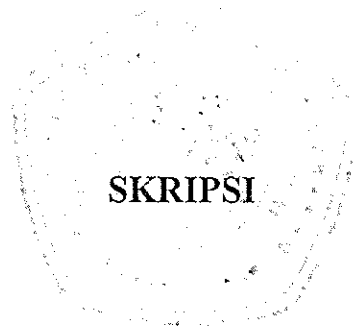


B/IKH  
2001  
0010

**KETAHANAN SPERMATOZOA KUCING YANG DIKOLEKSI  
DARI KAUDA EPIDIDIMIS DAN VAS DEFEREN DALAM  
MEDIUM TALP DAN PBS**



**EKO SUSANTO  
B01496168**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
2001**

TANPA IBARAT TERANG DI MIMPI  
ORANG MENIMBA AIR SAMUDRA  
ORANG BERDOA TAK UNJUNG HENTI DI DALAM  
KERJA  
ORANG BEKERJA DALAM DOA

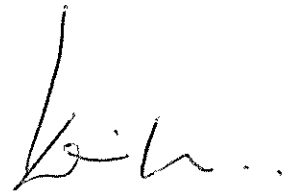
*Aku Persembahkan Karyaku Ini Untuk  
Yang Maha Agung,  
Ibu, Bapak, Adikku Yoyok  
Serta Yuni*

Judul : Ketahanan Spermatozoa Kucing yang Dikoleksi dari Kauda Epididimis dan Vas Deferen dalam Medium TALP dan PBS  
Nama : EKO SUSANTO  
NRP : B01496168

Menyetujui,

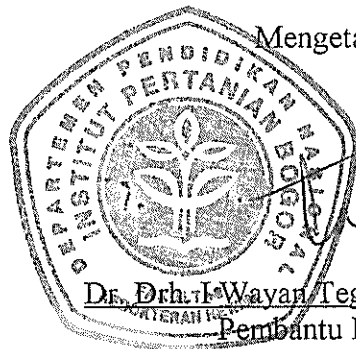


Dr. Drh. Arief Boediono  
Pembimbing I



Drh. Kusdiantoro Mohamad  
Pembimbing II

Mengetahui,



Dr. Drh. I Wayan Teguh Wibawan, MS  
Pembantu Dekan I

Tanggal Lulus : 15 Maret 2001

**KETAHANAN SPERMATOZOA KUCING YANG DIKOLEKSI  
DARI KAUDA EPIDIDIMIS DAN VAS DEFEREN  
DALAM MEDIUM TALP DAN PBS**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana  
pada Fakultas Kedokteran Hewan  
Institut Pertanian Bogor

**EKO SUSANTO  
B01496168**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
2001**

## RINGKASAN

**EKO SUSANTO.** Ketahanan Spermatozoa Kucing yang Dikoleksi dari Kauda Epididimis dan Vas Deferen dalam Medium TALP dan PBS. Dibimbing oleh **Dr. Drh. ARIEF BOEDIONO** dan **Drh. KUSDIANTORO MOHAMAD.**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa kucing yang dikoleksi dari kauda epididimis dan vas deferen dalam medium TALP dan PBS setelah preservasi atau penyimpanan testis pada suhu 5°C. Spermatozoa dikoleksi dari kauda epididimis dan vas deferen yang diambil dari testis yang telah disimpan selama 0, 3, 5 dan 7 hari pada suhu 5°C. Spermatozoa dikoleksi dari kauda epididimis dengan metode aspirasi, sedangkan spermatozoa dari vas deferen dikoleksi dengan metode pembilasan. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa diamati selama 16 jam (0, 4, 8 dan 16 jam) inkubasi *in vitro*. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa medium TALP mampu mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimal lebih baik daripada medium PBS. Pada preservasi sampai hari ke-3 motilitas spermatozoa mampu dipertahankan sampai jam ke-16 inkubasi *in vitro*, sedangkan pada preservasi hari ke-5 dan ke-7 keutuhan membran plasma spermatozoa hanya mampu dipertahankan sampai jam ke-8 inkubasi *in vitro*.

## SUMMARY

**EKO SUSANTO.** *Viability of Cat Spermatozoa Collected from Cauda Epididymis and Vas Deference in TALP and PBS Medium. Under Supervision : Dr. Drh. ARIEF BOEDIONO and Drh. KUSDIANTORO MOHAMAD.*

*The aim of this research is to find out the motility and the integrity plasma membrane cat spermatozoa collected from cauda epididymis and vas deference during the spermatozoa incubation in TALP and PBS medium after testis preservation in 5°C. Spermatozoa was collected from cauda epididymis and vas deference which have been preservated until 0, 3, 5 and 7 days at 5°C. The cauda epididymis spermatozoa was collected by aspirating method and the vas deference spermatozoa was collected by flushing method. The motility and integrity of plasma membrane was evaluated during 16 hours (0h, 4h, 8h and 16h) in vitro incubation. The results show that TALP medium can endure the motility and integrity of plasma membrane spermatozoa epididimal better than PBS medium. On 3<sup>th</sup> day of preservation, the motility of spermatozoa can be endured until in vitro incubation 16<sup>th</sup> hour, and on 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of preservations integrity of plasma membrane only can be endured until 8<sup>th</sup> hour in vitro incubation.*

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Lamongan pada tanggal 28 Oktober 1977 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, anak dari pasangan Gatot Sujanto dan Ning Kustiyah.

Penulis menempuh pendidikan di SD 1 Sukodadi, Lamongan (1984-1990), SMP 1 Lamongan (1990-1993), SMA 2 Lamongan (1993-1996) dan masuk Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor pada tahun 1996 melalui jalur Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN).

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur hanya kepada Allah S.W.T. yang telah memberikan karunia-Nya yang sangat besar sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Ketahanan Spermatozoa Kucing yang Dikoleksi dari Kauda Epididimis dan Vas Deferen dalam Medium TALP dan PBS.

Penulis dengan penuh hormat mengucapkan terima kasih kepada Dr. Drh. Arief Boediono selaku pembimbing pertama dan Drh. Kusdiantoro Mohamad selaku pembimbing kedua yang telah banyak membantu dan membimbing dalam menyelesaikan pembuatan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada :

1. Drh. Ita Djuwita, M. Phil dan Drh. Gunanti, MS yang telah membantu penulis selama melaksanakan penelitian.
2. Keluarga besar Laboratorium Embriologi dan teman-teman sepenelitian Pujiono, Yusman, Rindang, Tamlin, Cecep, Dedi, Bebel, Endah dan Dina atas segala bantuan dan dukungannya.
3. Dra. R. Iis Arifiantini MS. yang telah memberikan saran-saran untuk perbaikan skripsi ini.
4. Drh. Achmad Sjahir yang telah membimbing dan memberikan motivasi kepada penulis selama kuliah di FKH-IPB.
5. Ibu, Bapak dan Yoyok serta keluarga di Lamongan atas do'a dan kasih sayangnya.
6. Yuni yang telah memberikan cinta dan kasih sayangnya.

7. Teman-temanku di WG 5 & 2 (Tutut, Hendri, Juki, Nizar, D'Ef, Budi, Ismed, Rulli, Lukman, Dodi dan Yos), SK 24 (Dewi, Indah, Ina, Ami, Adun dan Mas Andi) dan teman seperjuangan Seno, Armin, Hendro, Deni, Rudi, n'Dollik serta Aldo.

Akhirnya, semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu kedokteran hewan dan kepada siapapun yang menggunakannya.

