

B/FKH
2001
0132

**KAJI BANDING KUALITAS DAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA
SEMEN BEKU SAPI PADA SETIAP TAHAP JALUR DISTRIBUSI**

SKRIPSI

Oleh :
ANANG SETIAWAN ACHMADI
B01497113



FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001

**KAJI BANDING KUALITAS DAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA
SEMEN BEKU SAPI PADA SETIAP TAHAP JALUR DISTRIBUSI**

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Pada Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor

Oleh :
ANANG SETIAWAN ACHMADI
B01497113



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

**Sesungguhnya.....
sesudah kesukaran itu ada kemudahan.
(QS. Alam Nasyroh : 6)**

**Bagi orang yang berakal,
Ilmu bak samudera
Yang tak bertepi dan berujung
Ilmu bagai air samudera
Diminum makin haus
(Esdy)**

**...Katakanlah, " Samakah orang-orang yang
mengetahui dengan orang-orang yang tidak
mengetahui ?
Sesungguhnya orang yang berakallah yang
dapat menerima pelajaran.
(QS. Az Zumar : 9)**

**Skripsi ini kupersembahkan kepada
Bapak, Ibu, Kakak dan Adikku tercinta
yang telah memberikan segalanya...
dan kepada sahabat sekaligus kekasihku
Tersayang...**

Judul Skripsi : Kaji Banding Kualitas dan Keutuhan Membran Plasma
Semen Beku Sapi Pada Setiap Tahap Jalur Distribusi

Nama : Anang Setiawan Achmadi

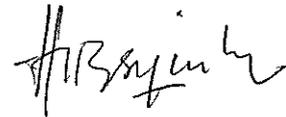
NRP : B01497113

Telah diperiksa dan disetujui oleh :



Dr. drh. Iman Supriatna

Pembimbing I



Drh. Irpansyah Batubara

Pembimbing II

Mengetahui,



Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan
Pembantu Dekan I

Tanggal : 11 Februari 2002

RINGKASAN

Anang S. Achmadi. Kaji Banding Kualitas dan Keutuhan Membran Plasma Semen Beku Sapi Pada Tiap Tahap Jalur Distribusi.

(di bawah bimbingan Dr. drh. Iman Supriatna dan Drh. Irpansyah Batubara)

Peningkatan program IB terus dilakukan dalam usaha meningkatkan produksi hasil ternak. Salah satu cara untuk meningkatkannya adalah dengan perbaikan kualitas semen beku yang akan diinseminasikan ke sapi. Perbaikan kualitas semen dapat dilakukan pada saat proses pembuatan semen beku di balai, seperti di BIB Lembang dan BIB Singosari. Di samping itu perlu dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui bahwa kualitas semen yang diproduksi dan didistribusikan. Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan standar (pemeriksaan warna, volume, konsentrasi, motilitas, dan lainnya). Pemeriksaan yang lain ialah pemeriksaan integritas membran plasma, dalam hal ini dilakukan dengan metode *hypoosmotic swelling test (HOS test)*. Hypoosmotic swelling test ini disebut-sebut sebagai metode rutin dalam pemeriksaan fertilitas spermatozoa manusia (Jeyendran dan Zaneveld, 1986). Metode ini mudah dilakukan, lebih murah dan praktis dibandingkan metode-metode penentuan fertilitas spermatozoa sebelumnya. Metode ini semakin mudah lagi setelah larutan NaCl yang hipoosmotis dinyatakan dapat dipakai dalam metode HOS Test (Ariguno dan Tjokronegoro, 1988).

Suatu penelitian telah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Bagian Reproduksi dan Kebidanan, mulai bulan Juni sampai September 2001. Penelitian ini bertujuan untuk a) mengetahui kualitas semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi, b) mengetahui keutuhan membran plasma spermatozoa semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi dan c) membandingkan kualitas semen beku dan keutuhan membran plasma pada setiap tahap jalur distribusi.

Semen beku sebanyak 32 straw yang terdiri dari 8 straw yang berasal dari masing-masing tahapan distribusi yaitu balai, propinsi (SPIB I), kabupaten (SPIB II),

dan pos IB. Masing-masing straw dilakukan pemeriksaan konsentrasi, motilitas, persentase hidup dan abnormalitas serta persentase keutuhan membran plasma, dimana sebelumnya dilakukan *thawing* (pencairan kembali). Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola satu faktor. Data yang terkompilasi disidik dengan analisis ragam klasifikasi satu arah (*analysis of variance one way, Anova*). Pengolahan data menggunakan komputer dengan program SAS versi 6.12.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan pada kualitas semen yang ada pada tiap tahap distribusi. Konsentrasi yang dihasilkan oleh semen beku produksi BIB Lembang adalah $63,62 \times 10^6$ sel/ml, pada tahap propinsi (SPIB I) $57,94 \times 10^6$ /ml, pada tahap kabupaten (SPIB II) $60,44 \times 10^6$ sel/ml dan pos IB $59,70 \times 10^6$ sel/ml. Motilitas spermatozoa pada BIB Lembang, propinsi (SPIB I), kabupaten (SPIB II) dan pos IB adalah masing-masing menunjukkan nilai 42,26 %, 36,67%, 35,26 %, dan 38,65 %. Nilai persentase hidup didapatkan yaitu untuk balai inseminasi (52,41%), propinsi (57,36 %), kabupaten (56,27 %) dan pos IB (47,79 %). Persentase abnormalitas spermatozoa ialah: balai inseminasi 31,26 %, propinsi 31,62 %, kabupaten 31,00 % dan pos IB 33,37 %. Sedangkan untuk persentase keutuhan membran plasma spermatozoa pada balai inseminasi (BIB Lembang), propinsi, kabupaten, dan pos IB menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata yaitu nilai berturut-turut adalah 42,87 %, 41,91 %, 44,11 %, 36,56 %.

Dari hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan secara umum bahwa keadaan semen beku sapi pada tiap tahap jalur distribusi menunjukkan kualitas yang sama. Pemeriksaan konsentrasi, motilitas dan abnormalitas menunjukkan hasil dibawah *standard quality control*, sedangkan berdasarkan persentase hidup dan pemeriksaan keutuhan membran plasma menunjukkan hasil diatas *standard quality control*.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 26 Oktober 1978 di desa Ajibarang, kabupaten Banyumas anak kedua dari tiga bersaudara dari Bapak Hartono dan Ibu Budi Lestari. Penulis menempuh pendidikan di Sekolah Dasar Negeri (SDN) Patikraja II, Banyumas lulus tahun 1991. Kemudian melanjutkan ke SMPN 8 Purwokerto dan lulus tahun 1994. Penulis lulus dari sekolah lanjutan atas pada tahun 1997 di SMU Negeri 1 Purwokerto.

Pada tahun 1997, penulis diterima di Institut Pertanian Bogor melalui jalur Undangan Masuk IPB (USMI) pada Fakultas Kedokteran Hewan. Setelah menyelesaikan program Tingkat Persiapan Bersama (TPB) selama satu tahun, Penulis melanjutkan studi di Fakultas Kedokteran Hewan. Selama menjadi mahasiswa penulis aktif dalam aktivitas keorganisasian intra- dan ekstrakampus serta beberapa kepanitiaan terutama yang dilaksanakan oleh Asrama IPB Ekasari.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan taufiq dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini, tidak lepas dari bimbingan, saran, bantuan dan dorongan moril maupun materiil dari berbagai pihak. Sehubungan dengan hal tersebut penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Dr. drh. I Wayan Teguh Wibawan yang telah memberikan kemudahan dalam penyelesaian skripsi ini dalam bidang administrasi.

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dr. drh. Iman Supriatna atas kesediaan dan kesabarannya membimbing penulis baik pada saat penelitian, penyusunan dan penyelesaian skripsi ini. Disamping itu kepada Bapak Drh. Irpansyah Batubara yang telah bersusah payah dalam pengadaan bahan dan perlengkapan penelitian sehingga dapat selesai. Proses penyelesaian permasalahan pada saat penelitian dan bimbingan yang telah diberikan penulis ucapkan terimakasih. Seluruh staf dan karyawan Bagian Reproduksi dan Kebidanan FKH IPB khususnya kepada Mas Bondan yang telah membantu pada saat penelitian secara pribadi saya ucapkan terimakasih.

Kepada Bapak dan Ibu, terimakasih atas doa dan bimbingannya selama ini sehingga penulis dapat menjalankan tugasnya sebagai anak yang berbakti. Teguran dan nasehat sangat membantu penulis sehingga dapat menyelesaikan penulisan ini. Tidak ada yang berharga di dunia ini kecuali berkah dan doa yang telah di berikan

oleh Bapak dan Ibu. Khusus buat Kakak dan adikku, terimakasih atas dorongan motivasi yang diberikan.

Teman-teman satu penelitian : Yudi, Reza, Dilla, Erlin, Dewi dan Ayu, penulis ucapkan terimakasih atas kerjasamanya pada saat penelitian. Spesial penulis ucapkan terimakasih dari hati yang paling dalam untuk “Ndu” Wiedz yang selalu menyadarkan saya untuk secepatnya menyelesaikan penulisan ini. Dan kepada Rekan-rekan Asrama Ekasari, Genetika 21 serta Loji 143 saya ucapkan terimakasih.

