,61 ^b	F _{w*ak} : 0,075 p : 0,973
	60	89,00 \pm 2,89 ^b	
6,0	30	62,47 \pm 15,68 ^c	
	60	63,60 \pm 15,79 ^c	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.6. menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin, suplementasi akrosin 0; 3,0 μg , 4,5 μg dan 6,0 μg masing-masing diperoleh rataan persentase kapasitas spermatozoa domba EG adalah : 79,10 - 82,21%; 76,42 - 80,23%; 86,76 - 89,00%; 62,47 - 63,60%. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin sampai 4,5 μg dapat meningkatkan rataan persentase kapasitas spermatozoa domba.

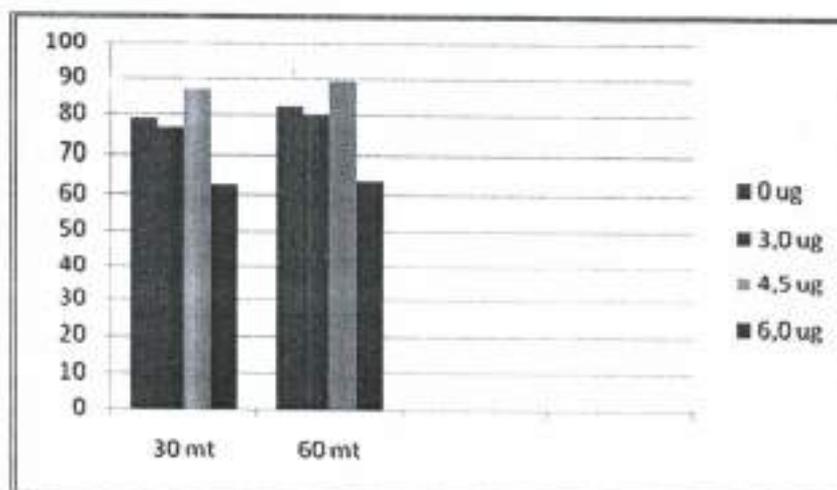
Hasil pengamatan kapasitas spermatozoa domba EG dengan pewarnaan CTC menggunakan mikroskop *epifluorescence* pada pembesaran 400 kali (gambar 5.2.12)



Gambar 5.2.12. Hasil pengamatan status kapasitas spermatozoa domba pada proses pengenceran dengan pewarnaan CTC menggunakan mikroskop *epifluorescence* (Bar = $\frac{1}{2}$ μm), keterangan : A. non kapasitas, B. kapasitas dan C. reaksi akrosom.

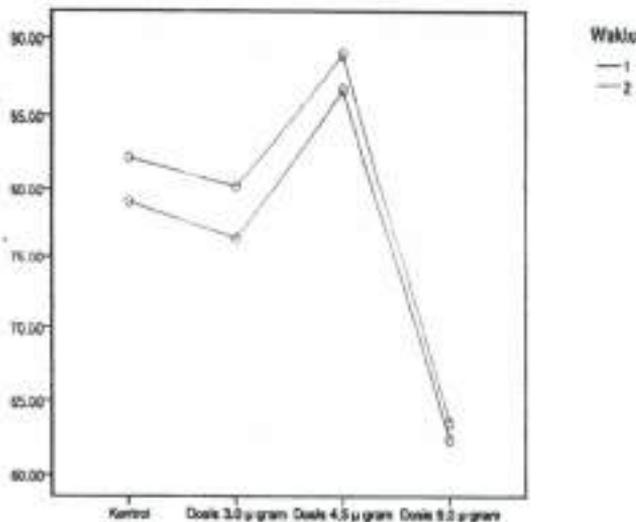
Status kapasitas spermatozoa domba dari pewarnaan CTC di atas memperlihatkan ada tiga bentuk pendaran fluoresen pada kepala spermatozoa domba, yaitu (1) distribusi fluoresen yang sama pada membran kepala spermatozoa (gambar 5.2.12A), menunjukkan spermatozoa domba yang non kapasitas, (2) fluoresen terkonsentrasi pada daerah *acrosomal* (gambar 5.2.12B), menunjukkan spermatozoa domba yang mengalami kapasitas, dan (3) fluoresen terkonsentrasi pada daerah *pra acrosomal* (gambar 5.2.12C), menunjukkan spermatozoa domba yang mengalami reaksi akrosom. Hasil pendaran fluoresen pada spermatozoa domba (gambar 5.2.12.) di atas merupakan gambaran distribusi Ca^{2+} pada membran kepala spermatozoa, seperti telah dilaporkan oleh Mattioli, *et al* (1996), Kaul *et al* (1997) dan Susilawati (2005).

Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase kapasitas spermatozoa domba tertera pada gambar 5.2.13.



Gambar 5.2.13. Rataan persentase kapasitas spermatozoa domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

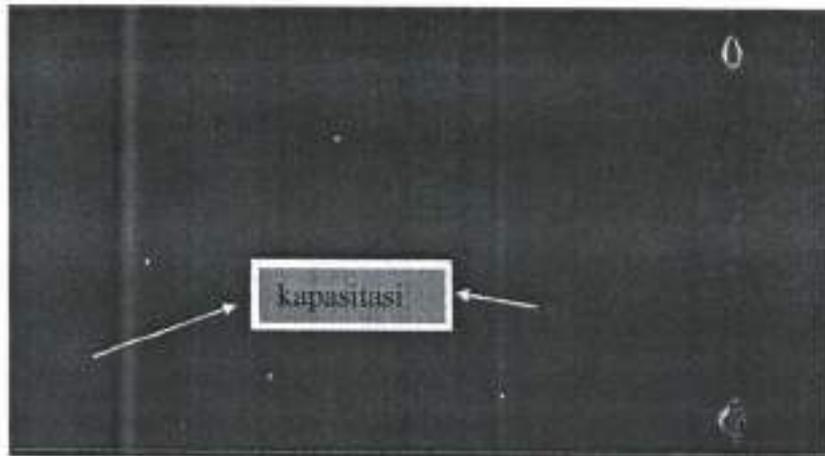
Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rataan persentase kapasitas spermatozoa domba EG (lampiran 5).