Bogor, Maret 2001

Penulis



## DAFTAR ISI

|  |     |
|--|-----|
| DAFTAR ISI.....                                  | iv  |
| DAFTAR TABEL.....                                | v   |
| DAFTAR GAMBAR.....                               | vi  |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                             | vii |
| BAB I. PENDAHULUAN.....                          | 1   |
| BAB II. MATERI DAN METODA.....                   | 7   |
| 2.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....            | 7   |
| 2.2. Metoda Penelitian.....                      | 7   |
| 2.2.1. Koleksi Spermatozoa.....                  | 7   |
| 2.2.2. Evaluasi.....                             | 8   |
| 2.2.2.1.Motilitas.....                           | 8   |
| 2.2.2.2.Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa..... | 8   |
| 2.3. Rancangan Percobaan.....                    | 9   |
| 2.4. Analisa Data.....                           | 10  |
| BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN.....               | 11  |
| BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN.....                | 23  |
| DAFTAR PUSTAKA.....                              | 24  |

## DAFTAR TABEL

|          |  |    |
|----------|--|----|
| TABEL 1. | Persentase Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa yang Dikoleksi dari Kauda Epididimis dalam Medium TALP..... | 18 |
| TABEL 2. | Persentase Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa yang Dikoleksi dari Vas Deferen dalam Medium TALP.....      | 20 |

## DAFTAR GAMBAR

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| GAMBAR 1. | HOS TEST Positif.....  | 9  |
| GAMBAR 2. | Motilitas Spermatozoa Hasil Koleksi dari Kauda Epididimis.....               | 12 |
| GAMBAR 3. | Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Hasil Koleksi dari Kauda Epididimis..... | 13 |
| GAMBAR 4. | Motilitas Spermatozoa Hasil Koleksi dari Vas Deferen.....                    | 14 |
| GAMBAR 5. | Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Hasil Koleksi dari Vas Deferen.....      | 15 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| LAMPIRAN 1. | Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Hasil Koleksi dari Kauda Epididimis dan Vas Deferen Dalam Medium TALP dan PBS..... | 27 |
| LAMPIRAN 2. | Komposisi Medium TALP.....   | 29 |
| LAMPIRAN 3. | Komposisi Medium PBS.....  | 30 |
| LAMPIRAN 4. | Komposisi Medium Hypo-Osmotic Test.....  | 31 |

# BAB I

## PENDAHULUAN

Terdapat 7 famili, 92 genus dan 238 spesies dalam ordo karnivora. Lebih dari 100 spesies tersebut terancam punah menurut *Convention of International Trade in Endangered Species* (CITES). Blackfooted Ferret (*Mustella nigrites*), Florida Panther (*Felis concolor coryi*) dan Red Wolf (*Canis rufus*) adalah tiga spesies yang terancam punah di Amerika Utara (Howard, 1993). Indonesia yang merupakan negara beriklim tropis mempunyai 9 genus dari ordo karnivora yang juga terancam punah. Sembilan genus tersebut adalah Tiger (*Panthera tigris*), Leopard (*Panthera pardus*), Fishing Cat (*Felis viverrina*), Binturong (*Arctictus binturong*), Tangalung Civet (*Viverra tangalunga*), Hairy-nosed Catter (*Lutra sumatrana*), Malayan Sunbear (*Halarctos malayanus*), Hog Budger (*Arctoryx collovis*) dan Wild Dog atau Dhole (*Cuan alpinus*) (Carter, 1979). Hewan-hewan tersebut terancam punah yang diakibatkan semakin menyempitnya habitat mereka akibat perburuan liar untuk kepentingan manusia.

Berbagai usaha telah dilakukan untuk mencegah kepunahan hewan tersebut. Suaka margasatwa dan penangkaran-penangkaran hewan langka merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan populasinya. Tetapi dalam usaha penangkaran tersebut ditemukan banyak kendala terutama dalam masalah reproduksi. Masalah-masalah tersebut bisa diakibatkan oleh kematian hewan dan sulitnya hewan untuk beradaptasi dengan lingkungan baru.

Bioteknologi reproduksi di bidang peternakan merupakan langkah awal dalam usaha peningkatan populasi. Bioteknologi reproduksi dimulai dengan ditemukannya teknologi inseminasi buatan (IB), transfer embrio (TE), fertilisasi *in vitro* (FIV), *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), kloning dan teknologi lain yang terkait. Saat ini penelitian mengenai transfer embrio dan fertilisasi *in vitro* telah dikembangkan di Indonesia terutama pada hewan ternak. Pengembangan bioteknologi di bidang reproduksi peternakan diharapkan dapat diaplikasikan dalam usaha untuk meningkatkan populasi hewan langka.

Proses reproduksi tidak dapat dipisahkan dengan proses fertilisasi. Fertilisasi adalah pertemuan dan bergabungnya dua sel gamet, yaitu oosit dari hewan betina dan spermatozoa dari hewan jantan, menjadi satu sel yang disebut zigot (Kanagawa *et al.*, 1989). Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) proses ini meliputi penetrasi spermatozoa melalui kumulus ooforus, korona radiata, zona pelusida dan masuk ke dalam vitelus ovum. Dalam vitelus, kepala spermatozoa membesar membentuk pronukleus jantan. Ovum mengalami aktivasi dan meneruskan kembali proses miosis dari metafase II sampai terlepasnya benda kutub II. Hasilnya berupa ovum dengan komplemen kromosom haploid dan pembentukan benda kutub kedua. Kromatin akan memadat membentuk pronukleus betina. Pronukleus jantan dan betina akan bertemu dan melebur (*singami*). Ovum yang telah difertilisasi ini disebut zigot. Fertilisasi pada mamalia berbeda dengan fertilisasi pada hewan vertebrata tingkat rendah maupun hewan invertebrata. Pada hewan vertebrata tingkat rendah maupun hewan invertebrata fertilisasi terjadi di luar tubuh hewan tersebut (*eksternal*). Perbedaan ini menyebabkan perbedaan pada kondisi lingkungan fisik dan kimiawi

yang memungkinkan proses fertilisasi berlangsung. Pada mamalia tempat fertilisasi pada hampir semua hewan ternak terjadi pada bagian bawah ampulla tuba fallopii (Toelihere, 1979). Kondisi normal pada saluran reproduksi harus optimal untuk mendukung terjadinya proses fertilisasi.

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan dapat membuktikan bahwa fertilisasi pada mamalia dapat dilakukan di luar tubuh. Proses ini disebut fertilisasi ekstra korporeal atau fertilisasi *in vitro* (FIV) (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) merupakan rangkaian kegiatan reproduksi di luar tubuh melalui pematangan oosit hasil koleksi dari ovarium, perlakuan fertilisasi dan pengembangan embrio dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan menggunakan medium tertentu. Banyak aspek yang harus diperhatikan dalam teknik fertilisasi *in vitro*, antara lain penanganan sel telur dan penanganan spermatozoa. Fertilisasi *in vitro* banyak memberikan keuntungan, antara lain yaitu tidak memerlukan biaya pemeliharaan ternak donor, pakan dan hormon superovulasi untuk menghasilkan embrio yang baik. Oosit yang digunakan selain didapatkan dari hewan betina hidup juga dapat berasal dari hewan betina postmortem dari rumah potong hewan (RPH) (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Spermatozoa bisa didapatkan dari ejakulat dan juga dapat berasal dari hewan jantan postmortem. Hal ini sesuai dengan laporan Boediono (1995) yang menyatakan bahwa infertilitas dan kematian bukan merupakan berakhirnya proses reproduksi. Selain penanganan sel telur dan spermatozoa, peranan medium juga mempunyai pengaruh yang penting dalam keberhasilan teknik ini.

Spermatozoa yang digunakan dapat berasal dari spermatozoa ejakulat maupun spermatozoa non ejakulat. Penampungan sperma ejakulat biasa menggunakan metode vagina buatan maupun dengan elektroejakulator. Pemijatan pada kelenjar aksesoris per rektal juga dapat digunakan untuk mengkoleksi spermatozoa. Pengkoleksian semen dengan elektroejakulator atau dengan vagina buatan pada hewan yang dikehendaki dapat dilakukan tanpa resiko bagi hewannya dan juga bagi pengkolektornya. Metode ini akan memberikan spermatozoa ejakulat normal meskipun metode ini membutuhkan *teaser* atau betina estrus serta tidak bisa digunakan pada beberapa spesies tertentu. Teknik ini dapat dilakukan pada beberapa spesies seperti Blue Fox (*Alopex lagopus*) dan Silver Fox (*Vulpes vulpes*) (Howard, 1993). Pada kucing koleksi spermatozoa dapat dilakukan dengan menggunakan elektroejakulator setelah kucing dibius (Axner *et al.*, 1998). Howard (1993) juga melaporkan bahwa koleksi spermatozoa juga dapat dilakukan pada hewan postmortem. Metode ini meliputi maserasi atau pembilasan spermatozoa dari duktus deferens dan kauda epididimis dalam cairan ion kuat yang tinggi atau cairan krioprotektan. Kauda epididimis dan duktus deferens dapat digunakan sebagai sumber koleksi spermatozoa karena dalam kauda epididimis terjadi proses pematangan spermatozoa dan juga sebagai depot spermatozoa (Toelihere, 1979).

Untuk keberhasilan fertilisasi *in vitro*, spermatozoa yang digunakan harus mempunyai motilitas yang tinggi, mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom pada saat yang tepat serta membutuhkan membran yang masih aktif (Correa dan Zavos, 1994). Kapasitasi adalah suatu proses persiapan atau perubahan fisiologis di dalam saluran kelamin betina untuk mempertinggi daya fertilisasi spermatozoa. Kapasitasi



spermatozoa sangat penting dalam teknik fertilisasi *in vitro* sebab spermatozoa yang belum mengalami kapabilitas tidak dapat menembus zona pelusida oosit (Kanagawa *et al.*, 1989). Kapabilitas spermatozoa secara *in vivo* dapat terjadi di dalam uterus dan atau tuba fallopii (Supriatna dan Pasaribu, 1992). First dan Parish (1987) juga melaporkan bahwa kapabilitas juga dapat terjadi pada epididimis. Kapabilitas dapat dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan medium kultur yang berasal dari serum dan cairan folikel serta penanganan spermatozoa dengan menggunakan berbagai medium yang berbeda atau larutan ion kuat dalam konsentrasi yang tinggi atau ionophore (Kanagawa *et al.*, 1989). Motilitas spermatozoa juga mempunyai peranan yang sangat penting sewaktu proses pertemuan dengan ovum. Pada umumnya terdapat korelasi yang baik antara motilitas dengan kapabilitas fertilisasi (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Dalam FIV diperlukan medium yang berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk pematangan oosit, kapabilitas spermatozoa, fertilisasi dan perkembangan embrio. Medium kultur ini susunan komponennya dibuat menyerupai komponen pada fertilisasi *in vivo*.

Medium yang biasa digunakan dalam penanganan spermatozoa diantaranya adalah *phosphate buffered saline* (PBS) dan *tyrode albumin lactate pyruvate* (TALP). Medium TALP sering digunakan karena medium ini merupakan medium kompleks yang dapat mempertahankan pH karena memiliki sistem buffer fisiologis yang dilakukan oleh HEPES (N-ethanesul formicacid) (Bavister,1981). Kitu (1997) menyatakan bahwa TALP merupakan medium pematangan dan medium untuk fertilisasi.

Medium PBS merupakan medium yang sering digunakan dalam penelitian menggunakan sel hidup karena mengandung komposisi zat-zat nutrisi seperti glukosa dan garam-garam anorganik serta mengandalkan kemampuan buffer dari fosfat (Malole, 1990). Donoghue *et al.* (1996) melaporkan bahwa medium PBS dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa kalkun sampai 76%. Penelitian yang menggunakan medium PBS untuk penanganan spermatozoa juga dilakukan oleh Kurniawan (1999) dan Pujiono (1999).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa kucing yang dikoleksi dari kauda epididimis dan vas deferens dalam medium TALP dan PBS setelah preservasi atau penyimpanan testis pada suhu 5°C. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi sumber informasi dalam penelitian berikutnya yang menggunakan spermatozoa kucing dalam penerapan teknik fertilisasi *in vitro* (FIV).

## BAB II

### MATERI DAN METODA

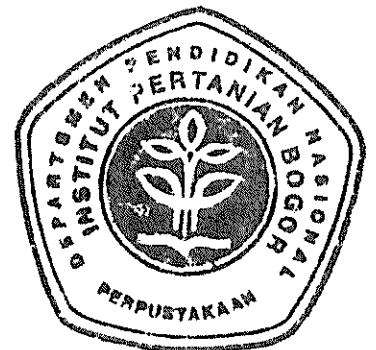
#### 2.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Embriologi bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, antara bulan Agustus 1999 sampai September 1999.

#### 2.2. Metoda Penelitian

##### 2.2.1. Koleksi Spermatozoa

Spermatozoa dikoleksi dari testis kucing setelah operasi kastrasi sebanyak 12 ekor kucing. Testis dimasukkan dalam plastik steril yang telah diberi label dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 5°C selama periode 0, 3, 5 dan 7 hari. Spermatozoa dikoleksi dari kauda epididimis dan vas deferens. Pengkoleksian dilakukan dengan metode aspirasi untuk kauda epididimis dan metode *flushing* (pembilasan) untuk vas deferens. Pengkoleksian spermatozoa dari kauda epididimis dilakukan menggunakan jarum berukuran 26 G yang dihubungkan dengan spuit 1 mL yang telah berisi 0,5 mL medium PBS (Nissui, Jepang) yang telah ditambahkan *bovine serum albumin* (BSA; Sigma. USA) 0,3% serta penisilin 100 IU/mL dan streptomisin 100 mg/mL. Diberlakukan metode yang sama untuk medium TALP. Aspirasi dilakukan sebanyak 5 kali pada tempat yang berbeda. Pujiono (1999)



melaporkan bahwa dengan metode aspirasi didapatkan konsentrasi spermatozoa kucing sebesar  $17,99 \times 10^6/\text{mL}$ .

Pengkoleksian dari vas deferens dengan metode *flushing* dilakukan dengan memotong vas deferens menjadi dua bagian, terhadap masing-masing potongan dilakukan pembilasan dengan medium TALP dan PBS.

## 2.2.2. Evaluasi

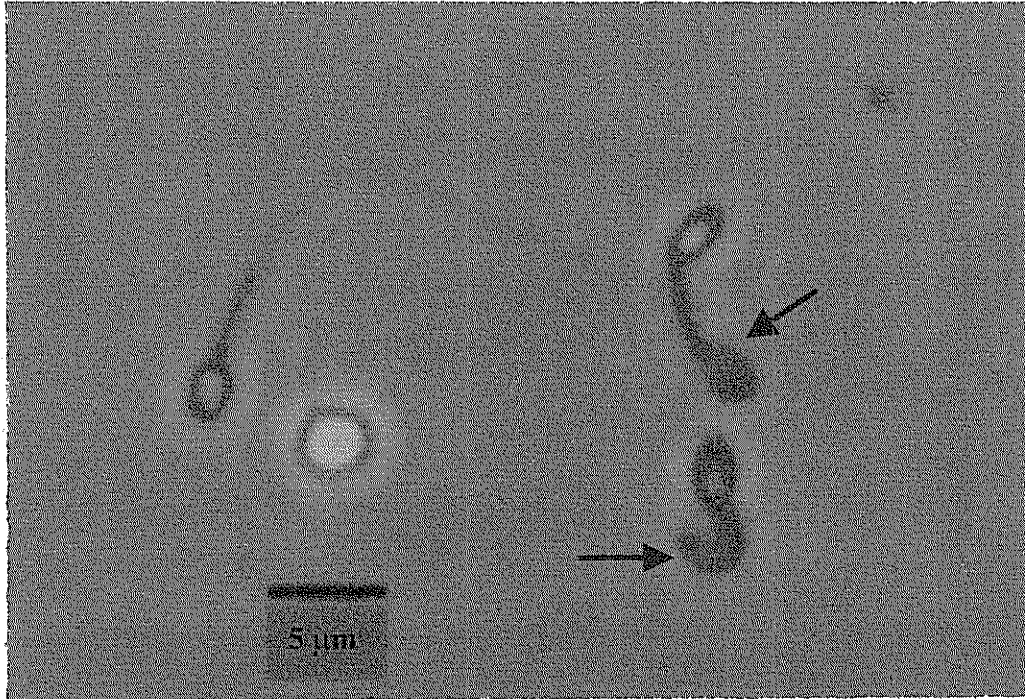
### 2.2.2.1. Motilitas

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan kamar hitung Neubauer di bawah mikroskop fase kontras (Olympus) dengan pembesaran 400X. Penghitungan spermatozoa motil dilakukan secara langsung terhadap spermatozoa yang mempunyai pergerakan ke depan (progresif). Penghitungan secara langsung ini dimungkinkan karena konsentrasi spermatozoa per lapang pandang tidak terlalu padat. Presentase dihitung dari jumlah spermatozoa motil terhadap jumlah total spermatozoa.