Menyadari keterbatasan penulis, maka sudah selayaknya penulis mengharapkan saran dan kritik guna penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata dengan mengharap ridho Allah SWT, semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Bogor, Januari 2002

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
1.4 Kerangka Pemikiran	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Fisiologi Semen	5
2.2 Morfologi Spermatozoa	7
2.3 Semen Beku	10
2.4 Prosedur Pembekuan Semen	12
2.4.1 Pemeriksaan Semen Segar	13
2.4.2 Pengenceran Semen Sapi	13
2.4.3 Pembekuan dan Penyimpanan Semen	13
2.4.4 Evaluasi Kualitas Semen Beku	14
2.5 Pemeriksaan Kualitas Semen Beku	14
2.5.1 Pemeriksaan Baku (<i>Standard</i>)	14
2.5.2 Pemeriksaan Integritas Fisiologis Sel-Sel Spermatozoa	15
2.4.2.1 <i>Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test)</i> sebagai	
Salah Satu Metode dalam Pemeriksaan	
Integritas Membran Spermatozoa	15
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.2 Perlengkapan Penelitian	18
3.2.1 Semen Beku	18
3.2.2 Bahan Penelitian	18

3.2.3 Alat-alat	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Pencairan Semen Beku (<i>Thawing</i>)	19
3.3.2 Evaluasi Semen Beku Setelah Pencairan (<i>Pascathawing</i>) .	19
3.3.2.1 Pengukuran Konsentrasi dan Persentase Motilitas Spermatozoa	19
3.3.3.2 Pemeriksaan Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa	20
3.3.3.2. Pemeriksaan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa.....	21
3.4. Rancangan Penelitian dan Analisis Data	22
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kualitas Semen Beku Secara Standard pada Setiap Tahap Jalur Distribusi	23
4.1.1 Konsentrasi Semen Beku	23
4.1.2 Motilitas Spermatozoa	25
4.1.3 Persentase Hidup Spermatozoa	26
4.1.4 Persentase Abnormalitas Spermatozoa	27
4.2 Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) dengan Uji HOS Test pada Setiap Tahap Jalur Distribusi	28
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Komposisi kimia semen sapi	7
2.	Rataan konsentrasi pada setiap tahap jalur distribusi	23
3.	Rataan persentase motilitas semen beku sapi pada setiap tahap	
	jalur distribusi	25
4.	Rataan persentase spermatozoa hidup pada setiap jalur distribusi... .	27
5.	Rataan persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap tahap.....	
	distribusi	27
6.	Rataan persentase membran plasma utuh (MPU) pada setiap.....	
	tahap jalur distribusi	29

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Diagram morfologis spermatozoa sapi	9
2.	Spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik	17
3.	Perbandingan antara spermatozoa yang hidup dan mati.....	21
4.	Diagram rataan konsentrasi semen beku sapi pada tiap tahap jalur distribusi.....	24
5.	Diagram rataan motilitas, persentase hidup dan abnormalitas, serta persentase MPU semen beku pada tiap tahap distribusi.....	31

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pembangunan peternakan merupakan salah satu subsektor dari pembangunan pertanian, yang artinya pola kebijaksanaan pembangunan peternakan tidak dapat dipisahkan seluruhnya dari pola kebijaksanaan pembangunan pertanian. Pembangunan peternakan di Indonesia bertujuan untuk meningkatkan populasi dan produksi hasil ternak, meningkatkan kemampuan berproduksi para peternak, perbaikan gizi masyarakat, serta mempertahankan kelestarian ternak dengan meningkatkan populasi dan perbaikan mutu genetik.

Salah satu ternak yang potensial untuk dikembangkan dalam melaksanakan pembangunan peternakan di Indonesia ialah ternak sapi. Populasi ternak ini di Indonesia untuk jenis sapi potong pada tahun 1999 berjumlah $\pm 12.102.500$ ekor, sedangkan untuk jenis sapi perah berjumlah ± 333.985 ekor dengan jumlah terbesar terdapat di pulau Jawa (Ditjennak dan ASOHI, 1999). Ternak sapi pada umumnya dipelihara oleh para petani secara tradisional dan sudah mulai di usahakan peternakan sapi dalam skala yang lebih besar dengan penanganan yang lebih modern.

Berbagai cara terus dilakukan dalam peningkatan populasi dan produksi hasil ternak yang salah satunya adalah dengan penerapan teknologi inseminasi buatan (IB). Teknologi IB ini mulai diperkenalkan di Indonesia sejak tahun 1952, dimana pengaplikasian di lapangan baru dimulai sejak permulaan tahun 1973 dengan mempergunakan semen beku dari berbagai bangsa sapi impor. Keberhasilan program

IB pada ternak sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kualitas dan kuantitas semen ternak jantan, kesehatan saluran reproduksi ternak betina, keterampilan inseminator serta kemampuan peternak dalam mendeteksi berahi (Toelihere, 1981). Sedangkan menurut Atmadilaga *et al.* (1974) dalam Toelihere (1981) mengatakan bahwa penerapan IB secara meluas tanpa perencanaan yang matang dan pelaksanaan program yang tidak konsekuen telah menyebabkan lebih banyak kegagalan daripada keberhasilan.

Dalam usaha untuk peningkatan keberhasilan program IB, kemajuan dalam teknologi IB sangat diperlukan. Salah satu cara untuk meningkatkannya adalah dengan perbaikan kualitas semen beku yang akan diinseminasikan ke ternak. Perbaikan kualitas semen dapat dilakukan pada saat proses pembuatan semen beku di balai, seperti di BIB Lembang dan BIB Singosari. Di samping itu perlu dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui bahwa kualitas semen yang diproduksi dan didistribusikan. Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan standar (pemeriksaan warna, volume, konsentrasi, motilitas, dan lainnya). Pemeriksaan yang lain ialah pemeriksaan integritas membran plasma, dalam hal ini dilakukan dengan metode *hypoosmotic swelling test (HOS test)*. Hypoosmotic swelling test ini disebut-sebut sebagai metode mutakhir dalam penentuan fertilitas spermatozoa manusia (Jeyendran dan Zaneveld, 1986). Metode ini mudah dilakukan, lebih murah dan praktis dibandingkan metode-metode penentuan fertilitas spermatozoa sebelumnya. Metode ini semakin mudah lagi setelah larutan NaCl yang hipoosmotis dinyatakan dapat dipakai dalam metode HOS Test (Ariguno dan Tjokronegoro, 1988).

spermatozoa bisa menimbulkan kebuntingan, maka perlu dilakukan pemeriksaan terhadap kualitas semen. Pemeriksaan tersebut dapat dilakukan terhadap semen cair atau semen beku. Penilaian kualitas ini dilakukan agar pada nantinya hanya semen yang kualitasnya bagus yang dipakai untuk program inseminasi buatan.

Pada tahun 1962, Foote menyebutkan beberapa uji terhadap kualitas semen, yaitu: volume dan penampilan semen, konsentrasi spermatozoa, motilitas spermatozoa, persentase hidup dan mati, morfologi spermatozoa, uji metabolik, uji impedansi, uji resistensi terhadap stress, pemeriksaan fisika dan biokimia semen.

Pada tahun 1986 Jeyendran dan Zaneveld mengenalkan metode lain dalam penentuan kualitas semen pada manusia. Metode yang digunakan adalah: 1) pemeriksaan adanya endapan pada semen dan pencairannya setelah ejakulasi, 2) pengukuran volume semen, 3) kekentalan, 4) konsentrasi spermatozoa, 5) motilitas spermatozoa, 6) morfologi spermatozoa, 7) uji biokimia, 8) *zona free hamster oocyte penetration test (hamster test)*, 9) *hypoosmotic swelling test*.

Pada saat ini metode hamster test adalah metode penentuan fertilitas spermatozoa yang paling handal, tetapi menurut Jeyendran dan Zaneveld (1986) metode inipun bukan merupakan indikator absolut dari spermatozoa yang fertil. Namun demikian metode ini dapat diandalkan daripada metode pemeriksaan morfologi dan motilitas.

Penerapan metode membran plasma utuh (HOS Test) sebagai penentu fertilitas spermatozoa semen beku pada setiap tahap jalur distribusi akan memberikan gambaran sejauh mana keberhasilan program inseminasi buatan yang telah dilaksanakan. Hal ini ditunjukkan oleh baik buruknya kualitas semen beku yang terdapat pada setiap jalur distribusi. Kecenderungan mendapatkan kualitas semen beku yang berbeda-beda di setiap tahap distribusi akan mengakibatkan produksi ternak sapi kurang optimal, terutama di daerah sekitar pos-pos IB. Peningkatan kualitas semen beku sapi akan berakibat pada peningkatan angka kebuntingan dan perbaikan jarak kelahiran (*calving interval*) dan begitupun terjadi sebaliknya bila ada penurunan kualitas semen beku sapi.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk a) menentukan kualitas semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi, b) mengetahui keutuhan membran plasma spermatozoa semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi dan c) membandingkan kualitas semen beku dan keutuhan membran plasma pada setiap tahap jalur distribusi.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan akan menjadi bahan informasi dalam penanganan distribusi semen sapi dari mulai produsen (balai inseminasi) sampai ke pos-pos IB untuk mengetahui kelaikan dari semen beku sapi.

