



LAPORAN PENELITIAN
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2004

POTENSI ANTIBODI SPERMATOZOA (ASA) TERHADAP SPERMATOGENESIS DAN FERTILISASI PADA TIKUS PUTIH

Peneliti:

Indah Norma Triana, M.Si., Drh.
Suherni Susilowati, M.Kes., Drh.
Budi Utomo, M.Si., Drh.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2004

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 4223/J03/PP/2004

Tanggal 7 Juni 2004

Nomor Urut: 18

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2004



LAPORAN PENELITIAN
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2004

POTENSI ANTIBODI SPERMATOZOA (ASA) TERHADAP SPERMATOGENESIS DAN FERTILISASI PADA TIKUS PUTIH

Peneliti:

Indah Norma Triana, M.Si., Drh.
Suherni Susilowati, M.Kes., Drh.
Budi Utomo, M.Si., Drh.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2004

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 4223/J03/PP/2004

Tanggal 7 Juni 2004

Nomor Urut: 18

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2004



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995730) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : ipunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

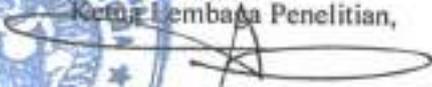
**IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. Judul Penelitian : **Potensi Antibodi Antispermatozoa (ASA) Terhadap Spermatogenesis dan Fertilitas Pada Tikus Putih**
- a. Macam Penelitian : () Fundamental, () Terapan, () Pengembangan, () Institusional
- b. Katagori Penelitian : () I () II () III () IV
2. Kepala Proyek Penelitian
- a. Nama Lengkap dan Gelar : drh. Indah Norma Triana, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. Pangkat/Golongan dan NIP: Pembina (Gol IV/a) 131 576 469
- d. Jabatan Sekarang : Lektor Kepala
- e. Fakultas/Puslit/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan
- f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
- g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Inseminasi Buatan Fak. Kedokteran Hewan Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
- a. Nama Instansi : -
- b. Alamat : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 5 (lima) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : 5.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
- a. Dilaksanakan Tanggal : 11 Oktober 2004
- b. Hasil Penelitian : () Baik Sekali (V) Baik
() Sedang () Kurang

Surabaya, 11 Oktober 2004



Mengetahui/Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS. 
NIP. 130 701 125

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian	:Potensi Antibodi Antispermatozoa (ASA)Terhadap Spermatogenesis Dan Fertilitas Pada Tikus Putih Jantan
Ketua Peneliti	:Indah Norma Triana,MSi, Drh.
Anggota Peneliti	:Suherni Susilowati, MKes,Drh. Budi Utomo, MSi,Drh.
Fakultas/Puslit	:Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
Sumber Biaya	:Dik Suplemen Tahun Ajaran 2004 SK. Rektor Unair Nomor 4223/JO3/PP/2004 tanggal 7 Juni 2004.

Imunisasi spermatozoa akan menginduksi produksi antibodi antispermatozoa yang akan menyelubungi antigen pada kepala dan ekor spermatozoa yang akan mengganggu proses kapasitasi sehingga menghambat terjadinya reaksi akrosom akibatnya kemampuan fertilisasi berkurang. Antibodi Antispermatozoa mempengaruhi sistem reproduksi yaitu terhadap:spermatogenesis, transport spermatozoa, daya tahan hidup spermatozoa, interaksi gamet dan daya tahan hidup embrio (Hinting, 1989; Liu, 1991; Clarke, 1988; Mandelbaum, 1987). Pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa imunisasi ekstrak testes tikus pada mencit betina mampu menurunkan jumlah fetus dalam setiap kebuntingan hewan coba (Qatrina ,B.W, 2000).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibodi antispermatozoa (ASA) terhadap spermatogenesis dan fertilitas pada tikus putih jantan. Manfaat penelitian ini adalah ekstrak testes dapat digunakan sebagai imunokontrasepsi. Adapun hipotesis penelitian ini adalah terdapat perbedaan jumlah spermatosit dan spermatid pada tikus putih jantan dan terdapat perbedaan fertilisasi pada tikus putih jantan pada perlakuan dengan antibodi antispermatozoa dan kelompok kontrol.

Penelitian ini menggunakan 10 buah testes tikus putih jantan yang diambil secara kastrasi kemudian digerus, diencerkan dengan Na Cl 1% sebanyak 10 ml, selanjutnya disaring dan disertrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit hingga terbentuk 3 lapisan yakni lemak dibagian atas, cairan bening ditengah dan endapan berwarna merah muda, kemudian cairan bening ditambah dengan PBS (Phosphat Buffer Saline) dan siap untuk disuntikkan. 24 ekor tikus jantan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu : Kelompok kontrol : tikus disuntik dengan Na Cl fisiologis 0,1 ml/sc/hari selama 45 hari. Kelompok I : tikus disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 15 hari. Kelompok II : mencit disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 30 hari. Kelompok III : tikus disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 45 hari. Selanjutnya masing-masing tikus pada tiap-tiap kelompok dikawinkan dan dilihat jumlah anaknya setelah melahirkan, selanjutnya tikus jantan dibunuh dan testesnya dibuat preparat histologis dan diperiksa jumlah spermatid dan spermatositnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah spermatid dan spermatosit pada kelompok perlakuan dan juga terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah anak yang dilahirkan pada kelompok perlakuan ($p < 0.05$).

Kesimpulan penelitian ini adalah penyuntikan ekstrak testes pada tikus putih jantan menurunkan jumlah spermatid, spermatozoa dan jumlah anak yang dilahirkan jika dikawinkan dengan tikus betina.

Saran penelitian ini adalah dosisnya dapat ditingkatkan agar diperoleh keadaan aspermatogenesis dan tidak terjadi fertilisasi sehingga dapat digunakan sebagai imunokontrasepsi.

Summary

The experiment was conducted the Potential of Antisperm Antibodies (ASA) to Spermatogenesis and Fertility of the Male White Rat. This research was to use ten of white rat testes and than to crush and added with Na Cl 1 % 10 cc and than to filtration and centrifuge 1800 rpm for ten minutes. Twenty four of the male white rat divided in to four groups :

- Group I : injected by Na Cl fisiologis 0,1 cc/sc/day for 45 days
- Group II : injected by suspension 0,1 cc/sc/day for 15 days
- Group III : injected by suspension 0,1 cc/sc/day for 30 days
- Group IV : injected by suspension 0,1 cc/sc/day for 45 days

Than each of the male rat on the group married and than count of the total of child after birth, male rat to killed for take of the testes, preparation of histologys and than count of the spermatocyt I,II and spermatid.

The result show that was count of the spermatocyt I,II dan spermatid has significant different in the group and control ($p < 0,05$).The total of child after birth significant different in the group and control ($p < 0,05$).

Conclution of this research was injected ASA (Antisperm Antibodies) on male white rat can decrease of the count of spermatocyt I,II , spermatid and total of the child after birth.

KATA PENGANTAR

Pudji syukur kita panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah Nya sehingga dapat diselesaikannya penulisan hasil laporan penelitian dengan judul : Peranan Antibodi Anti Spermatozoa (ASA) Terhadap Spermatogenesis Dan Fertilitas Pada Tikus Putih .

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof.dr. Puruhito Med. atas kepercayaannya mengabulkan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan dengan SK. Rektor No. 4223/JO3/PP/2004 Tanggal 7 Juni 2004.
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Prof.Dr.H. Sarmanu,MS, atas kelancaran administrasi mulai dari proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan hasil penelitian ini.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof.Dr. Ismudiono,MS,Drh. atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.

Sebagai suatu karya manusia, sudah barang tentu ada beberapa kekurangan di beberapa laporan ini. Saran dan kritik yang konstruktif sangat diharapkan untuk kematangan peneliti sendiri agar laporan ini memberi manfaat kepada pihak-pihak yang berkepentingan.

Surabaya , Oktober 2004

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang Masalah.....	1
I.2. Rumusan Masalah.....	2
I.3. Hipotesis Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1. Sistem Reproduksi Tikus Jantan.....	4
II.2. Alat Reproduksi Tikus Betina.....	4
II.3. Testes.....	5
II.4. Spermatogenesis.....	5
II.5. Fertilisasi.....	7
II.6. Antigen.....	9
II.7. Antibodi.....	9
II.8 Respon Imun.....	10
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	12
III.1. Tujuan Penelitian.....	12
III.2. Manfaat penelitian.....	12
BAB IV METODE PENELITIAN.....	13
IV.1. Tempat dan waktu Penelitian.....	13
IV.2. Alat – alat Penelitian.....	13
IV.3. Bahan – bahan Penelitian.....	13
IV.4. Prosedur Penelitian.....	13
IV.5. Analisis Data.....	14
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	18
Daftar Pustaka.....	19

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil jumlah spermatisit dan spermatid pada gambaran histologis Testes tikus putih yang disuntik dengan ekstrak testes	15
Tabel 2. Hasil jumlah anak yang dilahirkan dari tikus betina yang telah di-Kawinkan dengan tikus jantan yang disuntik dengan ekstrak testes..	16

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jumlah spermatisit pada gambaran testes tikus putih yang Disuntik dengan ekstrak testes.....	23
Lampiran 2. Jumlah spermatid pada gambaran testes tikus putih yang di- suntik dengan ekstrak testes.....	24
Lampiran 3. Jumlah anak tikus betina setelah dikawinkan dengan tikus Jantan yang disuntik dengan ekstrak testes.....	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok kontrol.....	21
Gambar 2. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok I.....	21
Gambar 3. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok II.....	22
Gambar 4. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok III.....	22

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Antibodi terhadap spermatozoa yang terbentuk karena adanya respon imun setelah penyuntikan dengan ekstrak testis dan dapat bereaksi dengan spermatozoa dari spesies yang sama maupun dari spesies yang berbeda. Spermatozoa merupakan faktor utama yang menyebabkan testis dapat sebagai imunogen (Mancini dan Andrada, 1978).

Antibodi Imobilizing spermatozoa dapat menyebabkan infertilitas baik pada laki-laki maupun pada wanita. Antibodi tersebut tidak hanya mengganggu proses migrasi spermatozoa di dalam saluran kelamin wanita, tetapi juga mengganggu berbagai tahap dalam proses fertilisasi, akan tetapi mekanisme imunologis dari pada produksi antibodinya belum jelas diketahui (Hiroaki, S, 1996). Menurut Hinting (1989), antibodi antispermatozoa selain mempengaruhi reaksi kapasitasi pada waktu fertilisasi juga mempengaruhi spermatogenesis.

Spermatozoa mempunyai sifat seperti antigen karena adanya autoantigen seperti SCA (Spermatozoa Coating Antigen), plasma membran antigen, akrosomal antigen, sitoplasma dan mitokondria antigen dan inti sel antigen (Voisin, 1984). Menurut Patricio, M (1996), spermatozoa mempunyai protein atau receptor untuk ikatan dengan zona pelucida yaitu galaktosiltransferase, D manosidase, protein tyrosin kinase dan lektin. Ikatan spesifik spermatozoa pada zona pelucida dimediasi oleh molekul galaktosyltransferase pada permukaan kepala yang terikat pada "O-linked oligosakarida pada ZP 3 dari zona pelucida yang akan menginduksi proses reaksi akrosom pada spermatozoa berupa pelepasan isi akrosom secara eksositosis, hal ini berguna bagi

spermatozoa untuk menembus zona pelusida (Albert,B et al, 1994). Menurut Gilbert (1994) dan Deborah, et al (1992) , pada proses reaksi akrosom terjadi proses eksositosis dari granula-granula di bawah lapisan membran spermatozoa yang berisi senyawa kimia , yang mirip dengan tripsin yang penting untuk menembus zona pelusida.

Imunisasi spermatozoa akan menginduksi produksi antibodi antispermatozoa yang akan menyelubungi antigen pada kepala dan ekor spermatozoa yang akan mengganggu proses kapasitasi sehingga menghambat terjadinya reaksi akrosom akibatnya kemampuan fertilisasi berkurang. Antibodi Antispermatozoa mempengaruhi sistem reproduksi yaitu terhadap : spermatogenesis, transport spermatozoa, daya tahan hidup spermatozoa, interaksi gamet dan daya tahan hidup embrio (Hinting, 1989; Liu, 1991; Clarke, 1988 ; Mandelbaum, 1987). Pada penelitian sebelumnya telah terbukti bahwa imunisasi ekstrak testis tikus pada mencit betina mampu menurunkan jumlah fetus dalam setiap kebuntingan hewan coba (Qatrina ,B.W, 2000).

Berdasarkan uraian diatas maka peneliti ingin meneliti potensi Antibodi Antispermatozoa (ASA) Terhadap Spermatogenesis Dan Fertilisasi Pada Tikus Putih.

I.2. Rumusan Masalah

- a. Apakah terdapat perbedaan terhadap spermatogenesis pada tikus putih pada perlakuan dengan Antibodi Antispermatozoa dan pada kelompok kontrol
- b. Apakah terdapat perbedaan terhadap fertilisasi pada tikus putih pada perlakuan dengan antibodi Antispermatozoa dan pada kelompok kontrol

I.3. Hipotesis Penelitian

- a. Terdapat perbedaan jumlah spermtosit dan spermatid pada tikus putih pada perlakuan dengan Antibodi Antispermatozoa dan pada kelompok kontrol
- b. Terdapat perbedaan fertilisasi pada tikus putih pada perlakuan dengan Antibodi Antispermatozoa dan pada kelompok kontrol

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Sistem Reproduksi Tikus Jantan.

Alat reproduksi tikus jantan terdiri dari testis dan saluran-salurannya serta kelenjar asesoris. Di dalam testis terdapat tubulus seminiferus yang mempunyai kemampuan memproduksi spermatozoa. Saluran reproduksi terdiri dari epididimis, vas deferens, ampula dan penis dimana di dalamnya terdapat uretra. Epididimis adalah suatu pembuluh yang berada dibagian dorsal testis, lanjutan dari duktus eferensia, terdiri dari 3 bagian yaitu caput, korpus dan kauda epididimis (Salisbury dan Van Demark, 1985). Kelenjar asesoris atau pelengkap yang berkembang adalah kelenjar prostat yang terletak disekitar uretra dan kantong kencing. Kelenjar asesoris tersebut menghasilkan cairan yang merupakan media pembawa spermatozoa pada waktu ejakulasi.

II.2. Sistem Reproduksi Tikus Betina

Alat reproduksi tikus betina terdiri dari ovarium sebagai organ reproduksi primer yang menghasilkan sel telur serta hormon reproduksi betina yaitu estrogen dan progesterone, dilengkapi dengan saluran reproduksi sebagai organ reproduksi sekunder yang terdiri dari oviduk, uterus, servik, vagina dan vulva. Saluran-saluran reproduksi betina selain bertugas menerima telur yang diproduksi oleh ovarium juga menampung spermatozoa yang dipancarkan oleh alat kelamin jantan (Hafez, 1993).

II.2. Testis

Testis merupakan suatu kelenjar yang mempunyai fungsi ganda yaitu sebagai fungsi reproduksi yang dapat menghasilkan hormon steroid yaitu testosteron (Hardjopranjoto, 1995).

Testis terletak pada daerah prepubis terbungkus dalam kantong skrotum dan digantung oleh funikulus spermatikus. Secara histologi testis dibungkus oleh beberapa lapisan yang terdiri dari tunika dartos disebelah luar, tunika vaginalis disebelah dalam dan tunika albuginea paling dalam. Dari tepi proksimal testis, suatu penebalan dari tunika albuginea berjalan memasuki masa testis disebut mediastinum. Dari mediastinum dilepaskan sekat-sekat, septula testis yang menembus masuk ke dalam substansi testis dan membagi menjadi lobuli-lobuli testis. Apabila tunika albuginea disayat, maka parenchym testis akan mengembang. Parenchym testis yang terdapat di dalam lobuli testis terdiri dari saluran-saluran kecil yang berkelok-kelok disebut tubulus seminiferus (Toelihere, 1981).

II.4. Spermatogenesis

Spermatogenesis dihasilkan di dalam tubuli seminiferi, berasal dari spermatogonia epitel germinalis yang terdapat di lapisan luar tubuli. Pertumbuhan sel-sel ini dengan suatu seri pembelahan sel yang berurutan diikuti berpindahannya sel tersebut ke arah lumen tubuli. Spermatogenesis adalah proses perkembangan spermatogonia menjadi spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus dari testis. Hormon FSH dan LH berasal dari kelenjar hipofisa anterior mempunyai peranan penting dalam mengatur proses spermatogenesis. FSH mengatur proses spermatogenesis sehingga terbentuk

spermatid sedang LH melalui pengaruhnya terhadap sel Leydig dapat menghasilkan hormon testosteron yang berfungsi mengatur proses spermiogenesis sehingga spermatid berubah menjadi spermatozoa. Proses spermatogenesis terdiri dari 2 tahap yaitu :

a. Tahap pertumbuhan jaringan spermatogenik dengan pembelahan sel sederhana dan diikuti dengan pembelahan reduksi. Tahap ini disebut tahap spermatositogenesis yang diakhiri dengan terbentuknya spermatid. Pada proses pembelahan reduksi jumlah kromosom dibagi menjadi 2, yaitu kromosom yang diploid ($2n$) menjadi kromosom haploid (n).

b. Tahap spermiogenesis, adalah tahap dimana spermatid akan mengalami pembelahan metamorfosa seluler sehingga terbentuk menjadi spermatozoa yang sempurna. Perubahan itu meliputi pembentukan akrosom, leher dan ekor spermatozoa (Hardjopranjoto, 1995; Hafez & Garner, 1993).

Spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferus yang terdapat di dalam lobulus testis. Menurut Pangkahila dkk (1980), spermatogenesis dibagi menjadi 4 fase yaitu fase proliferasi, fase miosis, fase spermiogenesis dan spermiasi.

a. Fase proliferasi yaitu terjadinya proses proliferasi dari sel-sel germinatif yang terjadi selama masa di dalam kandungan dan proses ini terhenti selama permulaan kehidupan pasca natal. Kegiatan proliferasi sel germinatif akan tampak lagi bersamaan dengan meningkatnya kadar hormon testosteron pada masa pubertas. Pada saat ini spermatogonia membelah menjadi spermatosit dengan cara pembelahan mitosis diikuti dengan fase miosis.

b. Fase miosis : adalah fase dimana terjadi reduksi jumlah kromosom sehingga menjadi setengah dari jumlah kromosom induk. Pada fase ini spermatosit I

membelah menjadi spermatosit II, kemudian akan membelah lagi menjadi spermatid yang mekanismenya sama dengan pembelahan mitosis.

- c. Fase spermiogenesis adalah fase dimana akan terjadi perubahan biokimia di dalam tubuh spermatid sehingga selama fase ini terjadi pembentukan akrosom dan ekor.
- d. Fase spermiasi adalah fase dimana terjadi perubahan dari spermatid menjadi spermatozoa dan sel ini akan berhubungan dengan sel sertoli. Pada fase ini terjadi perubahan morfologi yaitu sebagian sitoplasma yang dilepaskan diserap oleh sel sertoli, sedangkan sitoplasma yang masih menempel pada spermatozoa disebut protoplasmic droplet. Inti spermatid yang semula berbentuk bulat berubah menjadi bulat panjang sedangkan dari sentriol akan tumbuh ekor sehingga bentuk terakhir ini disebut spermatozoa.

Menurut penelitian Zhengwei dkk, (1990), jumlah spermatogonia dari tikus jantan berumur 30 hari berkisar antara 18,4 sampai 23,6 juta pertestis. Jumlah spermatosit I kira-kira 54,6 juta pertestis, setelah umur 70 hari jumlahnya menjadi 73,6 juta. Spermatid pertama muncul pada umur 25 hari kemudian bertambah banyak menjadi 85,7 juta pertestis pada umur 40 hari kemudian mencapai 151,9 juta pertestis pada umur 70 hari.

II.5. Fertilisasi

Fertilisasi atau pembuahan adalah peristiwa bergabungnya sebuah spermatozoa dengan sebuah ovum membentuk individu baru yang disebut zigot. Pada waktu proses fertilisasi, ovum masih terbungkus dengan banyak sel kumulus yang berasal dari folikel. Oleh karena itu, untuk terjadinya proses fertilisasi atau untuk dapat mencapai inti ovum,

spermatozoa harus menembus : (1). Sel granulose yang ada disekeliling ovum. (2). Zona pelusida sebagai pembungkus ovum dan (3). menembus membran vitelin(Hardjopranto, 1995).

Sel spermatozoa setelah memasuki ampulla dari tuba falopii menjadi semakin aktif bergerak. Ini disebabkan oleh adanya zat yang menyebabkan pergerakan spermatozoa menjadi semakin aktif di dalam cairan tuba falopii, zat tersebut antara lain adalah bikarbonat, asam amino bebas, oksigen , karbohidrat,steroid, CO₂ dan nukleotida yang semuanya dihasilkan oleh sel mukosa tuba falopii (Partodihardjo, 1987). Dalam proses fertilisasi selain sel spermatozoa akan menembus sel granulose atau sel kumulus karena pergerakannya sendiri, juga karena adanya enzim hialuronidase yang mampu menghancurkan sel kumulus. Secara normal, hanya satu spermatozoa yang memasuki ovum, hal ini karena zona pelusida mengalami perubahan setelah masuknya spermatozoa pertama dan menghalangi masuknya spermatozoa berikutnya. Perubahan inilah yang disebut reaksi zona. Pada ovum tikus betina, tempat masuknya spermatozoa mudah dideteksi oleh karena terdapat celah pada zona pelusida. Diduga reaksi pencegahan terhadap spermatozoa berikutnya akibat adanya perubahan struktur zona pelusida yang dimulai dari tempat masuknya spermatozoa kemudian meluas ke semua daerah zona pelusida, dan perubahan ini terjadi paling lambat pada daerah yang berlawanan dengan tempat masuknya spermatozoa pertama sehingga spermatozoa berikutnya mempunyai kesempatan masuk ke daerah tersebut. Fase terakhir penetrasi ovum meliputi pertautan kepala spermatozoa pada permukaan vitelus. Membran plasma spermatozoa menempel pada membran plasma ovum, pada daerah penempelan tersebut kedua membran plasma melebur sehingga terjadi persatuan antara inti dari spermatozoa dan inti dari ovum.

Kepala spermatozoa tampak membengkak, vitelus berkurang volumenya dan diakhiri dengan penyatuan pronukleus jantan dan betina (Toelihere, 1981 ; Suhana dan Rafiah, 1982).

II.6. Antigen

Antigen merupakan suatu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun, sedangkan imunogen adalah suatu bahan atau molekul yang dapat menimbulkan respon imun humoral atau seluler. Pada umumnya imunogen adalah juga antigen meskipun tidak selalu demikian (Baratawidjaja, 1998).

Suatu bahan atau molekul untuk dapat bersifat imunogen tergantung kepada beberapa factor yaitu : komposisi kimia, ukuran molekul, kompleks kimiawi, susunan genetic dari hewan itu sendiri, keasingan dan metode pelaksanaannya (Goodman, 1994). Sperma terdiri dari plasma dan spermatozoa. Banyak komponen protein spermatozoa dan plasma semen berfungsi sebagai antigen yang dapat merangsang pembentukan antibodi homolog, autolog dan heterolog. Respon imun tubuh akan memproduksi antibodi yang spesifik baik humoral maupun seluler, spesifik untuk setiap antigen yang diinjeksikan (Soehadi, 1982).

II.7. Antibodi

Pada dasarnya antibodi itu merupakan gama globulin yang disebut Immunoglobulin atau biasa disingkat dengan Ig, dan merupakan 20% dari seluruh plasma protein. Secara umum Ig digolongkan dalam lima golongan, masing-masing diberi nama Ig M, Ig G, Ig A, Ig D, Ig E. Immunoglobulin A merupakan immunoglobulin yang paling

banyak terdapat di dalam mukosa. Sekresi secara selektif Ig A didahului oleh adanya struktur khas dari Immunoglobulin ini sehingga dapat diikat oleh adanya reseptor khusus pada sel epitel (Subowo, 1993).

Imunoglobulin dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis (Baratawidjaja, 1998). Antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap suatu antigen harus mempunyai ciri-ciri struktur yang berbeda dengan antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap antigen lain (Bellanti, 1993).

II.8. Respon Imun

Respon imun diperlukan untuk tiga hal yaitu pertahanan, homeostasis dan pengawasan. Respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan diluar dan di dalam badan (Baratawidjaya , 1998). Respon tubuh ini mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing, untuk menetralkan, menyisihkan atau memetabolis benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri (Bellanti, 1993). Tidak semua antigen menimbulkan respon imun. Respon imun tergantung dari dosis, waktu pemberian dan sifat antigen (Baratawidjaya, 1998).

Respon imun dibagi dua yaitu respon imun spesifik dan non spesifik. Respon imun non-spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai macam mikroorganisme, karena dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Respon imun non-spesifik yang tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu, telah

ada dan siap berfungsi sejak lahir berupa permukaan tubuh dan berbagai komponen dalam tubuh. Komponen sistem imun non-spesifik dapat dibagi sebagai pertahanan fisik dan mekanik, pertahanan biokimia serta pertahanan humoral dan seluler (Baratawidjaya, 1998).

Respon imun spesifik merupakan suatu reaksi hospes terhadap benda asing yaitu mencakup rangkaian interaksi seluler yang diekspresikan dengan penyebaran produk-produk sel spesifik, yang dapat membedakan dari respon imun non spesifik adalah spesifisitas, heterogenitas dan memori (Bellanti, 1993). Sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun non spesifik untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi badan, tetapi pada umumnya terjadi kerja sama yang baik antara antibodi-komplemen-fagosit dan antara sel T- makrofag (Baratawidjaya, 1998).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

III.1. Tujuan Penelitian

- a. Untuk mengetahui peranan Antibodi Antispermatozoa (ASA) terhadap spermatogenesis pada tikus putih
- b. Untuk mengetahui peranan Antibodi Antispermatozoa (ASA) terhadap fertilisasi pada tikus putih jantan

III.2. Manfaat Penelitian

Diharapkan dengan adanya penelitian ini ekstrak testis (Antibodi Anti Spermatozoa) dapat digunakan sebagai imunokontrasepsi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

IV.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di laboratorium Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang dilaksanakan selama 5 bulan yaitu bulan Juni sampai Oktober 2004.

IV.2. Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari beker glas, tabung reaksi Erlenmeyer, mortir, scalpel, kertas saring, spuit disp. 1 ml, 10 ml, sentrifugasi, timbangan Cent-o-gram dari OHAUS.

IV.3. Bahan-bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah testis tikus jantan sebanyak 10 buah, Na Cl fisiologis, PBS (Phosphat Buffer Saline), tikus putih jantan dan tikus putih betina .

IV.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan 10 buah testis tikus putih jantan yang diambil dengan cara kastrasi kemudian digerus, diencerkan dengan Na Cl 1% sebanyak 10 ml, selanjutnya disaring dan disentrifus dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit hingga terbentuk 3 lapisan yakni lemak di bagian atas, cairan bening ditengah dan endapan

berwarna merah muda kemudian cairan bening ini ditambah dengan PBS dan siap untuk disuntikkan.

Perlakuan terhadap hewan percobaan :

Tikus jantan yang berjumlah 24 ekor dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan.

Kelompok kontrol (P₀) : tikus disuntik dengan NaCl fis. 0,1 ml/sc/hari selama 45 hari.

Kelompok I (P₁) : tikus disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 15 hari.

Kelompok II (P₂) : tikus disuntik dengan suspensi 0,1 ml /sc/hari selama 30 hari.

Kelompok III (P₃) : tikus disuntik dengan suspensi 0,1 ml /sc/hari selama 45 hari.

Selanjutnya masing masing tikus pada tiap-tiap kelompok dikawinkan dan dilihat jumlah anak yang dilahirkan , kemudian tikus jantan tersebut dibunuh dan diambil testesnya selanjutnya dibuat preparat histologi dan diperiksa jumlah sel spermatosit dan spermatidnya.

IV.4. Analisis Data.

Data yang diperoleh dicatat dan ditabulasikan kemudian dianalisis dengan F test, bila terdapat perbedaan antara perlakuan dilanjutkan dengan Uji BNT 5% (Santoso dan Fandy , 1992).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Hasil jumlah spermatosit dan spermatid pada gambaran histologis testes tikus putih yang disuntik dengan ekstrak testes dapat dilihat pada tabel 1 berikut :

Tabel 1. Jumlah spermatosit I,II dan spermatid

Perlakuan	Σ Spermatosit I,II	Σ Spermatid
Po	248,88 \pm 17,52	285,33 \pm 20,54
P1	214,66 \pm 13,90	215,89 \pm 10,85
P2	152,22 \pm 14,38	166,50 \pm 13,13
P3	109,66 \pm 17,94	125,99 \pm 5,9

Keterangan :

Po : Kelompok kontrol yaitu tikus yang disuntik dengan Na Cl fisiologis.

P1: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 15 hari

P2: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 30 hari

P3: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 45 hari

Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa jumlah spermatosit yang terendah adalah P3 (perlakuan selama 45 hari). Dengan analisis statistik (Lampiran 1) antara kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Dari tabel 1 juga dapat dilihat bahwa jumlah spermatid yang terendah adalah P3 (perlakuan selama 45 hari). Dengan analisis statistik (Lampiran 2) antara kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

V.2. Hasil jumlah anak yang dilahirkan dari tikus betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan yang mendapat perlakuan penyuntikan ekstrak testes dapat dilihat pada tabel 2 berikut :

Tabel 2. Jumlah anak yang dilahirkan

Perlakuan	Σ Anak yang dilahirkan
Po	10,83 \pm 1,33
P1	8,5 \pm 0,55
P2	5,17 \pm 0,75
P3	1,17 \pm 1,33

Keterangan :

Po : Kelompok kontrol yaitu tikus yang disuntik dengan Na Cl fisiologis.

P1: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 15 hari

P2: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 30 hari

P3: Kelompok tikus yang disuntik dengan suspensi 0,1 ml/sc/hari selama 45 hari

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa rata-rata jumlah anak yang paling sedikit adalah P3 (perlakuan selama 45 hari). Dengan analisis statistik (Lampiran 3) antara kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Sejak permulaan abad ke 20, spermatozoa sudah diketahui sebagai suatu antigen. Timbulnya antibodi terhadap antigen tubuhnya sendiri, seperti antispermatozoa di dalam tubuh jantan, termasuk keadaan autoimun. Dalam keadaan normal tubuh tidak membentuk antibodi terhadap diri sendiri karena semua antigen tubuhnya termasuk self antigen, sehingga sudah dikenal oleh sistem imun tubuh tersebut dianggap sebagai nonself antigen (Tjokronegoro, 1991). Hal tersebut karena terdapat suatu barrier yang dikenal dengan nama blood testes barrier, yang dibentuk oleh tight-junction dari sel-sel sertoli di dalam tubulus seminiferus, basal membran dan lapisan epitel yang menutupi

sistem transport spermatozoa mulai dari duktus efferent sampai dengan uretra (Hinting, 1989; Mandelbaum, 1987).

Antigen bisa terdapat pada tempat-tempat yang berlainan pada permukaan spermatozoa dan efek terhadap sistem reproduksipun bermacam-macam. Autoimun dapat menyebabkan aspermatogenesis, oligospermatogenesis atau kelainan dari morfologi spermatozoa . Pada penelitian ini didapatkan jumlah anak yang dilahirkan berkurang ataupun pada P3 ada tikus betina tidak didapatkan anak sama sekali, hal ini mungkin antibodi antispermatozoa menghambat kemampuan fertilisasi spermatozoa (Saling, 1985). Antibodi antispermatozoa mempengaruhi kapasitas spermatozoa, reaksi akrosom, binding spermatozoa atau penetrasi zona pelucida, fusi spermatozoa-sel telur atau pembelahan zigot (Liu, 1991). Antibodi antispermatozoa dapat bereaksi dengan antigen determinant pada embrio dan menghalangi implantasi atau menyebabkan abortus spontan setelah terjadi implantasi (Clarke, 1988 ; Mandelbaum, 1987).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI. 1. Kesimpulan Penelitian

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa :

- a. Penyuntikan Antibodi Antispermatozoa (ekstrak testes) pada tikus putih jantan dapat menurunkan jumlah spermatisit dan spermatid.
- b. Setelah tikus putih jantan tersebut dikawinkan ,maka jumlah anak yang dilahirkan berkurang.

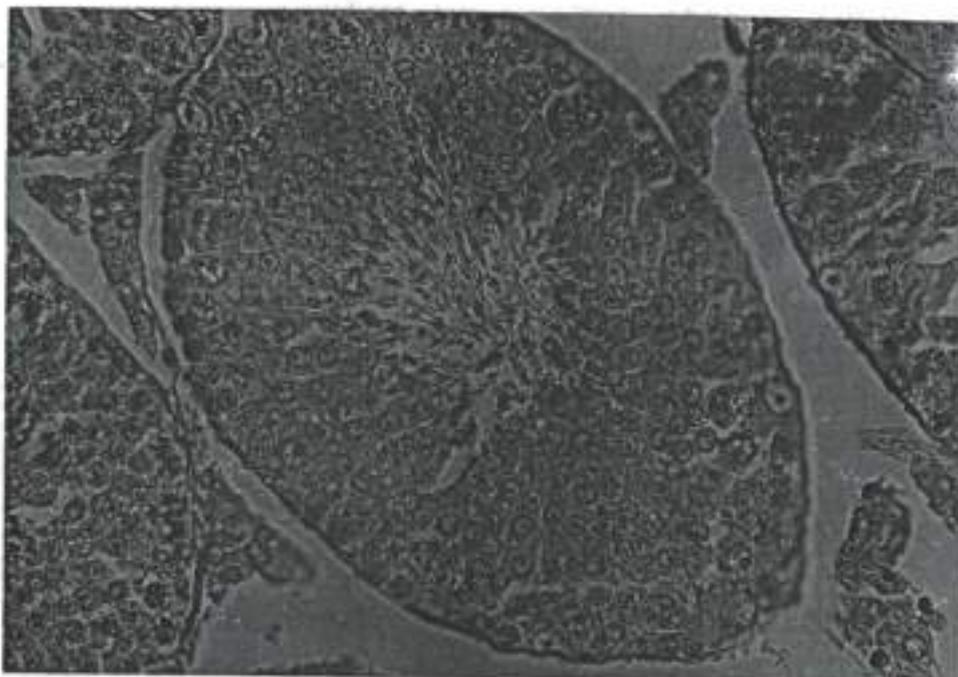
VI.2. Saran Penelitian

Saran dari penelitian ini adalah dosisnya dapat ditingkatkan agar diperoleh keadaan yang aspermatogenesis dan tidak terjadi fertilisasi sehingga dapat digunakan sebagai imunokontrasepsi

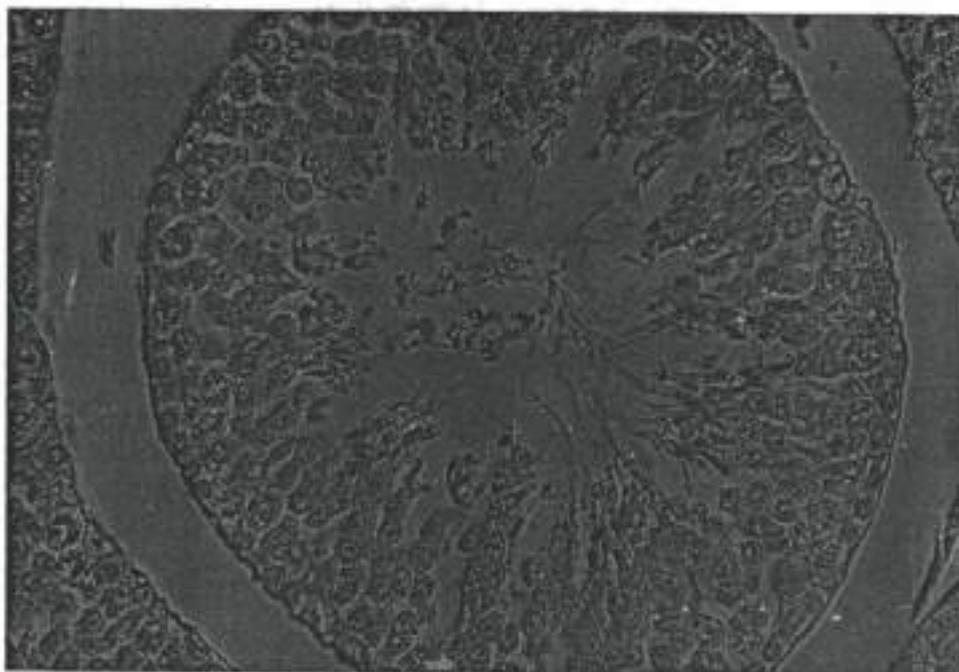
DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B, Bray, D, Lewis, J dan Raff, M, 1994. *Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing. New York. London.
- Baratawidjaja, K.G, 1998. *Imunologi Dasar*. Edisi Ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.
- Bellanti, J.A, 1993. *Imunologi III*. Edisi Bahasa Indonesia. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Deborah, J.B dan Patricia, M.S, 1992. *Molecular Mechanisms of Fertilization and Action of Development*. *Animal Reproduction Science*. 28. pp.79-86.
- Evans, G dan W.M.C. Maxwell, 1987. *Salomon Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Departement of Animal Husbandry. Sydney.
- Goodman, J.W, 1994. *Immunogens and Antigens In Daniel P.S, Abba, I.T and Tristran, G.P. Ed. Basic and Clinical Immunology*. Appleton and Lange. Norwalk. Connecticut.
- Gordon, I, 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB. International. Cambridge.
- Hafez, E.S.E, 1993. *Reproduction in Farm Animal* 6th. ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Hardjopranjoto, S, 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hiroaki, S; Yoshiyuki, T; Koji, Y, 1996. *Production of Human Sperm Immobilizing Antibodies in Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice Reconstituted with Human Peripheral Bloodlymphocytes from Infertile Women*. *American Journal of Reproductive Immunology*.
- Hunter, R.H.F, 1995. *Fisiologi dan Tehnologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Edisi LITB. Bandung.
- Mancini, R.E dan Andrada, 1978. *Imunological Factors*. In *Human Male and Female Infertility*. In max Samter. Ed. *Imunological Diseases* .3th.Ed. Vol.II. Little Brown and Company United State of America. 1308-1324.

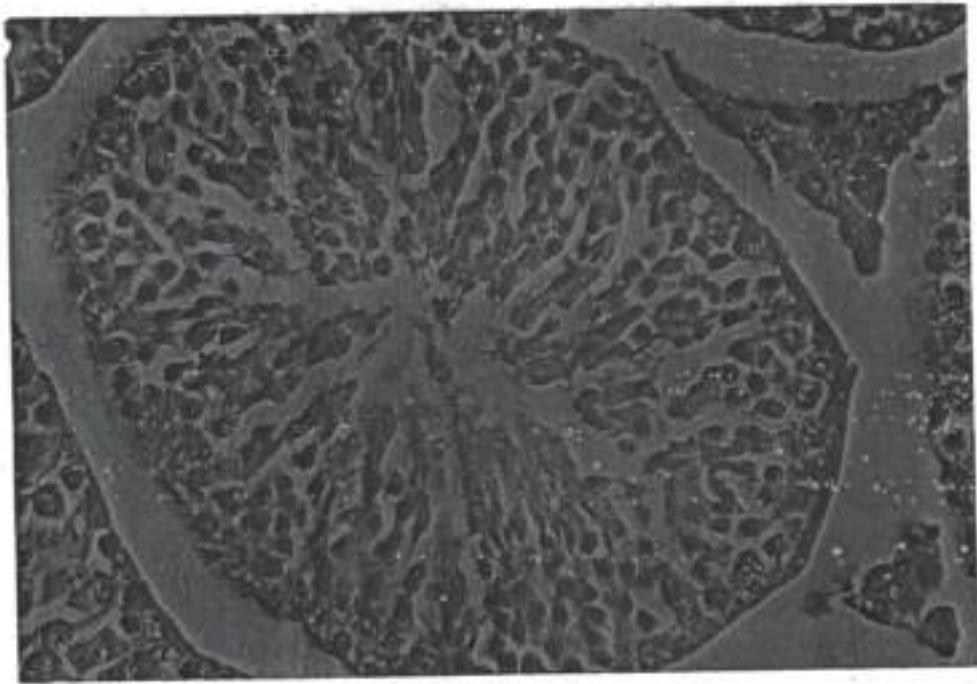
- Maslich, D, 1992. Peranan Antibodi Antispermatozoa (Antisperm Antibody :ASA) Terhadap Timbulnya Infertilitas Pada Pria. Laporan Penelitian .Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Pangkahila, J.A; O.S Tendean; M.Loegito; Loegito, 1980. Spermatogenesis in Arsyad, K.M. Proseding Seminar Spermatogenesis. Perkumpulan Andrologi Indonesia (PANDI). Surabaya.
- Partodihardjo, S, 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi III. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Patricio, M dan Miguel, I, 1999. Interaction of Human Spermatozoa with the Zona Pelucida of Oocyte. Home Journal Lybrary Index.
- Qatrina, B.W, 2000. Pengaruh Pemberian Ekstrak Testis Tikus (Ratus Norvegicus Terhadap Fertilitas Mencit Betina (Mus Musculus).
- Santoso, S dan Fandy, T, 2001. Riset Pemasaran. Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. P.T. Gramedia. Jakarta.
- Suhana, N dan R.T.Rafiah, 1982. Diferensiasi. Embriologi Dalam Tingkat Selluler, Molekuler. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Toelihere, M.R, 1979. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.
- Toelihere, M.R, 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.
- Viosin, G.A. Active Immunization Against Sperm and Sperm Autoantigen in. D.B. Crighton and Immunological Aspect of Reproduction in Mammals, Butter Worth. London.
- Zhengwei, Y; G.W. Nigel and M.K David, 1990. A Quantitative Study of Spermatogenesis in The Developing Rat Testes. J.Biol.Rep.43.629-635.



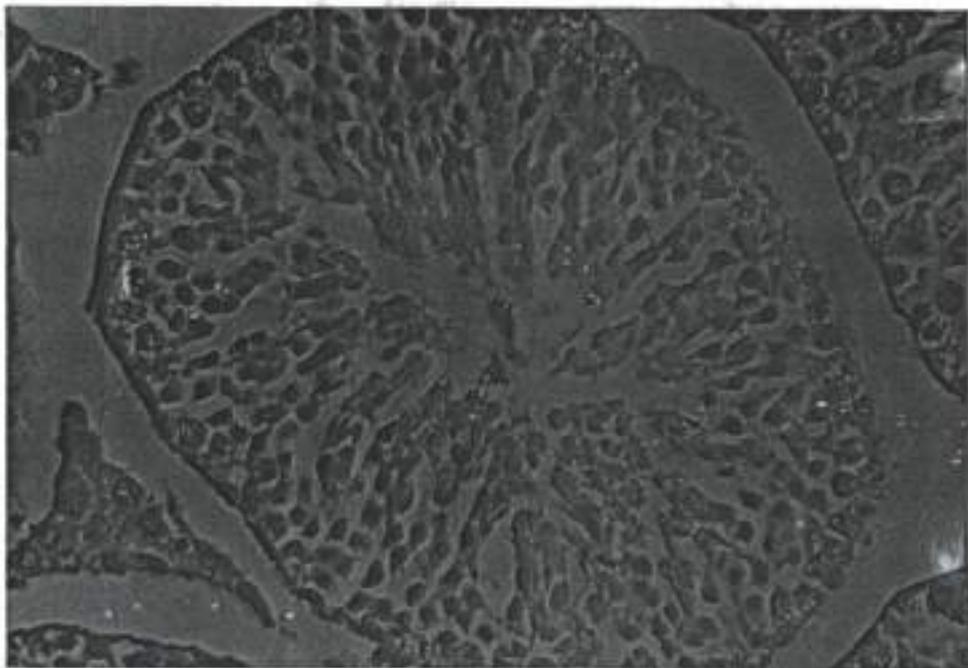
Gb.1. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok kontrol



Gb.2. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok I



Gb.3. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok II



Gb.4. Gambaran histologis testes tikus pada kelompok III

Oneway

Descriptives

Jumlah spermatid

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					0	6		
1	6	215.8867	10.8495	4.4293	204.5008	227.2725	201.00	230.00
2	6	166.4967	13.1284	5.3596	152.7193	180.2740	150.00	187.33
3	6	125.9967	5.9307	2.4212	119.7727	132.2206	117.66	132.00
Total	24	198.4275	62.0209	12.6600	172.2384	224.6166	117.66	304.66

ANOVA

Jumlah spermatid

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	84736.024	3	28245.341	151.226	.000
Within Groups	3735.510	20	186.775		
Total	88471.534	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah spermatid

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	69.4433*	7.8904	.000	47.3583	91.5283
	2	118.8333*	7.8904	.000	96.7483	140.9183
	3	159.3333*	7.8904	.000	137.2483	181.4183
1	0	-69.4433*	7.8904	.000	-91.5283	-47.3583
	2	49.3900*	7.8904	.000	27.3050	71.4750
	3	89.8900*	7.8904	.000	67.8050	111.9750
2	0	-118.8333*	7.8904	.000	-140.9183	-96.7483
	1	-49.3900*	7.8904	.000	-71.4750	-27.3050
	3	40.5000*	7.8904	.000	18.4150	62.5850
3	0	-159.3333*	7.8904	.000	-181.4183	-137.2483
	1	-89.8900*	7.8904	.000	-111.9750	-67.8050
	2	-40.5000*	7.8904	.000	-62.5850	-18.4150

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Oneway

Descriptives

Jumlah spermatisit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	248.8800	17.5181	7.1517	230.4959	267.2641	220.66	270.30
1	6	214.6633	13.8986	5.6741	200.0777	229.2490	203.66	240.33
2	6	152.2200	14.3792	5.8703	137.1300	167.3100	139.33	171.33
3	6	109.6633	17.9404	7.3241	90.6360	128.4906	90.00	140.00
Total	24	181.3567	57.1379	11.6632	157.2294	205.4839	90.00	270.30

ANOVA

Jumlah spermatisit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	69945.684	3	23315.228	90.662	.000
Within Groups	5143.353	20	257.168		
Total	75089.037	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah spermatisit

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	34.2167*	9.2586	.007	8.3020	60.1314
	2	96.6600*	9.2586	.000	70.7453	122.5747
	3	139.2167*	9.2586	.000	113.3020	165.1314
1	0	-34.2167*	9.2586	.007	-60.1314	-8.3020
	2	62.4433*	9.2586	.000	36.5286	88.3580
	3	105.0000*	9.2586	.000	79.0853	130.9147
2	0	-96.6600*	9.2586	.000	-122.5747	-70.7453
	1	-62.4433*	9.2586	.000	-88.3580	-36.5286
	3	-42.5567*	9.2586	.001	16.6420	68.4714
3	0	-139.2167*	9.2586	.000	-165.1314	-113.3020
	1	-105.0000*	9.2586	.000	-130.9147	-79.0853
	2	-42.5567*	9.2586	.001	-68.4714	-16.6420

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Oneway

Descriptives

Jumlah anak tikus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	10.83	1.33	.54	9.44	12.23	9	12
1	6	8.50	.55	.22	7.93	9.07	8	9
2	6	5.17	.75	.31	4.38	5.96	4	6
3	6	1.17	1.33	.54	-.23	2.56	0	3
Total	24	6.42	3.84	.78	4.79	8.04	0	12

ANOVA

Jumlah anak tikus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	317.833	3	105.944	96.313	.000
Within Groups	22.000	20	1.100		
Total	339.833	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah anak tikus

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	2.33*	.61	.005	.64	4.03
	2	5.67*	.61	.000	3.97	7.36
	3	9.67*	.61	.000	7.97	11.36
1	0	-2.33*	.61	.005	-4.03	-.64
	2	3.33*	.61	.000	1.64	5.03
	3	7.33*	.61	.000	5.64	9.03
2	0	-5.67*	.61	.000	-7.36	-3.97
	1	-3.33*	.61	.000	-5.03	-1.64
	3	4.00*	.61	.000	2.31	5.69
3	0	-9.67*	.61	.000	-11.36	-7.97
	1	-7.33*	.61	.000	-8.03	-5.64
	2	-4.00*	.61	.000	-5.69	-2.31

*. The mean difference is significant at the .05 level.