### 2.2.2.2. Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa

Keutuhan membran plasma spermatozoa diamati dengan metode yang dilaporkan oleh Correa dan Zavos (1994) yaitu dengan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test). Larutan spermatozoa dalam masing-masing medium sebanyak 2  $\mu\text{L}$  dimasukkan dalam 8  $\mu\text{L}$  medium HOS Test pada tabung Ependorf dan diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 45 menit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus) dengan pembesaran 400X.

Penghitungan dilakukan sampai 100 spermatozoa. HOS Test positif ditandai dengan ekor spermatozoa yang melengkung atau menggembung (Gambar 1).



Gambar 1. HOS Test positif ditandai dengan ekor spermatozoa yang melengkung atau menggembung.

### 2.3. Rancangan Percobaan

Percobaan yang pertama dilakukan adalah untuk mengetahui kemampuan medium TALP dan PBS dalam mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis dan vas deferens selama 16 jam inkubasi *in vitro*. Setelah didapatkan medium yang optimal maka dilanjutkan dengan percobaan kedua untuk mengetahui ketahanan spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis dan vas deferens pada suhu 5°C selama 3, 5 dan 7 hari. Ketahanan

spermatozoa setelah penyimpanan kauda epididimis dan vas deferens dilakukan sesuai pada percobaan pertama dengan menggunakan salah satu medium terbaik. Ulangan di dalam setiap percobaan dilakukan sebanyak tiga kali.

#### **2.4. Analisa Data**

Data yang diperoleh dari setiap parameter hasil pengamatan selama 16 jam dianalisis dengan menggunakan ANOVA yang berpola rancangan acak lengkap (RAL) dan dilanjutkan dengan *Duncan's Test* jika terdapat perbedaan yang nyata. Faktor yang digunakan adalah hari preservasi, yaitu 0, 3, 5 dan 7 serta medium spermatozoa. Parameter yang digunakan adalah motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa selama 16 jam inkubasi *in vitro*.

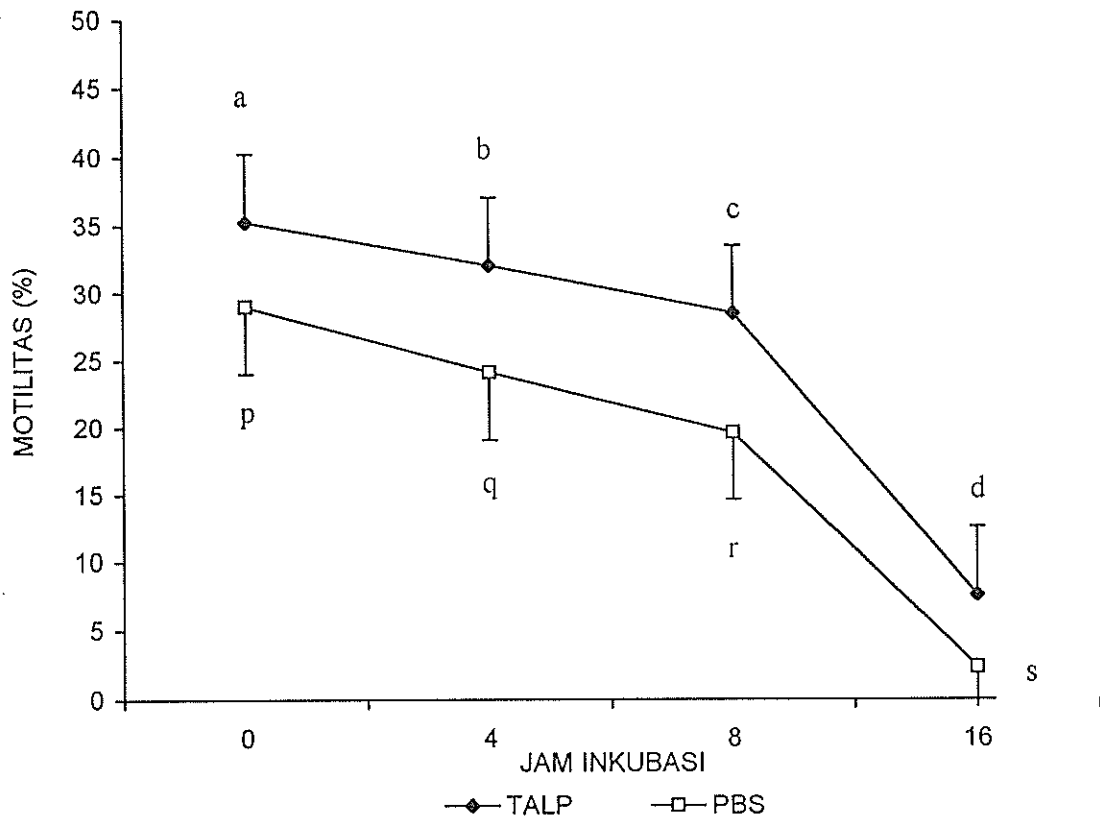
### BAB III

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan motilitas spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis testis setelah inkubasi *in vitro* dalam medium TALP menunjukkan penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) terjadi baik pada jam ke-4 (32,08%), jam ke-8 (28,59%) maupun jam ke-16 (7,63%) jika dibandingkan dengan jam ke-0 (35,27%). Demikian juga pada medium PBS, penurunan motilitas yang nyata ( $P < 0,05$ ) juga terjadi pada jam ke-4 (24,15%), jam ke-8 (19,67%) dan jam ke-16 (2,35%) inkubasi *in vitro* jika dibandingkan dengan jam ke-0 (29,13%). Motilitas spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis dalam medium TALP menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) dibanding dengan medium PBS pada 0, 4, 8 dan 16 jam inkubasi *in vitro*. Medium TALP mampu mempertahankan motilitas spermatozoa koleksi dari kauda epididimis relatif lebih baik dibandingkan dengan medium PBS (Gambar 2; Tabel 3).

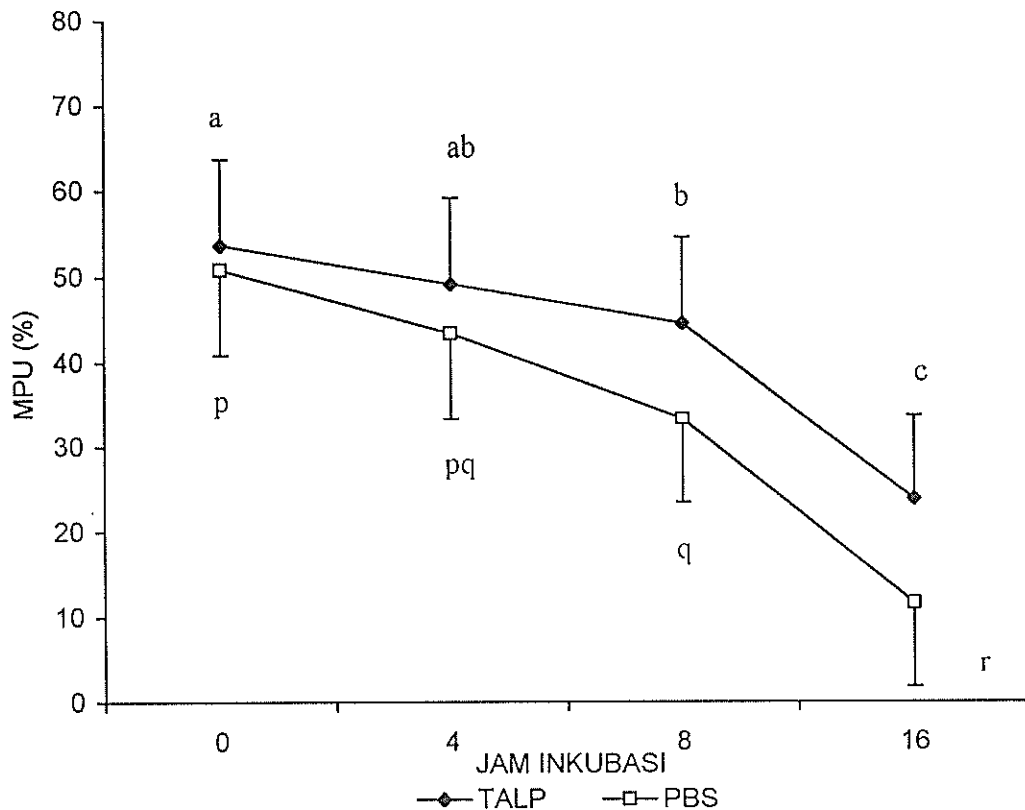
Keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis testis setelah inkubasi *in vitro* dalam medium TALP sampai jam ke-4 (49,25%) dan jam ke-8 (44,76%) inkubasi tidak menunjukkan penurunan yang nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan jam ke-0 (53,73%), tetapi terjadi penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada jam ke-16 (23,95%) inkubasi. Penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) persentase keutuhan membran plasma spermatozoa dalam medium PBS juga baru terjadi pada jam ke-16 (11,76%) jika dibandingkan dengan jam ke-0 (50,87%), jam ke-4 (43,5%) dan jam ke-8 (33,54%) inkubasi *in vitro*. Medium TALP juga mampu

mempertahankan keutuhan membran plasma lebih baik dibandingkan medium PBS ( $P < 0,05$ ) untuk jam inkubasi *in vitro* ke-0, 4, 8 dan 16 (Gambar 3; Tabel 4).



Gambar 2. Motilitas spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis. (a, b, c, d pada medium TALP,  $P < 0,05$ ; p, q, r, s pada medium PBS,  $P < 0,05$ ; TALP > PBS,  $P < 0,05$ )

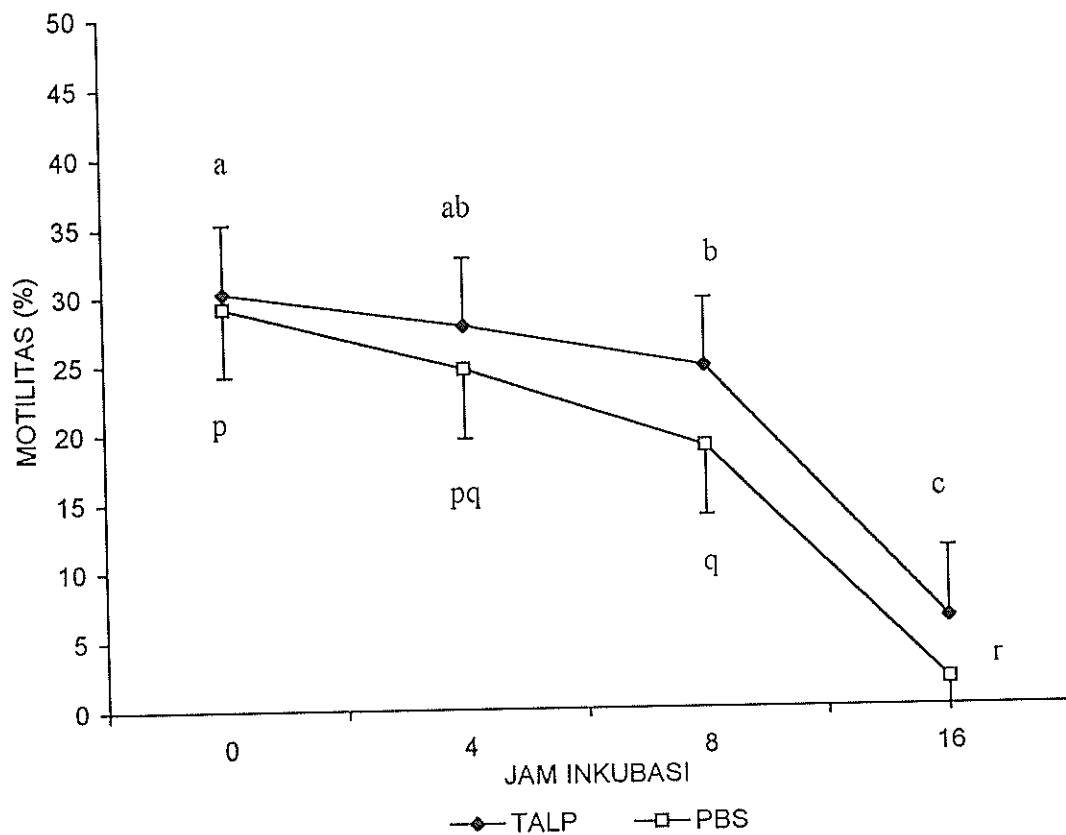




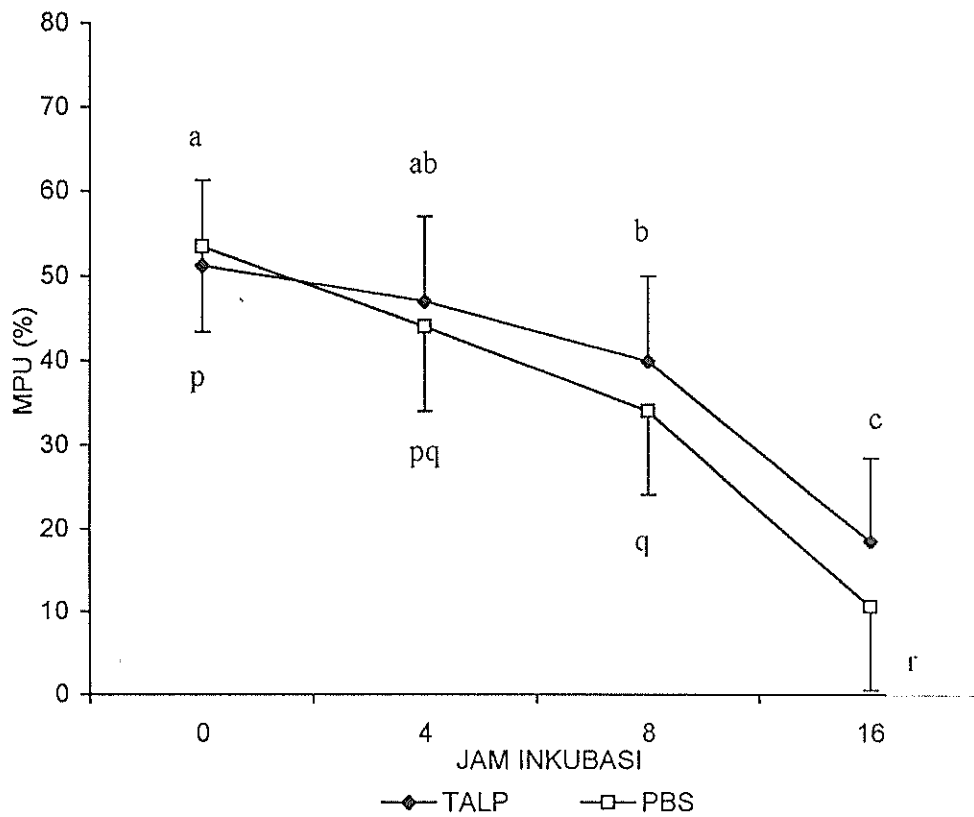
Gambar 3. Keutuhan membran plasma spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis. (a, b, c pada medium TALP,  $P < 0,05$ ; p, q, r pada medium PBS,  $P < 0,05$ ; TALP > PBS,  $P < 0,05$ ) MPU : Membran Plasma Utuh

Motilitas spermatozoa yang dikoleksi dari vas deferens testis setelah inkubasi *in vitro* dalam medium TALP menunjukkan penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada jam ke-16 (6,34%) inkubasi jika dibandingkan dengan jam ke-0 (30,25%), jam ke-4 (27,74%) dan jam ke-8 (24,65%) inkubasi. Penurunan motilitas spermatozoa yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada jam ke-16 (1,87%) jika dibandingkan dengan jam ke-0 (29,15%), jam ke-4 (24,55%) dan jam ke-8 (18,85%) inkubasi *in vitro* juga terjadi dalam medium PBS. Motilitas spermatozoa dalam medium TALP dan PBS

menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada 0, 4, 8 dan 16 jam inkubasi *in vitro* (Gambar 4; Tabel 5).



Gambar 4. Motilitas spermatozoa hasil koleksi dari vas deferen. (a, b, c pada medium TALP,  $P < 0,05$ ; p, q, r pada medium PBS,  $P < 0,05$ ; TALP > PBS,  $P < 0,05$ )



Gambar 5. Keutuhan membran plasma spermatozoa hasil koleksi dari vas deferen.  
 (a, b, c pada medium TALP,  $P < 0,05$ ; p, q, r pada medium PBS,  $P < 0,05$ ;  
 TALP > PBS,  $P > 0,05$ )  
 MPU : Membran Plasma Utuh

Keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari vas deferen setelah inkubasi *in vitro* dalam medium TALP memperlihatkan penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada jam ke-16 (18,54%) jika dibandingkan dengan jam ke-0 (51,37%), jam ke-4 (47,1%) dan jam ke-8 (40,1%) inkubasi. Penurunan yang nyata ( $P < 0,05$ ) juga terjadi pada jam ke-16 (10,56%) jika dibandingkan dengan jam ke-0 (53,45%), jam ke-4 (44,1%) dan jam ke-8 (34,15%) inkubasi *in vitro* dalam medium PBS. Keutuhan membran plasma spermatozoa dalam medium TALP dan PBS tidak menunjukkan

perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) selama 16 jam inkubasi *in vitro* (Gambar 5; Tabel 6). Namun demikian secara keseluruhan medium TALP relatif lebih mampu mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa daripada medium PBS.

Motilitas merupakan salah satu faktor yang penting dalam penilaian kualitas spermatozoa. Motilitas penting artinya dalam perjalanan spermatozoa melewati saluran kelamin hewan betina dan dalam proses penetrasi ovum saat fertilisasi. Tingkat gerak maju spermatozoa yang tinggi sangat dibutuhkan untuk penetrasi membran sel telur *in vitro* (Hunter, 1995). Hal yang sama juga dilaporkan oleh Hafez (1993) bahwa gerakan yang progresif memungkinkan spermatozoa dapat menembus sel-sel kumulus ooforus dan zona pelusida ovum sehingga proses fertilisasi dapat terjadi.

Terdapat dua faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa yaitu faktor endogen dan faktor eksogen (Hafez, 1993). Ketersediaan sumber energi merupakan faktor endogen yang sangat penting. Sumber energi yang digunakan dalam motilitas spermatozoa adalah ATP. Proses pembentukan ATP sebagai sumber energi dapat terjadi pada keadaan tanpa oksigen (anaerob) atau dengan oksigen melalui siklus Krebs (Toelihere, 1979). Sumber energi pada medium TALP berasal dari laktat dan piruvat. Sumber energi pada medium PBS berasal dari glukosa dan piruvat. Dari komposisi tersebut, terlihat bahwa TALP mengandung sumber energi lebih banyak dalam hal piruvat, sedangkan TALP tidak mempunyai sumber energi yang berasal dari glukosa, tetapi mempunyai sumber energi yang berasal dari laktat. Meskipun PBS mempunyai sumber energi yang berasal dari glukosa, untuk dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa, glukosa harus terlebih dahulu diubah menjadi laktat atau piruvat

melalui siklus asam trikarboksilat (Bavister, 1981). Hal ini menyebabkan sumber energi pada medium TALP lebih mudah digunakan oleh spermatozoa dibandingkan sumber energi pada medium PBS. Takahashi dan First (1992) melaporkan bahwa tanpa glukosa, embrio akan tetap berkembang dengan adanya laktat atau piruvat.

Kestabilan pH merupakan salah satu faktor eksogen yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa. Spermatozoa kucing mempunyai pH 7,7 (Hafez, 1970). Secara umum spermatozoa akan mampu hidup dan aktif dalam waktu yang lama pada pH 7,0. TALP merupakan medium yang mempunyai pH yang stabil karena dalam penyusunnya terdapat komponen HEPES yang berperan penting sebagai sistem buffer pH (Bavister, 1981). Sedangkan PBS mengandalkan kemampuan buffer dari fosfat (Malole, 1990). Meskipun kedua medium ini memiliki sistem buffer yang berbeda akan tetapi kedua medium tersebut memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan pH selama inkubasi in vitro spermatozoa domba (Kurniawan, 1999).

Penurunan keutuhan membran plasma spermatozoa ini diduga masih terkait dengan kemampuan medium dalam mempertahankan kestabilan pH. Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa medium TALP cenderung untuk mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa lebih baik dibandingkan dengan PBS.

Suplementasi serum ke dalam medium berperan antara lain sebagai pembawa faktor hormonal untuk menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas sel, membantu perlekatan dan penyebaran sel untuk pembentukan matriks ekstraseluler serta sebagai protein pembawa mineral, lemak, vitamin, dan unsur-unsur esensial lainnya (Malole, 1990). Rahmawati (1999) menyatakan bahwa penambahan serum pada

medium diduga akan meningkatkan energi melalui peningkatan proses glikolisis. Glukosa dalam serum akan meningkatkan proses glikolisis sehingga akan meningkatkan energi.

Secara umum medium TALP mampu mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma lebih baik dibandingkan dengan medium PBS. Dalam percobaan selanjutnya medium TALP digunakan untuk melihat motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis dan vas deferens testis setelah penyimpanan selama 0, 3, 5 dan 7 hari pada suhu 5°C.

Tabel 1. Persentase motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis dalam medium TALP.

| Parameter | Preservasi Hari Ke- | Inkubasi Jam Ke-   |                    |                    |                    |
|-----------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|           |                     | 0                  | 4                  | 8                  | 16                 |
| Motilitas | 0                   | 35,27 <sup>a</sup> | 32,08 <sup>a</sup> | 28,59 <sup>a</sup> | 7,63 <sup>a</sup>  |
|           | 3                   | 30,85 <sup>b</sup> | 27,51 <sup>b</sup> | 26,65 <sup>a</sup> | 7,35 <sup>a</sup>  |
|           | 5                   | 9,35 <sup>c</sup>  | 7,15 <sup>c</sup>  | 5,28 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
|           | 7                   | 9,27 <sup>c</sup>  | 6,45 <sup>c</sup>  | 2,97 <sup>c</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
| MPU       | 0                   | 53,73 <sup>a</sup> | 49,25 <sup>a</sup> | 44,76 <sup>a</sup> | 23,95 <sup>a</sup> |
|           | 3                   | 49,63 <sup>b</sup> | 45,25 <sup>a</sup> | 40,65 <sup>a</sup> | 21,55 <sup>b</sup> |
|           | 5                   | 47,75 <sup>b</sup> | 42,95 <sup>a</sup> | 38,35 <sup>b</sup> | 0 <sup>c</sup>     |
|           | 7                   | 46,25 <sup>b</sup> | 42,20 <sup>a</sup> | 36,45 <sup>b</sup> | 0 <sup>c</sup>     |

Keterangan : MPU = Membran Plasma Utuh  
a, b, c pada kolom dan parameter yang sama (P<0,05)

Persentase motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis dan vas deferens setelah 3, 5 dan 7 hari penyimpanan menunjukkan pola penurunan yang sama selama 0, 4, 8 dan 16 jam inkubasi *in vitro* dalam medium TALP (Tabel 1 dan 2). Motilitas spermatozoa pada hari 3 preservasi tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) pada inkubasi *in vitro* 8 dan 16 jam meskipun berbeda nyata ( $P<0,05$ ) pada 0 dan 4 jam inkubasi *in vitro*. Sebaliknya motilitas spermatozoa pada hari ke-5 dan ke-7 hari preservasi mengalami penurunan yang drastis jika dibandingkan dengan hari ke-0 dan ke-3 preservasi. Hasil ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa hasil koleksi dari preservasi kauda epididimis dapat dipertahankan sampai 16 jam inkubasi *in vitro* setelah 3 hari preservasi (Tabel 1).

Keutuhan membran plasma spermatozoa tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) pada preservasi hari ke-7 dibanding hari ke-0 sampai jam ke-4 inkubasi *in vitro* dan mulai berbeda nyata ( $P<0,05$ ) yang kecil pada jam ke-8 inkubasi *in vitro* pada hari ke-5 preservasi. Hasil ini menunjukkan preservasi kauda epididimis memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap penurunan motilitas dibandingkan dengan keutuhan membran plasma spermatozoa.