Gambar 5.2.14. Grafik suplementasi akrosin terhadap kapasitas spermatozoa
Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase kapasitas membran spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau (—) : pemeriksaan 60 menit

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap kapasitas spermatozoa domba EG dilanjutkan dengan uji HSD (Tukey). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa akrosin dan perlakuan dengan akrosin 3,0 µgram pada berbagai level lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rataan persentase kapasitas spermatozoa domba EG . Perlakuan dengan konsentrasi akrosin 4,5 dan 6,0 µg pada berbagai lama inkubasi menunjukkan berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap rataan persentase kapasitas spermatozoa domba EG (lampiran 5).



Gambar 5.215. Spermatozoa dalam keadaan kapasitasi yang ditandai dengan sebagian dari kepala spermatozoa yang berfluoresensi

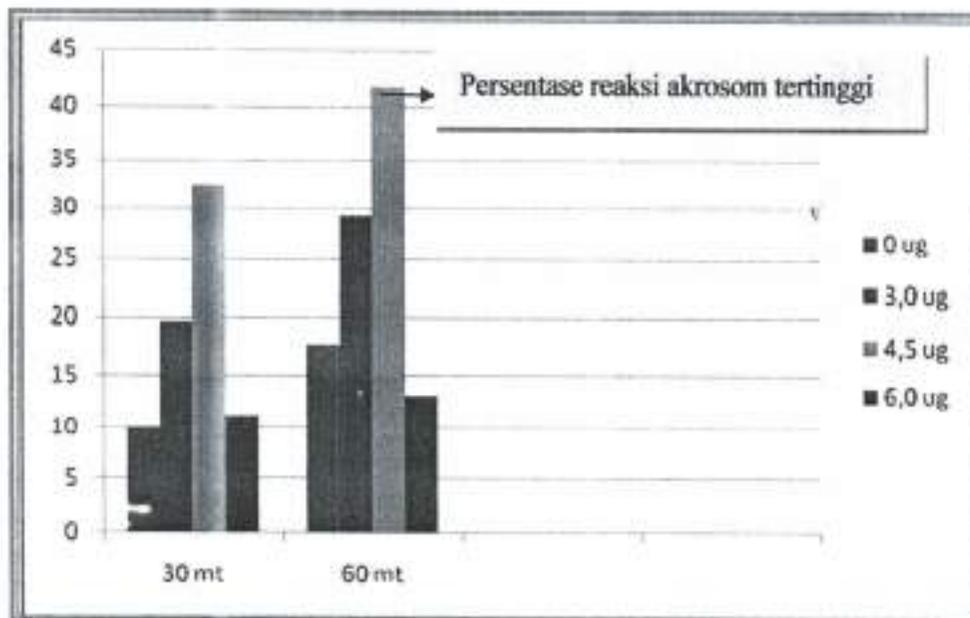
Rataan persentase kapasitasi spermatozoa dari perlakuan suplementasi akrosin 4,5 µg menunjukkan terjadi peningkatan sehubungan lama inkubasi 30 dan 60 menit masing-masing adalah : 86,76% dan 89,00%. Hal ini memberikan indikasi bahwa pada spermatozoa domba mengalami peningkatan kapasitasi (Mc. Donald dan Pineda, 1989).

Tabel 5.7. Rataan Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba EG Setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (µg)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba (%)	Akrosin
0	30	10,05 ± 2,95 ^a	F _w : 12,669 p : 0,007
	60	17,72 ± 6,61 ^a	
3,0	30	19,69 ± 8,72 ^a	F _A : 28,166 p : 0,000
	60	29,12 ± 8,58 ^a	
4,5	30	32,33 ± 10,39 ^b	F _{wA} : 0,704 p : 0,552
	60	41,79 ± 19,08 ^b	
6,0	30	11,02 ± 2,72 ^c	
	60	13,05 ± 4,12 ^c	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata (p<0,05)

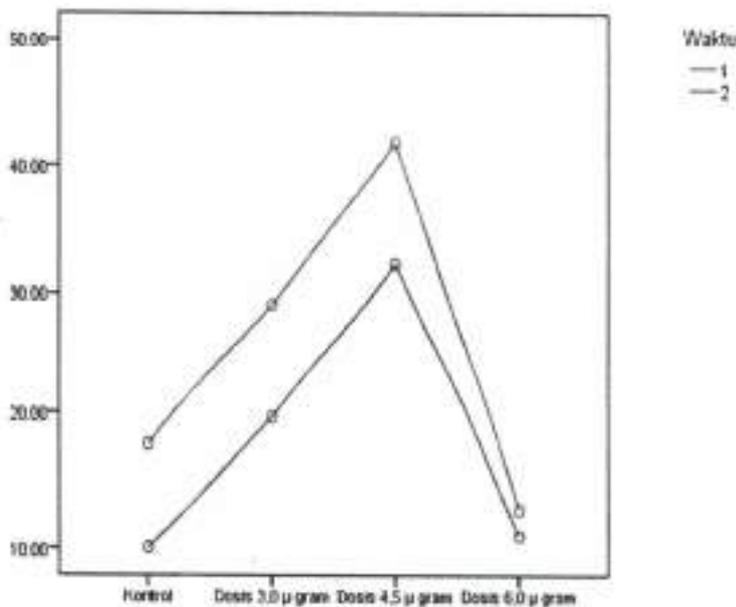
Tabel 5.7. menunjukkan bahwa perlakuan tanpa suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba berkisar antara 10,05-41,79%. Perlakuan suplementasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg masing-masing menghasilkan rataan persentase reaksi akrosom berkisar antara 10,05-17,72%; 19,69-29,12; 32,33-41,79 dan 11,02-13,05. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 3,0 μg dapat meningkatkan rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba. Hubungan antara suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba tertera pada gambar 5.2.16



Gambar 5.2.16. Rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba EG. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan

persentase reaksi akrosom spermatozoa domba, sedangkan interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba (lampiran 7).



Gambar 5.2.17. Grafik suplementasi akrosin terhadap reaksi akrosom

Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase reaksi akrosom spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau(—) : pemeriksaan 60 menit

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap reaksi akrosom spermatozoa domba dilanjutkan dengan uji HSD (Tukey). Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan tanpa akrosin dan perlakuan dengan akrosin 3,0 µ gram pada berbagai level lama inkubasi menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba EG. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi akrosin 4,5 dan 6,0 µ g pada berbagai lama

inkubasi menunjukkan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rataan persentase reaksi akrosom spermatozoa domba EG (lampiran 7).



Gambar 5.2.18. Spermatozoa dalam keadaan reaksi akrosom yang ditandai dengan adanya garis hitam pada kepala spermatozoa yang berfluoresensi

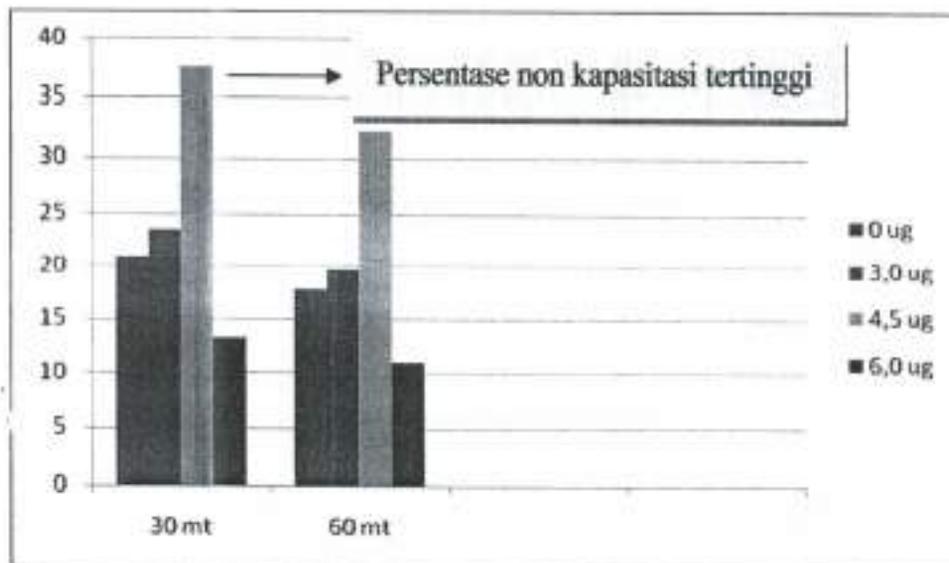
Tabel 5.8. Rataan Persentase Non Kapasitas Spermatozoa Domba EG Setelah Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi

Kadar Akrosin (μg)	Lama Inkubasi (menit)	Rataan Non Kapasitas Spermatozoa Domba (%)	Anova
0	30	$20,89 \pm 7,55^a$	$F_W : 3,984$ $p : 0,004$
	60	$17,78 \pm 5,57^a$	
3,0	30	$23,56 \pm 8,59^b$	$F_A : 20,707$ $p : 0,000$
	60	$19,76 \pm 8,50^b$	
4,5	30	$37,52 \pm 15,68^c$	$F_{W^*A} : 0,117$ $p : 0,949$
	60	$32,33 \pm 10,39^c$	
6,0	30	$13,27 \pm 3,56^a$	
	60	$10,99 \pm 2,89^a$	

Keterangan : notasi yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5.8. menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin menghasilkan rataan persentase non kapasitas spermatozoa domba berkisar antara 10,99 – 37,52. Suplementasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg masing- masing menghasilkan rataan persentase non kapasitas berkisar antara 17,78 – 20,89; 19,76 – 23,56; 32,33 – 37,52 dan 10,99 – 13,27. Secara deskriptif menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 6,0 μg dapat meningkatkan rataan persentase non kapasitas spermatozoa domba. Hubungan

antara konsentrasi suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap rata-ran persentase non kapasitas spermatozoa domba EG tertera pada gambar 5.2.19.

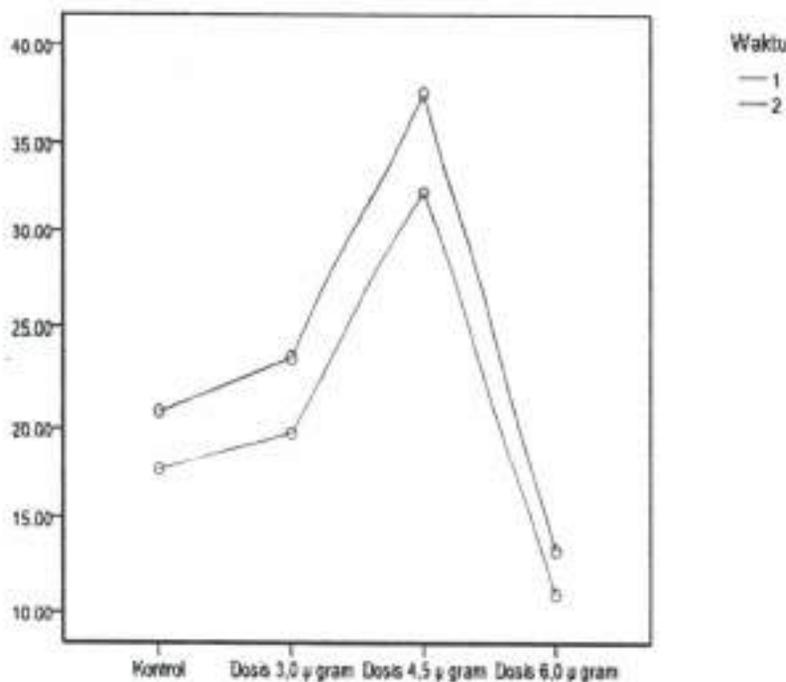


Gambar 5.2.19. Rataan persentase non kapasitas spermatozoa domba EG setelah suplementasi akrosin dengan lama inkubasi yang berbeda

Kombinasi perlakuan suplementasi akrosin dan lama inkubasi keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap rata-ran persentase non kapasitas spermatozoa domba EG. Efek utama dari perlakuan suplementasi akrosin, lama inkubasi dan interaksi antara keduanya menunjukkan berpengaruh tidak nyata ($p > 0,01$) terhadap rata-ran persentase non kapasitas spermatozoa domba EG (lampiran 6).

Karakteristik perbedaan pengaruh suplementasi akrosin dan lama inkubasi terhadap non kapasitas spermatozoa domba dilanjutkan dengan uji Honestly Significant Different (HSD). Hasil analisis menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin dibandingkan dengan suplementasi akrosin dosis 3,0 dan 4,5 μg berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rata-ran persentase non kapasitas spermatozoa domba,

sedangkan tanpa suplementasi akrosin dibandingkan dengan suplementasi akrosin 6,0 μg pada lama inkubasi yang berbeda berpengaruh tidak nyata ($p>0,05$) terhadap rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa domba.



Gambar 5.2.20. Grafik suplementasi akrosin terhadap non kapasitas

Keterangan :

- sumbu absis (horizontal) : pemberian dosis akrosin
- sumbu ordinat (vertikal) : persentase non kapasitas spermatozoa
- warna biru (—) : pemeriksaan 30 menit
- warna hijau(—) : pemeriksaan 60 menit



Gambar 5.2.21 . spermatozoa dalam keadaan non kapasitasi yang ditandai dengan seluruh bagian kepala spermatozoa berfluoresensi

5.2.6. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Imunositokimia Spermatozoa Domba EG

Proses imunositokimia adalah proses dimana terjadi pengenalan antara antibodi dengan antigen dari akrosin. Uji ini untuk mengetahui apakah antibodi akrosin (monoklonal) yang kita berikan dapat mengenali reseptor dari sel spermatozoa.



Gambar 5.2.22. Terjadinya ikatan antigen-antibodi akrosin pada spermatozoa Secara imunositokimia

Adanya enzim akrosin yang terdapat pada membran bagian dalam (inner layer) dari akrosom ini akan dikenali oleh antibodi akrosin (monoklonal) yang diberikan secara eksternal. Hal tersebut untuk mengetahui adanya ikatan antigen – antibodi dari akrosin tersebut. Seperti diketahui bahwa uji imunositokimia ini diperlukan untuk melihat gambaran spermatozoa dan ikatannya setelah pemberian antibodi. Dari gambar di atas jelas terlihat bahwa secara imunositokimia telah terjadi ikatan antara antigen dan antibodi

BAB VI PEMBAHASAN

6.1. Karakteristik semen beku domba PE setelah dithawing

Motilitas spermatozoa merupakan tolok ukur kualitas yang sifatnya subyektif karena berdasarkan keputusan individu pemeriksa (Bearden dan Fuquay, 1997). Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada kondisi medianya (Salisbury, *et al.*, 1978). Spermatozoa yang motilitasnya baik terlihat dari gerak massa membentuk awan tebal dan gerak progresif individu aktif ke depan (Susilawati, 2007). Suryadi, dkk. (2004) menyatakan bahwa motilitas massa 2⁺ adalah cukup baik dan motilitas individu 50% - 80% tergolong normal. Motilitas dapat dijadikan sebagai ukuran tidak langsung terhadap aktivitas metabolisme dengan daya hidup spermatozoa serta mempunyai kontribusi yang penting pada saat transportasi di saluran reproduksi betina, usaha untuk mencapai oosit dan penetrasi *zona pellucida* (Garner dan Hafez, 2000; Hallap, 2005). Pemeriksaan kualitas fisiologis spermatozoa lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan gambaran tentang kondisi fisiologis per individu spermatozoa sebagai ukuran keberhasilan proses fertilisasi. Aspek fisiologi spermatozoa lanjutan meliputi integritas membran, kapasitasi, reaksi akrosom dan non kapasitasi spermatozoa.

Kapasitasi dini pada spermatozoa domba berhubungan dengan rendahnya kandungan energi terutama fruktosa. Kandungan fruktosa dalam semen domba yaitu 250 mg/100 ml, lebih rendah dari semen sapi yaitu 460 – 600 mg/100 ml (Garner dan Hafez, 2000), selain itu domba tergolong spesies hewan dengan kandungan kolesterol yang rendah. Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa domba dan babi hutan hanya membutuhkan waktu 1 sampai 2 jam untuk mencapai kapasitasi spermatozoa yang optimal, karena semen domba memiliki kolesterol yang lebih rendah (14 % dari total lemak) dibandingkan dalam semen sapi dan manusia memiliki kandungan kolesterol lebih tinggi (25 mol dari total lemak) dalam semennya, sehingga untuk mencapai kapasitasi yang optimal membutuhkan waktu lebih lama yaitu 6 sampai 8 jam.

6.2. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Motilitas Spermatozoa Domba PE

Suplementasi akrosin 4,5 µgram menghasilkan rataan persentase motilitas spermatozoa domba lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Hal ini karena penambahan akrosin dapat menurunkan pembentukan asam laktat dalam sel yang berakibat pada peningkatan pH, sehingga proses metabolisme menjadi meningkat. Peningkatan proses metabolisme menyebabkan bertambahnya pembentukan ATP, sehingga akan meningkatkan motilitas spermatozoa (Jones, et al., 1992; Garner dan Hafez, 2000; Rigau, et al., 2002; Ford, 2006).

Menurut Bearden dan Fuquay (1997) suplementasi akrosin berperan dalam menstabilkan membran, sehingga proses transport aktif dapat dipertahankan dan mencegah hilangnya ion-ion penting dalam spermatozoa. Transport aktif berfungsi untuk pertukaran zat-zat intraseluler maupun ekstra seluler sehingga metabolisme dapat meningkat dan menghasilkan ATP yang cukup banyak sebagai sumber energi untuk motilitas.

Secara alami motilitas spermatozoa domba PE akan mengalami penurunan seiring lamanya waktu inkubasi. Selama proses inkubasi spermatozoa terus melakukan pergerakan dan metabolisme yang membutuhkan banyak energi sehingga semakin lama, persediaan nutrisi yang dibutuhkan spermatozoa semakin berkurang. Keadaan ini menyebabkan spermatozoa mengalami penurunan motilitasnya (La Ode Ba'a., 2009) dan dalam jangka waktu yang lama akan menurunkan fertilitas dan plasma semen menjadi tidak isotonis.

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kondisi lingkungan panas dan dingin, demikian juga penanganan semen pada waktu pemeriksaan kualitas semen (Sarastina, 2006, La Ode Ba'a, 2009). Selanjutnya Ax, et al. (2000) menyatakan bahwa motilitas *in vitro* bervariasi sesuai dengan kepadatan cairan, suhu lingkungan, umur spermatozoa dan faktor nutrisi.

6.3. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Viabilitas Spermatozoa Domba PE

Suplementasi akrosin 4,5 µg pada berbagai lama inkubasi menghasilkan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa domba PE yang lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin sampai dengan 4,5 µg dalam semen domba PE masih memberikan efek yang lebih baik terhadap kehidupan spermatozoa. Akrosin dapat meningkatkan metabolisme sebagai sumber energi utama spermatozoa (Garner dan Hafez, 2000; Susilawati, 2003). Suplementasi akrosin 6,0 µg telah menunjukkan terjadi penurunan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa domba PE. Hal ini diduga berkaitan dengan pembentukan asam laktat (Hafez, 2000).

Selama inkubasi, spermatozoa mengalami perubahan molekul penyusun membran yang menyebabkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran. Bearden dan Fuquay (1997) menyatakan bahwa aktifitas metabolik semen menjadi maksimum jika diencerkan dengan pengencer isotonik, akan tetapi jika pengencer bersifat hipotonik atau hipertonik akan menurunkan kecepatan metabolisme tetapi tidak akan meningkatkan spermatozoa hidup.

Membran berfungsi melindungi organ dalam sel dan sebagai filter pada permukaan intraseluler dan ekstraseluler. Spermatozoa yang mati menunjukkan membran plasmanya rusak. Keadaan ini menyebabkan proses metabolisme sel terganggu dan permeabilitas membran menjadi sangat tinggi sehingga zat warna eosin negrosin dapat melewati membran dan berakibat fatal bagi spermatozoa (Saili, 1999 ; La Ode Ba'a, 2009).

6.4. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Abnormalitas Spermatozoa Domba PE

Suplementasi akrosin dosis 4,5 µg dapat menurunkan rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa domba PE. Hal ini diduga karena akrosin berperan meningkatkan stabilitas membran dengan cara berikatan dengan fosfolipid yang

terkandung dalam kepala spermatozoa (Chen, *et al.* 1999), sehingga jika membran utuh tidak dapat ditembus zat warna eosin negrosin (Saili, 1999), sehingga menghambat abnormalitas spermatozoa domba.

Abnormalitas spermatozoa dibedakan atas abnormalitas primer yaitu kelainan spermatozoa karena proses spermatogenesis di dalam tubuli seminiferi dan abnormalitas sekunder yaitu kelainan spermatozoa setelah meninggalkan tubuli seminiferi (La Ode Ba'a, 2009). Rataan persentase abnormalitas domba PE yang diperoleh dari penelitian ini kurang dari 10. Hal ini menunjukkan bahwa proses penanganan semen dari penampungan sampai dilakukan suplementasi secara teknis telah dilakukan dengan baik, sehingga abnormalitas sekunder dapat ditekan serendah mungkin. Bearden dan Fuquay (1997) menyatakan bahwa abnormalitas sampai 25% belum berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa dalam proses fertilisasi. Said (2004) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa kurang dari 20% masih layak digunakan untuk inseminasi buatan.

Nur, *et al.* (2005) menyatakan bahwa larutan hipoosmotik menyebabkan spermatozoa yang membrannya utuh akan mengikat air sehingga bagian tubuh menggelembung dan ekor akan melingkar, sedangkan apabila membrannya rusak terjadi kehilangan air dan cairan lainnya (dehidrasi) sehingga terjadi fusi pada dua permukaan (*inner membrane dan outer membrane*) sehingga membran menjadi tidak stabil atau terjadi *lipid bilayer destabilitation* yang ditandai dengan membran yang mengkerut dan ekor yang lurus. Ketidakstabilan membran ini berakibat pada penurunan fisiologi spermatozoa (Sum, *et al.*, 2003).

6.5. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Domba PE

Suplementasi akrosin 0; 3,0; 4,5 dan 6,0 μg pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rata-ran persentase integritas membran spermatozoa domba PE yang tidak berbeda nyata satu sama lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μg memberikan respon yang baik terhadap integritas membran spermatozoa domba, karena : (1) akrosin berperan dalam menstabilkan membran dan mempertahankan kualitas spermatozoa selama

inkubasi (Bearden dan Fuquay, 1997), (2) akrosin juga berperan mempertahankan integritas pada proses transport aktif membran spermatozoa, transport aktif mencegah hilangnya komposisi ion-ion vital dari spermatozoa (Hafez, 2002), (3) akrosin dapat berikatan dengan fosfolipid yang terdapat pada kepala spermatozoa (Chen *et al*, 1993, La Ode Ba'a, 2009). Membran sel merupakan bagian terluar yang membatasi bagian dalam dengan lingkungan luar sel dan berperan sebagai filter pada pertukaran zat-zat intraseluler dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2000).

6.6. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Status Kapasitas Spermatozoa Domba EG

Suplementasi 4,5 µg pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rataan persentase kapasitas spermatozoa domba yang lebih tinggi, dengan demikian maka penambahan suplementasi akrosin 4,5 µg dapat menghambat kapasitas spermatozoa domba. Hal ini karena akrosin berfungsi mempertahankan spermatozoa agar terjadi kapasitas dan mempercepat terjadinya reaksi akrosom pada saat fertilisasi (Mori, *et. al*, 1993).

Flesch dan Gadella (2000) menyatakan bahwa kapasitas pada beberapa jenis ternak dapat bersifat *reversible* karena dalam seminal plasmanya mengandung makro molekul yang berperan sebagai faktor kapasitas. Makro molekul tersebut adalah glikokaliks yang merupakan oligosakarida dan terikat dengan protein dan lemak (Evans dan Graham, 1989; Darnel, *et al.*, 1990), sehingga spermatozoa yang telah mengalami kapasitas mampu untuk melakukan fertilisasi (Maxwell dan Watson, 1996; La Ode Ba'a, 2009).

Kapasitasi pada spermatozoa domba berhubungan dengan kandungan kolesterol yang rendah pada semennya. Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk kapasitas spermatozoa optimal berhubungan dengan kandungan kolesterol. Spesies hewan dengan kandungan kolesterol tinggi yaitu 25 % dari total lemak netral (manusia dan sapi) membutuhkan waktu yang lebih lama (antara 6-8 jam) untuk mencapai kapasitas optimal, sementara spermatozoa babi hutan dan kambing dengan kandungan kolesterol lebih rendah

yaitu 14% dari komposisi lemak netral (Flesch dan Gadella, 2000), sehingga kapasitas yang optimal hanya membutuhkan waktu 1 sampai 2 jam (Yanagimachi, 1994).

6.7. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba EG

Suplementasi akrosin 4,5 µg pada lama inkubasi 30 dan 60 menit menghasilkan rata-rata persentase reaksi akrosom spermatozoa domba yang tinggi, sehingga lebih baik dari perlakuan lainnya. Hal ini karena suplementasi akrosin 4,5 µg dapat mempercepat kapasitas dan meningkatkan terjadinya reaksi akrosom (Liberda, *et al.* 2001).

Reaksi akrosom hanya terjadi pada spermatozoa yang mempunyai membran utuh (Flesch dan Gadella, 2000). Selain itu reaksi akrosom berlangsung menjelang spermatozoa melakukan penetrasi pada zona pelusida /ZP (Grudzinskis dan Yovich, 1995) dan untuk dapat menetrasi ZP, spermatozoa domba harus menjalani reaksi akrosom. Sebelum reaksi akrosom berlangsung, spermatozoa perlu mensekresikan enzim tertentu yaitu proakrosin yang kemudian diaktifkan menjadi akrosin (Susilawati, 2003; La Ode Ba'a, 2009).

6.8. Pengaruh Suplementasi Akrosin dan Lama Inkubasi Terhadap Non-kapasitasi Spermatozoa Domba EG

Suplementasi akrosin 3,0 dan 4,5 µg pada lama inkubasi yang berbeda menghasilkan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa domba yang lebih rendah dari pada tanpa suplementasi. Hal ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin dapat menurunkan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa domba. Penurunan rata-rata persentase non kapasitas spermatozoa domba EG tertinggi diperoleh pada suplementasi akrosin 4,5 µg.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanpa suplementasi akrosin dan perlakuan dengan suplementasi akrosin 4,5 µg menghasilkan rata-rata persentase non kapasitas yang semakin menurun dengan lama inkubasi 60 menit. Fakta ini menunjukkan bahwa suplementasi akrosin mampu memberikan pengaruh

spermatozoa menjadi lebih siap pada proses fertilisasi, yaitu meningkatkan kapasitas dan reaksi akrosom (Mori, *et al.*, 1993). Selain itu, akrosin juga berperan dalam mempertahankan integritas proses transport aktif membran spermatozoa. Transport aktif tersebut mencegah hilangnya komposisi ion-ion vital dari spermatozoa (Hafez, 2002; La Ode Ba'a; 2009, Susilowati, 2007).

6.9. Pengaruh Suplementasi Akrosin Terhadap Imunositokimia Spermatozoa Domba EG

Adanya enzim akrosin yang terdapat pada membran (inner maupun outer membrane) dari akrosom ini akan dikenali oleh antibodi akrosin (monoklonal) yang diberikan secara eksternal. Hal tersebut untuk mengetahui adanya ikatan antigen – antibodi dari akrosin tersebut. Seperti diketahui bahwa uji imunositokimia ini diperlukan untuk melihat gambaran spermatozoa dan ikatan antigen- antibodi (Aulan'am, 2004; Rantam, 2003). Dari gambar diatas jelas terlihat bahwa secara imunositokimia telah dikenali antibodi akrosin pada spermatozoa tersebut.

BAB VII

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana Penelitian Tahun ke 2 adalah sebagai berikut :

1. Pengaruh Suplementasi Enzim Akrosin Terhadap Penetrasi Zona Pelusida Pada Sel Telur (Ovum) Domba EG
3. Pengaruh Suplementasi Enzim Akrosin Pada Fertilisasi In-Vitro Domba EG
2. Pengaruh Suplementasi Enzim Akrosin Terhadap Perolehan Embrio Domba EG

BAB VIII KESIMPULAN DAN SARAN

8.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

- a. Suplementasi akrosin 4,5 μg dapat meningkatkan motilitas, viabilitas, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa domba EG
- b. Suplementasi akrosin 6,0 μg dapat menurunkan motilitas, viabilitas, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa domba EG
- c. Suplementasi akrosin 3,0; 4,5 dan 6,0 μg tidak berpengaruh terhadap integritas membran spermatozoa domba EG
- d. Uji imunositokimia menunjukkan adanya ikatan antigen-antibodi pada akrosin

8.2. Saran

Suplementasi (penambahan) akrosin dengan dosis 4,5 μg dapat digunakan untuk meningkatkan potensi biologis spermatozoa domba EG, sehingga dapat dipakai sebagai bahan alternatif (bioaktif) untuk perbaikan fertilitas ternak (domba).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous 2007. Kondisi Peternakan di Indonesia saat ini. Direktorat Jendral Peternakan. Jakarta.
- Adel A. Zalata, Ashraf H. Ahmed and Frank H. Comhaire.2004. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J. Androl. Dec.*, 6, 2004 : 313-318
- Aditi Chatterjee, Sagarika Kanjilal and Asok K. Bhattacharyya.2000. Purification of human seminal acrosin inhibitor and its kinetics. *Reproductive Biology Laboratory. Department of Bio-chemistry, Calcutta University College of Science, 35, Bally gunge Circuler Road, Calcutta 700019 India. J. Biology of Reproduction. Vol 13: 571-578*
- Aitken, R.J. 1995. Aseessment of Sperm Function for IVF. *Human Reprod.* 3:89-95.
- Aulani'am. 2004. Dasar-Dasar Biomolekul. FMIPA. Universitas Brawijaya Press. Malang. 20-23
- Aulani'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 53-85
- Ax RL., MR. Dally, BA. Didion, RW. Lenz, CC. Love, DD. Varmer and Hafez, ESE. 2000. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animal. Awollers Kltiwer Company. Philadelphia.
- Baldi, E; L. Michael; B. Lorella; M. Monica and F. Gianni. 2000. Intracelluler Event and Signaling Pathways Involved In Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity and Acrosom Reaction. *Frontier in Bioscience.* 5:110-123.
- Bailey, L., and B.T. Storey. 2001. Calcium Influx into Mouse Spermatozoa Activated by Solubilized Mouse Zona Pelusida, Monitored with the Calcium Fluorescent Indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pelusida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Mol.Reprod. Dev.* 39: 297-308.
- Bearden, HJ. and JW. Fuquay. 1997. Applied Animal Reproduction. 4nd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Bergeron, A; M.H. Crete; Y. Bridle and P. Manjunath. 2004. Low Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg York Decreases the Binding of the Major of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biol. Reprod.* 70: 708-717

- Chang; MR. Curry and PF. Watson. 2002. Sperm Structure and Function in Gamete the Spermatozoon. Cambridge Reviews in Human Reproduction. Ed. J.G. Gruzinkas & J.L. Yovich, Cambridge University Press.
- Chen. Y., RH. Foote and CC. Brockett. 1993. Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurin and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology*. 30: 123-137.
- Chen. Y., MJ. Cann, TN. Litvin, V. Lourgenko, ML. Sinclair and J. Buck. Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science*, 289: 625-628.
- Dauzier, L. and Thibault. C. 1995. Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biol. Reprod.* 2: 128-158.
- Darnell. J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Molecular Cell Biology*. 2nd Edition. Sci.Am.Books : 141-527.
- Davendra, C. dan M.Burns. 1994. *Produksi Domba di Daerah Tropis*. Penerbit ITB. Bandung. 21-28, 119-120.
- Donald's, Mc. 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th Edition. Edited by : Maurico H Pineda, Michael Dooley. Pp 154 – 225.
- Edda Topfer Petersen. 1999. Carbohydrate based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. Institute of Reproductive Medicine, Veterinary School of Hanover, Germany. *J HumanReproduction*. Vol 5 : 314 -329
- Evans. WH and JM. Graham. 1989. *Membran Structure and Function*. IRL Press. Oxford University. Oxford: 11-28.
- Flesh. FM. and BM. Gadella. 2000. Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in The Process of Fertilization. *Biochim Biohys Acta*. 1469: 197-235
- Ford, WCL. 2006. Glycolysis and Sperm Motility : does a Spoonful of Sugar Help the Flagellum go Round. *Human Reprod.* 12 (3) : 267-274.
- Gadella. BM. and PE. Visconti. 2006. Regulation of Capacitation in The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Ed. By C.P. De Jonge and CLR. Barratt. Cambridge University Press.
- Garner and Hafez, ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Philadelphia, Baltimore, New York, London.

- Gilbert, S.F. 1998. *Developmental Biology*, 2 nd ed. Sinauer Association, Inc Publisher, Sunderland, Massachusetts. P.313-330.
- Goodpasture JC., KL Polakoski and JD Zaneveld .2000. Acrosin, Proacrosin and Acrosin Inhibitor of human spermatozoa. Department of Physiology and Bio- physics, University of Illinois. USA. *American Society of Andrology*, Vol1 (3): 16-27
- Grudzinskas. JG. and JL. Yovich. 1995. *Gametes The Spermatozoa*. Cambridge University Press. Perth. Australia.
- Hafez, E.S.E. 2002. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia. USA. p 260-282.
- Hammerstedt, R.H.; J.K. Graham and P. Noland. 2000. Cryopreservation of Mammalian Sperm : What we ask them to survive. *J. Androl.* 2:151-156.
- Harrison, R.A.P. and B.M. Gadella, 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphat-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. 67 : 340-350.
- Higgins, J.E. and A.P.Klinbaun, 1985. *Design Methodology For Randomized Clinical Trial With an Emphasis on Contraceptive Research*. Family Health International.
- Jainudeen. MR., H. Wahid and ESE. Hafez. 2000. *Sheep and Goats in Reproduction in Farm Animal*. Hafez. B and Hafez. ESE. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Awollers Kltiwer Company. Philadelphia.
- Jones. GA., AG. Sacco and MG. Subramania. 1992. Histology of Female Rabbit Immunized with Deglycosylate Zona Pellucida Macromollecular of Pig. *J.Reprod. Fert.* 95:513-525.
- Kaul. G., S. Singhs, KK. Gandhi and SR. Anand. 1997. Calcium Requirement and Time Course of Capacitation of Goat Spermatozoa Assested by Clourtetracycline Assay. *J.Androl.* 29(5): 243-251.
- Kenneth Polakoski and Robert A. Mc Rorrie. 1983. Purification and Preliminary Characterization of a Proteinase (acrosin) from Boar Sperm Acrosomes. *Reproduction Research Laboratory of the Biochemistry Department, University of Georgia, Attens, Georgia. Journal of Biological Chemistry*, vol. 248 : 8178-8182.

- La Ode Ba'a. 2009. Peran D-fruktosa dan Kuning Telur Dalam Proses Penghambatan Kapasitas dan Kerusakan Membran Spermatozoa domba. Disertasi. Unibraw. Malang. 2009.
- Liberda. J., M.Kraus, H.Rysiava, V.Viasakova, V.Jonakova and M.Ticha. 2001. D-fructosa-Binding Proteins in Bull Seminal Plasma.: Isolation and Characterization of Biochemistry. Charles University. Czech Republic.
- Mattioli. M., B. Barboni, F. Lucini and E. Seren. 1996. Identification of Capacitation in Boar Spermatozoa by Chlortetracycline Staining. *Theriog.* 4 : 331-373.
- Maxwell. WMC. And PF. Watson. 1996. Recent Progres in Preservation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science.* 42 : 261-275
- Mc.Donald, LE. and MH. Pineda. 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction.* Lea and Febiger. Philadelphia.
- Mori. K., T. Dalton, M. Kumada, M. Maeda, M. Maegawa, K. Hirano and T. Aono. 1993. European Society of Human Reproduction and Embriology. Department Of Obstetrics and Gynaecology. School of Medicine. University of Tokushima, Jepang.
- Nur. Z., I. Dogan, U. Gunay and MK. Soylu. 2005. Relationships between Sperm Membrane Integrity and other Semen Quality Characteristics of the Semen of Saanen Goat Bucks. *Bull Vet Inst Pulawy.* \$(: 183-187.
- Mulyono, W. 2000. Cara Beternak Domba. PT. Aneka Ilmu. Semarang.
- Polakoski KL and Zaneveld LJD. 2000. Proteinase and protein inhibittor in andrology. Human semen and fertility regulation in men. CV Mosby Company, St Louis London. P564.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press. 145-147.
- Rao, J.F. and Hart, C.F. 1988. Mammalian Fertilization in Vitro : Sperm-Induced Preparation of The Zona Pellucida of Golden Hamster Ova for Final Binding. *J. Reprod. Fert.* 37: 433-445.
- Richard F. Parrish and Kenneth L. Polakoski. 1986. Purification and characterization of the initial active enzyme resulting from conversion of boar pro-acrosin to acrosin. Department of Obstetrics and Gynaecology. Washington University of Medicine, St. Louis, Missouri. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 253: 8428 – 8432.

- Rigau, T., M. Rivera, MJ. Palomo, JM. Fernandez, T. Mogas and JE. Rodriguez. 2002. Differential Effects of Glucose and Fructose on Hexose Metabolism in Dog Spermatozoa. *Reproduction*. 123: 579-591
- Rosatti, M.I.; M.T. Beconi; and M. Cordoba. 2003. Proacrosin -acrosin activity in capacitated and acrosome reacted - sperm from cryopreserved bovine semen. School of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires. Argentina. *J. Biocell*, 28 (3): 311-316. 2003
- Salisbury, G.W dan N.L. Van Demark. 1978. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. 269-371.
- Said, K., EM. Kalin, F. Afiani, M. Gunawan dan B. Tappa. 2004. Pengaruh Metode dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Prosiding Seminar Industri Peternakan Modern. Makasar.
- Saili, T. 1999. Efektifitas Penggunaan Albumin sebagai Medium Separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Sarastina. 2006. Analisis Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa Pada Berbagai Bangsa Sapi Menggunakan Computer Assisted Semen Analysis (CASA) Tesis Pascasarjana. Unibraw. Malang
- Sarwono. B. 2002. Beternak Domba Unggul. Cetakan X. Penebar Swadaya. Jakarta. 30-37, 64.
- Setiawan, T dan Arsa B. 2003. Beternak Domba Perah Peranakan Ettawa. Cetakan I. Penebar Swadaya. Jakarta. 3-13, 31-35.
- Steel, RGD and H. Torrie. 1989. Principles and Procedures of Statistics. International Student Edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd. Tokyo. Japan.
- Suhana, Nana, Rafiah dan Siti R. 2002. Deferensiasi Embriologi Dalam Tingkat Seluler, Subseluler dan Molekuler. Penerbit FK Universitas Indonesia Jakarta. hal 374.
- Sum, AK., R.Faller and JJ. Pablo. 2003. Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayer and Insights of the Interactions with Disaccharides. *J. Biophys.* 85: 2830-2844.
- Sumitro, SB. dan T. Susilawati. 1998. Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistem dan Inverted. Laboratorium Biologi. FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.

- Susilawati, T. 2000. Analisa Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Unair. Surabaya.
- Susilawati, T. 2003. Fisiologi Spermatozoa, Kapasitas, Reaksi Akrosom dan Fertilisasi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang
- Susilawati, T. 2005. Teknologi Reproduksi. Buku 2. Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati, T. 2007. Fungsi IGF-1 Complex Plasma Seminalis Domba Terhadap Integritas membran dan Viabilitas Spermatozoa. Unibraw. Malang.
- Susilowati, S. 2007. Peran Insulin Like Growth Factor-1 Complex Plasma Seminalis Domba Terhadap Potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. Disertasi S3 Pascasarjana Unair.
- Williams, RM; JK. Graham and RH. Hammerstedt.2001. Determination of the capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. *J. Biology of Reproduction*. vol 44 : 1080-1091.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol.1 Raven Press, New York, NY. USA. 1: 189-217.
- Zervos, IA; MP. Tsantarliotou; G. Vatzias; P Goulas and IA. Taitzoglou, 2005; Effects of dietary vitamin A intake on acrosin and plasminogen – activator activity of ram spermatozoa; *J. Reprod. and Ferti.* 129: 707-715.