1.4 Kerangka Pemikiran

Keberhasilan program inseminasi buatan di tentukan oleh banyaknya sapi betina yang bunting. Hal ini menunjukkan bahwa fertilitas spermatozoa sangat penting bagi keberhasilan program ini. Untuk mengetahui sejauh mana fertilitas

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fisiologi Semen

Semen adalah sekresi organ reproduksi jantan yang secara normal di ejakulasikan pada saat kopulasi atau dapat di tampung untuk kepentingan Inseminasi Buatan (Toelihere, 1985). Masih menurut Toelihere, (1985) semen terdiri dari dua bagian yaitu spermatozoa dan plasma semen. Spermatozoa dihasilkan di dalam testes sedangkan plasma semen adalah campuran sekresi yang dibuat oleh epididymis dan kelenjar kelamin pelengkap.

Semen sapi yang normal berwarnaseperti susu atau kram keputih-putihan dan keruh (Toelihere, 1981). Hal ini disebabkan oleh volume yang kecil tetapi mempunyai konsentrasi sperma yang tinggi (Toelihere, 1985). Konsentrasi spermatozoa merupakan salah satu parameter yang seringkali dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen. Menurut Toelihere (1985), konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa yang terkandung dalam setiap mililiter semen. Konsentrasi spermatozoa sapi adalah $0,8-2,0 \times 10^9$ spermatozoa/ml (Salisbury dan Vande Mark, 1985), sedangkan menurut Schuh (2001) adalah $3,6-12 \times 10^9$ spermatozoa/ejakulasi.

Motilitas adalah daya gerak maju spermatozoa, merupakan ciri spermatozoa hidup dan normal yang menjadi salah satu kriteria untuk menentukan kualitas semen (Toelihere, 1985). Motilitas merupakan faktor yang sangat menentukan bagi spermatozoa untuk melewati cervix dan utero tubal *junction*, bahkan yang lebih

penting lagi, motilitas memungkinkan spermatozoa dapat menembus sel-sel cumulus ophorus dan zona pellucida dari ovum sehingga terjadi fertilisasi (Hafez, 1993).

Menurut Mann pada tahun 1969, motilitas spermatozoa yang baik dan aktivitas metabolik yang tinggi berhubungan sangat erat. Salah satu dari keduanya sama-sama dapat digunakan dengan baik sebagai metode penentuan fertilitas secara praktis, sebab kemampuan untuk melakukan fertilisasi disatu pihak dan motilitas serta metabolisme dipihak lain bersatu dalam dua daerah lokasi pada struktur spermatozoa.

Pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan melihat gerakan massa pada semen segar atau dengan menghitung persentasi spermatozoa yang motil progresif pada semen yang telah diencerkan atau setelah pembekuan dan thawing (Evans dan Maxwell, 1987). Menurut Zesfin dkk. (2001) motilitas spermatozoa pada sapi kelompok umur muda $65 \pm 13,81$ % dan kelompok sapi dewasa rata-rata $62,22 \pm 14,77$ %.

Persentase hidup spermatozoa dapat dievaluasi dengan menggunakan pewarna diferensial eosin atau eosin negrosin. Zat warna eosin akan diserap oleh spermatozoa yang mati sehingga akan berwarna merah atau merah muda akibat permeabilitas dinding sel meninggi pada sel spermatozoa yang mati (Toelihere, 1981).

Pada tahun 1985, Toelihere menyebutkan bahwa Blom (1950) mengklasifikasikan abnormalitas sperma menjadi dua macam yaitu primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada tubulus seminiferi akibat dari kelainan-kelainan spermatogenesis, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi sesudah sperma

meninggalkan tubuli seminiferi, selama perjalanannya melalui saluran epididymis, selama ejakulasi atau dalam manipulasi ejakulat tersebut.

Secara fisiologis komposisi kimia semen sapi dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Komposisi kimia plasma semen sapi (Toelihere, 1985)

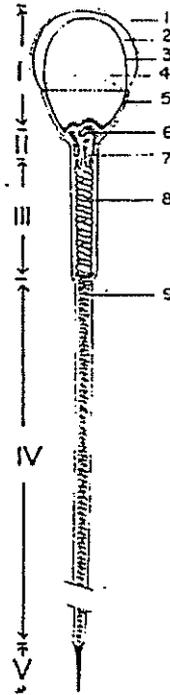
Komposisi Semen	Satuan	Nilai
PH	-	6,9
Air	g/ml	90
Natrium	mg/100ml	230
Kalium	mg/100ml	140
Calcium	mg/100ml	44
Magnesium	mg/100ml	9
Chlorida	mg/100ml	180
Fructosa	mg/100ml	530
Asam Sitrat	mg/100ml	720
Inositol	mg/100ml	35
GPC	mg/100ml	350
Ergothionine	mg/100ml	-
Protein, g/ml	g/ml	6,8
Plasmalogen	mg/100ml	30 -90

2.2 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa dibentuk didalam testis, melalui proses yang disebut spermatogenesis, tetapi mengalami pematangan lebih lanjut didalam epididymis dimana sperma disimpan sampai ejakulasi (Toelihere, 1985). Masih menurut Toelihere (1985) spermatogenesis dibagi menjadi dua tahap yaitu spermatocytogenesis atau pembentukan spermatis primer dan sekunder dari spermatogonia dan spermiogenesis atau pembentukan spermatozoa dari spermatid.

Spermatozoa pertama kali dilihat oleh Doktor Ham, dan pengamatannya pertama kali dilaporkan oleh Antoni van Leeuwenhoek pada tahun 1677 segera sesudah penemuan mikroskop (Salisbury dan Vande Mark, 1985). Dari hasil pengamatan sesudah itu baru diperoleh kejelasan mengenai morfologinya. Sperma merupakan suatu sel kecil, kompak dan sangat khas yang tidak tumbuh atau membagi diri (Toelihere, 1985). Masih menurut Toelihere (1985) meskipun ukuran dan bentuk spermatozoa berbeda pada berbagai jenis hewan namun struktur morfologinya adalah sama (Gambar 1). Sperma yang normal terdiri dari bagian kepala, leher, badan dan ekor yang seluruhnya ditutupi oleh membran (Salisbury dan Vande Mark, 1985). Panjang dan lebar kepala kira-kira 8,0–10,0 μm kali 4,0–4,5 μm pada sperma sapi. Tebal kepala lebih kurang 0,5–1,5 μm atau kurang pada semua species. Badan atau bagian tengah sperma mempunyai panjang 1,5–2 kali panjang kepala, 10,0–15,0 dan diameter sekitar 1,0 μm pada semua species. Ekor spermatozoa adalah 35,0–45,0 μm panjang dan 0,4–0,8 μm diameter. Panjang keseluruhan spermatozoa pada hewan peliharaan mencapai 50–70 μm .

Kepala terdiri atas akrosom dan nukleus. Akrosom adalah selubung anterior nukleus, terdiri dari dua lapis membran yaitu membran luar dan membran dalam. Nukleus seluruhnya dilindungi oleh membran nukleus. Antara nukleus dan akrosom terdapat bahan perinuklear. Kepala sperma terisi sepenuhnya dengan materi inti, akrosom, terdiri atas deoxyribonucleic acid (DNA) bersenyawa dengan protein (Toelihere, 1985). Menurut Foote (1962) setiap spermatozoa mengandung kurang lebih 2,5 milyar informasi penting untuk membentuk foetus walaupun diperlukan 300 milyar spermatozoa untuk membentuk satu gram DNA.



Gambar 1. Diagram morfologis spermatozoa sapi. I. kepala, II. leher, III. badan, IV. ekor, V. ujung ekor, 1. membran sitoplasma, 2. akrosom, 3. membran nukleus, 4. selubung posterior, 5. sentriol proksimal, 6. fibril pusat, 7. selubung mitokondria, 8. helix fibrosa. (Toelihere, 1981)

Leher spermatozoa terdiri dari berkas-berkas fibril yang terbentuk dari dua cincin yang masing-masing terdiri dari sembilan fibril yang mengelilingi dua fibril pusat. Kedua cincin berasal dari granula yang mengelilingi sentriol proksimal didasar kepala spermatozoa, dan fibril pusat berasal dari sentriol proksimal. Berkas fibril ini memiliki rumus $9 + 9 + 2$ yang merupakan ciri susunan fibril dari spermatozoa mammalia (Salisbury dan Vande Mark, 1985).

Bagian badan spermatozoa merupakan kelanjutan dari leher, tetapi dibungkus oleh selubung mitokondria yang banyak mengandung bahan lipoid, dan ujungnya berakhir pada cincin sentriol yang merupakan tempat tumbuhnya ekor (Salisbury dan Vande Mark, 1985). Fibril pada bagian badan dan ekor selain mengandung banyak

lipida juga mengandung sistem sitokrom, kompleks enzim dan koenzim yang diperlukan untuk proses glikolisis dan respirasi sel.

Ekor sperma yang panjang (40–50 μm) dapat dibagi atas 3 bagian ; bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung, dan berasal dari sentriol spermatid selama spermiogenesis. Ia memberi gerak maju kepada spermatozoa dengan gelombang-gelombang yang dimulai di daerah implantasi ekor-kepala dan berjalan ke arah distal sepanjang ekor bagaikan pukulan cemeti (Toelihere, 1985). Spermatozoa dengan struktur morfologi yang normal akan mampu bergerak mendekati ovum dengan adanya fungsi fibril kontraktile dan memasuki ovum tersebut dengan terdapatnya fungsi enzim-enzim yang terkandung pada bagian kepala khususnya akrosom.

2.3 Semen Beku

Semen beku ialah semen yang telah diencerkan kemudian dibekukan jauh di bawah titik beku air. Jauh titik pembekuan ini dari titik beku 0°C tergantung pada zat yang dipakai untuk membekukannya dan manfaat yang diperoleh dengan pembekuan itu. Pengawetan semen dilakukan dengan tujuan agar semen yang diperoleh masih dapat dipergunakan setelah beberapa waktu yang lama, sehingga fertilitas semen tetap terjaga tinggi seperti sedia kala. Schuh (1988) menyebutkan bahwa dengan menggunakan semen beku (*frozen semen*), dibutuhkan sekurang-kurangnya lima sampai 10 juta sperma yang motil progresif tiap inseminasi untuk mendapatkan rata-rata fertilisasi yang optimal.

Pengawetan semen dapat dilakukan dengan beberapa cara. Salisbury dan Van de Mark (1985) menyebutkan dua teknik pengawetan semen agar fertilitas yang optimal dari spermatozoa dapat dipertahankan. Teknik pertama adalah menyediakan

semua ion-ion esensial, zat-zat makanan, enzim-enzim, koenzim-koenzim, dan vitamin-vitamin serta secara kontinu membuang sisa metabolisme yang membatasi kehidupan spermatozoa. Sistem ini berdasarkan tehnik dialisis yang dikembangkan oleh Vande Mark dan Coutrier. Tehnik kedua adalah dengan penghambatan secara fisik dan kimiawi semua aktivitas minimal yang penting di dalam spermatozoa. Tehnik pertama menghendaki pengetahuan yang lengkap tentang fungsi dan kebutuhan-kebutuhan spermatozoa serta usaha untuk memenuhi kebutuhan tersebut. Sedang tehnik kedua menghendaki dibuatnya suatu proses penghambatan aktivitas spermatozoa tanpa mengurangi fungsinya dan kesempurnaan proses pemulihan kembali aktivitas tersebut. Tehnik kedua ini relatif lebih mudah dilaksanakan dengan cara penurunan temperatur, sehingga proses metabolisme tertekan.

Menurut Toelihere (1981) upaya pengawetan semen dengan cara pembekuan telah ada sejak penemuan Lazaro Spallanzani pada tahun 1803. Ia mengamati bahwa pembekuan semen kuda di salju atau pada temperatur musim dingin tidak mematikan spermatozoa, malahan mempertahankannya dalam keadaan tidak bergerak sampai terkena panas dan sesudah itu spermatozoa terus bergerak selama 7,5 jam.

Sampai saat ini proses pembekuan semen pada ternak masih mengalami beberapa permasalahan seperti terjadinya *cold shock*, *osmotic shock*, kerusakan intra seluler akibat terbentuknya kristal es, perubahan permeabilitas membran yang menyebabkan kematian sel saat pencairan kembali/thawing (Toelihere, 1981). Beberapa upaya dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan diatas diantaranya penggunaan gliserol dengan konsentrasi yang optimal, penambahan gliserol secara perlahan untuk mencegah *osmotic shock* serta pemberian kesempatan equilibrasi atau

adaptasi untuk keseimbangan molekuler antara spermatozoa dengan bahan pengencer (Salisbury dan Vande Mark, 1985).

Penggunaan gliserol sebagai krioprotektan sangat penting bagi hidup spermatozoa selama proses pembekuan walaupun penggunaan agen ini bila berlebihan juga dapat bersifat toksik bagi sel spermatozoa (Parks and Graham, 1992). Gliserol juga dapat menekan terjadinya kerusakan enzim-enzim yang terdapat didalam spermatozoa yang sangat penting dalam proses fertilisasi (Singh, dkk, 1992).

Waktu equilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer sehingga sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Toelihere, 1981). Setelah semen mengalami equilibrasi, pembekuan bisa segera dilakukan dengan cara lambat menggunakan straw dari plastik atau dengan cara pembekuan cepat dalam bentuk pelet (Salisbury dan Vande Mark, 1985).

2.4 Prosedur Pembekuan Semen

Pembekuan merupakan gejala pengeringan fisik dimana pelarut (air) akan membeku menjadi kristal-kristal es, sedangkan bahan-bahan terlarut akan terkumpul dalam larutan yang tersisa dan akan bertambah pekat (Salisbury dan VandeMark, 1985). Apabila semen dibekukan (-130° C) dan disimpan pada temperatur yang sangat rendah yaitu dalam nitrogen cair (-196° C) maka reaksi-reaksi metabolisme spermatozoa akan terhenti, sehingga daya hidup spermatozoa dapat diperpanjang untuk jangka waktu yang lama (Evans dan Maxwell, 1985).

Pada tempat-tempat produksi semen beku memiliki prosedur tersendiri dalam proses pembuatan semen beku. Terutama BIB Lembang sebagai salah satu produsen

semen beku telah menetapkan tata cara dalam memproduksi semen beku tersebut. Adapun prosedur dalam produksi semen beku yang telah ditetapkan oleh BIB Lembang terdiri atas :

2.4.1 Pemeriksaan Semen Segar

Pengolahan semen di laboratorium adalah prosedur tetap yang harus dilakukan mulai dari pemeriksaan sampai ke penyimpanan semen. Pemeriksaan semen segar meliputi : 1) pemeriksaan makroskopis yang terdiri atas pemeriksaan warna, volume dan konsistensi, 2) pemeriksaan mikroskopis yang terdiri atas pemeriksaan gerakan massa, gerakan individu dan konsentrasi yang dilakukan dengan spektrofotometer. Kualitas semen segar yang baik ialah yang berwarna putih susu, konsistensi kental, volume lebih dari 5 ml, gerakan massa 2+, gerakan individu 70 % dan konsentrasi 1.500×10^6 spermatozoa/ml.

2.4.2 Pengenceran Semen Sapi

Bahan pengencer yang digunakan di BIB Lembang adalah susu skim. Prosedur yang dilakukan ialah dengan mencampurkan semen dengan bahan pengencer Part A (buffer antibiotika 950 cc dan kuning telur 50 cc) dan disimpan dalam inkubator. Setelah itu dilakukan glycerolisasi yaitu penambahan glycerol (16 %) pada bahan pengencer yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari *cold shock* dan *osmotic shock*. Proses pengisian dilakukan 2,5 jam setelah proses glycerolisasi berakhir.

2.4.3 Pembekuan dan Penyimpanan Semen

Straw yang sudah terisi semen dibekukan diatas permukaan liquid nitrogen didalam *storage container* pada suhu -110 sampai -120^0 C selama 9 menit. Setelah

itu dimasukkan ke dalam goblet dengan kapasitas 550-750 dosis straw, lalu disimpan didalam kontainer yang terendam N₂ cair dengan suhu -196⁰ C. Untuk menjaga volume nitrogen cair yang hilang karena penguapan, maka setiap hari ditambahkan 30 liter N₂ cair.

2.4.4 Evaluasi Kualitas Semen Beku

Evaluasi yang dilakukan setelah pencairan kembali ialah penghitungan persentase hidup dan gerakan individual dari spermatozoa. Standar minimal untuk persentase hidup adalah 40 % dengan gerakan individu spermatozoa 3. Kemudian untuk *Water Incubator Test* standar minimalnya adalah 20 % dengan gerakan individu 2. Berdasarkan petunjuk teknis pengawasan mutu bibit ternak standar minimal untuk semen beku yang baik mengandung 25 juta spermatozoa/0.25 ml, gerakan massa semen segar 2+, dan *post thawing motility* 40 % (Ditjennak, 2000).

2.5 Pemeriksaan Kualitas Semen Beku

2.5.1 Pemeriksaan Standar

Pemeriksaan kualitas semen secara standard terdiri atas pemeriksaan makroskopis dan pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan warna, bau, volume, konsistensi, dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan motilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa, persentase hidup mati, pemeriksaan abnormalitas spermatozoa, dan pengukuran aktivitas metabolik spermatozoa (Toelihere, 1981).

Pemeriksaan terhadap penampilan semen seperti pemeriksaan volume, warna, konsistensi, dan pH sangat penting untuk menentukan ada tidaknya kontaminasi semen oleh kotoran, urine, darah atau rambut. Pemeriksaan ini biasanya dilakukan

terhadap semen segar, jarang dilakukan pada semen beku. Volume dan konsentrasi sangat penting untuk menentukan ketersediaan jumlah spermatozoa untuk pengenceran semen, sehingga tetap memenuhi kecukupan jumlah spermatozoa dalam satu dosis inseminasi. Spermatozoa hidup dan mati dapat ditunjukkan dengan metode pewarnaan eosin. Spermatozoa yang mati akan permeabel terhadap eosin, karena mengalami perubahan membran.

Morfologi spermatozoa diperiksa di bawah mikroskop. Ketidaknormalan spermatozoa dapat terjadi pada bagian kepala dan ekor. Keadaan akrosom juga diperhatikan karena peranannya yang khusus dalam fertilisasi. Berbagai keadaan yang abnormal akan ditemukan pada spermatozoa. Sedangkan uji metabolik seperti konsumsi oksigen, oksidasi piruvat, penggunaan fruktosa, produksi asam laktat, perubahan pada fosfat organik, waktu reduksi metilen biru dan resazurin, serta perubahan pH merupakan petunjuk aktivitas metabolik dari spermatozoa.

2.5.2 Pemeriksaan Integritas Fisiologis Sel-Sel Spermatozoa

Pemeriksaan integritas fisiologis merupakan pemeriksaan kualitas semen yang berhubungan dengan integritas organela sel sehingga dapat melakukan fungsi fisiologis. Pemeriksaan ini biasanya ditunjukkan oleh adanya keutuhan membran plasma sel, keutuhan akrosom, dan kemampuan fertilisasi. Untuk mengetahui kemampuan viabilitas dan fisiologis dapat diketahui dengan menggunakan metode diantaranya HOS test, TAU test, dan hamster ovum penetration test.

2.5.2.1 *Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test)* sebagai Salah Satu Metode dalam Pemeriksaan Integritas Membran Spermatozoa

Penentuan fertilitas spermatozoa dapat dilakukan melalui analisa semen, baik

terhadap plasma seminalis maupun spermatozoa itu sendiri. Juga dapat ditentukan dengan mengadakan evaluasi terhadap kejadian fertilisasi di lapangan melalui analisa kartu fertilitas seperti perhitungan angka kebuntingan, banyaknya pelayanan inseminasi per kebuntingan, dan angka kelahiran.

Pada manusia penentuan fertilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan menganalisa semen. Metode yang digunakan adalah: 1) pemeriksaan adanya endapan pada semen dan pencairannya setelah ejakulasi, 2) pengukuran volume semen, 3) kekentalan, 4) konsentrasi spermatozoa, 5) motilitas spermatozoa, 6) morfologi spermatozoa, 7) uji biokimia, 8) *zona free hamster oocyte penetration test (hamster test)*, 9) *HOS test (Jeyendran dan Zaneveld, 1986)*.

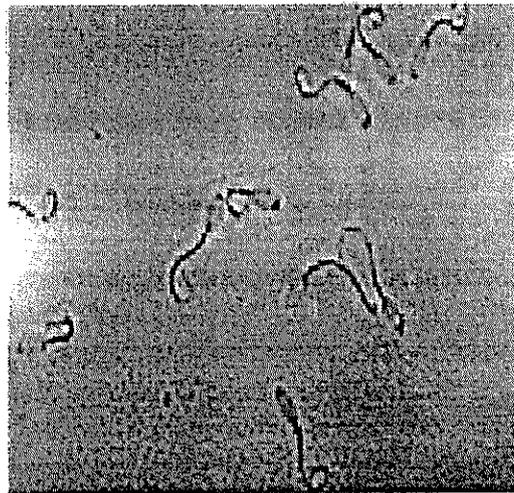
Hypoosmotic swelling test mulai diperkenalkan pada tahun 1963 oleh Drevius yang menemukan bahwa spermatozoa yang terpapar pada medium hypoosmotic akan mengalami pembengkokan ekor sehingga seperti spiral. Menurut dia pembengkokan ini adalah akibat gangguan kontraksi-relaksasi ekor oleh karena adanya aliran ion atau bahan yang berat molekulnya rendah dari ekor ke medium hypoosmotik tersebut. Penelitian ini dilakukannya terhadap spermatozoa sapi dengan menggunakan larutan ringer 20 % (Jeyendran dan Zaneveld, 1986).

Jeyendran dan Zaneveld (1986) meneliti hal ini dengan menggunakan larutan hypoosmotik yang terbuat dari 100 ml aquades berisi 2,7 g fruktosa ($C_6H_{12}O_6$) dan 100 ml aquades yang berisi 1,47 sodium sitrat bihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$). Mereka melakukannya terhadap spermatozoa manusia, dan hasilnya juga demikian.

Jeyendran dan Zaneveld berpendapat bahwa spermatozoa dengan membran -- plasma yang utuh dan fungsional akan bertambah volumenya jika terpapar pada suatu

medium hipoosmotik. Medium akan menggunakan tekanan osmotik yang cukup besarnya untuk mengakibatkan terjadinya aliran air masuk ke dalam spermatozoa sehingga menjadi bengkak.

Dasar metode HOS Test adalah hukum osmosis. Bila spermatozoa terpapar pada medium hipoosmotik, maka air akan mengalir ke dalam spermatozoa sampai tercapai keseimbangan osmotik antara larutan di dalam dan larutan di luar spermatozoa, sehingga spermatozoa bengkak. Kebengkakan ini berupa pembengkakan yang mudah dilihat. Peristiwa osmosis pada spermatozoa ini dapat terjadi karena membran plasmanya bersifat semipermeabel dan berfungsi normal. Jadi spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik dan memperlihatkan pembengkakan ekor adalah spermatozoa yang normal (Gambar 2.).



Gambar 2. Spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik.

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Penelitian dilakukan selama empat bulan yaitu mulai bulan Juni 2001 sampai bulan September 2001.

3.2. Perlengkapan Penelitian

3.2.1. Semen Beku

Semen beku yang dipergunakan dalam penelitian ini berjumlah 32 straw yang diambil dari Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dan BIB Lembang dengan cara mengambil 8 straw dari masing-masing tahap mengikuti tahapan jalur distribusi mulai dari balai inseminasi (BIB Lembang) selaku produsen semen beku, propinsi (SPIB I), kabupaten (SPIB II) dan pos-pos IB.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dipergunakan meliputi larutan NaCl fisiologis 0,95 %, larutan hiposmotik (0,179 g NaCl/100 ml aquadest), pewarna eosin-negrosin 2 %, aquabides, nitrogen cair dan alkohol.

3.2.3. Alat-alat

Peralatan yang dipakai meliputi satu unit container lengkap, mikroskop, *automatic thawer*, gunting, *cryotube*, pipet leukosit, haemositometer, gelas objek, *cover glass*, *counter*, *heater*, gelas ukur, pipet, gelas pengaduk, timbangan, termos, mikropipet, dan inkubator.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pencairan Semen Beku (*Thawing*)

Pencairan kembali semen beku dilakukan mengikuti metode Pace *et al.* (1981) pada sapi, yaitu dengan mencelupkan straw yang berisi semen beku ke dalam air bersuhu 37⁰C selama 30 detik.

3.3.2. Evaluasi Semen Beku Setelah Pencairan (*Pascathawing*)

Pemeriksaan kualitas semen beku dilakukan setelah pencairan kembali (*thawing*). Pemeriksaan itu merupakan pemeriksaan mikroskopis yang meliputi: 1) penghitungan konsentrasi dan persentase motilitas spermatozoa, 2) persentase spermatozoa hidup dan abnormalitas, 3) keutuhan membran plasma (MPU).

3.3.2.1. Pengukuran Konsentrasi dan Persentase Motilitas Spermatozoa

Pengukuran konsentrasi spermatozoa dihitung secara kuantitatif dengan menggunakan metode kamar hitung Neubauer. Penghitungan dapat diketahui dari jumlah seluruh spermatozoa dalam lima kotak besar atau secara ringkas untuk 80 kotak kecil yang dihitung. Untuk menghitung konsentrasi dipergunakan rumus :

Konsentrasi (spermatozoa/ml) = Pengenceran x 50.000 x total spermatozoa dihitung

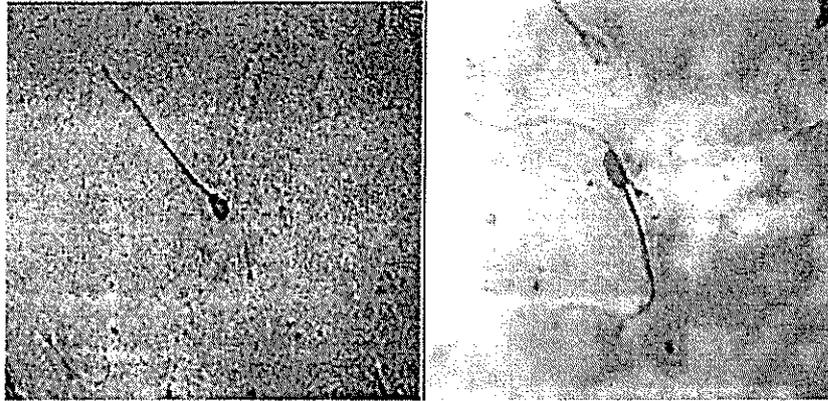
Persentase motilitas spermatozoa yang dihitung dalam penelitian kualitas semen adalah jumlah spermatozoa yang bergerak progresif ke depan yang terdapat dalam semen. Semen diencerkan ke dalam pipet leukosit dengan cara mengisi semen sampai angka 1, kemudian ditambahkan NaCl fisiologis sampai angka 11, besarnya pengenceran yang diperoleh adalah 10 kali. Tabung yang telah berisi semen tadi, dihomogenkan dengan cara memutar tabung membentuk angka delapan kemudian diteteskan pada kamar hitung Neubauer dan ditutup dengan *cover glass*.

Evaluasi terhadap persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang mati (sperma tidak bergerak/immotil, bergerak ditempat, berputar, mundur, dan bergerak oskilatoris) pada lima kotak haemositometer. Setelah jumlah spermatozoa yang mati di dalam lima kotak dihitung, kemudian dipanaskan perlahan-lahan hingga semua spermatozoa itu mati dan terimmobilisasi pada gelas objek agar mudah dalam penghitungan. Penghitungan kembali dilakukan pada lima kotak haemositometer untuk mengetahui total seluruh spermatozoa. Hasil pengurangan antara total seluruh spermatozoa dengan spermatozoa yang mati merupakan yang bergerak progresif (bergerak lurus ke depan). Untuk mengetahui persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan rumus:

$$\text{Persentase motilitas spermatozoa} = \frac{\text{spermatozoa bergerak maju progresif}}{\text{total seluruh spermatozoa}} \times 100 \%$$

3.3.3.2 Pemeriksaan Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa

Persentase hidup spermatozoa dilakukan menggunakan pewarna eosin 2%, kemudian dilakukan ulasan secara cepat dan difiksasi pada *heater* (waktu yang diperlukan untuk mencampur hingga selesai fiksasi tidak boleh lebih dari 15 detik). Pemeriksaan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 10x45. Spermatozoa dihitung dengan cara berurutan atau zig-zag sampai 10 lapang pandang (atau 200 spermatozoa). Spermatozoa yang hidup tidak akan berwarna dan yang telah mati akan berwarna merah pada bagian kepalanya. Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan persentase hidup spermatozoa (Gambar 3.).

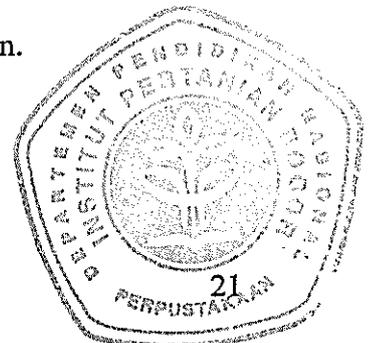


Gambar 3. Perbandingan antara spermatozoa yang hidup dan mati. Setelah pemberian pewarnaan eosin 2 % spermatozoa yang berwarna merah menunjukkan spermatozoa yang telah mati, sedangkan yang tidak berwarna merah adalah yang masih hidup

3.3.3.3. Pemeriksaan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa

Pemeriksaan terhadap membran plasma utuh (MPU) dilakukan memakai uji yang pernah dilakukan oleh Jeyendran dan Zaneveld (1986), yaitu dengan *hyposmotic swelling test* (HOS test). Prosedur pemeriksaannya adalah dengan menggunakan medium HOS berupa NaCl hipotonik 0,031 M (0,179 g NaCl dalam 100 ml aquades).

Sebanyak 10 μ l semen dicampurkan ke dalam 500 μ l medium HOS lalu diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37⁰C. Kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 kali. Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah sebanyak 200 spermatozoa atau 10 kali lapang pandang. Semen yang diperiksa akan terlihat adanya perubahan morfologik bila diinkubasi pada medium HOS. Perubahan ini akan dicirikan oleh pembengkakan pada bagian ujung ekor, lengkungan ekor, ekor yang memendek, dan menebal yang menunjukkan utuhnya membran.



3.4. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Desain yang digunakan dalam percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola 1 faktor dimana faktor tahapan distribusi sebagai faktor tunggal. Setiap perlakuan dilakukan dengan pengulangan sebanyak delapan kali. Data yang terkompilasi disidik dengan analisis ragam klasifikasi satu arah (*analysis of variance one way, Anova*). Pengolahan data menggunakan komputer dengan program SAS versi 6.12.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Semen Beku Secara Standard pada Setiap Tahap Jalur Distribusi

4.1.1 Konsentrasi Semen Beku

Hasil pemeriksaan dari setiap sampel didapatkan bahwa besarnya konsentrasi pada setiap tahap jalur distribusi menunjukkan tidak ada perbedaan (Tabel 2.).

Tabel 2. Rataan konsentrasi pada setiap tahap jalur distribusi

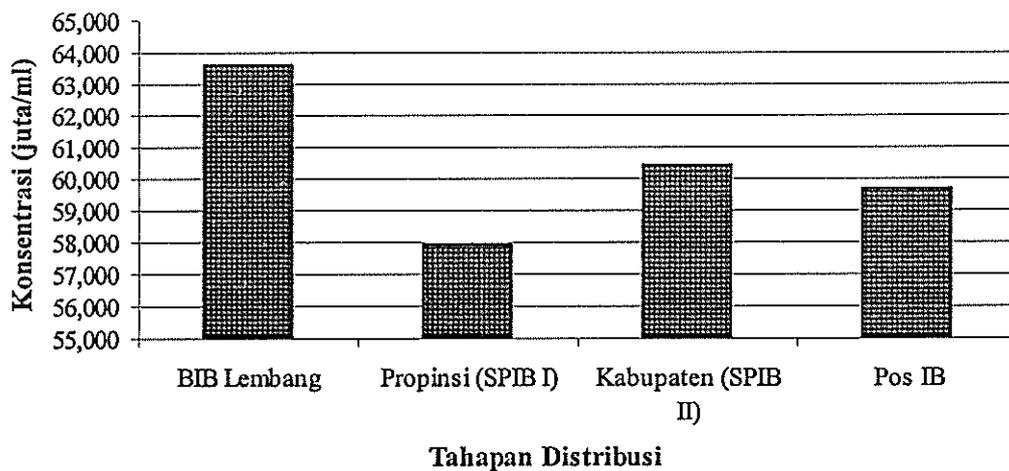
Tahapan	Konsentrasi (juta/ml)
BIB Lembang	63,62 ^A
Propinsi (SPIB I)	57,94 ^A
Kabupaten (SPIB II)	60,44 ^A
Pos IB	59,70 ^A
Rata-rata	60,42

Angka diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

Konsentrasi yang dihasilkan oleh semen beku produksi BIB Lembang adalah $63,62 \times 10^6$ sel/ml, pada tahap propinsi (SPIB I) $57,94 \times 10^6$ /ml, pada tahap kabupaten (SPIB II) $60,44 \times 10^6$ sel/ml dan pos IB $59,70 \times 10^6$ sel/ml (Gambar 4.). Nilai ini berada dibawah standar minimal yang ditetapkan pemerintah. Ditjennak (2000) menetapkan bahwa kualitas semen beku yang baik memiliki konsentrasi sebesar 25 juta spermatozoa/0,25 ml atau 100 juta spermatozoa/ml. Namun demikian, dari konsentrasi yang ditunjukkan semen beku tersebut masih dapat diinseminasikan dengan konsekuensi akan menghasilkan angka fertilitas yang rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Salamon (1982) bahwa dalam penggunaan inseminasi buatan ditemukan hubungan yang mendatar antara jumlah spermatozoa

yang di inseminasikan dengan jumlah anak, yaitu diatas nilai antara 28 juta sampai 128 juta spermatozoa. Dia memperkirakan bahwa dengan nilai antara tersebut, setiap penambahan 25 juta spermatozoa akan meningkatkan jumlah anak kira-kira 13%. Berdasarkan hal tersebut, dapat diketahui bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi yang ditunjukkan oleh satu semen beku maka peluang menghasilkan kebuntingan akan semakin besar.

Sedangkan Foote (1962) menyatakan bahwa setiap dosis inseminasi harus mengandung paling sedikit lima juta spermatozoa yang hidup dan motil. Toelihere (1981) menyatakan bahwa pada sapi, satu dosis inseminasi dengan semen beku paling sedikit harus mengandung 12 juta spermatozoa. Schuh (1988) menyatakan bahwa dengan menggunakan semen beku (*frozen semen*), dibutuhkan sekurang-kurangnya lima sampai 10 juta sperma yang motil progresif tiap inseminasi untuk mendapatkan rata-rata fertilisasi yang optimal.



Gambar 4. Diagram rata-rata konsentrasi semen beku sapi pada tiap tahap jalur distribusi.

4.2 Motilitas Spermatozoa

Motilitas banyak digunakan secara luas untuk menguji kualitas semen dalam hal kemampuan spermatozoa untuk dapat tetap hidup. Menurut Mann (1969), motilitas spermatozoa yang baik dan aktivitas metabolik yang tinggi berhubungan sangat erat. Dari pemeriksaan sampel didapatkan hasil seperti tercantum pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan persentase motilitas semen beku sapi pada setiap tahap jalur distribusi

Tahapan	Motilitas (%)
BIB Lembang	42,36 ^A
Propinsi (SPIB I)	36,67 ^A
Kabupaten (SPIB II)	35,26 ^A
Pos IB	38,65 ^A
Rata-rata	38,24

Angka diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

Motilitas pada semen beku produksi BIB Lembang (42,36 %) , menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan motilitas spermatozoa semen beku sapi yang terdapat di propinsi (SPIB I), kabupaten (SPIB II) dan pos IB yang masing-masing menunjukkan nilai 36,67 %, 35,26 %, dan 38,65 %. Nilai yang ditunjukkan oleh hasil diatas menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa semen beku untuk tahap propinsi (SPIB I), kabupaten (SPIB II), dan pos IB berada dibawah standar minimal. Ditjennak (2000) menetapkan bahwa *post thawing motility* untuk semen beku yang baik adalah sebesar 40 %. Walaupun secara empiris dibawah standard kualitas baku semen beku yang dipakai akan tetapi secara statistika menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata, maka dapat diinseminasikan. Rendahnya nilai yang ditunjukkan tersebut dapat disebabkan karena kerusakan yang terjadi pada proses distribusi.

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa selalu digunakan sebagai pegangan yang termudah dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan. Daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Kecepatan pergerakan spermatozoa untuk masing-masing spesies berbeda dan bervariasi sesuai dengan kondisi medium dan suhu lingkungannya (Toelihere, 1985).

4.3 Persentase Hidup Spermatozoa

Perbedaan afinitas warna karena permeabilitas membran sel yang lebih tinggi pada spermatozoa yang telah mati, sebagai akibat tidak ada lagi yang memelihara dan mengatur pompa natrium dan kalium sel, digunakan untuk menghitung persentase spermatozoa yang hidup dan mati. Spermatozoa yang masih hidup akan tetap tidak berwarna saat diberi pewarnaan eosin 2 %, karena eosin yang terikat pada natrium dengan mekanisme pompa natrium akan terdorong keluar. Pada spermatozoa yang telah mati, tidak terdapat perbedaan potensial ion natrium dan kalium antara didalam dan diluar sel, sehingga eosin yang berikatan dengan natrium akan dengan mudah berdifusi dan menunjukkan warna merah pada kepala spermatozoa saat diberi pewarna eosin 2 %.

Berdasarkan mekanisme dan metode tersebut, hasil penghitungan persentase spermatozoa yang hidup tidak menunjukkan perbedaan yang nyata untuk semua tahapan jalur distribusi yaitu mulai balai inseminasi (52,41%), propinsi (57,36 %), kabupaten (56,27 %) dan pos IB (47,79 %). Foote (1962) menyatakan bahwa dibutuhkan 50 % spermatozoa yang hidup dan motil untuk dipakai dalam inseminasi. Untuk lebih lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rataan persentase spermatozoa hidup pada setiap jalur distribusi

Tahapan	Hidup (%)
BIB Lembang	52,41 ^A
Propinsi (SPIB I)	57,35 ^A
Kabupaten (SPIB II)	56,21 ^A
Pos IB	47,79 ^A
Rata-rata	53,44

Angka diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

Jika dibandingkan dengan persentase motilitas, terlihat persentase hidup lebih tinggi pada setiap tahap jalur distribusi (Tabel 3 dan 4.). Hal ini menunjukkan bahwa banyak diantara spermatozoa yang masih hidup namun tidak motil atau hanya bergerak secara abnormal.

4.4 Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Penentuan jumlah dan macam abnormalitas spermatozoa dalam suatu ejakulat harus dipakai bersamaan dengan pemeriksaan-pemeriksaan lain seperti penentuan motilitas, konsentrasi dan jumlah sperma yang hidup dan mati. Secara keseluruhan persentase abnormalitas spermatozoa menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada setiap tahapan jalur distribusi (Tabel 5.).

Tabel 5. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap tahap jalur distribusi

Tahapan	Abnormalitas (%)
BIB Lembang	31,26 ^A
Propinsi (SPIB I)	31,62 ^A
Kabupaten (SPIB II)	31,00 ^A
Pos IB	33,37 ^A
Rata-rata	31,82

Angka diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

Abnormalitas spermatozoa pada setiap tahap ialah : balai inseminasi 31,26 %, propinsi 31,62 %, kabupaten 31,00 %, dan pos IB 33,37 %. Angka-angka tersebut secara statistik menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Menurut Toelihere (1981), sapi dengan spermatozoa yang abnormal melewati 30-35% menunjukkan adanya infertilitas atau ketidaksuburan pejantan tersebut. Pada tahap pos IB memiliki nilai persentase hidup yang rendah (47,79 %) dengan nilai abnormalitas yang tinggi (33,37 %) dan merupakan paling tinggi pada abnormalitas spermatozoa. Hal ini dapat disebabkan oleh proses distribusi dimana sampel yang diperiksa akan mengalami pemindahan kontainer yang berulang-ulang. Pemindahan tersebut mengakibatkan terjadinya pemaparan suhu dari mulai suhu yang rendah (-196°C) ke suhu lingkungan yang tinggi (25°C), kemudian kembali lagi ke suhu yang rendah. Adanya fluktuasi suhu yang terjadi berulang-ulang mengakibatkan banyak kerusakan pada spermatozoa. Minimnya bahan N_2 cair dalam kontainer dapat menyebabkan suhu kontainer naik mencapai suhu -150°C yang juga dapat mengakibatkan kerusakan pada spermatozoa. Sedangkan menurut Toelihere (1981) menyatakan bahwa perjalanan atau pengangkutan yang jauh dibawah kondisi-kondisi yang buruk seperti kepanasan atau kedinginan yang berlebihan, dan kelemahan fisik dapat menurunkan kualitas semen dan fertilitas hewan jantan.

4.2 Persentase Membran Plasma Utuh dengan Uji HOS Test pada Setiap Tahap Jalur Distribusi.

Kriopreservasi spermatozoa menyebabkan serangkaian hasil yang merugikan yang ditandai dengan penurunan fertilitas. Diantara perubahan ini kerusakan

integritas membran plasma atau tudung akrosom merupakan indikasi kerusakan terbesar dari fungsi yang hilang (Varcancel *et al.* 1994).

Integritas membran tidak hanya penting untuk metabolisme namun juga perubahan-perubahan tertentu dalam komponen membran terutama selama proses fertilisasi. Kerusakan membran plasma akan menyebabkan hilangnya motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi karena lepasnya komponen seluler dan inaktivasi protein –protein enzim penting didalam akrosom.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada setiap tahap yaitu balai inseminasi (BIB Lembang, propinsi, kabupaten, dan pos IB menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan nilai berturut-turut adalah 42,87 %, 41,91 %, 44,11 %, 36,56 %. Nilai terendah ditunjukkan pada tahapan pos IB, yang dapat disebabkan oleh kerusakan membran, baik yang disebabkan oleh cekaman dingin, stress osmotik karena lamanya waktu pembekuan dan kerusakan akibat pengangkutan dari pusat sampai ke pos IB (Tabel 6.).

Tabel 6. Rataan persentase MPU pada setiap tahap jalur distribusi

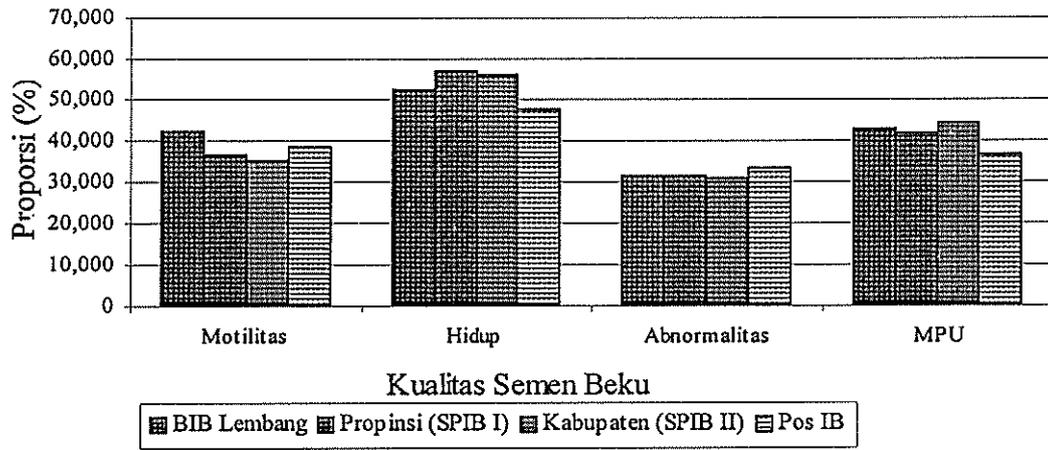
Tahapan	MPU (%)
BIB Lembang	42,87 ^A
Propinsi (SPIB I)	41,91 ^A
Kabupaten (SPIB II)	44,11 ^A
Pos IB	36,56 ^A
Rata-rata	41,37

Angka diikuti huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$)

Nilai standar minimal untuk persentase MPU belum ditetapkan oleh balai. Nilai ini berada diatas nilai dari hasil penelitian Evans dan Maxwell (1986) yang menyatakan bahwa persentase MPU untuk semen beku sapi sebesar 30 %.

Berdasarkan hasil penelitian untuk ternak yang lain yaitu untuk domba dengan metode HOS test adalah $65,7 \pm 1,2$ % (Soderquist *et al.* 1997). Sedangkan Werdhany (1999) menyatakan bahwa persentase MPU untuk kambing Peranakan Etawah adalah sebesar 38,19 %.

Pada semua tahapan distribusi, nilai persentase motilitas tidak berbeda jauh dibandingkan persentase MPU (Tabel 3 dan 6). Hal ini dapat dijelaskan karena secara fisiologis terdapat hubungan tidak langsung antara keutuhan membran plasma dengan motilitas. Motilitas dapat terjadi karena daya gerak fibril-fibril mikrotubul dalam ekor spermatozoa yang disebabkan adanya energi. Energi dihasilkan dari metabolisme spermatozoa hidup yang berlangsung dalam mitokondria. Dengan demikian tingginya persentase motilitas pasti akan diikuti dengan tingginya nilai persentase MPU dan tentu saja persentase hidup spermatozoa. Namun, fosforilasi untuk menghasilkan energi lebih besar karena adanya reaksi mitokondria kopling, sehingga pada saat terjadi kerusakan membran plasma telah terlebih dahulu berlangsung dan terbentuk ATP sebagai sumber energi yang kemudian dipergunakan sebagai daya gerak. Pada kondisi ini apabila kita lakukan pemeriksaan terhadap motilitas dan MPU akan didapatkan persentase motilitas yang lebih tinggi dari persentase MPU. Namun untuk spermatozoa seperti ini, akan segera kehilangan motilitasnya apabila dilakukan inkubasi pada suhu 37°C . Secara keseluruhan rata-rata motilitas, persentase hidup dan abnormalitas, serta persentase MPU dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram rata-rata motilitas, persentase hidup dan abnormalitas, serta persentase MPU semen beku pada tiap tahap distribusi.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa pada setiap tahapan jalur distribusi yang dimulai BIB Lembang, Propinsi (SPIB I), Kabupaten (SPIB II), dan Pos IB menunjukkan kualitas semen beku sapi yang tidak berbeda nyata. Rataan persentase keutuhan membran plasma semen beku sapi memiliki peringkat yang sama. Nilai kualitas semen beku yang ditunjukkan berada dibawah *standard quality control* yang ditetapkan berdasarkan standar minimal untuk pemeriksaan konsentrasi dan *post thawing motility*. Sedangkan pada persentase hidup dan MPU menunjukkan hasil yang baik. Berdasarkan hal tersebut maka uji HOS test dapat dipergunakan untuk pemeriksaan kualitas semen beku sebagai pelengkap uji kualitas semen beku.

5.2 Saran

Saran untuk kelanjutan penelitian ini adalah perlu dilakukan uji laboratoris dengan sampel yang lebih lengkap untuk menentukan kualitas semen beku yang konstan dari produsen sampai konsumen. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam skala lapangan untuk membuktikan kualitas semen. Untuk balai inseminasi, sangat penting ditetapkan prosedur dan standar minimal untuk pemeriksaan konsentrasi secara kuantitatif (metode haemositometer), persentase abnormalitas dan persentase keutuhan membran plasma untuk menunjukkan kualitas semen beku yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariguno, D. dan A. Tjokronegoro. 1988. Seluk-beluk tentang *hypoosmotic swelling test*. *Medika*. 12 : 1117 – 1119.
- Campbell, R.C., H.M. Dott and T.D. Glover. 1957. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agri. Sci.* 48:1-8.
- Ditjennak dan ASOHL. 1999. Buku Statistik Peternakan. Direktorat Bina Program. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Ditjennak. 2000. Petunjuk Teknis Pengawasan Mutu Bibit Ternak. Direktorat Perbibitan. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Evans, G and WMC. Maxwell. 1987. Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats. Bouterworth. Sydney.
- Foote, R. H. 1962. Physiological aspect of artificial insemination, pp. 313 – 343. *In* : Cole, H. H. and P. T. Cupps. (eds.). *Reproduction Domestic Animals*. 2nd Ed. Academic Press, New York and London.
- Hafez, E. S. E. 1993. Semen evaluation in reproduction in farm animals. *In* : Hafez E.S.E. (ed.). *Reproduction in Farm Animal*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Jeyendran, R. S. and L. J. Zaneveld. 1986. Introduction for *Hypoosmotic Swelling Test*. Short Course : *Reproduction Andrology and Non Hormonal Contraception*. Luke's Medical Centre. Chicago.
- Jainudeen, M. R., and E. S. E. Hafez. 1987. Reproductive cycle of sheep and goats. *In* : E. S. E. Hafez (ed.). *Reproduction in Farm Animal*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Mann, T. 1969. Physiology of semen and of the male reproductive tract. 2nd Ed. *In* : Cole, H.H. and P. T. Cupps (eds.). *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press. New York.
- Pace, M.M, J.J. Sullivan, F.I. Elliot, E.F. Graham and G.H. Coulter. 1981. Effects of thawing temperature number of spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml french straws. *J. Anims. Sci.* 53:693 –701.
- Parks, J.E and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-220.

- Salisbury, G.W. dan N.L. Vande Mark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gajah Mada University Press.
- Salamon, S. and A.J. Ritar. 1982. Deep freezing of Angora goat semen : effects of diluent composition and methode and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust.Biol.Sci.* 35:295-303.
- Schuh, H. 1988. Investigations to maximize the semen dilution of positive performance-tested bulls for artificial insemination. Thesis. Munich.
- Schuh, H. 2001. Comparison Between Liquid and Deep Frozen Semen for Artificial Insemination in Developing and Developed Countries. <http://www.fao.org/ag/aga/agap/war/warall/u6600b0m.htm>
- Singh, M.P, A.K. Sinha, B.K. Singh, and R.L. Prasad. 1992. Effect of cryoprotectant on release of various enzymes of buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 45:405-416.
- Soderquist, L., N. Madrid-Bury and H. Rodriguez-Martinez. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48:1115-1125.
- Toelihere, M.R. 1981. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Mutiara. Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Valcarcel, A, M.A. de las Heras, L.Perez, D.F. Moses and H.Baldassarre. 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 41:483-489.
- White, I.G. 1978. Mammalian Semen. In : Hafez, E.S.E. Reproduction in Farm Animals. 3rd Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Werdhany, W.I. 1999. Efektivitas penambahan α - tokoferol di dalam pengencer tris dan susu skim terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. Thesis. Pascasarjana IPB.
- Zesfin, Z. Zen, D. Putra, dan Ramadalen. 2001. Potensi Spermatozoa pada Epididymis Testis Sapi Pesisir. Panduan Seminar dan Abstrak. Pengembangan Peternakan Berbasis Sumberdaya Lokal. Fakultas Peternakan IPB.

LAMPIRAN

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 12

Analysis of Variance Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

SAMPEL 4 Lbg kab pos pro

Number of observations in data set = 32

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 13

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: KONS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	135.62750000	45.20916667	0.58	0.6324
Error	28	2178.75250000	77.81258929		
Corrected Total	31	2314.38000000			

R-Square	C.V.	Root MSE	KONS Mean
0.058602	14.59850	8.82114444	60.42500000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SAMPEL	3	135.62750000	45.20916667	0.58	0.6324

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 14

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: MOT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	227.82250000	75.94083333	1.36	0.2744
Error	28	1560.27250000	55.72401786		
Corrected Total	31	1788.09500000			

R-Square	C.V.	Root MSE	MOT Mean
0.127411	19.52233	7.46485217	38.23750000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SAMPEL	3	227.82250000	75.94083333	1.36	0.2744

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 15

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: HDP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	447.85093750	149.28364583	1.28	0.3001
Error	28	3262.44625000	116.51593750		
Corrected Total	31	3710.29718750			

R-Square	C.V.	Root MSE	HDP Mean
0.120705	20.19859	10.79425484	53.44062500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SAMPEL	3	447.85093750	149.28364583	1.28	0.3001

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 16

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: ABN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	27.55250000	9.18416667	0.46	0.7126
Error	28	559.38250000	19.97794643		
Corrected Total	31	586.93500000			

R-Square	C.V.	Root MSE	ABN Mean
0.046943	14.05004	4.46966961	31.81250000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SAMPEL	3	27.55250000	9.18416667	0.46	0.7126

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 17

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: MPU

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	265.54093750	88.51364583	1.13	0.3521
Error	28	2184.51125000	78.01825893		
Corrected Total	31	2450.05218750			

	R-Square	C.V.	Root MSE	MPU Mean
	0.108382	21.35298	8.83279451	41.36562500

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SAMPEL	3	265.54093750	88.51364583	1.13	0.3521

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 18

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: KONS

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 28 MSE= 77.81259

Number of Means 2 3 4

Critical Range 9.035 9.493 9.789

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	SAMPEL
A	63.625	8	Lbg
A			
A	60.438	8	kab
A			
A	59.700	8	pos
A			
A	57.938	8	pro

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 19

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MOT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 28 MSE= 55.72402

Number of Means 2 3 4

Critical Range 7.646 8.033 8.284

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	SAMPEL
A	42.363	8	Lbg
A			
A	38.650	8	pos
A			
A	36.675	8	pro
A			
A	35.263	8	kab

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 20

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: HDP

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 28 MSE= 116.5159

Number of Means 2 3 4

Critical Range 11.06 11.62 11.98

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	SAMPEL
A	57.350	8	pro
A			
A	56.213	8	kab
A			
A	52.413	8	Lbg
A			
A	47.788	8	pos

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 21

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: ABN

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 28 MSE= 19.97795

Number of Means 2 3 4

Critical Range 4.578 4.810 4.960

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	SAMPEL
A	33.375	8	pos
A			
A	31.613	8	pro
A			
A	31.263	8	Lbg
A			
A	31.000	8	kab

The SAS System 18:25 Friday, January 10, 1997 22

Analysis of Variance Procedure

Duncan's Multiple Range Test for variable: MPU

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate

Alpha= 0.05 df= 28 MSE= 78.01826

Number of Means 2 3 4

Critical Range 9.047 9.506 9.802

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	SAMPEL
A	44.113	8	kab
A			
A	42.875	8	Lbg
A			
A	41.913	8	pro
A			
A	36.563	8	pos