Motilitas spermatozoa hasil koleksi dari vas deferens pada hari ke-3 preservasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) sampai 16 jam inkubasi *in vitro* dibandingkan dengan hari ke-0, sedangkan hari ke-5 dan ke-7 menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan hari ke-0 dan ke-3.

Keutuhan membran plasma spermatozoa tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) pada 7 hari preservasi dibandingkan dengan hari ke-0 sampai 4 jam inkubasi *in vitro* dan

mulai berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) pada hari ke-5 preservasi setelah 8 jam inkubasi *in vitro* meskipun perbedaannya kecil (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari vas deferens dalam medium TALP.

| Parameter | Preservasi Hari Ke- | Inkubasi Jam Ke-   |                    |                    |                    |
|-----------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|           |                     | 0                  | 4                  | 8                  | 16                 |
| Motilitas | 0                   | 30,25 <sup>a</sup> | 27,74 <sup>a</sup> | 24,65 <sup>a</sup> | 6,34 <sup>a</sup>  |
|           | 3                   | 28,87 <sup>a</sup> | 26,54 <sup>a</sup> | 23,11 <sup>a</sup> | 9,56 <sup>a</sup>  |
|           | 5                   | 10,75 <sup>b</sup> | 7,23 <sup>b</sup>  | 5,21 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
|           | 7                   | 8,27 <sup>b</sup>  | 5,45 <sup>b</sup>  | 3,87 <sup>b</sup>  | 0 <sup>b</sup>     |
| MPU       | 0                   | 51,37 <sup>a</sup> | 47,10 <sup>a</sup> | 40,10 <sup>a</sup> | 18,54 <sup>a</sup> |
|           | 3                   | 49,37 <sup>a</sup> | 46,73 <sup>a</sup> | 39,56 <sup>a</sup> | 20,45 <sup>a</sup> |
|           | 5                   | 48,53 <sup>a</sup> | 44,95 <sup>a</sup> | 39,78 <sup>a</sup> | 0 <sup>b</sup>     |
|           | 7                   | 47,35 <sup>a</sup> | 43,54 <sup>a</sup> | 37,10 <sup>b</sup> | 0 <sup>b</sup>     |

Keterangan : MPU = Membran Plasma Utuh  
a, b pada kolom dan parameter yang sama ( $P < 0,05$ )

Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa dari vas deferens (Tabel 2) menunjukkan pola dan persentase yang sama dengan spermatozoa kauda epididimis (Tabel 1), akan tetapi dari hasil uji statistik menunjukkan bahwa spermatozoa hasil koleksi dari vas deferens lebih baik daripada kauda epididimis.

Penurunan motilitas yang cenderung drastis setelah preservasi selama hari ke-5 menunjukkan bahwa terjadi penghambatan metabolisme spermatozoa. Pujiono (1999) melaporkan bahwa testis kucing yang disimpan dalam suhu 5°C mengalami penurunan motilitas spermatozoanya pada hari ke-3. Pangestu (1997) melaporkan



bahwa motilitas spermatozoa epididimal kambing mengalami penurunan yang nyata selama tiga hari penyimpanan yaitu pada hari ketiga motilitas yang didapatkan hanya 15%, sedangkan dari hasil penelitian ini didapatkan motilitas spermatozoa hasil koleksi dari kauda epididimis selama 3 hari preservasi sebesar 30,85%. Hal ini mungkin diakibatkan oleh ukuran testis kucing yang kecil sehingga pengaruh preservasi pada 5°C benar-benar menghambat metabolisme spermatozoa selain menghambat pembusukan. Menurut laporan Graham *et al.*, (1978) bahwa spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis yang disimpan pada suhu mendekati 0°C dapat bertahan sampai 48 jam. Sedangkan Diaka (1994) menyatakan bahwa pengaruh luar seperti disimpan pada suhu 5°C selama 72 jam cenderung untuk merusak spermatozoa diakibatkan oleh robeknya membran sitoplasma sehingga cairan intraseluler cepat hilang.

Keutuhan membran plasma merupakan salah satu indikator yang menunjukkan kemampuan spermatozoa dalam melakukan penetrasi terhadap oosit saat proses fertilisasi. Kerusakan pada membran plasma spermatozoa akan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino dan asam lemak. Akibat terganggunya mekanisme ini maka spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitasnya akan menurun, demikian juga motilitasnya. Rusaknya membran plasma juga akan mengganggu keseimbangan ion-ion yang esensial bagi spermatozoa. Proses kapasitas, reaksi akrosom dan pengikatan spermatozoa ke oosit memerlukan membran yang secara biokimiawi aktif (Correa dan Zavos, 1994).

Kurniawan (2000) melaporkan bahwa medium TALP mampu mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa kambing dengan baik sampai inkubasi selama 18 jam dibandingkan dengan motilitasnya.

Motilitas spermatozoa dan keutuhan membran plasma spermatozoa merupakan faktor yang berpengaruh dalam keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro*. Kemampuan spermatozoa ini dibutuhkan untuk melakukan penetrasi pada membran oosit. Pada preservasi selama 3 hari, motilitas spermatozoa masih dapat dipertahankan sampai 16 jam inkubasi *in vitro*, sedangkan pada preservasi selama 5 dan 7 hari motilitas hanya mampu dipertahankan selama 8 jam inkubasi *in vitro*. Spermatozoa kucing postmortem yang disimpan dalam lemari es dengan suhu 5°C selama 3 hari preservasi yang dikoleksi dari kauda epididimis maupun vas deferens dalam medium TALP masih mempunyai motilitas yang cukup tinggi untuk dapat digunakan dalam teknik fertilisasi *in vitro*.

Secara umum spermatozoa kucing postmortem dengan preservasi selama 7 hari masih memungkinkan digunakan untuk fertilisasi mikro sperma tunggal karena dalam teknik ini hanya membutuhkan spermatozoa tunggal yang masih hidup dengan membran plasma yang utuh. *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test) untuk teknik fertilisasi spermatozoa tunggal pernah dilakukan oleh Chan *et al.*, (1996). Lee *et al.*, (1996) yang menyatakan bahwa penyuntikan spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom akan meningkatkan rata-rata kebuntingan dalam teknik fertilisasi mikro sperma tunggal.

## BAB IV

### KESIMPULAN DAN SARAN

Medium TALP lebih mampu mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa kucing yang dikoleksi dari kauda epididimis dan vas deferens dibandingkan dalam medium PBS.

Motilitas spermatozoa kucing mampu dipertahankan sampai 16 jam inkubasi *in vitro* selama 3 hari preservasi kauda epididimis dan vas deferens pada suhu 5°C. Sedangkan keutuhan membran plasma mampu dipertahankan sampai jam ke-8 inkubasi *in vitro* setelah 7 hari preservasi. Spermatozoa hasil koleksi dari vas deferens menunjukkan mampu mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasmanya lebih baik daripada kauda epididimis.

Mengingat motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa sangat penting dalam proses keberhasilan teknik FIV, disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sampai proses fertilisasi dan kultur embrio secara *in vitro* pada kucing dengan spermatozoa setelah preservasi selama 3 hari atau ICSI dengan spermatozoa yang telah dipreservasi selama 7 hari preservasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Axner, E., B. Strom Holst and C. Linde-Forsberg.** 1998. Morphology of Spermatozoa in The Cauda Epididymidis Before and After Electroejaculation and Comparison with Ejaculated Spermatozoa in The Domestic Cat. *Theriogenology*, 50:973-979.
- Bavister, B.D.** 1981. Analysis of Culture Media for In Vitro Fertilization And Criteria of Succes in Fertilizator An Embrionic Development In Vitro. L. Mastroianni and J.D. Biggers (eds). Plenum Press. New York and London.
- Boediono, A.** 1995. Aplikasi Bioteknologi Reproduksi Pada Hewan Ternak Dalam Rangka Peningkatan Produksi Dan Kualitas. *Inovasi*, 6:26-38.
- Carter, V.W.** 1979. Land Mammal of Indonesia, First English Language Edition by PT Intermesa. Jakarta.
- Chan, P.J., J.U. Corselli, W.C. Patton, J.D. Jacobson and A. King.** 1996. The Association Between Hypoosmotic Swelling Used in The ICSI Procedure and Sperm Head Decondensation in Abstract American Society for Reproductive Medicine. Birmingham. Alabama.
- Correa, J.R. and P.M. Zavos.** 1994. The Hypoosmotic Swelling Test : Its Employment As An Assay To Evaluate The Functional Integrity Of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. *Theriogenology*, 42:351-360.
- Diaka, J.K.** 1993. Subjecting Canine Semen to The Hypoosmotic Test. *Theriogenology*, 38:1280-1289.
- Donoghue, A.M.** 1996. Assesment Of The Membrane Integrity Of Fresh And Stored Turkey Spermatozoa Using A Combination Of Hypoosmotic Stress, Fluorescent Staining And Flow Cytometry. *Theriogenology*, 46:153-163.
- First, N.L. and J.J. Parish.** 1987. In Vitro Fertilization of Ruminants. University of Wisconsin. Departement of Meat and Animal Sciences. Madison. Wisconsin.
- Graham, E.F., M.K.L. Schmehl, B.K. Evensen and D.S. Nelson.** 1978. Semen Preservation in Non-Domestic Mammals in Artificial Breeding of Non-Domestic Animals. P.F. Watson (eds). Academic Press. London.
- Hafez, E.S.E.** 1970. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Lea and Febiger. Philadelphia.

- Hafez, E.S.E.** 1993. *Reproduction In Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia. 6<sup>th</sup> Edition.
- Howard, J.G.** 1993. *Semen Collection And Analysis In Carnivores in The Zoo And Wild Animal Medicine*. Murray E. Fowler (eds). W.B. Saunders Company. Denver Colorado.
- Hunter, R.H.F.** 1995. *Fisiologi Dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina*. Penerbit ITB. Bandung.
- Kanagawa, H., O. Abas-Mazni and Conrado A. Valdez.** 1989. *Oocyte Maturation And In Vitro Fertilization In Farm Animals in Biotechnology For Livestock Production*. Plenum Press. New York And London.
- Kitu, M.A.** 1997. *Medium Kultur Dalam Teknik Fertilisasi In Vitro Pada Ternak Sapi*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Kurniawan, D.** 1999. *Pengaruh Pencucian Dan Pre-Inkubasi Pada Motilitas Dan Keadaan Membran Spermatozoa Domba*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Kurniawan, D.F.** 2000. *Ketahanan Dan Keutuhan Membran Plasma Sperma Kambing Peranakan Etawah Dan Kambing Kacang Dalam Medium Fertilisasi In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Lee, D.R., Y.J. Lim, J.E. Lee, H.J. Kim, H.S. Yoon and S.I. Roh.** 1996. *Induction Acrosom Reaction in Spermatozoa Accelerates Development of Fertilized Human Oocyte after ICSI in Abstract American Society for Reproductive Medicine*. Birmingham. Alabama.
- Malole, M.B.M.** 1990. *Kultur Sel Dan Jaringan Hewan*. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- Pangestu, M.** 1997. *Viability of Goat Epididymal Sperm up to 3 Days after Death in Abstract*. 4<sup>th</sup> International Meeting on Biotechnology in Animals Reproduction. Bogor.
- Pujiono.** 1999. *Viabilitas Spermatozoa Epididimal Kucing Lokal (*Felis catus*) Pada Penyimpanan Suhu Dingin*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.
- Rahmawati, D.** 1999. *Penambahan Berbagai Jenis Serum Dalam Medium Inkubasi Untuk Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa Domba Secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor.

- Supriatna, I. dan F.H. Pasaribu.** 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio Dan Pembekuan Embrio. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- Takahashi, Y. and N.L. First.** 1992. In Vitro Development of Bovine One-Cells Embryos : Influence Of Glucose, Lactate, Pyruvate, Amino Acids And Vitamin. *Theriogenology*, 37:963-978.
- Toelihere, M.R.** 1979. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.

## LAMPIRAN 1.

Tabel 3. Motilitas spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis.

| MEDIUM | INKUBASI JAM KE-         |                          |                          |                         |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|        | 0                        | 4                        | 8                        | 16                      |
| TALP   | 35,27±1,13 <sup>aa</sup> | 32,08±1,43 <sup>ba</sup> | 28,59±0,98 <sup>ca</sup> | 7,63±0,69 <sup>da</sup> |
| PBS    | 29,13±0,47 <sup>ab</sup> | 24,15±1,17 <sup>bb</sup> | 19,67±1,43 <sup>cb</sup> | 2,35±0,23 <sup>db</sup> |

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a, b, c, d; P<0,05)

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A, B; P<0,05)

Tabel 4. Keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari kauda epididimis

| MEDIUM | INKUBASI JAM KE-          |                           |                           |                           |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        | 0                         | 4                         | 8                         | 16                        |
| TALP   | 53,73±1,43 <sup>aa</sup>  | 49,25±0,99 <sup>abA</sup> | 44,76±1,20 <sup>ba</sup>  | 23,95±1,54 <sup>ca</sup>  |
| PBS    | 50,87±1,17 <sup>abB</sup> | 43,50±2,14 <sup>abB</sup> | 33,54±0,86 <sup>bbB</sup> | 11,76±1,13 <sup>cbB</sup> |

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a, b, c; P<0,05)

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A, B; P<0,05)

Tabel 5. Motilitas spermatozoa yang dikoleksi dari vas deferen

| MEDIUM | INKUBASI JAM KE-         |                           |                          |                         |
|--------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
|        | 0                        | 4                         | 8                        | 16                      |
| TALP   | 30,25±1,95 <sup>aA</sup> | 27,74±2,55 <sup>abA</sup> | 24,65±2,14 <sup>bA</sup> | 6,34±1,19 <sup>cA</sup> |
| PBS    | 29,15±2,71 <sup>aB</sup> | 24,55±1,17 <sup>abB</sup> | 18,85±1,15 <sup>bB</sup> | 1,87±0,50 <sup>cB</sup> |

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a,b,c;P<0,05)

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A, B;P<0,05)

Tabel 6. Keutuhan membran plasma spermatozoa yang dikoleksi dari vas deferen

| MEDIUM | INKUBASI JAM KE-        |                          |                         |                         |
|--------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|        | 0                       | 4                        | 8                       | 16                      |
| TALP   | 51,37±1,77 <sup>a</sup> | 47,10±2,25 <sup>ab</sup> | 40,10±0,76 <sup>b</sup> | 18,54±1,22 <sup>c</sup> |
| PBS    | 53,45±1,81 <sup>a</sup> | 44,10±0,76 <sup>ab</sup> | 34,15±1,57 <sup>b</sup> | 10,56±0,38 <sup>c</sup> |

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a, b, c;P<0,05)



## LAMPIRAN 2.

### KOMPOSISI MEDIUM TALP

| BAHAN   | mg/mL          |
|---|----------------|
| CaCl <sub>2</sub> *                               | 29             |
| KCL   | 23             |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O*              | 31             |
| NaCl  | 582            |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O | 4              |
| As. Laktat (60% sirup)                            | 0,38-0,4416 mL |
| HEPES   | 238            |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 209            |
| Phenol Red  | -              |
| Pyruvat   | 0,1105         |
| BSA   | 600 (0,3%)     |

\*) diberikan terakhir

### LAMPIRAN 3.

#### KOMPOSISI MEDIUM PBS

| BAHAN                               | g/L        |
|-------------------------------------|------------|
| CaCl <sub>2</sub>                   | 0,01       |
| KCL                                 | 0,20       |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O | 0,10       |
| NaCl                                | 8          |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 1,15       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0,20       |
| Natrium Pyruvat                     | 0,036      |
| Glukosa                             | 1          |
| Penisilin                           | 100.000 IU |
| Streptomisin                        | 0,1        |
| BSA                                 | 0,3%       |



#### LAMPIRAN 4.

#### KOMPOSISI MEDIUM HOS-TEST

| BAHAN I  | DALAM 100 mL AQUADEST |
|----------|-----------------------|
| Fruktosa | 2,7 g                 |

---

| BAHAN II                         | DALAM 100 mL AQUADEST |
|----------------------------------|-----------------------|
| Sodium Sitrat. 2H <sub>2</sub> O | 1,47 g                |

Kedua bahan dicampurkan dan dipisahkan dalam kemasan tube 1 mL dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .