# PERFORMANS MOTILITAS, TUDUNG AKROSOM UTUH DAN VELOSITAS SPERMATOZOA TANPA DAN DENGAN METODE 'SWIM UP' PASCA 'THAWING' PADA SEMEN BEKU SAPI POTONG

**TESIS**

Oleh

ICHWANDI

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU TERNAK**
**PROGRAM PASCASARJANA – FAKULTAS PETERNAKAN**
**UNIVERSITAS DIPONEGORO**
**2004**

# PERFORMANS MOTILITAS, TUDUNG AKROSOM UTUH DAN VELOSITAS SPERMATOZOA TANPA DAN DENGAN METODE 'SWIM UP' PASCA 'THAWING' PADA SEMEN BEKU SAPI POTONG

**Oleh**

**ICHWANDI**

**NIM : H4A 002 011**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Magister Pertanian
pada Program Studi Magister Ilmu Ternak Program Pascasarjana
Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU TERNAK**
**PROGRAM PASCASARJANA – FAKULTAS PETERNAKAN**
**UNIVERSITAS DIPONEGORO**
**2004**

| | | |
|---|---|---|
| Judul Tesis | : | PERFORMANS MOTILITAS, TUDUNG AKROSOM UTUH DAN VELOSITAS SPERMATOZOA TANPA DAN DENGAN METODE *SWIM UP* PASCA *THAWING* PADA SEMEN BEKU SAPI POTONG |
| Nama Mahasiswa | : | ICHWANDI |
| Nomor Induk Mahasiswa | : | H4A 002 011 |
| Program Studi | : | MAGISTER ILMU TERNAK |

Telah disidangkan di hadapan Tim Penguji
dan dinyatakan lulus pada tanggal 26 Maret 2004

Pembimbing Utama

Dr. Ir. Yon Supri Ondho, MS

Pembimbing Anggota

Dr. Ir. M.I. Sri Wuwuh, MS

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Ternak

Dr. Ir. Umiyati Atmomarsono
NIP. 130 529 440

Ketua Jurusan

Dr. Ir. Mukh Arifin, MSc
NIP. 131 668 531

Dekan Fakultas Peternakan

Ir. Bambang Srigandono, MSc
NIP. 130 241 757

4

## ABSTRACT

**Ichwandi**. H4A002011. Motility, Acrosome Integrity and Velocity Sperm Performance with or without Swim Up Procedure on Frozen Thawed Semen of Beef Cattle (Advisors: **Yon Supri Ondho** and **M.I Sri Wuwuh**).

The objective of this research was to compare the sperm performance of motility, acrosome integrity and velocity between post thaw and after swim up on beef cattle frozen semen, besides to obtain the selected of sperm as well. This research conducted at Animal Reproduction and Breeding Science Laboratory, Animal Husbandry Faculty. Diponegoro University since Desember 20, 2003 until February 28, 2004.

The material used in this research was 36 ministraw frozen semen origin from 3 Breeds of beef cattle (Simental, Limousin and Brahman) which produced by Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran Semarang. Three parameters observed were motility, acrosome integrity and velocity of sperm. Data statistic be analyzed by the analysis of variance procedure on every breed which the bull and swim up as the factors.

The analysis of variance result shows that swim up has highly significant effect ($P<0.01$) to sperm motility. The average post thaw motility on Simental is 30-32.5% while after swim up is 55-62.5%. On Limousin the average of motility is 27.5-37.5% then after swim up is 62.5-65%. The average motility on Brahman are 30-35% and 60-70% in post thawed and after swim up respectively. However there was no differ in integrity acrosome between post thaw and after swim up for all of Breed used. The velocity observation shows that swim up has highly significant effect ($P<0.01$) on Brahman and meanwhile it has significant effect ($P<0.05$) on Simental and Limousin.

This research concluded that swim up be able increasing the percentage of motility, potentially promoting the velocity and also maintaining the proportion of integrity acrosome on beef cattle frozen semen.


Keywords: motility, acrosome integrity, velocity, swim up.

# ABSTRAK

**Ichwandi. H4A002011**. Performans Motilitas, Tudung Akrosom Utuh dan Velositas Spermatozoa Tanpa dan dengan Metode 'Swim Up' Pasca 'Thawing' Pada Semen Beku Sapi Potong. (Pembimbing: **Yon Supri Ondho** dan. **M.I. Sri Wuwuh**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui performans motilitas, tudung akrosom utuh dan velositas spermatozoa pada semen beku pasca 'thawing' dengan setelah 'swim up' serta memperoleh spermatozoa terseleksi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Pemuliaan dan Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro mulai tanggal 20 Desember 2003 sampai dengan 28 Februari 2004.

Materi dalam penelitian ini adalah semen beku sebanyak 36 ministraw dari 3 bangsa semen sapi potong (Simental, Limousin dan Brahman) yang diperoleh dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran. Parameter yang diamati adalah motilitas spermatozoa, tudung akrosom utuh dan velositas spermatozoa. Data diolah secara statistik menggunakan prosedur sidik ragam pada tiap bangsa dengan 'swim up' dan pejantan sebagai faktor.

Hasil analisis ragam menunjukan bahwa 'swim up' memberi pengaruh sangat nyata ($P<0.01$) terhadap motilitas spermatozoa. Pada bangsa Simental rataan motilitas pada saat 'thawing' berkisar dari 30–32.5%, sementara setelah 'swim up' rataan yang ditunjukan adalah 55-62.5%. Pada bangsa Limousin rataan motilitas adalah 27.5-37.5% dan setelah 'swim up' adalah 62.5-65%. Selanjutnya rataan motilitas yang ditunjukan pada bangsa Brahman adalah 30-35% dan setelah 'swim up' menjadi 60-70%. Namun pada pengamatan keutuhan tudung akrosom spermatozoa diketahui bahwa 'swim up' tidak memberikan pengaruh nyata pada keutuhan tudung akrosom spermatozoa dari semua bangsa yang digunakan dengan rataan besaran keutuhan tudung akrosom adalah 58–63%. Kemudian pada pengamatan velositas menunjukan bahwa 'swim up' memberi pengaruh sangat nyata ($P<0.01$) pada bangsa Brahman dan berpengaruh nyata ($P<0.05$) pada bangsa Simental dan Limousin.

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini bahwa dengan metode 'swim up' dapat diperoleh spermatozoa motil yang lebih banyak, meningkatkan velositas serta dapat mempertahankan dan tidak mempengaruhi kondisi keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada semen beku sapi potong.


Kata Kunci: motilitas, keutuhan tudung akrosom, velositas, swim up

*Seandainya semua pohon yang ada dibumi dijadikan pena dan lautan menjadi tintanya bahkan ditambah tujuh laut lagi, maka belum cukup untuk menuliskan perkataan (rahmat dan kemurahan) Allah. Sesungguhnya Allah Maha Kuasa dan Bijaksana*
*(QS Luqman : 27)*

Kupersembahkan untuk orang tua, kakak
dan adik-adiku atas segala perhatian,
pengorbanan, motivasi dan do'a....

Terima kasih kepada Allah SWT atas semua limpahan berkah dan hidayah serta hikmah yang diberikan selama ini. Untuk Pak Etek' dan keluarga atas support dan motivasi, Pak Tengku Hanafiah atas doanya (I pray for the best luck for you, may Allah bless you with whatever the best for you, so don't forget do your best for Allah). Priyono MIT untuk pertemanan yang baik...Anak-anak Pleburan Raya 41 (Hadi, Bagus, Taufik, Wahyu, Nico, Bowo, Johan, Rizal, Jabir dan Hendro 'Damn') untuk persahabatan dan semua kenangan yang tertinggal (...masa depan adalah lautan yang tak pernah surut), temen-temen kongkow di rental tataz, wartel bang Ndank, bajigur 'Abah' dan fotocopy titin. My Old friends di FMIPA UI (Ipan 'bane' and Budi 'combro' to provide for all chemical materials), Ibnu Azis untuk teladan kerendahan hati dan kesederhanaan (moga-moga antum sampe ke Senayan..), Hafil dan Sjahrazad (u inspired me a lot!!!)...Temen-temen di LIA Candi (where I lay my head is home!!), Bang Ben yang bikin ketawa terussss....serta semua orang baik yang pernah kujumpai dan kota semarang yang peaceful, terima kasih.

# KATA PENGANTAR

Perkembangan sains di bidang bioteknologi reproduksi berjalan demikian pesat. Sejumlah penemuan disertai aplikasi pada sektor terkait terus menunjukan progresifitas dengan tingkat keberhasilan yang mengagumkan. Metode yang sampai saat ini terus dikembangkan cenderung memberikan porsi terbesar yang bermuara pada upaya mempertinggi akurasi keberhasilan fertilisasi. Metode 'swim up' yang berhulu pada seleksi spermatozoa motil merupakan salah satu teknik dan sering digunakan khususnya dalam manipulasi gamet untuk kepentingan fertilisasi *in vitro*.

Pada kesempatan ini penulis sangat berterima kasih kepada Dr.Ir. Yon Supri Ondho, MS sebagai pembimbing utama dan Dr. Ir. Sri Wuwuh, MS sebagai pembimbing anggota atas waktu dan bantuannya selama membimbing penulis dalam melakukan penelitian serta memperkaya penulis dalam mengkaji bahasan serta penulisan pada penyusunan tesis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Ir. Umiyati Atmomarsono, MS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Ternak atas semua saran dan nasehatnya yang membuka sedemikian luas khususnya dalam memperlancar kegiatan studi penulis. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Ir. Mukh Arifin, MSc, Dr. Ir. Sudjatmogo, MS dan Ir. Barep Sutiyono, MS sebagai penguji serta Dr. Ir. Sumarsono, MS sebagai Panitia ujian dan seluruh rekan atas semua masukan yang sangat berharga dalam penulisan ini.

Dikesempatan akhir penulis berharap agar hasil penelitian ini bermanfaat bagi kita semua khususnya bagi para pengguna serta dapat memberi kontribusi sebagai bahan pengkayaan dari aplikasi teknik-teknik telah ada sebelumnya.

Semarang, April 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

## DAFTAR TABEL

## DAFTAR ILUSTRASI

## DAFTAR LAMPIRAN

# BAB I

# PENDAHULUAN

Kualitas semen merupakan salah satu faktor yang memegang peranan penting serta sering dianggap memiliki korelasi positif dalam menentukan keberhasilan terjadinya fertilisasi. Sejumlah kriteria dengan penetapan standar minimal telah menjadi semacam acuan penilaian untuk menentukan kualitas semen, baik secara makroskopis maupun mikroskopis pada berbagai tingkat aplikasi dilapangan.

Bila direntangkan jalur perjalanan dalam hal ini spermatozoa mulai dari awal proses pembentukan hingga pertemuannya dengan sel telur (ovum), nampak jelas bahwa tahapan terakhir merupakan tahap paling kritis dalam penentuan keberhasilan terjadinya fertilisasi. Perjalanan yang relatif panjang di satu sisi, secara teoritis membutuhkan atau bahkan mempersyaratkan kondisi aktifitas spermatozoa yang baik (unggul), meskipun sel-sel sperma itu sendiri dilain pihak mengalami proses kapasitasi secara alamiah. Sehingga praktis ketersediaan sejumlah spermatozoa berkualitas yang terseleksi (aktifitas didalam organ reproduksi betina) akan sangat membantu maksud pencapaian tersebut.

Saat ini sejumlah penelitian terus dikembangkan dalam rangka memperbaiki kualitas spermatozoa khususnya untuk keperluan fertilisasi *in vitro* (FIV). Dibidang peternakan aplikasi serupa tentu akan sangat bermanfaat serta besar artinya dalam upaya peningkatan populasi bermutu genetik yang baik, misalnya dengan penggunaan spermatozoa terseleksi yang nantinya diharapkan

mampu mempertinggi akurasi keberhasilan fertilisasi dalam menghasilkan embrio kembar identik dan sebagainya.

Pengembangan bioteknologi dibidang teknologi reproduksi seperti misalnya 'intracytoplasmic sperm injection' (ICSI) dan 'subzonal sperm insertion' (SUZI) telah memungkinkan menginokulasi spermatozoa langsung kedalam ovum. Hasilnya pada tahun 1993 telah lahir lebih dari 300 bayi dengan memanfaatkan teknologi tersebut. Aplikasi dari kegiatan di atas, tentu berhulu pada proses seleksi terhadap spermotozoa, meski hingga saat ini cenderung dikatakan porsi terbesar masih termanfaatkan untuk keperluan manusia khususnya pada golongan normospermia.

Kemampuan individu spermatozoa memiliki atau dapat digunakan sebagai indikasi dari kemampuan sel tersebut dalam melakukan daya penetrasi pada sel telur. Motilitas progresif dengan pergerakan atau kecepatan yang konstan akan sangat membantu proses penetrasi dimaksud. Selanjutnya efektifitas daya penetrasi dalam menembus dinding sel telur sangat tergantung serta merupakan peran dari enzim akrosomal (*acrosin dan hyaluronidase*) yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa dalam melisiskan zona pelucida.

Bertitik tolak dari uraian diatas, muncul suatu pemikiran untuk dapat melakukan suatu penelitian dalam rangka memperoleh spermatozoa motil serta mengamati pula kecepatan geraknya dan kondisi keutuhan tudung akrosom khususnya pada semen sapi potong. Salah satu metode telah diperkenalkan oleh peneliti terdahulu yaitu pemisahan spermatozoa motil dengan plasma semen yang telah dilakukan terhadap semen manusia dan dikenal dengan metode 'swim up'

atau migrasi ke atas. Metode ini merupakan tiruan secara *in vitro* dari migrasi spermatozoa untuk melewati getah servik uterus secara *in vivo*.

Metode 'swim up' merupakan metode yang baik untuk mendapatkan spermatozoa motil yang berkualitas baik untuk kepentingan fertilisasi *in vitro* maupun untuk keperluan Inseminasi Buatan pada beberapa kasus tertentu. Dengan metode 'swim up' plasma semen dapat diganti dengan medium buatan, antara lain medium Tyrode, medium Locke, garam faal, medium Ham's $F_{10}$, medium Kramer, medium T6 dan lain-lain.

Sehingga sehubungan dengan maksud diatas, dirasa perlu dilakukan suatu penelitian dengan judul "Performans Motilitas, Tudung Akrosom Utuh dan Velositas Spermatozoa Tanpa dan Dengan Metode 'Swim up' Pasca 'Thawing' Pada Semen Beku Sapi Potong". Diharapkan dari hasil penelitian ini diperoleh informasi tentang performans motilitas, kecepatan dan keutuhan tudung akrosom pada semen beku sapi potong. Aplikasi dari hasil penelitian ini akan sangat membantu khususnya dalam pengembangan teknologi reproduksi khususnya pada tehnik pemisahan spermatozoa motil serta informasi berguna lainya tentang kecepatan serta kondisi keutuhan tudung akrosom spermatozoa.

## 1.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui performans motilitas, tudung akrosom utuh dan velositas spermatozoa pada semen beku sesaat setelah 'thawing' dengan setelah 'swim up'

2. Memperoleh spermatozoa terseleksi yang dapat dimanfaatkan untuk aplikasi selanjutnya.

## 1.2 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memperoleh informasi tentang performans motilitas, tudung akrosom utuh serta velositas spermatozoa pada semen beku sapi potong dengan teknik 'swim up'
2. Memberi alternatif pilihan dalam teknik pemisahan spermatozoa motil disamping teknik-teknik yang telah ada
3. Bahan kajian awal dalam peningkatan kualitas bagi industri pembuat semen

## 1.3 Kerangka Pemikiran

Motilitas dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa merupakan parameter penting dalam menilai kualitas semen serta berguna sebagai indikator keberhasilan fertilisasi. Pada bagian akrosom terdapat enzim akrosomal (*acrosin* dan *hyaluronidase*) berfungsi untuk melisiskan sel-sel kumulus pada saat terjadi pertemuan spermatozoa dengan sel telur. Sementara untuk menembus membran sel telur, spermatozoa membutuhkan energi yang cukup, sehingga faktor gerakan merupakan refleksi adanya aktifitas metabolisme dari ketercukupan energi. Faktor kecepatan spermatozoa dapat menjadi cerminan dari kemampuan/daya spermatozoa dalam membantu penetrasi pada sel telur. Salah satu metode yang

sering digunakan dalam menyeleksi spermatozoa unggul saat ini adalah metode 'swim up' yang merupakan tiruan secara *in vitro* dari migrasi spermatozoa melewati getah serviks uterus secara *in vivo.*

## 1.4 Hipotesis

1. Motilitas spermatozoa pada semen beku setelah 'swim up' lebih tinggi dibandingkan setelah 'thawing'.
2. Tudung akrosom utuh pada semen beku setelah 'swim up' lebih tinggi dibandingkan setelah 'thawing'.
3. Velositas pada semen beku setelah 'swim up' lebih tinggi dibandingkan setelah 'thawing'.

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Semen

Menurut Toelihere (1981), semen adalah sekresi kelamin hewan jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tapi dapat juga ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan Inseminasi Buatan. Semen terdiri dari dua bagian, yaitu spermatozoa dan plasma semen. Spermatozoa dihasilkan oleh testis, sedangkan plasma semen adalah campuran sekresi yang dibuat epididymis dan kelenjar-kelenjar pelengkap, yaitu vesikularis, bulbo uretrhalis dan prostata yang berfungsi sebagai media dan merupakan sumber makanan yang nantinya akan dijadikan sumber energi untuk gerak dan metabolisme sel. Menurut Hafez (1987) komposisi cairan mani sapi terdiri atas fruktosa, sorbitol, GPC, inosol, asam sitrat, plasmalogen, sodium, potasium, clor, kalium dan magnesium. Komposisi kandungan air mani dapat dilihat pada Tabel 1.

Semen atau mani dalam Ilmu Reproduksi Hewan adalah zat cair yang keluar dari tubuh melalui penis sewaktu kopulasi yang terdiri dari bagian yang berupa sel dan bagian yang tidak bersel. Sel-sel itu hidup dan bergerak disebut spermatozoa dan zat cair didalam mana sel-sel itu berenang disebut seminal plasma (Partodihardjo, 1992).

Tabel 1. Komposisi Kimia Cairan Mani Sapi (Hafez ,1987)

| Bahan | Jumlah (mg) |
|---|---|
| Fruktosa | 530 |
| Sorbitol | 75 |
| Glyserol Phosporil Cholin | 350 |
| Inosol | 35 |
| Asam Sitrat | 720 |
| Plasmalogen | 60 |
| Sodium | 230 |
| Potasium | 140 |
| Chlor | 180 |
| Ca | 44 |
| Mg | 8 |

## 2.2 Spermatozoa

Menurut Partodihardjo (1992), spermatozoa sebagian besar terdiri dari : Deoxyribonucleoprotein yang terdapat dalam nucleus yang merupakan kepala dari sperma. Muco-polysaccharide yang terikat pada molekul-molekul protein terdapat di akrosom, yaitu bagian pembungkus kepala. Plasmalogen atau lemak aldehydehidrogen yang terdapat di bagian leher, badan dan ekor dari sperma, merupakan bahan yang dipergunakan oleh sperma untuk respirasi endogen. Protein yang menyerupai keratine yang merupakan selubung tipis yang meliputi seluruh badan, kepala dan ekor sperma. Protein ini mempunyai ikatan dengan unsur zat sulfur yang diduga bertanggungjawab terhadap sifat elastisitas permukaan sel sperma itu. Sperma mengandung bermacam-macam enzim dan co-enzim yang pada umumnya digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi.

## 2.3 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa normal memiliki kepala, leher, badan dan ekor. Dibawah mikroskop bagian dinding depan kepala tampak sekitar 2/3 bagian tertutup oleh akrosom. Tempat sambungan dasar akrosom dan kepala disebut cincin nukleus, diantara kepala dan badan terdapat sambungan pendek yaitu leher yang berisi sentiole proksimal, kadang-kadang dinyatakan sebagai pusat kinetik aktifitas spermatozoa. Bagian badan mulai dari leher dan berlanjut ke cincin sentriole. Bagian badan dan ekor mampu bergerak bebas, meskipun tanpa kepala. Ekor serupa cambuk, membantu mendorong spermatozoa bergerak maju (Salisbury dan Van Demark, 1985). Menurut Toelihere (1981) sperma merupakan satu sel yang kecil, kompak, sangat khas, tidak bertumbuh dan terdiri dari bagian kepala dan ekor. Sperma yang mati permeabilitasnya meninggi, terutama pada pangkal kepalanya.

Kepala sperma mengandung inti yang berisi kromosom yang mengandung DNA (Deoxyribo Nukleid Acid) yang bersenyawa dengan protein sebagai pembawa formula genetik. penggerak. Bagian ekor berfungsi sebagai penggerak. Sesuai dengan morfologi spermatozoa dan pola metaboliknya dengan dasar produksi energi, spermatozoa hidup dapat mendorong dirinya sendiri maju ke depan di dalam lingkungan zat cair (Salisbury dan Van Demark, 1985). Pada umumnya setiap penyimpangan morfologi dari struktur sperma yang normal dipandang sebagai abnormal. Abnormalitas sperma dapat terjadi pada kepala atau ekor (Toelihere, 1981).

## 2.4 Kualitas Semen

Menurut Toelihere (1981) bahwa pemeriksaan umum semen meliputi: (1) Volume semen yang langsung terbaca pada tabung penampung yang berskala, (2) Warna, semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputihan dan keruh, (3) Konsistensi, dengan menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan. Standar minimum bagi kualitas semen segar yang dapat dipakai untuk Inseminasi Buatan adalah minimum mengandung 500 juta sel/ml ejakulat dan 50 % spermatozoa hidup dan aktif (Toelihere, 1981). Segera sesudah penampungan dilakukan pemeriksaan umum terhadap ejakulat di dalam tabung penampungan (Salisbury dan Van Demark 1985). Pemeriksaan terdiri dari pengamatan terhadap warna, kekentalan semen, gelombang massa, dan pencatatan volume. Selanjutnya secara terperinci Toelihere (1981) menjelaskan bahwa karakteristik semen dapat digunakan sebagai indikator dari fertilitas.

Untuk gerakan massa ditentukan dengan penilaian sebagai berikut: (1) Sangat baik (+++) terlihat gelombang besar, gelap, tebal dan aktif bagaikan gumpalan awan hitam dekat waktu hujan, bergerak cepat dan berpindah-pindah, (2) Baik (++) terlihat gelombang tipis, kecil, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban, (3) Lumayan (+) tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan-gerakan individual aktif progresif, (4) Buruk (0) bila hanya sedikit atau tidak ada gerakan-gerakan individual. Sedangkan gerakan individual dilakukan penilaian sebagai berikut : 0. Sel mani imotil atau tidak bergerak; 1. Gerak berputar di tempat; 2. Gerak berayun atau melingkar, kurang 50 % bergerak progresif dan tidak ada gelombang; 3. Antara 50 - 80 % sel mani bergerak progresif dan

menghasilkan gerakan massa; 4. Pergerakan progresif gesit dan segera membentuk gelombang dengan 90 % sel mani motil; 5. Gerakan sangat progresif, gelombang sangat cepat bergerak 100 % motil (Toelihere, 1981).

Robert (1971) yang dikutip oleh Toelihere (1981) mengklasifikasikan kelainan morfologik spermatozoa dalam dua kelompok yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer meliputi kepala kecil, kepala besar atau miring, kepala kembar, ekor bercabang, leher besar dan melipat (Partodihardjo, 1992). Sedangkan abnormalitas sekunder meliputi ekor terputus, kepala tanpa ekor, bagian tengah melipat, adanya butiran-butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosoma terlepas (Toelihere, 1981). Spermatozoa yang berbentuk abnormal tidak dapat membuahi ovum, tidak perduli apakah abnormalitas tersebut terjadi di dalam tubuli seminiferi (abnormalitas primer) atau di dalam saluran kelamin jantan dan sewaktu ejakulasi (abnormaltas sekunder). Selama abnormalitas sperma belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi (Toelihere, 1981).

## 2.5 Motilitas

Pada umumnya terdapat korelasi yang cukup baik antara motilitas dan kapasitas fertilisasi (Toelihere, 1981). Motilitas atau pergerakan spermatozoa telah dinyatakan sebagai salah satu variabel yang penting dalam mengevaluasi potensi fertilitas dalam semen. Kategori yang dipakai untuk mengklasifikasikan motilitas spermatozoa adalah; (a). Jika sperma bergerak cepat dan lurus ke depan, (b). Jika sperma bergerak lambat atau sulit maju lurus atau bergerak tidak lurus,

(c). Jika sperma tidak bergerak maju, (d). Jika sperma tidak bergerak. Untuk menghasilkan persentase setiap kategori motilitas, maka dihitung seratus spermatozoa secara berurutan (WHO, 1988). Dari sumber yang sama diperoleh pula bahwa jika sperma dipisahkan dari cairannya, spermatozoa masih mampu motil, laju ini akan meningkat apabila ditambah sejumlah substrat berupa fruktosa, glukosa, monosa, asam laktat, asam piruvat, asam asetat, gliserol dan sorbitol.

Penilaian sperma yang aktif meliputi sperma yang aktif bergerak atau hidup dan penilaian dilakukan pada suhu 37-40°C. Untuk persentase sperma yang aktif tak terlalu harus lebih besar daripada 70% (Hafez, 1987). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa antara lain temperatur, pH, viskositas dan faktor mekanik (misalnya pengocokan, sentrifugasi). Perubahan temperatur ternyata berpengaruh terhadap pergerakan spermatozoa. Pergerakan akan meningkat dari tidak ada atau sedikit gerak pada temperatur 5-10°C dan pergerakan akan meningkat sampai pada temperatur antara 40-44°C. Peningkatan pergerakan spermatozoa akan mendekati garis linier pada temperatur antara 5–35°C (Mitchell, 1976). Penurunan pergerakan spermatozoa baru terjadi pada temperatur lebih dari 37°C karena adanya peningkatan metabolisme spermatozoa sehingga mempercepat habisnya nutrisi yang terdapat dalam medium spermatozoa (Appel dan Evans, 1978).

Perubahan pH dapat menyebabkan hilangnya progresivitas spermatozoa. Kecepatan gerak spermatozoa berbanding terbalik dengan viskositas medium. Bila medium pekat, spermatozoa sukar bergerak dan diperlukan banyak energi untuk

menggerakkan ekor spermatozoa (Mitchell, 1976). Motilitas yang tinggi pasca 'thawing' sangat diperlukan oleh spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina untuk dapat mencapai tempat fertilisasi sesuai waktu yang telah diperhitungkan menjelang waktu ovulasi pada puncak kesuburan sel telur (Natal *et al.*, 1999).

## 2.6 Semen Beku

Semen beku adalah semen yang telah diencerkan dan selanjutnya dibekukan pada suhu tertentu yang bertujuan untuk menghambat aktifitas dan metabolisme spermatozoa. Keuntungan semen beku menurut Toelihere (1981) adalah (a) semen yang berasal dari pejantan unggul dapat dipakai secara efesien sepanjang tahun, (b) dapat mengatasi hambatan waktu dan jarak, (c) memungkinkan perkawinan selektif dengan pejantan unggul untuk wilayah yang luas, (d) biaya pengangkutan relatif murah. Namun masih menurut sumber yang sama kerugian dari semen beku adalah (a) terdapat 10–20% sapi jantan menghasilkan semen yang tidak tahan terhadap pembekuan, (b) harga semen beku yang lebih mahal baik biaya produksi maupun penyimpanannya, (c) selama proses pembekuan terjadi 20 sampai 80% dengan rata-rata 50%, spermatozoa akan mati, (d) apabila kesehatan pejantan tidak dipertahankan maka semen beku akan berpotensi untuk menyebarluaskan penyakit baik viral maupun bakteri serta (e) pemakaian semen beku secara besar-besaran akan membatasi jumlah pejantan yang dipakai dan mungkin mempersempit dasar genetik suatu bangsa tertentu.

Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) bahwa pengawetan semen dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan menyediakan semua ion-ion

esensial, zat makanan, enzim-enzim, koenzim-koenzim dan vitamin serta secara kontinyu membuang sisa metabolisme yang membatasi kehidupan spermatozoa dengan menghambat secara fisik dan kimiawi semua aktifitas sampai tingkat minimal di dalam spermatozoa. Pembekuan semen sebagai metode pengawetan harus memperhatikan keadaan lingkungan spermatozoa yang meliputi suhu, tekanan osmotik, pH, sumber energi, pengawasan bakterial, pengamanan bahan toksik dan penetralan produk-produk metabolisme.

## 2.7 Velositas

Menurut Farley (2002) velositas spermatozoa berguna dalam menduga fertilisas, sehingga variabel ini dapat digunakan sebagai model pada fertilisasi secara *in vitro*. 'Cold shock' dapat menurunkan velositas dan motilitas spermatozoa meskipun secara statistik tidak terdapat korelasi positif antara velositas dengan persentase motil pada spermatozoa (Suttiyotin, 1998). Hasil penelitian Kato (2001) menunjukan bahwa persentase progresivitas dan velositas spermatozoa merupakan parameter yang berguna sebagai indikasi untuk menilai pengaruh gerakan dari spermatozoa. Menurut Gordon (1994) bahwa sel cumulus oophorus yang terdapat disekitar oosit pada manusia dapat merangsang aktivitas kecepatan spermatozoa, namun keberadaan zat toksik akan dapat menghambat aktifitas tersebut. Penilaian fertilitas dapat dilihat dari velositas spermatozoa sehingga model regresi logistik berdasarkan nilai velositas akan sangat berguna dalam menduga tingkat fertilitas (Sloot, 1997). Dari hasil penelitian Holt *et al.* (1989) dalam menilai hubungan kecepatan spermatozoa dengan fertilitas pada

manusia yang dilakukan pada semen beku *in vitro* dikatakan bahwa terdapat korelasi yang baik pada kecepatan spermatozoa setelah diinkubasikan dengan tingkat konsepsi yang diperoleh. Ion-ion potasium, kalsium, sodium dan klorid sangat berpengaruh pada velositas spermatozoa, dimana kalsium dapat meningkatkan velositas dan potasium dapat menurunkan persentase motil spermatozoa (Detweiler dan Thomas, 1998). Pada penelitian yang dilakukan oleh Kamal *et al.* (1994) terlihat peningkatan velositas pada semen yang setelah di 'swim up'.

## 2.8 Tudung Akrosom Utuh

Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluarnya materi genetik dan enzim *hyaluronidase* dari bagian kepala spermatozoa. Asam *hyaluronidase* mempunyai peranan penting untuk melisiskan zona pelucida pada sel telur yang berfungsi pada saat fertilisasi (Garner dan Hafez, 2000).

Spermatozoa mudah mengalami kerusakan selama proses kriopreservasi, sehingga menyebabkan penurunan kualitas (motilitas, daya hidup dan keutuhan tudung akrosom) sesudah 'thawing' dan akhirnya mempengaruhi pula tingkat fertilitasnya (Natal *et al.,* 1999). Spermatozoa yang memiliki persentase hidup tinggi menandakan bahwa membran plasma masih utuh secara fisik, sehingga organel sel spermatozoa akan terlindungi, kebutuhan zat-zat makanan dan ion-ion untuk proses metabolisme tersedia. Tudung akrosom perlu tetap utuh sebelum semen di inseminasikan supaya enzim-enzim seperti hialuronidase, akrosin, CPE

dan sebagainya yang terdapat di dalamnya dapat terbawa dan baru dilepaskan di dalam organ reproduksi betina untuk meleburkan dinding sel telur pada proses pembuahan.

Spermatozoa setelah 'thawing' sangat rentan terhadap kerusakan sebagai akibat adanya perubahan tiba-tiba dalam kondisi osmotik yang diinduksi oleh adanya pengeluaran gliserol yang cepat (Salisbury dan Van Demark, 1985). Persentase tudung akrosom utuh terbaik akan diperoleh bila 'thawing' semen beku dilakukan pada suhu $27^0$C dan $37^0$C selama 30 detik (Natal *et al.*, 1999). Ditambahkan pula bahwa rendahnya persentase motilitas dan tudung akrosom utuh pada 'thawing' dengan suhu tinggi menunjukan bahwa protein yang terdapat dalam semen telah mengalami denaturasi sehingga terjadi perubahan protoplasma yang komplek dan tidak dapat diperbaiki kembali, akibatnya terjadi kematian pada spermatozoa.

Menurut O'Neill *et al.* (1989) 'thawing' menurunkan motilitas spermatzoa dan membran utuh, terdapat 40-60% spermatozoa yang motil namun yang tidak rusak hanya berkisar 20-30%. Kriopreservasi spermatozoa menyebabkan serangkaian hasil merugikan yang ditandai dengan penurunan fertilitas. Diantara perubahan ini kerusakan integritas membran plasma atau tudung akrosom merupakan indikasi kerusakan terbesar dari fungsi yang hilang (Varcarcel *et al.*, 1994).

## 2.9 Metode 'Swim up' atau Migrasi ke atas

Metode 'Swim up' merupakan migrasi spermatozoa motil yang berenang dari lapisan bawah semen ke lapisan atas (Harris *et al.,* 1981). Metode ini merupakan tiruan secara *in vitro* dari migrasi spermatozoa untuk melewati getah serviks uterus secara *in vivo* (Hartamto *et al.,* 1991). Getah serviks itu sendiri diketahui dapat berfungsi untuk menyeleksi spermatozoa motil yang bebas dari plasma semen dan serpihan-serpihan lain yang ada dalam plasma semen misalnya leukosit, epitel atau spermatozoa imotil dan spermatozoa mati (Mahyunis, 1982). Dengan metode 'swim up' plasma semen dapat diganti dengan medium buatan, antara lain medium Tyrode, medium Locke,garam faal, medium Ham`s $F_{10}$, medium Kramer, medium $T_6$ dan lain-lain (Sahir, 1983).

Dari beberapa metode yang telah digunakan, metode 'swim up' merupakan metode yang baik untuk mendapatkan spermatozoa motil yang berkualitas baik untuk kepentingan Inseminasi Buatan atau fertilisasi *in vitro* (Hartamto *et al.,* 1991). Menurut De Quelje *et al.* (1985), bahwa bentuk-bentuk abnormal spermatozoa hasil isolasi lebih sedikit dibandingkan dengan bentuk spermatozoa abnormal pada waktu masih di dalam seminal plasmanya.

Metode 'swim up' dapat menurunkan proporsi kromosom yang menyimpang dan spermatozoa yang tak matang (Jakab *et al.,* 1998). Menurut Correa *et al.* (1997) metode 'swim up' dapat pula digunakan sebagai sarana pemulihan kembali bagi semen setelah 'thawing'. Spermatozoa yang 'swim up' ke media baru menunjukan persentase hidup dari semen (Parrish, 1987).

# BAB III

# MATERI DAN METODE

## 3.1 Materi

Dalam penelitian ini digunakan semen beku sebanyak 36 ministraw yang berasal dari 3 bangsa sapi potong (Simental, Limousin dan Brahman). Dari tiap bangsa digunakan 3 ekor pejantan dengan masing-masingnya diambil 4 ministraw sebagai ulangan. Selanjutnya status semen dianggap seragam sebelum dilakukan pengamatan dengan asumsi bahwa pemberian perlakuan sampai dengan proses pembekuan adalah sama untuk masing-masing bangsa. Seluruh sampel yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran, Semarang.

## 3.2 Alat- alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kamar hitung Neubaeur, 'counter', mikroskop cahaya dan perangkatnya, inkubator, kontainer penyimpan semen dan perangkatnya, tabung reaksi, stop watch, termometer, sterilisator, aluminum foil dan haemositometer.

## 3.3 Bahan-bahan yang digunakan

1. Larutan NaCl fisiologis (NaCl 0,9%)
2. Larutan Kramer (NaCl, KCl, $MgSO_47H_2O$, $NaHCO_3$, $NaH_2PO_4$, Glukosa, Laktase Kalsium, Sodium Piruvat)
3 Semen beku sapi potong

### 3.4 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dan kegiatan-kegiatan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

a. Pembuatan larutan Kramer

Pembuatan medium Kramer mengacu pada teknik pembuatan yang dilakukan oleh Sahir (1983) dengan mencampurkan kedalam 100 ml aquades bahan-bahan NaCl, KC1, $MgS0_4.7H_20$, $NaHC0_3$, $NaH_2PO_4$, glukosa, laktase kalsium dan sodium piruvat dengan komposisi seperti terlihat pada Tabel 2. Senyawa-senyawa tersebut diaduk hingga homogen.

Tabel 2. Komposisi Medium Kramer (Sahir, 1983)

| Zat | Jumlah (mg) |
|---|---|
| NaCl | 684.8 |
| KCl | 40.0 |
| $MgSO_47H_2O$ | 20.0 |
| $NaHCO_3$ | 201.6 |
| $NaH_2PO_4$ | 15.8 |
| Glukosa | 100.0 |
| Laktase Kalsium | 64.0 |
| Sodium Piruvat | 2.0 |

b. Penyimpanan larutan

Larutan Kramer disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu $2^0$- $8^0$C. Sebelum digunakan larutan Kramer diletakan pada suhu kamar.

c. 'Thawing'

Semen beku dalam mini straw di 'thawing' dengan cara memasukan mini straw dalam wadah berisi air pada suhu $37^0$C selama 30 detik.

d. Proses pemisahan spermatozoa motil dengan metode 'Swim up'

Proses pengumpulan spermatozoa motil dilakukan dengan mengadopsi serta memodifikasi (dalam hal ini volume semen disesuaikan kebutuhan) metode yang dilakukan oleh Hartamto *et al.* (1991). Prosedur tersebut dilakukan sebagai berikut; semen yang telah di 'thawing' diletakan pada dasar tabung, selanjutnya dengan hati-hati diteteskan larutan Kramer diatasnya dengan perbandingan 1:1 hingga terlihat jelas perbedaan antar kedua cairan tersebut. Kemudian semen yang telah diberi larutan Kramer diatasnya, diinkubasikan selama 30 menit pada suhu $37^0$C dalam posisi miring dengan tujuan untuk memperluas permukaan sehingga spermatozoa motil yang bermigrasi semakin banyak. Spermatozoa-spermatozoa yang hidup dan motil akan berenang ke atas, lalu setelah mengalami masa inkubasi, diambil bagian atas dari larutan tersebut dengan menggunakan pipet mikro yang steril. Selanjutnya dibawah mikroskop diamati motilitas, kecepatan gerak individu dan keadaan tudung akrosom spermatozoa.

### 3.5 Parameter yang diamati

Dalam penelitian ini beberapa parameter yang akan diamati pada spermatozoa adalah:

1. Motilitas
2. Tudung akrosom utuh
3. Velositas

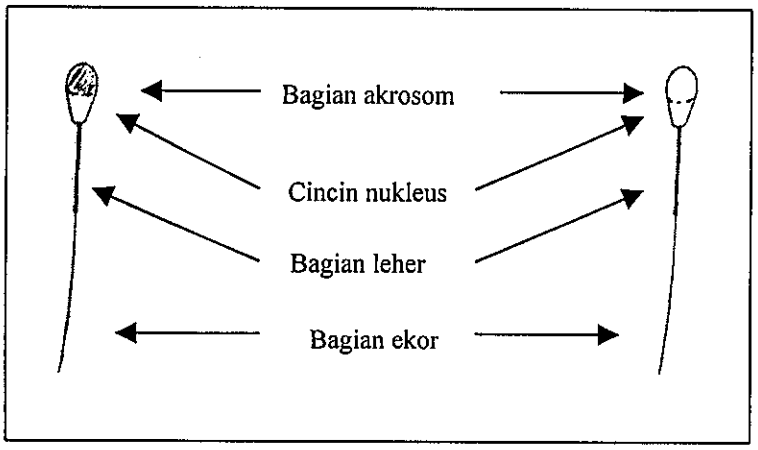
Pengamatan dilakukan sebanyak dua kali, yaitu sesaat setelah 'thawing' dan setelah semen diberikan teknik 'swim up'.

a. Motilitas

Menurut Partodihardjo (1992), perhitungan pergerakan dalam persen dilakukan dengan melihat jumlah spermatozoa yang bergerak ditaksir dan dinyatakan dalam persen dibanding yang tidak bergerak. Perbedaan penaksiran hanya dalam puluhan persen, misalnya 60%,70 dan 80%.

b. Tudung Akrosom Utuh

Pengamatan tudung akrosom dilakukan dengan melihat kesempurnaan kondisi kepala spermatozoa dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Dihitung sekurangnya pada 50 sel spermatozoa.




Ilustrasi 1. Gambar Keutuhan Tudung Akrosom

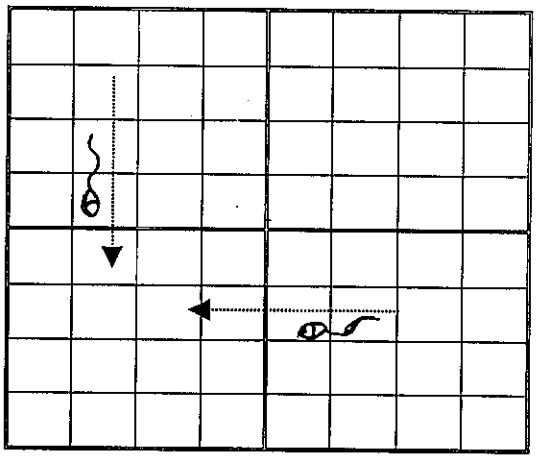
Kesempurnaan tudung akrosom dicermati dengan menggerakan titik fokus pada wilayah pandang dibawah mikroskop untuk memperjelas kondisi tiap tudung kepala spermatozoa. Tudung akrosom dinilai utuh bila terlihat jelas garis pembungkus pada bagian kepala, garis cincin nukleus serta warna yang lebih

gelap pada bagian atas kepala (Ilustrasi 1). Perhitungan tudung akrosom utuh digunakan metode yang digunakan oleh Natal *et al.* (1999)

$$\text{TAU} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa bertudung akrosom utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

c. Velositas

Penghitungan kecepatan dilakukan dengan melihat jarak tempuh spermatozoa pada kamar hitung berbanding dengan waktu yang dibutuhkan. Dilakukan perhitungan sedikitnya pada 25 spermatozoa. Perhitungan hanya dilakukan pada spermatozoa yang bergerak secara sejajar baik secara vertikal maupun horizontal dengan garis pada kamar hitung. Selanjutnya dikonversikan jumlah kotak kecil yang ditempuh dengan besaran tiap kotaknya adalah 0.05 mm. Teknik penghitungan kecepatan spermatozoa ini merupakan modifikasi dari teknik yang digunakan sebelumnya oleh Soeradi (1970). Ilustrasi 2 menggambarkan pengamatan velositas spermatozoa.



Ilustrasi 2. Pengamatan velositas pada kamar hitung Neubauer

Arah panah menunjukan pergerakan spermatozoa baik secara vertikal, maupun horizontal pada bidang wilayah pandang kamar hitung. Rumus yang digunakan dalam menghitung velositas adalah:

$$\text{Velositas} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh pada kamar hitung (mm)}}{\text{Waktu yang dibutuhkan spermatozoa (det)}}$$

### 3.6 Analisa Data

Data diolah secara statistik menggunakan prosedur sidik ragam pada tiap bangsa dengan 'swim up' dan pejantan sebagai faktor, mengikuti model linier sebgai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$ dimana:

Yijk = Hasil pengamatan pada pejantan ke i dengan swim up ke j dan ulangan ke k

$\mu$ = Nilai tangah umum

$\alpha_i$ = Pengaruh pejantan ke-i

$\beta_j$ = Pengaruh swim up ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaksi pejantan dan swim up

$\varepsilon_{ijk}$ = Pengaruh galat

Uji Lanjut digunakan Duncan Multiple Range Test (DMRT) menurut petunjuk Steel dan Torrie (1995).

Tabel 3. Penyajian data

| Pengamatan | Kelompok | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Simental | Limousin | Brahman | Total Bangsa |
| Setelah 'thawing' | Y11. | Y12. | Y13. | Y1.. |
| Setelah 'swim up' | Y21. | Y22. | Y23. | Y2.. |
| Jumlah | Y.1. | Y.2. | Y.3. | Y... |
| Rata-rata | $\bar{Y}$.1. | $\bar{Y}$.2. | $\bar{Y}$.3. | $\bar{Y}$... |

## 3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

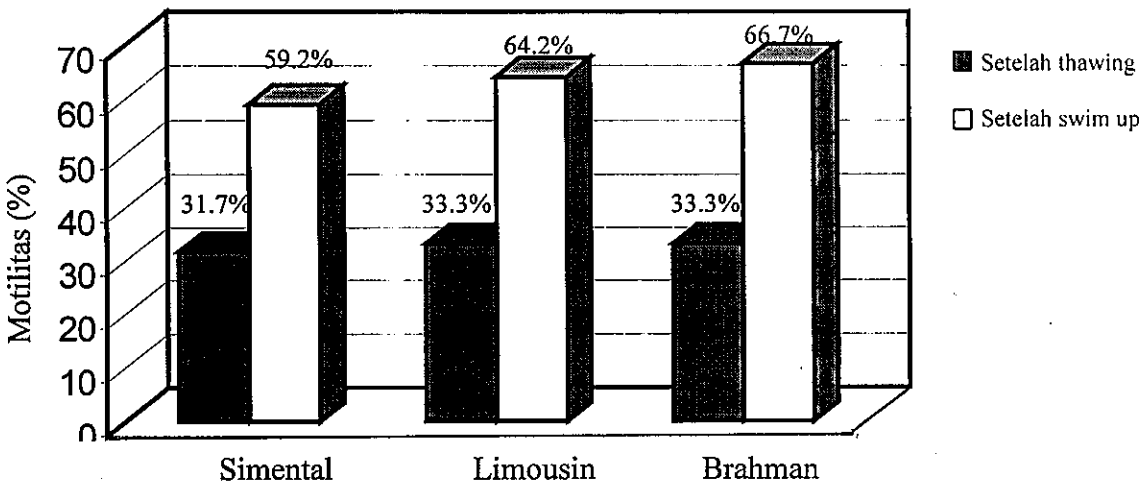
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Pemuliaan dan Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Diponegoro mulai tanggal 20 Desember 2003 sampai dengan 28 Februari 2004.

# BAB IV

# HASIL DAN PEMBAHASAN

## 4.1 Motilitas

Pada pengamatan motilitas yang dilakukan selama penelitian diperoleh rataan motilitas seluruh pejantan dari 3 bangsa Rataan motilitas pasca 'thawing' adalah berkisar antara 27.5-37.5% (Lampiran 1). Rataan tersebut lebih rendah dibandingkan dengan persentase motilitas yang dinilai sesaat setelah penampungan (karena hanya semen dengan motilitas 70% yang selanjutnya digunakan untuk semen beku). Ilustrasi 3 merupakan diagram batang rataan motilitas dari 3 bangsa pejantan yang digunakan pada penelitian ini.




Ilustrasi 3. Diagram Batang Rataan Motilitas dari 3 Bangsa Pejantan

Penurunan motilitas pada semen setelah 'thawing' merupakan akibat dari pengaruh penanganan spermatozoa sejak ditampung sampai dengan 'thawing',

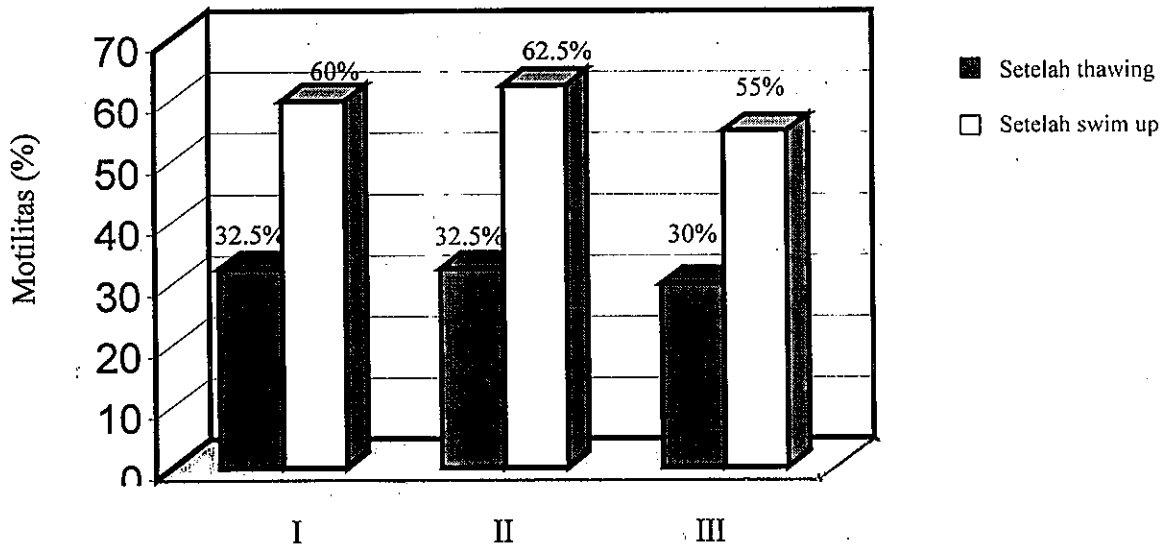
terutama saat proses pembekuan. Perubahan temperatur pada proses pembekuan merupakan tahapan kritis yang berakibat menurunkan persentase motilitas. Menurut Hafez (1987) bahwa perubahan temperatur berpengaruh terhadap pergerakan spermatozoa. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa antara lain temperatur, pH, viskositas dan faktor mekanik (misalnya pengocokan dan sentrifugasi). Ditambahkan oleh Toelihere (1981) bahwa salah satu kerugian dari semen beku adalah terdapat 10–20% sapi jantan menghasilkan semen yang tidak tahan terhadap pembekuan, serta selama proses pembekuan terjadi, 20 sampai 80% dengan rata-rata 50% spermatozoa akan mati.

Pada pengamatan semen setelah dilakukan 'swim up' pada 3 bangsa pejantan yang digunakan dalam penelitian ini, diperoleh rataan sebesar 55-70%. Secara kuantitas motilitas lebih tinggi pada semen setelah di 'swim up'. Kenyataan ini disebabkan karena telah terjadi proses migrasi spermatozoa kedalam larutan 'Kramer' yang berada diatasnya. Dengan memanfaatkan kemampuan progresivitas spermatozoa, maka individu yang memiliki keunggulan tersebut akan bermigrasi kedalam medium baru meninggalkan yang tidak progresif. Disamping itu, ketersedian suplai nutrisi berupa glukosa pada medium 'Kramer' turut berperan dalam mendukung proses metabolisme spermatozoa. Menurut Partodihardjo (1992) semen dapat menggunakan glukosa sebagai sumber energi dengan baik.

### 4.1.1 Motilitas pada Simental

Hasil pengamatan khususnya untuk analisa semen pasca 'thawing' pada pejantan bangsa Simental diperoleh rataan motilitas masing-masingnya adalah:

32,5% untuk pejantan I; 32,5% untuk pejantan II dan 30% untuk pejantan III (Lampiran 1). Setelah dilakukan pemisahan dengan metode 'swim up' pada bangsa Simental diperoleh rataan berturut-turut 60%; 62,5% dan 55% . Ilustrasi 4 menggambarkan diagram batang rataan motilitas dari masing-masing pejantan dari bangsa Simental.



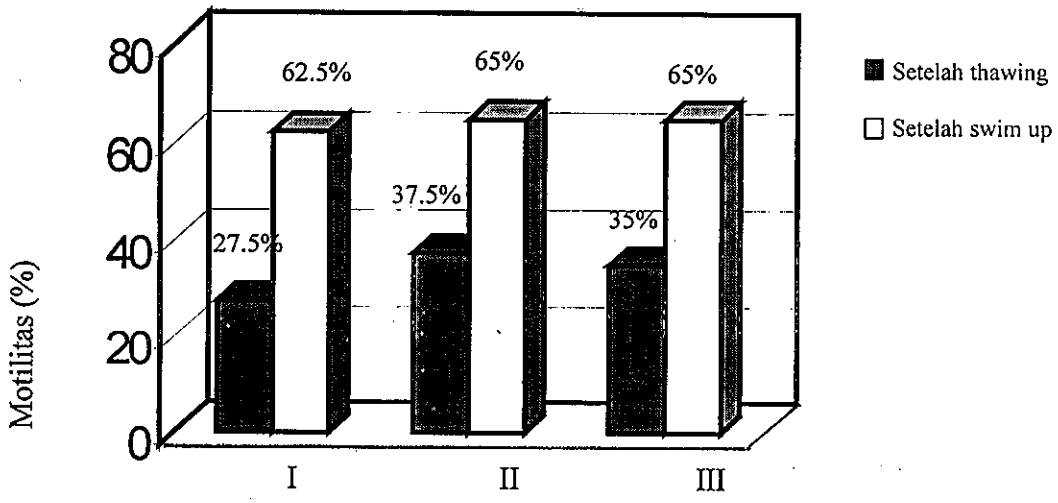

Ilustrasi 4. Diagram Batang Rataan Motilitas Semen Pejantan Simental

Pada analisa ragam nampak bahwa 'swim up' memberi pengaruh sangat nyata ($P<0.01$) terhadap motilitas spermatozoa setelah 'thawing' pada semen pejantan bangsa Simental. Migrasi spermatozoa motil ke dalam media 'Kramer' memberi kontribusi pada tingginya rataan motilitas pada semen setelah 'swim up', disamping stimulus dari pengaruh inkubasi pada suhu $37^0$C selama 30 menit yang turut membantu peningkatan pergerakan spermatozoa. Menurut Mitchell (1976) pergerakan spermatozoa akan meningkat mulai dari tidak ada atau sedikit gerak pada temperatur 5-10°C akan meningkat sampai pada temperatur antara 40-44°C.

Peningkatan pergerakan spermatozoa akan mendekati garis linier pada temperatur antara 5–35°C. Sementara itu tidak terdapat perbedaan nyata pada pengujian antar individu pejantan dari ketiga pejantan Simental yang digunakan.

### 4.1.2 Motilitas pada Limousin

Pengamatan motilitas untuk bangsa Limousin diperoleh rataan setelah 'thawing' sebagai berikut: 27.5% untuk pejantan I; 37.5% pada pejantan II dan 35% pada pejantan III (Lampiran 1). Setelah dilakukan 'swim up' pada bangsa yang sama diperoleh hasil rataan berturut-turut untuk motilitas adalah: 62.5% pada pejantan I; 65% pada pejantan II dan 65% pada pejantan III. Ilustrasi 5 menggambarkan diagram batang rataan motilitas dari masing-masing pejantan dari bangsa Limousin.




Ilustrasi 5. Diagram Batang Rataan Motilitas Spermatozoa Pejantan Bangsa Limousin

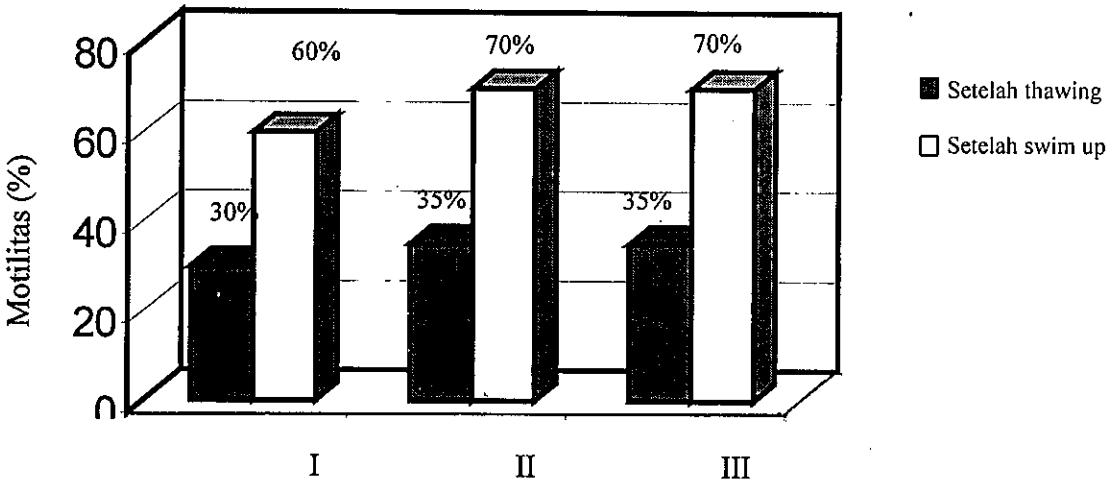
Hasil rataan motilitas pada semen setelah 'swim up' pada bangsa ini menunjukan peningkatan secara persentase dibandingkan sesaat setelah di

'thawing'. Pengaruh viskositas larutan rupanya dapat membantu memulihkan pergerakan spermatozoa setelah bermigrasi dari media sebelumnya. Ditegaskan dari hasil uji statistik bahwa 'swim up' memberi pengaruh sangat nyata ($P<0.01$) terhadap motilitas. Salah satu alasan terjadinya penurunan persentase motil pada semen pasca 'thawing' diduga karena berkurangnya ketersediaan sumber nutrisi yang dapat digunakan dalam proses metabolisme terutama ketersediaan fruktosa yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi oleh spermatozoa. Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) proses metabolisme spermatozoa akan menurun sejalan dengan habisnya fruktosa, sehingga dapat mempengaruhi penurunan motilitas.

Disamping itu, peningkatan persentase motilitas pada semen setelah 'swim up' dikarenakan ketersedian suplai baru nutrisi dalam media 'Kramer' dapat membantu peningkatan aktifitas metabolisme spermatozoa. Menurut WHO (1988) bahwa spermatozoa masih mampu meningkatkan gerakannya bila dipisahkan dari cairannya, laju ini akan meningkat apabila ditambah sejumlah substrat berupa fruktosa, glukosa, monosa, asam laktat, asam piruvat, asam asetat, gliserol dan sorbitol. Faktor lain yang turut mempengaruhi adalah jarak tempuh yang pendek, sehingga memungkinkan spermatozoa yang bergerak lambat pun dapat mencapai medium 'Kramer'. Atas dasar penjelasan tersebut maka secara rataan 'swim up' akan mempertinggi persentase motilitas pada semen pasca 'thawing'. Pada pengamatan antar individu pejantan diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan nyata diantara 3 individu pejantan bangsa Limousin yang digunakan dalam penelitian ini.

### 4.1.3 Motilitas pada Brahman

Pengamatan motilitas pejantan bangsa Brahman diperoleh rataan motilitas setelah 'thawing' sebagai berikut: 30% pada pejantan I; 35% pada pejantan II dan 35% pada pejantan III (Lampiran 1.). Setelah dilakukan 'swim up' diperoleh rataan persentase motilitas berturut-turut 60% pada pejantan I; 70% pada pejantan II dan 70% pada pejantan III. Analisa statistik pada bangsa Brahman menunjukan pula bahwa 'swim up' memberikan pengaruh yang sangat nyata (P<0.01) terhadap motilitas, meskipun tidak terdapat perbedaan nyata pada 3 individu pejantan yang digunakan dalam penelitian ini. Ilustrasi 6 menggambarkan diagram batang rataan motilitas dari masing-masing pejantan dari bangsa Brahman.




Ilustrasi 6. Diagram Batang Rataan Motilitas Spermatozoa Pejantan Bangsa Brahman

Dari hasil pengamatan yang dilakukan pada ketiga bangsa yang diamati, menunjukan bahwa 'swim up' memberi pengaruh sangat nyata (P<0.01) dalam mempertinggi motilitas spermatozoa. Fertilisasi *in vitro* sangat memerlukan

spermatozoa dengan motilitas yang tinggi, hal ini dapat dilakukan dengan berbagai cara dalam mengisolasi spermatozoa motil ('swim up', percoll density, dsb) sedangkan sejumlah bahan kimia yang ditambahkan dapat merangsang atau bahkan meningkatkan motilitas pada spermatozoa sapi (Gordon, 1994). Migrasi spermatozoa dengan meninggalkan media plasmanya serta masuk kedalam medium baru memungkinkan aktifitas metabolisme meningkat, dikarenakan substitusi penggunaan fruktosa dengan glukosa yang tersedia pada medium 'Kramer' dapat digunakan sebagai sumber energi baru di dalam aktifitas metabolisme. Adapun rendahnya persentase motil pada semen setelah 'thawing' menurut Gordon (1994) dikarenakan teknik pembekuan yang ada sekarang ini dan dilakukan oleh pabrik pembuat semen beku hanya mampu mempertahankan spermatozoa hidup berkisar 50%.

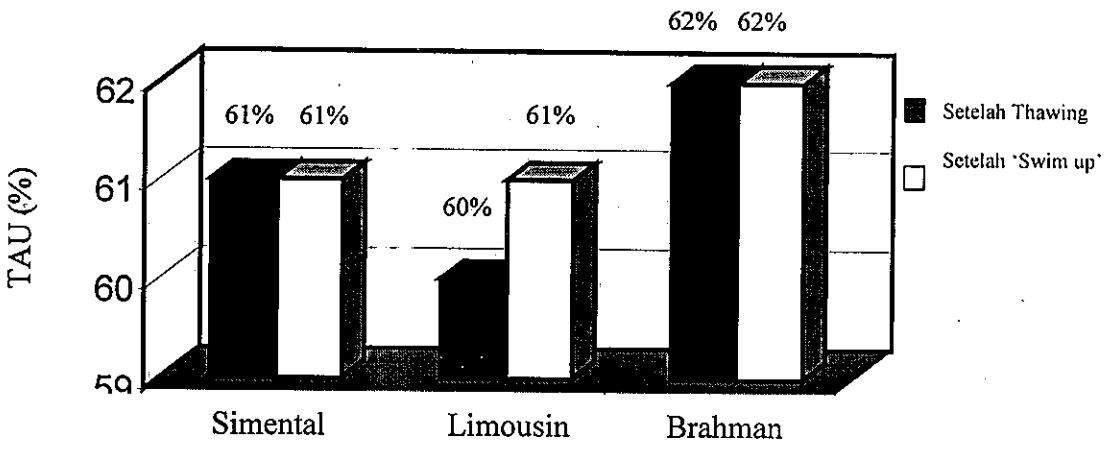
Pada saat semen dibekukan terjadi proses metabolisme yang terus berlangsung di dalam suasana anaerob sampai dengan saat penyimpanan didalam $N_2$ cair. Suasana anaerob menyebabkan produk akhir metabolisme berupa asam laktat tidak dapat teroksidasi sehingga terjadi akumulasi atau penumpukan asam laktat yang berakibat pH medium menurun. Keadaan ini mengakibatkan lingkungan yang tidak mendukung bagi spermatozoa. Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) bahwa pada banyak penelitian spermatozoa sapi yang didinginkan dibawah suhu tubuh menunjukan motilitas menurun dan berhenti sama sekali pada temperatur beberapa derajat diatas titik beku, namun metabolisme tetap berlangsung meski secara perlahan-lahan.

Kondisi demikian tidak terjadi pada semen setelah di 'swim up', hal ini disebabkan oleh lingkungan spermatozoa yang aerob sehingga tidak terjadi penumpukan asam laktat pada akhir metabolisme karena proses oksidasi berjalan normal, demikian pula pH medium tidak mengalami penurunan. Kenyataan ini didukung oleh Salisbury dan Van Demark (1985) yang mengatakan bahwa di lingkungan aerob, beberapa substansi termasuk asam laktat dapat dioksidasi oleh spermatozoa dengan hasil akhir sebagai $CO_2$ dan air. Proses tersebut memiliki efisiensi 19 kali produksi energi dalam ikatan fosfat yang berasal dari bentuk fruktosa secara glikolisis.

**4.2. Tudung Akrosom Utuh (TAU)**

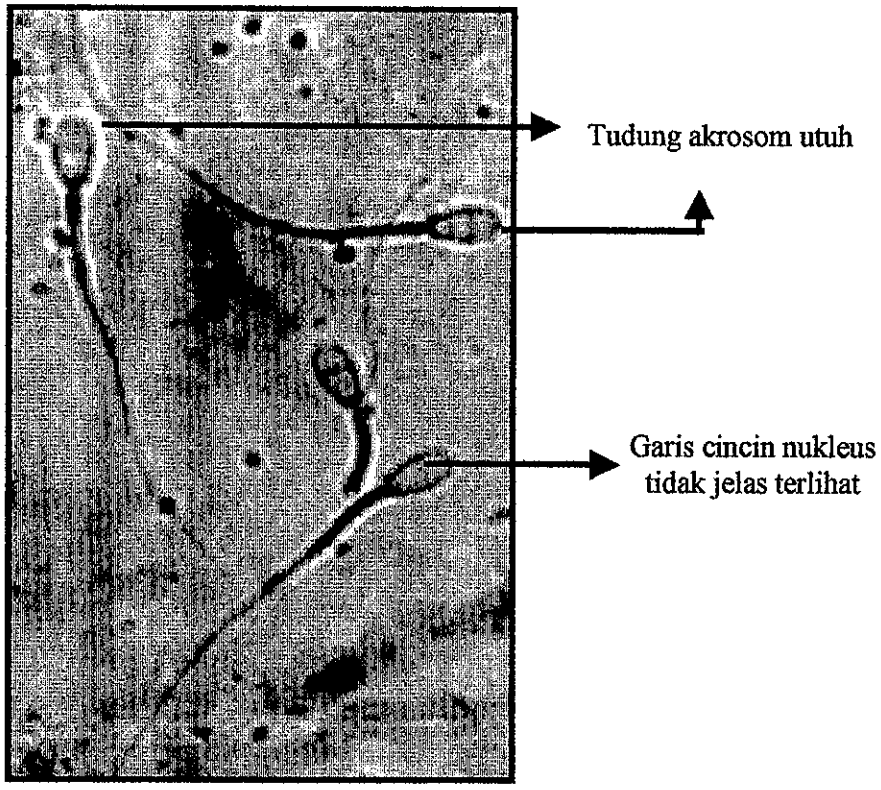
Pada pengamatan TAU yang dilakukan selama penelitian diperoleh rataan TAU seluruh pejantan dari 3 bangsa Rataan TAU pasca 'thawing' adalah berkisar antara 58–63% (Lampiran 2). Hasil analisis statistik menunjukan bahwa 'swim up' dan individu pejantan tidak memberikan pengaruh nyata pada keutuhan tudung akrosom. Angka rataan yang cenderung sama saat 'thawing' dan sesudah 'swim up' disebabkan karena spermatozoa yang memiliki kemampuan progresif akan tetap memanfaatkan sifatnya untuk dapat bermigrasi kemedium 'Kramer', tanpa mengkhawatirkan utuh tidaknya kondisi tudung akrosom. Dilain pihak metode 'swim up' merupakan salah satu cara dalam pengumpulan spermatozoa motil dengan memanfaatkan gerak progresif dari spermatozoa, dimana pergerakan individu sangat tergantung dari ayunan pada bagian ekor. Gerak maju spermatozoa disebabkan ayunan pada bagian ekor (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Atas dasar pendapat tersebut maka besaran rataan keutuhan tudung akrosom yang diperoleh setelah 'thawing' akan sangat mungkin dapat merefleksikan pula persentase keutuhan tudung akrosom pada semen setelah 'swim up'. Sehingga sangat beralasan bila persentase keutuhan tudung akrosom yang diperoleh setelah 'thawing' tidak berbeda jauh dengan keutuhan tudung akrosom pada semen 'swim up'. Ilustrasi 7 merupakan diargam batang dari keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada 3 bangsa pejantan yang diamati dalam penelitian ini




Ilustrasi 7. Diagram Batang Rataan Tudung Akrosom Utuh dari 3 Bangsa Pejantan Sapi Potong

Secara kuantitas persentase keutuhan tudung akrosom saat 'thawing' maupun setelah 'swim up' pada penelitian ini masih dalam kriteria layak (58–63%) untuk dapat digunakan dalam fertilisasi baik *in vitro* maupun untuk kepentingan inseminasi buatan untuk beberapa kasus tertentu. Menurut Chan (1996) keutuhan tudung akrosom mencapai 40% memungkinkan terjadinya kegagalan dalam fertilisasi. Ilustrasi 8 merupakan hasil pengamatan keutuhan tudung akrosom yang diperoleh saat penelitian.




Ilustrasi 8. Pengamatan Tudung Akrosom Utuh

Fokus kajian atau pokok bahasan yang lebih mendalam tentang keutuhan tudung akosom tentunya sangat dibutuhkan serta lebih diarahkan terutama pada upaya memperkecil terjadinya kerusakan tudung akrosom khususnya saat proses pembekuan. Menurut Natal *et al.* (1999) spermatozoa mudah mengalami kerusakan selama proses kriopreservasi, sehingga menyebabkan penurunan kualitas (motilitas, daya hidup dan keutuhan tudung akrosom) sesudah 'thawing' dan akhirnya mempengaruhi pula tingkat fertilitasnya. Tudung akrosom perlu tetap utuh sebelum semen diinseminasikan supaya enzim-enzim seperti hialuronidase, akrosin dan lain sebagainya yang terdapat di dalamnya dapat

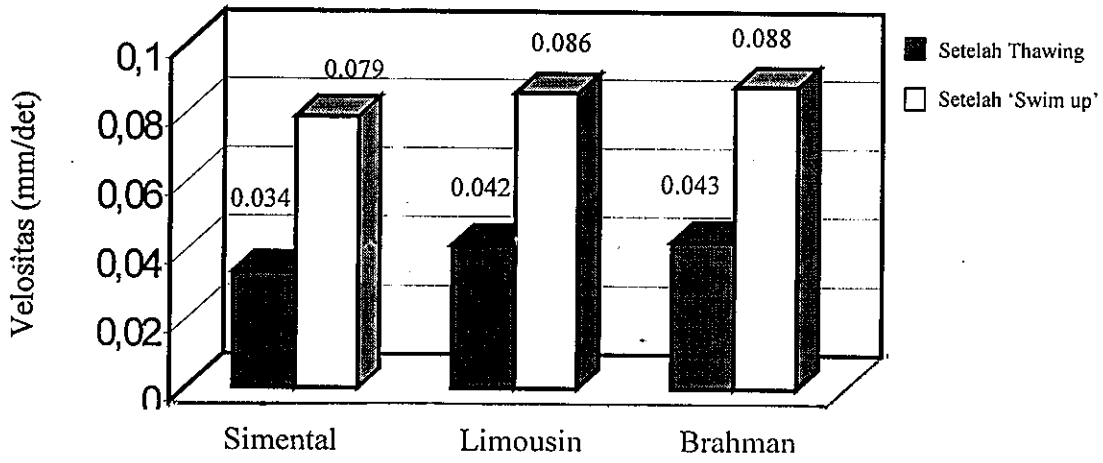
terbawa dan baru dilepaskan di dalam organ reproduksi betina untuk meleburkan dinding sel telur pada proses pembuahan. Selanjutnya dijelaskan pula bahwa rendahnya persentase motilitas dan tudung akrosom utuh pada semen pasca 'thawing' menunjukan bahwa protein yang terdapat dalam semen telah mengalami denaturasi sehingga terjadi perubahan protoplasma yang komplek dan tidak dapat diperbaiki kembali, akibatnya terjadi kematian pada spermatozoa.

Dari sebuah hasil penelitian analisis semen setelah 'thawing' pada semen yang diencerkan, diperoleh kenyataan sebagai berikut: pengaruh pengencer semen kemungkinan dapat merugikan spermatozoa dikarenakan terjadinya kerusakan membran sel spermatozoa dan terjadi kebocoran sehingga zat-zat vital keluar melalui membran sel, namun hal tersebut dapat dicegah dengan penambahan albumin (Makler dan Jakobi, 1981). Pemeriksaan morfologi pasca 'thawing' menunjukan bahwa spermatozoa mengalami kerusakan pada bagian leher. Ada juga spermatozoa yang ekornya putus, sebagian terputus dari bagian tengah ekor, membran plasma sobek dan sebagian terlepas, kepala membengkak, membran akrosom rusak dan lepas atau bahkan bagian akrosom lepas dari bagian ujung anterior kepala spermatozoa (Reviani *et al.*, 1998).

Kriopreservasi spermatozoa menyebabkan serangkaian hasil yang merugikan ditandai dengan penurunan fertilitasnya. Diantara perubahan ini kerusakan membran plasma atau tudung akrosom merupakan indikasi kerusakan terbesar dari fungsi yang hilang (Varcarcel *et al.*, 1994). Berdasarkan hasil uji statistik serta uraian pembahasan diatas, nampak 'swim up' dapat mempertahankan serta tidak memberikan pengaruh negatif bagi kondisi keutuhan tudung akrosom spermatozoa dari tiap-tiap pejantan pada 3 bangsa yang digunakan.

## 4.3 Velositas

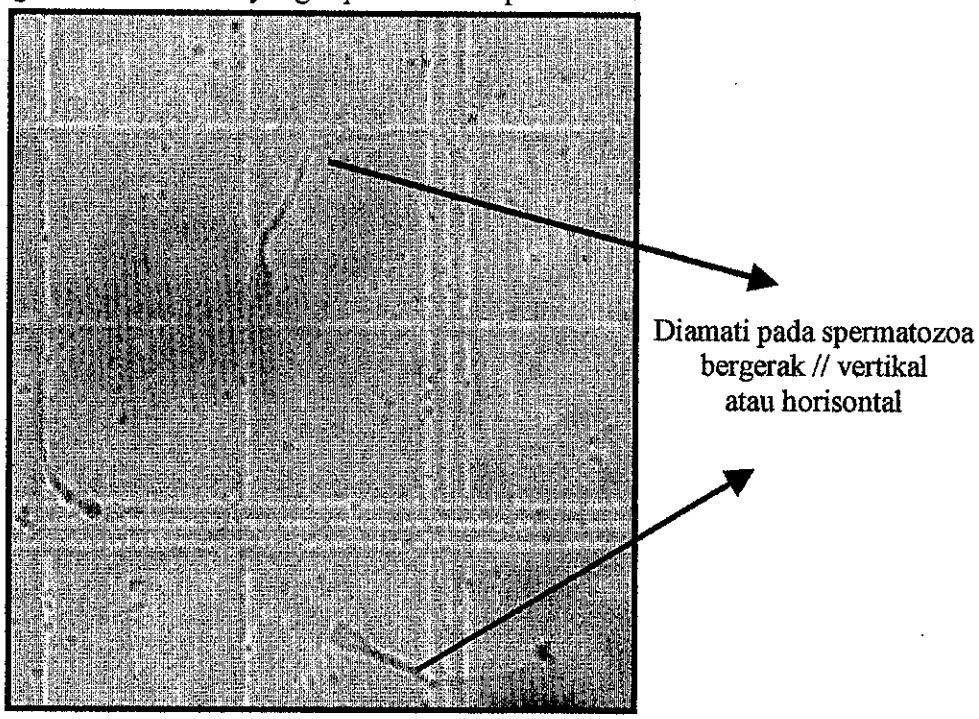
Pada pengamatan velositas yang dilakukan selama penelitian diperoleh rataan velositas seluruh pejantan dari 3 bangsa Rataan motilitas pasca 'thawing' adalah berkisar antara 0.031-0.046 mm/det (Lampiran 3). Ilustrasi 9 merupakan diagram batang rataan velositas dari 3 bangsa pejantan yang digunakan dalam penelitian.




Ilustrasi 9. Diagram Batang Rataan Velositas Spermatozoa dari 3 Bangsa Pejantan Sapi Potong

Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) kecepatan rata-rata spermatozoa pada suhu 37$^0$C adalah 5.82 ± 0.36 mm/menit serta bervariasi sesuai perubahan suhu dengan optimum 41-43$^0$C. Bila dikonversikan kedalam satuan mm/det maka akan diperoleh kecepatan spermatozoa yang dimaksud adalah 0.097 mm/det. Bila data tersebut dibandingkan dengan rataan hasil penelitian maka tampak rataan velositas setelah 'thawing' lebih rendah. Ada beberapa kemungkinan yang dapat dijelaskan berkaitan dengan rataan besaran kecepatan spermatozoa yang diperoleh pasca 'thawing' antara lain: pertama adalah faktor

penyimpanan dibawah titik beku sangat berpengaruh terhadap aktifitas maupun gerakan spermatozoa sebagai akibat dari proses metabolisme dan penurunan pH berupa melemahnya gerakan spermatozoa; faktor kedua adalah pengaruh viskositas (kepekatan) medium. Ilustrasi 10 dibawah ini merupakan hasil pengamatan velositas yang diperoleh saat penelitian.




Ilustrasi 10. Pengamatan Velositas Spermatozoa

### 4.3.1 Velositas pada Simental

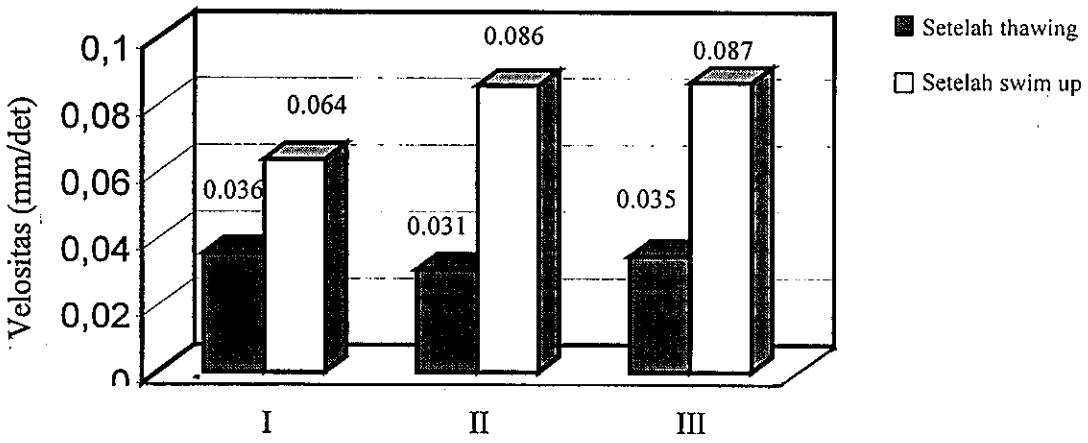
Rataan velositas (kecepatan) spermatozoa yang diamati pada bangsa Simental setalah 'thawing' diperoleh sebagai berikut: 0.036 mm/det pada pejantan I; 0.031 mm/det pejantan II dan 0.035 mm/det pada pejantan III (Lampiran 3). Kecepatan rata-rata spermatozoa pada domba dalam tabung kimia yang berjarak

ekuivalen dengan yang ditempuh oleh spermatozoa sepanjang saluruan reproduksi betina adalah 4.83 mm/menit (Salisbury dan Van Demark, 1985). Bila besaran ini dikonversikan kedalam satuan mm/detik dengan maksud menyamakan satuan pengukuran dengan besaran yang diperoleh dalam penelitian maka akan didapatkan kecepatan sebesar 0.081 mm/det.

Meskipun kenyataan tersebut tidak dapat dijadikan acuan dalam membandingkan kecepatan spermatozoa dari 2 bangsa hewan yang berbeda, namun kondisi tesebut dapat dijadikan sebagai bahan analisa dalam menilai kecepatan spermatozoa khususnya pada pasca 'thawing'. Kemungkinan yang dapat dijelaskan berkaitan dengan rataan besaran kecepatan spermatozoa yang diperoleh pasca 'thawing' pada bangsa Simental, antara lain: pertama adalah faktor penyimpanan dibawah titik beku sangat berpengaruh terhadap aktifitas maupun gerakan spermatozoa sebagai akibat dari proses metabolisme dan penurunan pH berupa melemahnya gerakan spermatozoa; faktor kedua adalah pengaruh viskositas (kepekatan) medium.

Hasil rataan kecepatan spermatozoa pada pejantan yang sama setelah 'swim up' diperoleh sebagai berikut: 0.064 mm/det pada pejantan I; 0.086 mm/det pada pejantan II dan 0.087 mm/det pada pejantan III (Lampiran 3). Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) kecepatan rata-rata spermatozoa pada suhu $37^0$C adalah 5.82 ± 0.36 mm/menit serta bervariasi sesuai perubahan suhu dengan optimum 41-$43^0$C. Bila dikonversikan kedalam satuan mm/det maka akan diperoleh kecepatan spermatozoa yang dimaksud adalah 0.097 mm/det. Sehingga dapat dikatakan bahwa rataan velositas yang diperoleh dalam penelitian ini tidak

terlalu banyak berbeda dengan yang diperoleh peneliti-peneliti terdahulu. Ilustrasi 11 merupakan diagram batang dari rataan velositas spermatozoa pada bangsa Simental.




Ilustrasi 11. Diagram Batang Rataan Velositas Spermatozoa Pejantan Bangsa Simental

Hasil penelitian memperlihatkan kecepatan spermatozoa setelah 'swim up' meningkat secara tajam. Hal ini disebabkan karena viskositas medium 'Kramer' lebih rendah dibandingkan dengan medium semen yang terdapat pada pengencer semen. Diketahui bahwa kecepatan spermatozoa menjadi lambat akibat kehabisan tenaga atau karena unsur gliserol yang dicampurkan dalam bahan pengencer atau substansi lain yang menyebabkan naiknya viskositas (Salisbury dan Van Demark, 1985).

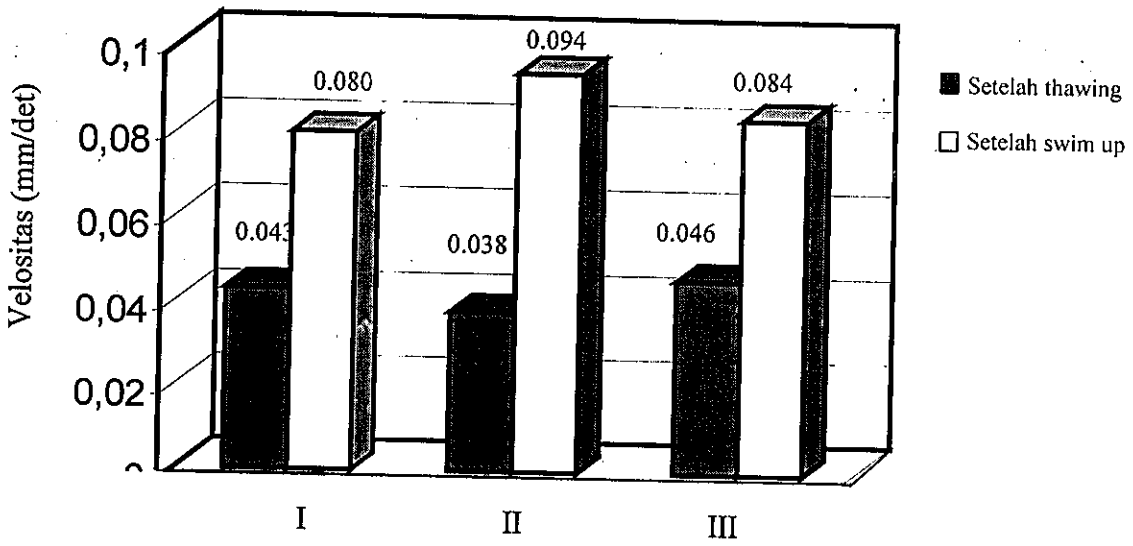
Berdasarkan analisa ragam diketahui bahwa 'swim up' berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap velositas spermatozoa. Viskositas ternyata merupakan faktor utama yang dapat menjelaskan hal tersebut disamping tentunya adanya stimulus dari pengaruh suhu saat diinkubasi serta kandungan ion-ion didalam

larutan 'Kramer'. Penelitian Holt *et al.* (1989) melaporkan bahwa dalam menilai hubungan kecepatan spermatozoa manusia pada semen beku dengan fertilitasi *in vitro*, terdapat korelasi yang baik terhadap kecepatan spermatozoa setelah diinkubasikan dengan tingkat konsepsi yang diperoleh. Ion-ion potasium, kalsium, sodium dan klorid sangat berpengaruh pada velositas spermatozoa, dimana kalsium dapat meningkatkan velositas dan potasium dapat menurunkan persentase motil spermatozoa (Thomas dan Detweller, 1998). Hasil uji statistik pada pejantan bangsa Simental menunjukan bahwa individu pejantan tidak memberi pengaruh pada velositas spermatozoa.

### 4.3.2 Velositas pada bangsa Limousin

Pada pengamatan velositas pasca 'thawing' bangsa Limousin diperoleh hasil rataan: 0.043 mm/det untuk pejantan I; 0.038 mm/det pada pejantan II dan 0.046 mm/det pada pejantan III (Lampiran 3). Setelah dilakukan 'swim up' diperoleh rataan velositas adalah: 0.08 mm/det pada pejantan I; 0.094 mm/det pejantan II; dan 0.084 mm/det pada pejantan III (lampiran 3).

Terlihat pada Ilustrasi 12 bahwa nilai rataan velositas setelah 'swim up' meningkat dibandingkan pasca 'thawing', hal ini merupakan penjelasan dari rendahnya viskosikas media 'Kramer' serta pemberian peningkatan suhu menjadi $37^0$C selama 30 menit pada masa inkubasi. Hasil ini diperkuat dengan hasil uji statistik yang menunjukan 'swim up' berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap velositas spermatozoa.



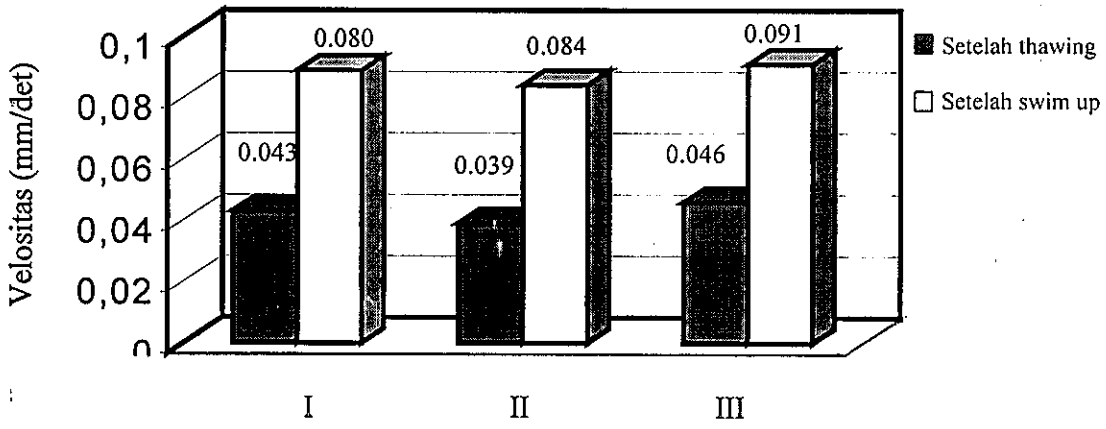

Ilustrasi 12. Diagram Batang Velositas Spermatozoa Pejantan Bangsa Limousin

Menurut Soeradi (1970) kecepatan normal spermatozoa didefinisikan sebagai kecepatan gerak yang dimiliki spermatozoa untuk menempuh jarak sepanjang 0.05 mm dalam waktu 0.7–1.2 detik. Bertolak dari pendapat tersebut dapat diketahui bahwa kecepatan spermatozoa normal adalah 0.05 mm berbanding 0.7 (bila diambil waktu tercepat, sehingga rataan kecepatan spermatozoa normal yang dimaksudnya adalah 0.071 mm/det.

Besaran tersebut tidak terlalu jauh dari hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, bahkan rataan yang diperoleh setelah 'swim up' pada penelitian ini menunjukan angka yang lebih baik. Velositas akan meningkat pada semen setelah di 'swim up' (Kamal *et al.*, 1994). Hasil uji lanjut antar pejantan menunjukan bahwa rataan velositas dari ketiga pejantan bangsa Limousin tersebut tidak menunjukan perbedaan nyata.

### 4.3.3 Velositas pada Brahman

Pada pengamatan velositas spermatozoa pejantan bangsa Brahman saat 'thawing' berturut-turut adalah: 0.043 mm/det untuk pejantan I; 0.039 untuk pejantan II mm/det dan 0.046 untuk pejantan III mm/det (Lampiran 3). Sementara itu setelah dilakukan 'swim up' diperoleh rataan velositas: 0.089 mm/det untuk pejantan I; 0.084 mm/det untuk pejantan II dan 0.091 mm/det untuk pejantan III. Ilustrasi 13 merupakan diagram batang dari rataan velositas spermatozoa pada 3 individu pejantan bangsa Brahman.




Ilustrasi 13. Diagram Batang Velositas Spermatozoa Pejantan Bangsa Brahman

Berdasarkan analisa ragam diketahui bahwa 'swim up' berpengaruh sangat nyata ($P<0.01$) terhadap velositas spermatozoa. Pada uji statistik antar individu diketahui pula bahwa 3 pejantan yang digunakan berbeda nyata ($P<0.05$) satu dengan yang lain. Hal ini sangat dimungkinkan karena kondisi umur spermatozoa pada pejantan III lebih muda dibandingkan 2 pejantan lainnya. Demikian pula yang terjadi pada pejantan I yang lebih muda

dibandingkan dengan pejantan II (terhitung saat semen ditampung sampai dengan saat 'thawing'). Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) bahwa kecepatan spermatozoa akan menurun bila umur semakin tua disamping faktor lainnya yaitu viskositas bahan pengencer tinggi dan konsentrasi spermatozoa tinggi.

# BAB V

# KESIMPULAN DAN SARAN

## Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan dengan metode 'swim up' dapat memperoleh spermatozoa motil yang lebih banyak, meningkatkan velositas serta dapat mempertahankan dan tidak mempengaruhi kondisi keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada semen beku sapi potong.

## Saran

Beberapa saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Untuk mendapatkan spermatozoa dengan motilitas tinggi dapat digunakan metode 'Swim up'
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengamati performans dari spermatozoa yang berada pada bagian dasar setelah pemisahan dengan metode 'swim up'
3. Perlu pengamatan tekanan osmotik khususnya pada pengencer semen dan medium yang digunakan sebagai larutan pada metode 'Swim up'
4. Perlu diamati persentase keutuhan tudung akrosom sesaat setelah penampungan, sehingga dapat diketahui serta dikaji penyebab penurunan kuutuhan tudung akrosom spermatozoa dengan lebih komprehensif
5. Perlu penelitian lanjutan misalnya dengan pemisahan kromosom X dan Y pada semen pasca 'swim up' yang akan sangat berguna dalam aplikasi teknologi reproduksi *in vitro*.

## DAFTAR PUSTAKA


Appell R.A and P.B Evan. 1978. The effect of temperature on sperm motility and viability. Fertil.Steril. **28**: 1239 – 1332.

Chan S.Y.W. 1989. Evaluation of computerized analysis of sperm movement characteristics and differential sperm tail swelling pattern in predicting human sperm *In vitro* fertilization capacity. **24**: 133-138 (internet)

Correa and Panayotan. 1997.Quantitative and qualitative characteristics of frozen thawed bovine spermatozoa recovered via a conventional and standardized swim up technique. Tohoku J.Exp.Med.**181** (2). (internet)

De Quelje, E., Hinting dan Adimoelja.1985. Karakteristik spermatozoa hasil isolasi spermatozoa motil dengan cara migrasi keatas.Medika **11** (1). FKUI. Jakarta.

Detweiler C and P. Thomas. 1998. Role of ion channels in the regulation of atlantic croacer sperm motility. J. Exp. Zoo **281**: 139-148. (internet)

Evans, G and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, London. (internet)

Farley. 2002. Helical nature of sperm swimming affects the fit of fertilization kinetics models to empiric data. Marine Biological Laboratory, The Florida State University. (internet)

Garner, D.L and E.S.E Hafez. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. reproduction in farm animals. 7th, 96-109. Lippincott Williams And Wilkins, USA.

Gordon. I 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos Biotechnology in Agriculture Series. University Press, Cambridge.

Hafez. E.S.E. 1987. Reproduction in Farm Animal. 5th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.

Hartamto, H.1988. Beberapa cara isolasi spermatozoa motil dengan metode swim up. Medika **14** (12). FKUI. Jakarta

Holt WV, F. Shenfield, T. Leonard, TD. Hartman and HD. Moore. 1989. The value of sperm swimming speed measurements in assessing the fertility of human fozen semen. Human Reproduction Vol **4**: 292-297. Institute of Zoology, Zoological Society of London. UK. (internet)

Jakab, Kovacs, Zaavaczki, Borsos. Efficacy of the swim up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. 1 Maret 2004 (internet)

Kamal. A, Jourodi, MD, Hamilto. C. Ulla.V and Siek, MD.1994. Predictive power of sperm motion analysis in *In vitro* fertilization. (internet)

Kato. M, Fukunishi K, Ikegawa S and Higuchi H, 2001. Overviw of studies on rat sperm motion analysis using a hamilton-thorne sperm-collaborative working study, J. Tox. Sci **26**: 285.

Mahyunis. 1982. Pengaruh Pencucian dengan Larutan Hanks dan Garam Faal terhadap Viabilitas Spermatozoa. Universitas Nasional Indonesia, Jakarta.

Makler.A and Jacobi.P. 1981. Effect of shaking and centrifugation on human sperm motility. J.Arch Andral 7: 21-26. (internet)

Mitchell J.A, Nelson L and Hafez, E.S.E. 1976. Motility of spermatozoa in human semen and fertilization in men. Page 85. Saint Louis, United States of America.

Natal.S, Tambing, Toelihere, Tuty Y dan Ketut. 1999. Motilitas, Daya hidup dan tudung akrosom utuh semen kambing peranakan etawah pada berbagai suhu thawing. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Jakarta

O'Neill. D.J, J.P Hanrahan and M.P Boland. 1989. The effect of different freezing curves on the viability, mitochondrial activity and acrosome integrity of ram spermatozoa. (internet)

Parrish JJ. 1987. Quantification of bovine sperm separation by aswim up method. J. Andr Vol 8 Issue 4: 259-266. (internet)

Partodihardjo.S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widia. Jakarta.

Reviani .W, Iman. S, Damiana .R dan Nia.N. 1998. Efektifitas krioprotektan dan evaluasi mutu spermatozoa hasil kriopreservasi sebagai kontribusi potensial preservasi genetika ayam hutan hijau yang ditangkarkan. Fisiologi dan Farmakologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Sahir, E. 1983. Pengaruh pencucian dengan beberapa media buatan terhadap kecepatan gerak dan viabilitas sperma. Tesis. Fakultas Pasca Sarjana Universirtas Indonesia, Jakarta.

Salisbury G.W dan Vandemark N.L. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gajah Mada University Press. Diterjemahkan oleh R. Djanuar.

Sloot.V.C. Jeffay, J. Dyer, R.R Barbee and D. Perreault.1997. Sperm motion predict fertility in male hamsters treated with alpha chlorohydrin. J. And Vol **18** Issue (6). University of North Carolina, USA. (internet)

Soeradi.O. 1970. Analisa Semen. Dalam: Keluarga Berencana, Integrasi Pendidikan Tingkat VI FKUI, hal: 77-82. Jakarta.

Steel. R.G.D dan J.H Torrie.1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. PT.Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. (Diterjemahkan oleh Bambang Sumantri).

Suttiyotin. 1998. Development of a simple, objective swim up technique for measurement of sperm motility and velocity. Research on Prince of Songkla University, Thailand. (internet)

Toelihere. 1981. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.

Toelihere. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.

Varcacel, A, M.A. De Las Heras, L. Peres, D.F. Mosos and H. Baldassarre. 1994. fluorescent staining asaa method of assesing membarane demage and post thaw survival of ram spermatozoa. Theriogenology **41**: 483-489. (internet)

World Health Organization.1987.WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge.