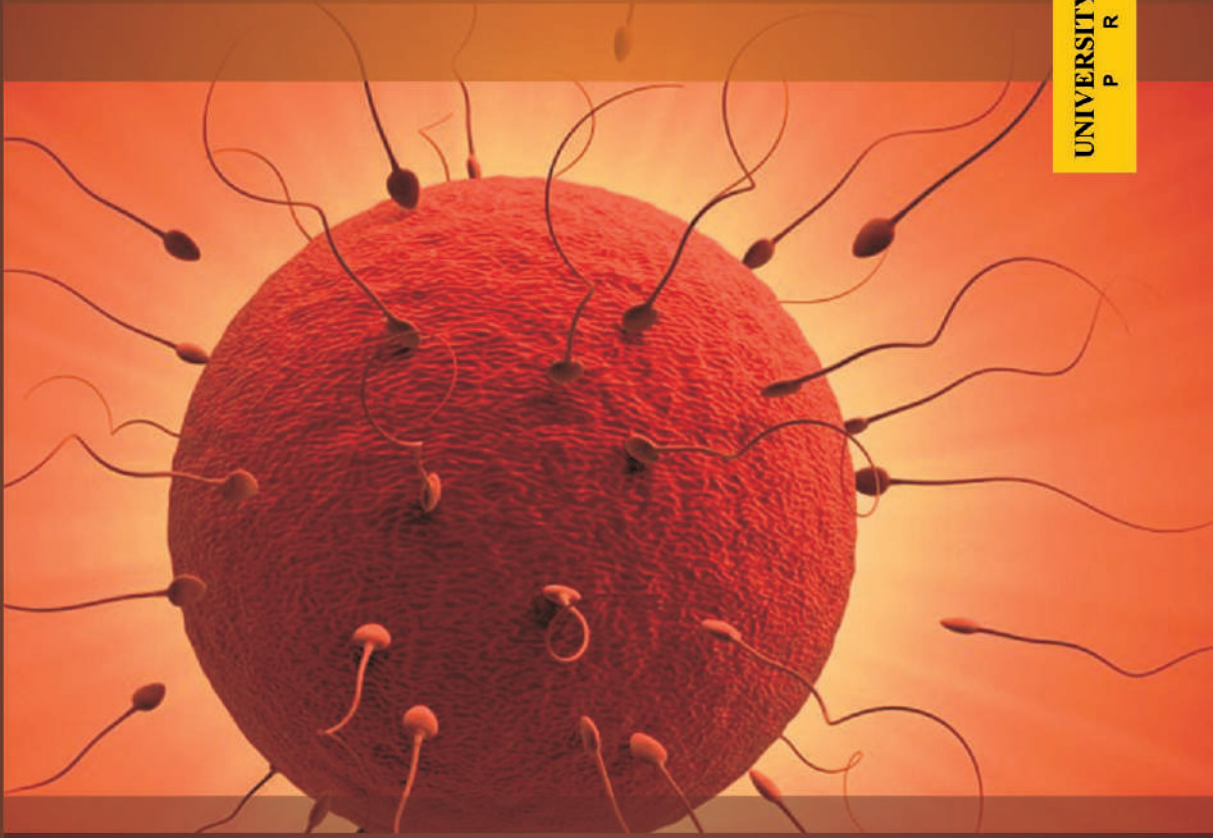


Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS.



SEXING SPERMATOZOA

Hasil Penelitian Laboratorium Dan Aplikasi Pada Sapi dan Kambing

**SEXING
SPERMATOOA**

Sanksi Pelanggaran Pasal 72
Undang-Undang Nomor 19 Tahun 2002

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00- (satu juta rupiah) atau paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah)
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan dan barang hasil pelanggaran hak cipta atau hak terkait, sebagaimana dimaksud ayat (1) dipidana dengan pidana paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

SEXING SPERMATOZOA

**Hasil Penelitian Laboratorium dan Aplikasi
pada Sapi dan Kambing**

Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS



2014

Sexing Spermatozoa (Hasil Penelitian Laboratorium dan Aplikasi pada Sapi dan Kambing)

© 2014 UB Press

Cetakan Pertama, November 2014

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

All Right Reserved

Penulis : Prof. Dr. Ir. Trinil Susilawati, MS.
Perancang Sampul : Wendi Wiranata
Penata Letak : Lusvita Anggraini
Pracetak dan Produksi : Tim UB Press



Penerbit:

Universitas Brawijaya Press (UB Press)

Penerbit Elektronik Pertama dan Terbesar di Indonesia

Anggota IKAPI

Jl. Veteran, Malang 65145 Indonesia

Telp: 0341-551611 Psw. 376

Fax: 0341-565420

e-Mail: ubpress@gmail.com

<http://www.ubpress.ub.ac.id>

ISBN: 978-602-203-711-8

xii + 82 hal, 15.5 cm x 23.5 cm

Dilarang keras memfotokopi atau memperbanyak sebagian atau seluruh buku ini tanpa seizin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Perencanaan jenis kelamin anak (sexing spermatozoa) dalam peternakan sangat diminati dan merupakan teknologi yang penting di dalam penyediaan pangan dari hewan di masa mendatang. Dengan adanya penemuan teknologi sexing, maka dalam industri peternakan dunia semakin membutuhkan penerapan teknologi sexing ini.

Buku ini berisikan tentang teori dasar teknik sexing spermatozoa dan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan mulai tahun 2003 hingga sekarang. Teknik sexing hasil penelitian tersebut adalah menggunakan metode Sentrifugasi Gradien Densitas, Filtrasi Sepadex Coulom dan Sedimentasi Putih Telur. Selain itu juga hasil aplikasinya pada Inseminasi Buatan dan In Vitro Fertilisasi. Selain hasil penelitian tersebut juga terdapat hasil-hasil penelitian dengan metode yang lain yaitu *flowcytometry* dan potensi perkembangan teknik sexing pada unggas.

Buku ini ditulis dengan harapan dapat sebagai pedoman bagi peneliti dan mahasiswa yang tertarik di bidang sexing spermatozoa. Selain itu juga untuk Balai Inseminasi Buatan yang akan memproduksi semen sexing.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih pada:

1. Pimpinan Universitas Brawijaya dan Fakultas Peternakan beserta Staf yang telah memfasilitasi penelitian di Laboratorium Ilmu Reproduksi Ternak, Laboratorium Biologi Fakultas MIPA, Laboratorium Sentral Hayati Universitas Brawijaya.
2. Pembimbing Disertasi saya yaitu Prof. Dr. Drh. Soehartojo, MSc, Prof. Dr.Drs. Sutiman Bambang Sumitro, SU dan Dr.dr. Aucky Hinting, Sp.Androlog
3. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Balai Inseminasi Buatan Daerah Ungaran dan Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian.
4. Staf peneliti yang pernah menjadi tim penelitian Sexing Spermatozoa yaitu Dr. Ir. Kuswati, MS, Dr. Ir. Nurul Isnaini, MP,

Achadiyah Rachmawati,Spt,MP, Dr. Dra. Sri Rahayu,M.Kes, Prof. Dr.Drh. Puji Sianto,M.Kes, Dr.Ir. Setya Budi Udrayana, MP dan Dr.Ir. Herni Sudarwati,MP , Juga Mahasiswa S1, S2 dan S3 yang berkontribusi didalam penelitian sexing pada penulisan skripsi, thesis dan disertasinya yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu.

Besar harapan kami, buku ini bermanfaat bagi para pembaca dan perkembangan teknologi sexing di Indonesia sehingga dapat diaplikasikan dalam peningkatan populasi dan produktivitas sapi di Indonesia.

DAFTAR ISI



KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II DASAR SEXING SPERMATOZOA	5
BAB III SEXING MENGGUNAKAN FILTRASI SEPHADEX.....	13
3.1 Jenis Sephadex yang Digunakan untuk Filtrasi Seleksi Jenis Kelamin Memengaruhi Kualitas dan Keberhasilan Seleksi Jenis Kelamin.....	16
3.2 Tahap Sexing Menggunakan Filtrasi Sephadex	18
BAB IV SEXING MENGGUNAKAN SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL	21
4.1 Hasil Penelitian Sexing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	24
4.2 Tahap Sexing dengan Gradien Densitas Percoll	27
4.3 Analisa Intak acrosome pada spermatozoa pada perlakuan sentrifugasi gradien densitas Percoll dan sedimentasi Putih Telur.....	29
BAB V SEXING MENGGUNAKAN ALBUMIN (PUTIH TELUR)	37
5.1 Hasil Penelitian Sexing Menggunakan Kolom Putih Telur pada Sapi.....	41
5.2 Hasil Penelitian pada Semen Kambing	43
BAB VI APLIKASI TEKNOLOGI SEXING	47
6.1 Uji Keberhasilan Kebuntingan hasil IB dengan semen sexing menggunakan metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll	48
6.2 Uji keberhasilan kebuntingan IB semen hasil sexing dengan gradien putih telur	55
BAB VII METODE SEXING PADA UNGGAS: STUDI PUSTAKA DAN ROADMAP PENELITIAN.....	61
7.1 Jenis-Jenis Ayam.....	62
7.2. Identifikasi dan Pengaturan Jenis Kelamin Pada Ayam ..	63

7.3. Metode Sexing Pada Ayam.....	66
DAFTAR PUSTAKA	71
RIWAYAT PENULIS	81

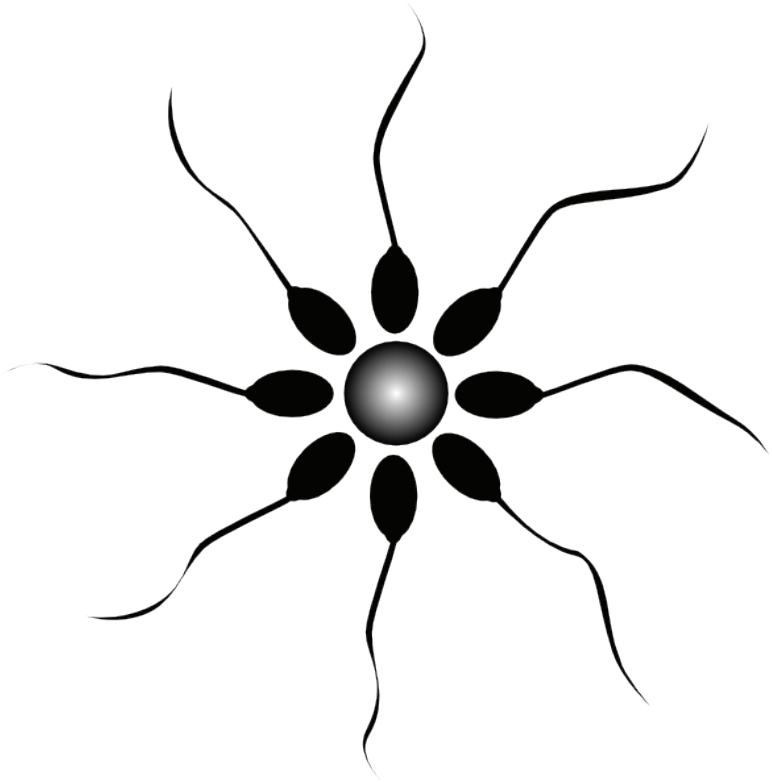
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Beberapa Perbedaan Spermatozoa X dan Y.....	7
Tabel 2.2. Teknik yang Digunakan untuk Memisahkan Spermatozoa X dan Y.....	9
Tabel 3.1. Karakteristik <i>Sephadex G-200</i>	15
Tabel 4.1 Contoh perbandingan <i>Percoll</i> dengan pengencer untuk 10x ulangan (20 ml semen).....	27
Tabel 4.2. Rata-rata \pm SD gambaran Reaksi akrosom pada perlakuan sexing dengan metode sentrifugasi gradien densitas <i>percoll</i> dan sedimentasi putih telur (albumin).....	31
Tabel 4.3. Rataan Weight % pada berbagai perlakuan.....	33
Tabel 4.4. Rataan Weight % σ pada berbagai perlakuan.....	34
Tabel 4.5. Rataan Atomic % pada berbagai perlakuan.....	35
Tabel 4.6. Rincian Biaya untuk setiap proses sexing dengan metode sentrifugasi gradien densitas <i>percoll</i>	36
Tabel 5.1. Kandungan Protein dalam Putih Telur.....	40
Tabel 5.2. Rincian Biaya untuk setiap proses sexing dengan metode sedimentasi putih telur.....	45
Tabel 6.1. Data Persentase Motilitas Spermatozoa.....	50
Tabel 6.2 Hasil Angka Kebuntingan, Perhitungan CR dan S/C pada berbagai perlakuan.....	52
Tabel 6.3 Jenis kelamin anak yang dilahirkan pada berbagai perlakuan.....	54
Tabel 6.4 Evaluasi Keberhasilan Kebuntingan Menggunakan Metode NRR 21, 42, 63 hari. Hasil IB menggunakan semen sexing dengan sedimentasi putih telur.....	56
Tabel 6.5. Evaluasi Kebuntingan dengan Angka Conception Rate (C/R) dan Service per Conception (S/C). Hasil IB menggunakan semen sexing dengan sedimentasi putih telur.....	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1.	Perbedaan persentase motilitas spermatozoa setelah filtrasi <i>sephadex</i> G100 dan G200 (Susilawati, 2000).....	16
Gambar 3.2.	Perbedaan persentase viabilitas Spermatozoa setelah filtrasi <i>sephadex</i> G100 dan G200 (Susilawati, 2000).....	17
Gambar 3.3.	Perbedaan konsentrasi spermatozoa setelah filtrasi <i>sephadex</i> G100 dan G200 (Susilawati, 2000).....	17
Gambar 3.4	Perbedaan persentase spermatozoa X pada berbagai tabung setelah filtrasi <i>sephadex</i> G100 dan G200 (Susilawati, 2000)	18
Gambar 3.5a.	Sexing Spermatozoa Menggunakan Metode Filtrasi <i>Sephadex</i> (Susilawati, 2000).....	19
Gambar 3.5b	Tahap sexing menggunakan filtrasi <i>sephadex</i> (Susilawati, 2000).....	20
Gambar 3.6	Tahap pembekuan spermatozoa hasil sexing menggunakan filtrasi <i>sephadex</i> (Susilawati, 2000).....	20
Gambar 4.1	Perbedaan persentase motilitas dan spermatozoa X pada lapisan bawah pada berbagai kecepatan dan waktu. (Susilawati, 2000).....	24
Gambar 4.2.	Berbagai macam mikro pipet dan tip yang dapat digunakan.....	26
Gambar 4.3.	Cara menggunakan mikropipet.....	27
Gambar 4.4	Tahap Sexing dengan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll (Susilawati, 2000).....	28
Gambar 4.5	Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom pada perlakuan percoll.....	29
Gambar 4.6.	Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom	

	pada kontrol.....	30
Gambar 4.7.	Hasil pewarnaan dengan FITC PNA pada berbagai perlakuan.....	30
Gambar 4.8.	Hasil Pengamatan dengan SEM Spermatozoa dengan pembesaran 2000 kali.....	32
Gambar 4.9.	Hasil pengamatan dengan SEM Spermatozoa dengan pembesaran 5000 kali dan hasil pengukuran panjang dan lebar kepala spermatozoa	32
Gambar 4.10.	Hasil pengamatan menggunakan SEM spermatozoa dengan pembesaran 7 000 kali.....	33
Gambar 4.11.	Grafik Rataan Weight % pada berbagai perlakuan.....	33
Gambar 4.12.	Rataan Weight % σ pada berbagai perlakuan	34
Gambar 4.13.	Rataan Atomic % pada berbagai perlakuan.....	35
Gambar 5.1	Proses Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Menggunakan Putih Telur (Susilawati, 2002).....	44
Gambar 5.2	Skema Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Menggunakan Putih Telur (Susilawati, 2002).....	45
Gambar 7.1.	Gambaran gen selama proses diferensiasi gonad pada embrio ayam.....	65



BAB I



PENDAHULUAN



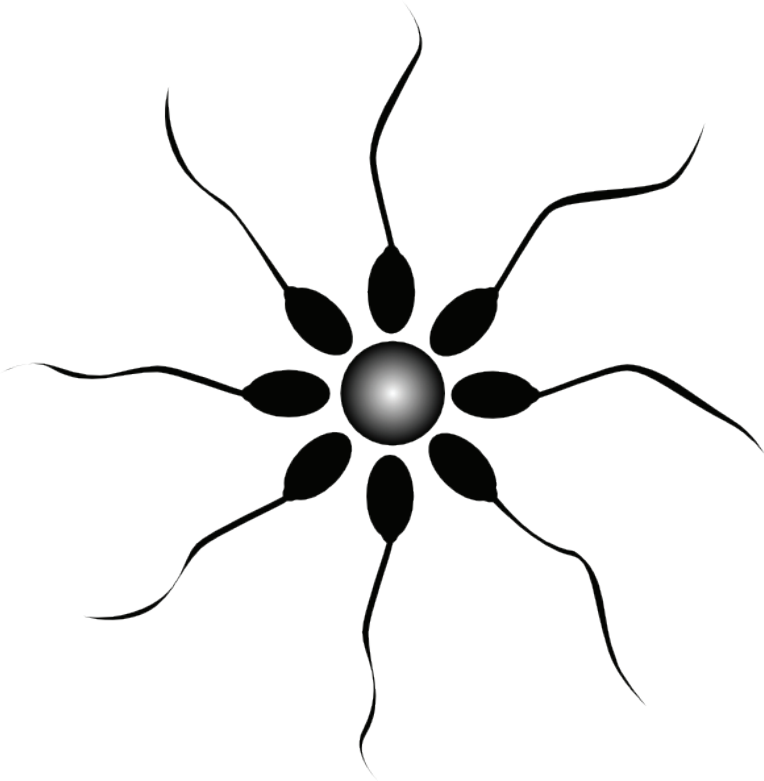
Inseminasi Buatan (IB) merupakan teknologi reproduksi ternak yang paling berhasil dan diterima secara luas oleh peternak karena biaya relatif murah dan terjangkau serta merupakan sarana yang efektif untuk menyebarkan bibit unggul. Inseminasi Buatan dapat ditingkatkan nilainya dengan menghasilkan bibit unggul dengan jenis kelamin sesuai tujuan pemeliharaan, misalnya untuk potong dibutuhkan jantan, sedang untuk bibit dibutuhkan betina. Teknologi yang dibutuhkan untuk pengaturan jenis kelamin anak tersebut dengan *sexing spermatozoa*.

Hal ini dapat berguna untuk mendapatkan anak dengan jenis kelamin yang diharapkan. Jenis kelamin ditentukan oleh adanya kromosom X dan Y pada spermatozoa pejantan (Garner and Hafez, 2008). Spermatozoa X dan Y mempunyai perbedaan dalam ukuran dan bentuk spermatozoa, berat, densitas, motilitas, muatan dan kandungan biokimia pada permukaannya (Hafez, 2008). Perbedaan-perbedaan ini menyebabkan spermatozoa X dan Y memungkinkan untuk dipisahkan.

Berbagai metode pemisahan spermatozoa X dan Y telah banyak dilakukan. Metode pemisahan tersebut antara lain sedimentasi, *albumin column*, sentrifugasi gradien densitas, elektroforesis, *H-Y antigen*, *flow cytometry* dan filtrasi dengan *Sephadex column* (Hafez, 2008). Pemisahan spermatozoa dengan Filtrasi *Sephadex Column* mudah dihasilkan dan diaplikasikan serta dapat menghasilkan spermatozoa X sebesar 70–75% (Hafez, 2008). Susilawati dkk. (1996), telah melakukan filtrasi spermatozoa menggunakan *Sephadex G-200* dan sentrifugasi gradien densitas *percoll*. Pada lapisan bawah dapat menghasilkan spermatozoa X sebanyak 86%, sedangkan dengan sentrifugasi gradien densitas *percoll* pada bagian atas adalah Y dan bagian bawah spermatozoa X sebanyak 89% (Susilawati dkk, 1999; Susilawati dkk, 2001). Selain itu, dengan metode tersebut juga telah berhasil dibekukan dengan

motilitas spermatozoa lebih tinggi dari 30% (Susilawati dkk, 2002). Akan tetapi konsentrasi yang didapat masih rendah yaitu antara 6–12 juta spermatozoa *per straw*, walaupun demikian mempunyai daya fertilitas yang tinggi dengan tingginya nilai kebuntingan yang dihasilkan yaitu 80% (Susilawati dkk. 2003; Susilawati, 2005).

Berdasarkan pada hasil-hasil penelitian yang dilakukan tersebut, maka disusunlah buku sexing spermatozoa yang berisikan dasar dari ditemukannya metode *sexing*, teknik pelaksanaan, hasil-hasil serta pustaka penunjangnya, sehingga diharapkan penelitian sexing spermatozoa ini dapat terus berkembang dan dapat diaplikasikan untuk pengembangan ternak di Indonesia.



BAB II



DASAR SEXING SPERMATOZOA

Awal abad ke-20, Guyer (1910) menemukan adanya kromosom seks yang terdapat pada keseluruhan komplemen kromosom. Kemudian pada tahun 1950an ditetapkan bahwa DNA merupakan komponen penting kromosom seks. Morruzi (1979) merupakan orang pertama yang menunjukkan bahwa DNA mungkin dapat digunakan sebagai faktor pembeda kromosom seks, dan lebih lanjut dapat dijadikan dasar untuk memisahkan spermatozoa X dan Y.

Adanya fakta bahwa spermatozoa X pada sebagian besar mamalia mengandung DNA lebih banyak daripada spermatozoa Y (Morruzi, 1979). Kromosom Y lebih kecil dan mengandung DNA lebih sedikit daripada kromosom X yang lebih besar, sedangkan autosom (kromosom yang terdapat pada sel-sel tubuh) yang dibawa oleh spermatozoa X dan Y memiliki kandungan DNA yang sama.

Pejantan pada mammalia menentukan jenis kelamin anak yang dilahirkan sebagai hasil pembelahan reduksi selama *spermatogenesis*, spermatozoa hanya mengandung setengah jumlah DNA pada sel-sel somatik dari spesies yang sama dan terbentuklah dua macam spermatozoa. Spermatozoa yang mengandung kromosom X (spermatozoa X) jika terjadi fertilisasi akan menghasilkan embrio betina, sedangkan spermatozoa spermatozoa Y akan menghasilkan embrio jantan, karena pada kromosom Y terdapat *Sex Determining Region Y gen* (SRY) yang menentukan terbentuknya testis pada hewan jantan (Bianchi, 1991; Graves, 1994 dan Koopman, 1995).

Panjang dan lebar kepala spermatozoa sapi kira-kira 8–10 μm dan 4–4,50 μm , tebal kepala 0,50–1,50 μm , bagian tengah spermatozoa mempunyai panjang 10–15 μm dan diameternya sekitar 1 μm , panjang ekor spermatozoa adalah 35–45 μm dengan

diameter 0,4–0,8 μm , sedangkan panjang keseluruhan spermatozoa mencapai 50–70 μm (Toelihere, 1985). Hasil penelitian Susilawati dkk (1999) menjelaskan bahwa pengukuran 2000 kepala spermatozoa sapi didapatkan panjang kepala rata-rata $8,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$ dan lebar kepala rata-rata $4,12 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Hasil pengukuran besar kepala spermatozoa (panjang x lebar) pada semen segar diperoleh rata-rata $32,75 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$. Sedangkan beberapa perbedaan spermatozoa X dan Y terdapat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Beberapa Perbedaan Spermatozoa X dan Y

Parameter	Perbedaan	Evaluasi
DNA	Spermatozoa Y lebih sedikit	Terukur dan <i>accepted</i>
Ukuran	Spermatozoa X lebih besar	Spermatozoa Y dapat diukur atau harus representatif dalam random populasinya
Identifikasi	Spermatozoa mengandung fluorescent	Species spesifik
Motilitas	Spermatozoa Y lebih cepat	Identifikasi yang akurat bila spermatozoa diwarnai pada F- Body
Muatan Permukaan	Spermatozoa X migrasi ke katoda	Tidak ada perbedaan muatan antara spermatozoa X dan Y

Sumber : Erricsson, R.J. and Glass, R.H. (1982). *Fungsional Differences Between Sperm bearing the X or Y Chromosome*. In *Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. R.P. Amann and G.E Seidel, Jr (eds) Boulder, Colorado University Associated Press).

Spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak di kepalanya, sehingga mengakibatkan ukuran kepala spermatozoa X lebih besar (Hafez,2008), maka Susilawati dkk. (1998) melakukan identifikasi spermatozoa X dan Y berdasarkan pada ukuran kepala, yaitu panjang kali lebar, apabila lebih besar dari rata-rata, maka dianggap spermatozoa X sedangkan apabila lebih kecil adalah spermatozoa Y. Berdasarkan cara penentuan tersebut diperoleh hasil persentase spermatozoa yang diprediksi sebagai spermatozoa

X sebanyak 52,10% dan spermatozoa yang diprediksi sebagai spermatozoa Y sebanyak 47,9%.

Spermatozoa Y umumnya lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak serta kemungkinan materi genetik dan DNA yang dikandung spermatozoa Y lebih sedikit dari pada spermatozoa X (Schilling dan Thormahlen, 1976; Sumner dan Robinson, 1976; Ericsson dan Glass, 1982 dalam Hafez, 2008). Dengan demikian, apabila dilakukan sentrifugasi, maka spermatozoa X cenderung lebih cepat membentuk endapan dibandingkan dengan spermatozoa Y (Mohri, 1987). Spermatozoa Y bergerak ke arah katoda (Ericsson and Glass, 1982 dalam Hafez, 2008). Berdasarkan perbedaan-perbedaan tersebut, berkembang metode pemisahan spermatozoa dengan menggunakan kolom albumin, *velocity sedimentation*, sentrifugasi dengan gradien densitas, motilitas dan pemisahan elektroforesis, *isoelectric focusing*, *H-Y antigen*, *flow sorting* dan *sephadex column* (Hafez, 2008 dan De Jonge dkk., 1997). Dari sekian banyak metode pemisahan spermatozoa X dan Y yang paling umum digunakan adalah pemisahan berdasarkan pada perbedaan densitas atau motilitas.

Pemisahan spermatozoa X dan Y saat ini yang menghasilkan populasi spermatozoa X dan Y yang terbanyak adalah dengan *flow cytometry*, akan tetapi alat yang digunakan harganya mahal (Battacharya dkk., 1976; Pinkel and Johnson, 1986; Johnson dkk., 1993; Hafez, 2008 dan Seidel dkk., 1997). Pemisahan spermatozoa dengan *flow cytometry* dapat memisahkan spermatozoa X dan Y dibandingkan dengan metode pemisahan yang lain, tetapi alat yang digunakan harganya mahal, sehingga sulit diaplikasikan. Metode pemisahan lain yang lebih murah, valid, lebih mudah dihasilkan dan diaplikasikan adalah filtrasi menggunakan *sephadex column* yang dapat menghasilkan spermatozoa X sebesar 70-75 % (Beernink, 1986 dalam Hafez, 2008). Kegunaan dari metode pemisahan spermatozoa adalah:

1. Menghasilkan lebih banyak betina yang superior untuk induk atau peremajaan dan menghasilkan susu, daging dan kulit atau bulu.
2. Menghasilkan lebih banyak jantan yang dikeluarkan dari betina dan dilakukan *cross breeding*, contoh: *dairy-beef cross*.
3. Menghasilkan pejantan untuk diambil keturunannya
4. Untuk program *progeny* dilakukan tes pada pejantan muda.
5. Menghindari intersex pada anak yang lahir kembar.

Tabel 2.2. Teknik yang Digunakan untuk Memisahkan Spermatozoa X dan Y

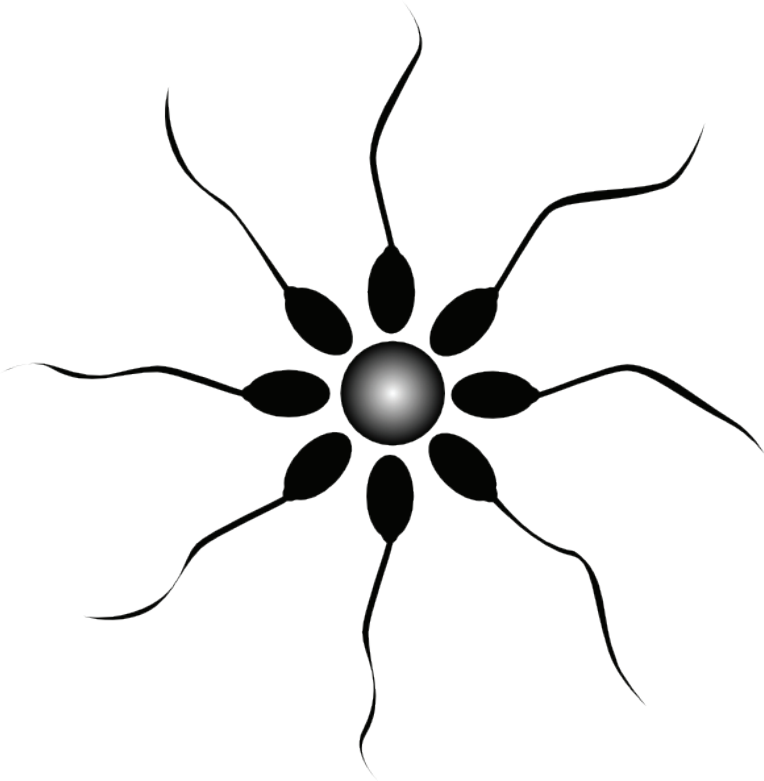
Teknik	Hasilnya
Sedimentasi pada media dengan immobilisasi spermatozoa	IB dengan semen tersebut menghasilkan betina sebanyak 70%
<i>Skim-milk powder, glycine, sodium sitrat, Gliserol</i>	Meningkatkan jumlah anak jantan yang dilahirkan bila yang digunakan spermatozoa pada lapisan atas
<i>Albumin coloumn</i>	Spermatozoa setelah preseleksi dengan metode ini berhasil dibekukan
<i>Velocity sedimentation</i>	Sedimentasi berdasarkan ukuran, densitas dan bentuk kepala. Perbedaan ukuran kepala faktor yang dominan pada tipe pemisahan ini, sedangkan bentuk tidak begitu penting
Sentrifugasi gradien densitas	Spermatozoa dipisahkan untuk mendapatkan sedimen dengan sentrifugasi gradien densitas, bahan yang dibuat gradien densitasnya lebih rendah dari spermatozoa. Dikembangkan dengan sentrifugasi pada waktu yang pendek, waktu yang pendek tidak menyebabkan pengaruh difusi yang signifikan.

Teknik	Hasilnya
Motilitas dan pemisahan menggunakan elektroforesis	Spermatozoa yang immotil dengan elektroforesis akan bergerak ke anoda pada pH netral, ketika pemisahan dengan elektroforesis pada kondisi yang konsisten maka spermatozoa yang motil akan bergerak kearah katode. Hasil pengamatan pada daerah kepala spermatozoa mempunyai muatan, sehingga spermatozoa bergerak, jika muatan negatif spermatozoa akan diorientasikan ke daerah ekor yang bergerak ke arah anoda yang mempunyai muatan negatif lebih besar .
<i>Isoelectric focusing</i>	Pemisahan dengan menggunakan kolom dengan menggunakan cairan yang stabil yg dibuat gradien densitas. Spermatozoa membentuk lapisan atau suspensi spermatozoa akan bermigrasi kearah isoelektrik
H-Y antigen	Spermatozoa diperlakukan dengan anti serum H-Y. Inseminasi pada tikus menggunakan spermatozoa yg diperlakukan dengan anti serum H-Y anti gen menghasilkan 45,4% jantan, sedangkan kontrol 53%
<i>Flow sorting</i> oleh kandungan DNA	Spermatozoa Y berhasil di sorting sebanyak 72-80%
<i>Sephadex Coloumn</i>	Didapat 70% spermatozoa X dengan cara spermatozoa dimasukkan dibagian atas. 65-85% spermatozoa X didapat pada filtrat.

Seleksi jenis kelamin pada kuda untuk peternakan komersial dilakukan untuk *replacement* betina dari satu induk. Spermatozoa yang fertilitasnya tinggi mempunyai nilai komersial yang tinggi. Tingkat fertilitas ini juga menentukan berapa kali harus dikawinkan untuk menentukan kebuntingan untuk menghasilkan jumlah anak yang akan digunakan untuk progeni atau dipelihara. Hasil dari evaluasi menunjukkan bahwa IB dengan semen *sexing* meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez 2008 dan De Jonge dkk, 1997).

Adanya fakta perbedaan tersebut, sehingga dapat dimanfaatkan untuk memisahkan spermatozoa X dan Y yang hanya mungkin dapat dilakukan sejak adanya *Flow Cytrometry*. Upaya pertama kali yang dilakukan untuk membedakan spermatozoa X dan Y menggunakan DNA dan analisis *Flow Cytrometry* tidak berhasil (Gledhill *et al.*, 1976). Namun, dengan kombinasi dari perkembangan metode pewarnaan dan adanya kenyataan bahwa sel *aspherical* seperti sel spermatozoa harus berorientasi terhadap sumber eksitasi sehingga perbedaan DNA secara relatif dapat diukur (Pinkel *et al.*, 1982). Faktor-faktor tersebut menjadi dasar analisis DNA spermatozoa secara rutin menggunakan instrumentasi komersial yang dimodifikasi (Johnson and Pinkel, 1986) dan menunjukkan perbandingan spermatozoa X dan Y dapat divalidasi dengan metode analisis (Johnson, 1988; Johnson *et al.*, 1987a; Welch and Johnson, 1999).

Pemisahan spermatozoa sampai menghasilkan populasi spermatozoa X dan Y yang mendekati murni berdasarkan perbedaan DNA telah dilakukan menggunakan *Flow Cytrometry* modifikasi (peralatan pemilih sel) (Johnson and Clarke, 1988; Johnson *et al.*, 1987b). Namun, laporan-laporan ini menunjukkan adanya pola kerusakan yang sama seperti analisis DNA spermatozoa yang telah disebutkan sebelumnya, yaitu spermatozoa mati, karena spermatozoa disonikasi untuk menghilangkan ekornya (dibandingkan spermatozoa motil yang masih utuh). Sebagai langkah awal untuk mengetahui kemampuan *Flow Cytrometry* memisahkan spermatozoa yang masih hidup, inti spermatozoa dipilih dan diinjeksikan ke dalam sitoplasma sel telur hamster (Johnson dan Clarke, 1988). Penelitian ini membuktikan bahwa DNA di dalam kepala spermatozoa yang telah dipisahkan masih aktif sehingga mampu memfertilisasi sel telur meskipun spermatozoa berada dalam kondisi standar tidak dapat memfertilisasi sendiri.



BAB III



SEXING MENGGUNAKAN FILTRASI SEPHADEX



Filtrasi gel *sephadex* merupakan suatu pemisahan menggunakan gel yang dibuat dari dasar *dextran*, yaitu suatu jaringan tiga dimensi dari molekul-molekul linier polisakarida yang berikatan dengan *epichlorohydrine* (Nur dan Adijuwana, 1989 dan Adimoelja, 1984). *Sephadex* tidak larut dalam semua larutan dan stabil dalam air, larutan garam, larutan organik, larutan alkalin dan larutan asam, namun akan terhidrolisa dalam asam kuat. *Sephadex* tidak meleleh dan dapat disterilkan pada kondisi basah dengan pH netral atau dapat disterilkan pada kondisi kering dalam *autoclave* selama 30 menit pada suhu 120°C tanpa kehilangan daya pisahnya. Jika *sephadex* dipanaskan lebih dari 120°C akan mengalami karamelisasi (Adimoelja, 1984). Bahan ini dapat mengembang dalam air membentuk struktur tertentu, sehingga dapat memisahkan molekul-molekul sesuai dengan ukurannya. Selain bentuk geometrik, sifat-sifat permukaannya juga memengaruhi kemampuan untuk penyaringannya. Molekul dengan berat molekul seratus sampai beberapa juta dapat dikumpulkan dan dipisahkan dengan metode ini (Nur dan Adijuwana, 1989).

Filtrasi dengan menggunakan gel *sephadex* merupakan separasi kromatografi berdasar afinitas. Molekul-molekul *sephadex* yang bersilang menjamin penyaringan yang selektif. Kekuatan mekanis *sephadex* tergantung pada tingkat ikatannya (*cross linking*) yang akhirnya menjamin porositas partikel-partikel itu (Dowson *et al.*, 1984). Tiap-tiap *sephadex* G memiliki selang berat molekul yang dapat dipisahkan, sedangkan karakteristik *sephadex* G-200 terdapat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1. Karakteristik *Sephadex* G-200

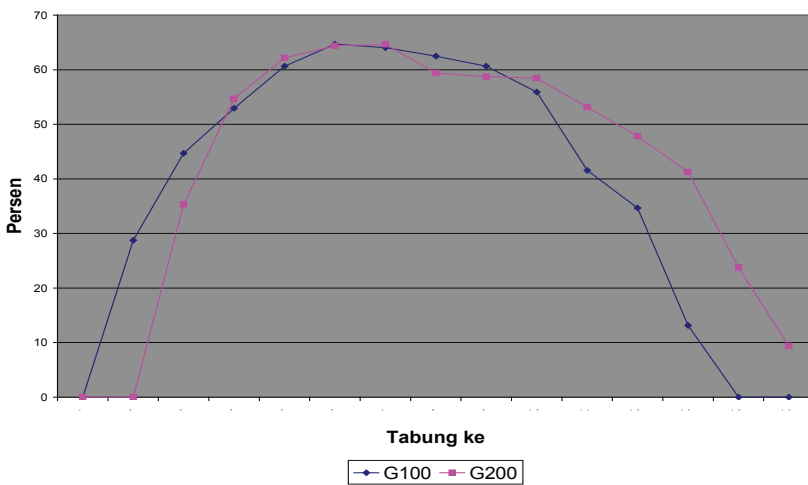
Sephadex	Kisaran berat	Molekul fraksi	Diameter	(μm)	Vol. Cairan untuk 1 g	BM media yang bisa dilewatkan (Dalton)
	Peptida	Dextran	Kering	Basah		
G-200	$5-600 \times 10^3$	$1-200 \times 10^3$	40-120	129-388	30-40	$6 \times 10^4 - 8 \times 10^6$

Catatan : molekul-molekul dengan berat di atas batas atas selang ini tidak dapat menembus gel dan masuk kedalam volume yang kosong. Molekul-molekul dengan ukuran lebih kecil umumnya dilepas (*dielusi*) setelah molekul-molekul yang lebih besar dilepas terlebih dahulu (Adimoelja, 1984).

Pemisahan menggunakan filtrasi, didapatkan spermatozoa X bergerak turun berdasarkan berat jenis dan motilitasnya sendiri, sedangkan Y masih ditahan oleh partikel-partikel gel sephadex, sehingga tidak dapat turun. Penyebab lain adalah tertariknya spermatozoa Y yang bermuatan negatif dengan *sephadex* yang bermuatan positif, dengan demikian dapat dipahami jika spermatozoa X yang bermuatan positif akan dilepaskan, sedangkan spermatozoa Y yang bermuatan listrik negatif akan ditarik (Ericsson dan Glass, 1982) yang disitir oleh Hafez and Hafez (2008). Filtrasi dengan *sephadex* dihasilkan 70% spermatozoa X pada filtrat (Hafez, 2008). Hasil penelitian Mahaputra, dkk (1989) bahwa untuk memisahkan spermatozoa domba dengan *sephadex* kolom G-200 berhasil mendapatkan spermatozoa X dan Y dengan perbandingan 81,3% dan 18,7%. Sementara itu, penelitian sebelumnya yang serupa, yaitu dengan menggunakan *sephadex* G-200 telah dilakukan oleh Adimoelja dkk. (1984) pada domba dihasilkan 87% spermatozoa X. Pada manusia oleh Steeno *et al.*, (1975) berhasil memisahkan 90%. Meskipun data tentang keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y akhir-akhir ini diragukan, namun data Geier *et all.*, (1990) membuktikan bahwa pemakaian metode pemisahan ini menghasilkan kelahiran bayi perempuan 80% . Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Susilawati dkk. (1997) pada spermatozoa sapi yang menggunakan *sephadex* G-200 didapatkan kelahiran *pedet* betina sebesar 82,5% dari 40 ekor *pedet*.

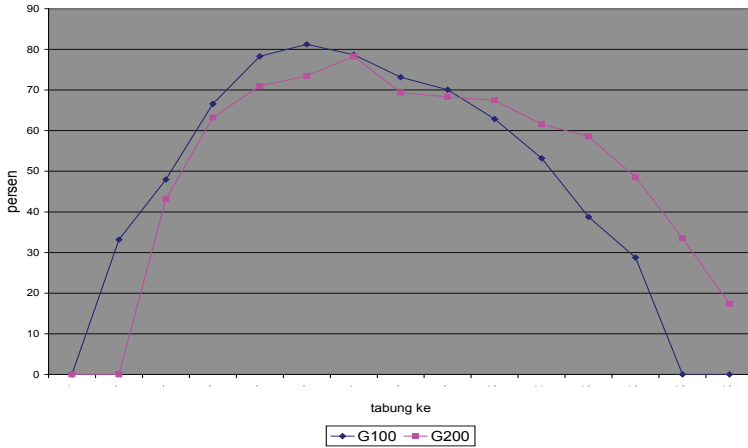
3.1 Jenis Sephadex yang Digunakan untuk Filtrasi Seleksi Jenis Kelamin Memengaruhi Kualitas dan Keberhasilan Seleksi Jenis Kelamin

Seleksi jenis kelamin dengan cara pemisahan spermatozoa X dan Y dengan filtrasi sephadex G100 dan G200 menghasilkan motilitas dan viabilitas spermatozoa pada filtrat dalam tabung seperti pada Gambar 3.1 dan 3.2. Persentase motilitas spermatozoa mula-mula rendah kemudian mengalami kenaikan dan selanjutnya mengalami penurunan. Motilitas spermatozoa mulai tabung ke tiga sampai dengan tabung ke delapan pada sephadex G100 dan ke sembilan pada *sephadex* G200 adalah yang tertinggi.



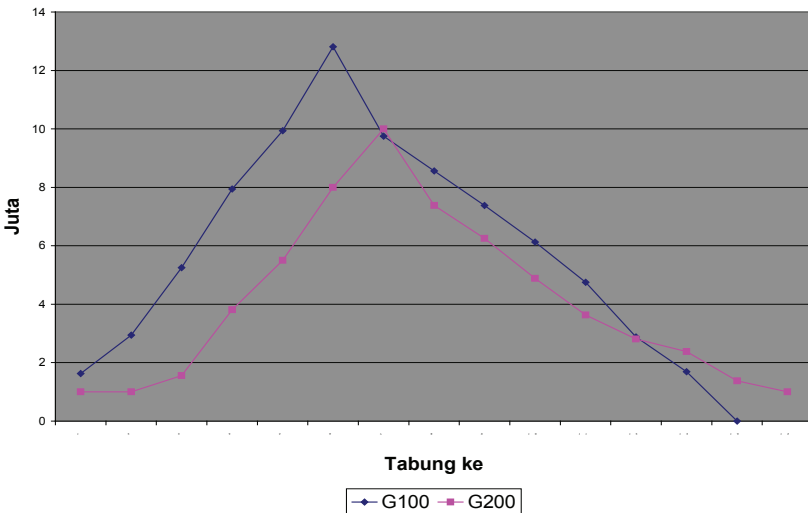
Gambar 3.1. Perbedaan persentase motilitas spermatozoa setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 (Susilawati, 2000)

Persentase motilitas spermatozoa setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 mengalami peningkatan sehingga pada tabung ke-5 sampai ke-10 didapatkan motilitas diatas 60%.

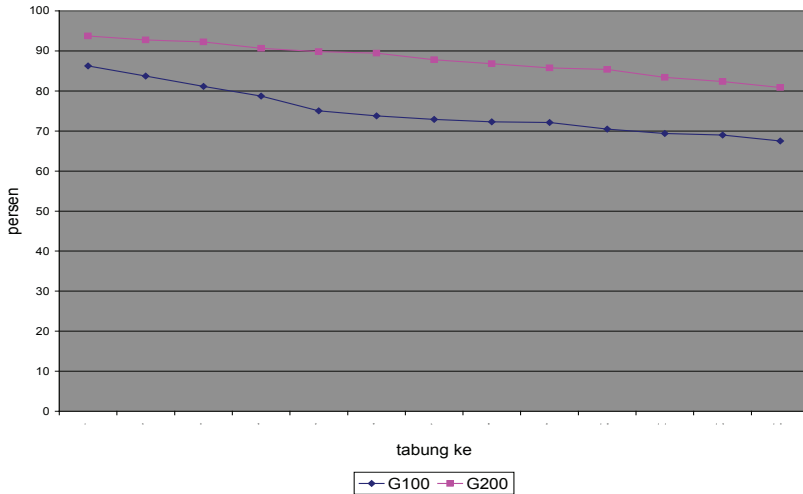


Gambar 3.2. Perbedaan persentase viabilitas Spermatozoa setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 (Susilawati, 2000)

Persentase viabilitas spermatozoa setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 mengalami peningkatan sehingga pada tabung ke-5 sampai ke-10 didapatkan viabilitas diatas 65%.



Gambar 3.3. Perbedaan konsentrasi spermatozoa setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 (Susilawati, 2000)



Gambar 3.4 Perbedaan persentase spermatozoa X pada berbagai tabung setelah filtrasi *sephadex* G100 dan G200 (Susilawati, 2000)

3.2 Tahap Sexing Menggunakan Filtrasi Sephadex

1. Pembuatan Medium

A. Medium pengencer *sephadex* (PBS Dulbecco's)

2,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 8 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 gr KCl dimasukkan dalam erlenmeyer dan dicampur dengan aquabides sebanyak 1 liter dan dihomogenasi, sehingga dapat disimpan dalam *refrigerator* sampai larutan ini digunakan.

B. Medium pengencer semen (tergantung pada pengencer yang digunakan, misalnya *Tris Aminomethane* Kuning Telur, *skim milk* dan lain-lain)

2. Persiapan Kolom

Kolom dengan diameter atas 1,8 cm; tinggi 17 cm dan diameter bawah 0,1 cm diberi *glass wool* pada dasar lehernya dan pada ujung bawah ditancapkan slang dari karet serta dipasang tegak pada statip.

3. Pembuatan Gel Sephadex

1 g *sephadex* diencerkan dengan 40 ml PBS Dulbecco's dan

diaduk sampai rata, kemudian dimasukkan dalam kolom yang telah disiapkan dan ujung bawahnya dijepit dengan arteri klem dan ditunggu gel *sephadex* sampai mengembang.

4. Pelaksanaan filtrasi

Semen yang memenuhi syarat (motilitas diatas 70% dan konsentrasi $2-5 \times 10^9$ spermatozoa/ml) dimasukkan dalam kolom yang berisi gel sephadex sebanyak 1 ml, penutup kolom bagian bawah (arteri klem) dibuka dan ditetesi terus menerus dengan pengencer semen dan filtrat ditampung dalam tabung *ependorf*. Apabila telah mencampai volume 1 ml, maka dipindahkan ketabung berikutnya sampai tidak terdapat spermatozoa. Pada umumnya, cairan yang mengandung spermatozoa X terdapat pada tabung ke-3 sampai dengan ke-10 dan diperoleh motilitas yang bagus dengan proporsi jenis kelamin yang ditinggi pula.

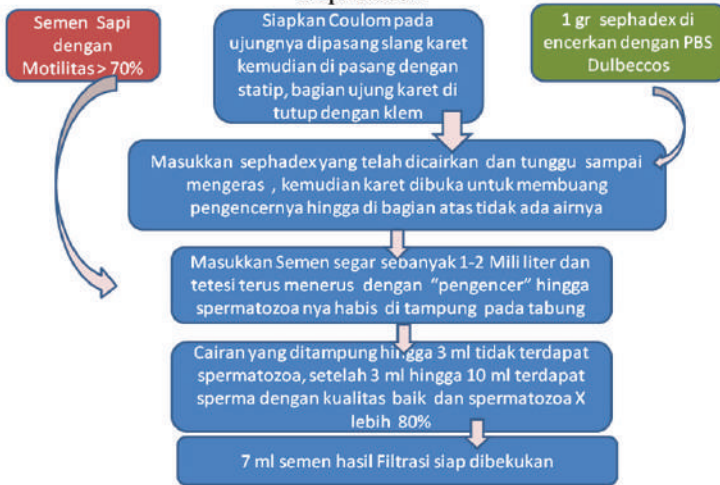


Sexing Spermatozoa Menggunakan Metode Filtrasi *Sephadex*

Gambar 3.5a. Sexing Spermatozoa Menggunakan Metode Filtrasi *Sephadex* (Susilawati, 2000)

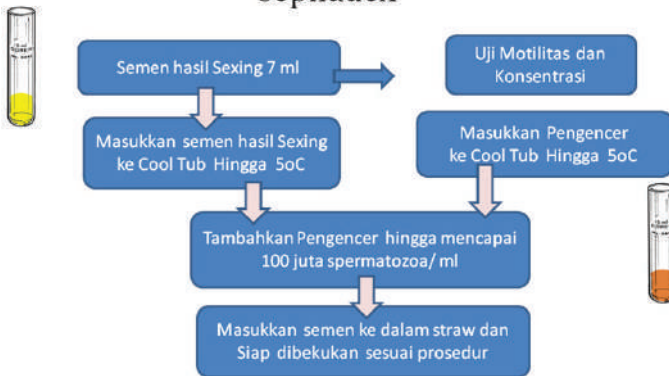
Tahap sexing menggunakan filtrasi sephadex seperti terdapat pada Gambar 3.5 dan tahap pembekuan spermatozoa hasil sexing menggunakan filtrasi sephadex terdapat pada Gambar 3.6.

Langkah-langkah sexing menggunakan Filtrasi sephadex

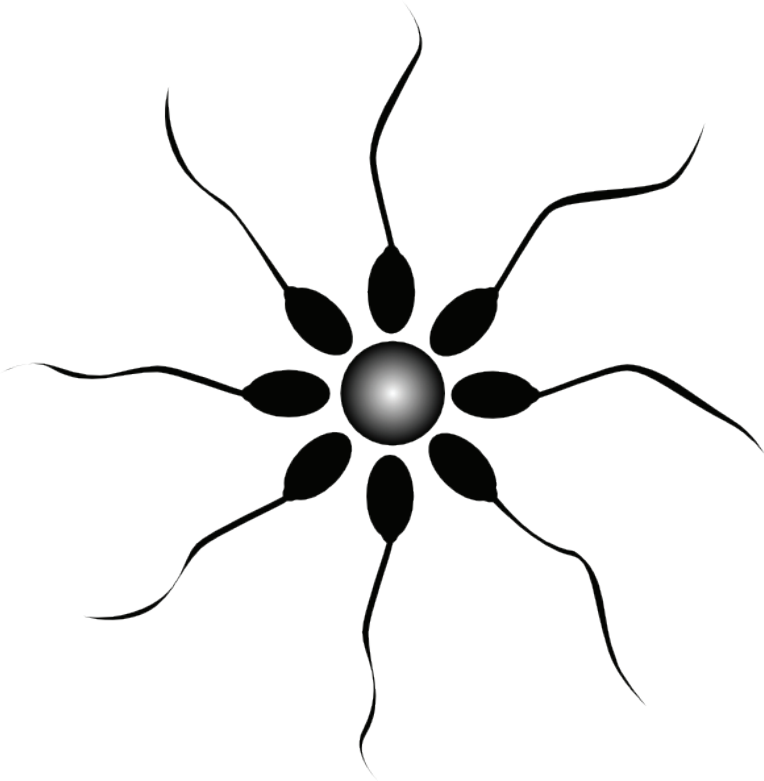


Gambar 3.5b Tahap sexing menggunakan filtrasi sephadex (Susilawati, 2000)

Langkah Pembekuan semen hasil Filtrasi sephadex



Gambar 3.6 Tahap pembekuan spermatozoa hasil sexing menggunakan filtrasi sephadex (Susilawati, 2000)



BAB IV

SEXING MENGGUNAKAN SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS *PERCOLL*



Percoll adalah medium yang terdiri dari partikel koloid diselaputi dengan *poly vinylpyrrolidone* (PVP) yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Selama ini, *Percoll* dapat digunakan untuk memisahkan darah, seperti fraksi-fraksi limfosit, monosit, eritrosit dan thimosit serta partikel sub seluler, seperti membran plasma, liposom dan mitochondria. Selain itu, *Percoll* juga dapat digunakan untuk memisahkan virus, bakteri dan spermatozoa (McClure *et al.*, 1989).

Menurut Kaneko *et al.* (1983), penggunaan *Percoll* dalam pemisahan spermatozoa dianggap memenuhi syarat, karena *Percoll* mempunyai sifat yang diperlukan untuk pemisahan spermatozoa, antara lain: dapat dibuat dalam berbagai densitas, viskositas rendah, tidak toksik, tidak dapat menembus membran sel, dapat disterilkan, tidak mempunyai efek negatif pada pemisahan spermatozoa, mudah dilepaskan dari zat yang dipisahkan, mudah membentuk gradien sendiri meskipun dengan pemutaran rendah.

Sifat-sifat fisik *Percoll* menurut *Pharmacia Fine Chemical t.t.* seperti yang dikutip oleh Downson *et al.*, (1986), yaitu:

1. Komposisi

Percoll mengandung partikel koloid silika yang dilapisi dengan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) berdiameter rata-rata 12 sampai 22 nm (dengan kisaran 15 sampai 30 nm).

2. Viskositas

Percoll mempunyai viskositas 10 ± 5 sentipois pada suhu 20°C . Viskositas *Percoll* lebih rendah dalam larutan garam (0,15 M NaCl) dari pada dalam air maupun dalam 0,25 M sukrosa, sehingga pembentukan gradiennya lebih cepat.

3. Osmolaritas dan pH

Percoll mempunyai pH $8,90 \pm 0,30$ pada suhu 20°C , namun *Percoll* juga mempunyai kapasitas *buffer* yang rendah,

sehingga dengan mudah disesuaikan menjadi pH 5,50–10 tanpa merubah sifat-sifatnya. Osmolaritasnya rendah (lebih kecil dari 20 mOs/kg H₂O) dengan demikian dapat membentuk gradien osmolaritas, sehingga diperoleh gradien densitas yang iso-osmotik dan betul-betul sesuai dengan keadaan fisiologis, karena itu dapat diperoleh sel dengan viabilitas tinggi dan morfologi yang utuh.

Densitas *Percoll* mempunyai densitas $1,13 \pm 0,005$ g/ml dan dapat membentuk gradien densitas dibawah $1,13$ g/ml. Untuk pemisahan sel-sel diencerkan dengan garam fisiologis atau medium kultur jaringan, sehingga densitasnya lebih rendah.

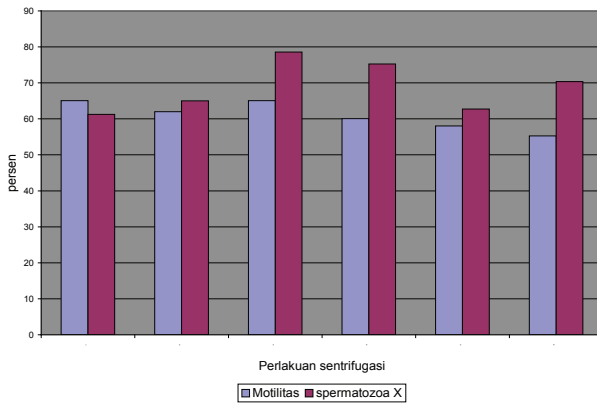
Pemisahan spermatozoa menggunakan sentrifugasi gradien densitas *percoll*, lebih baik jika dibandingkan dengan media lain. Hal ini disebabkan variasi densitas *percoll* dapat dengan mudah dibuat. Pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi lebih baik dilakukan pada waktu yang cepat, karena untuk menghindari besarnya gesekan akibat sentrifugasi dan terjadinya difusi medium pengencer ke dalam spermatozoa (Hafez, 2008).

Kaneko *et al.* (1983) melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y pada manusia dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas *Percoll* didapatkan spermatozoa Y sebesar 73,1% pada densitas 1,06 mg/ml, terus menurun dengan meningkatnya densitas *Percoll* dan akhirnya pada sedimen didapatkan 17,4% (densitas lebih dari 1,11 g/ml). Schwerin *et al.*, (1991) melakukan sentrifugasi menggunakan gradien densitas *percoll discontinous* gradien terdiri dari 10 lapisan masing-masing 0,6 ml larutan *percoll* dengan densitas antara 1,034 dan 1,068 g/ml. Medium gradien adalah TCM 199 ditambah buffer bikarbonat 0,35 g/liter. 30–45 juta spermatozoa diencerkan dalam 1,5 ml TCM 199 dalam 10% *Fetal Calf Serum (FCS)* ditempatkan dalam gradien yang bersuhu 4–6°C disentrifugasi 500 G selama 10 menit dihasilkan spermatozoa X atau Y lebih dari 90%. Hasil penelitian Susilawati, dkk (1996) dengan metode yang sama, tetapi dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm (850 G) selama 5 menit menghasilkan ratio spermatozoa atas dasar ukuran kepala spermatozoa sebesar 83,1%

dengan penurunan motilitas sekitar 10%. Penambahan serum berpengaruh positif terhadap motilitas spermatozoa. Menurut Par (1998), bagian yang berpengaruh dalam meningkatkan motilitas adalah protein dengan berat molekul 180 kD setelah diidentifikasi lebih lanjut adalah imunoglobulin G4 dan apolipoprotein.

4.1 Hasil Penelitian Sexing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas *Percoll*

Hasil penelitian *sexing* dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas *Percoll*, menunjukkan hasil seperti pada gambar 4.1. Pada perlakuan 3 (2250 rpm selama 5 menit) menunjukkan proporsi spermatozoa X dan Y yang tertinggi dengan motilitas yang paling baik, sehingga untuk penelitian selanjutnya perlakuan ini yang digunakan. Persentase motilitas spermatozoa setelah *sexing* atau seleksi jenis kelamin menggunakan sentrifugasi gradien densitas *Percoll* mengalami penurunan dengan menggunakan pengencer TCM 199 atau *Tris Aminomethane* kuning telur pada lapisan atas maupun lapisan bawah.



Gambar 4.1 Perbedaan persentase motilitas dan spermatozoa X pada lapisan bawah pada berbagai kecepatan dan waktu. (Susilawati, 2000)

Catatan :

- Perlakuan 1 :2000 rpm selama 5 menit
- Perlakuan 2 :2000 rpm selama 10 menit
- Perlakuan 3 :2250 rpm selama 5 menit

- Perlakuan 4 :2250 rpm selama 10 menit
- Perlakuan 5 :2500 rpm selama 5 menit
- Perlakuan 6 :2500 rpm selama 10 menit

Rataan persentase motilitas pada semen segar adalah $70,0 \pm 0$, sedangkan setelah sentrifugasi pada lapisan atas dan bawah dengan menggunakan medium *Tris Aminomethane* adalah $61,66 \pm 3,53$ dan $60,0 \pm 5,0$; sedangkan pada pengencer TCM 199 adalah $61,11 \pm 4,86$ dan $61,11 \pm 3,33$. Penurunan kualitas spermatozoa ini disebabkan oleh spermatozoa berada diluar tubuh, suhu, terpisahnya dengan seminal plasma, gaya sentrifugasi dan gesekan antara medium dengan membran spermatozoa. Pada penelitian ini lebih baik dari pada penelitian Susilawati dkk. (1996) bahwa motilitas spermatozoa setelah sentrifugasi hanya sekitar 50%. Hal ini membuktikan bahwa penambahan kuning telur sebelum sentrifugasi dapat mempertahankan atau melindungi spermatozoa, sehingga motilitas spermatozoa jauh lebih rendah dibandingkan dengan semen segar. Junandri (2014) Seksing dengan metode sentrifugasi gradien densitas *percoll* menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dan andromed® dapat menjaga kualitas spermatozoa tetap baik, serta menjaga spermatozoa agar tidak mengalami kapasitas dini setelah proses seksing. Pengencer semen CEP-2 ditambah kuning telur 10% memiliki kemampuan yang sama dengan pengencer komersial andromed® dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kualitas spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah sebaik pengencer andromed®

Di dalam proses seksing menggunakan metode sentrifugasi gradien densitas *percoll* ini membutuhkan ketrampilan yang tinggi dalam menggunakan mikropipet, maka perlu diperkenalkan bermacam-macam *micropipet* serta cara penggunaan *micropipet* seperti pada gambar 4.2 dan 4.3.

Macam-macam Mikropipet



Kalibrasi Mikropipet

Macam Produk Socorex

Gambar 4.2. Berbagai macam mikro pipet dan tip yang dapat digunakan.

Keterangan :

1. Mikropipet di produksi oleh beberapa perusahaan , sehingga terdapat beberapa nama dagang dari mikropipet.
2. Mikropipet dilengkapi dengan Tip mikropipet dengan ukuran dan fungsi yang berbeda
3. Mikropipet terdapat yang sigle untuk satu tip dan terdapat yang multi channel untuk banyak tip .
4. Mikropipet terdapat beberapa model dan ukuran, ada yang satu ukuran tetapi ada juga yang ukurannya bisa diatur. Selain itu juga terdapat kapasitas yang berbeda-beda pula

Misal :kapasitas 200 – 1000 μl ; kapasitas 0 – 200 μl ; kapasitas 0-100 μl

Cara Menggunakan Mikropipet



Gambar 4.3. Cara menggunakan mikropipet

Gambar 4.3. Cara menggunakan mikropipet

4.2 Tahap Sexing dengan Gradien Densitas *Percoll*

1. Pembuatan Gradien Densitas *Percoll*

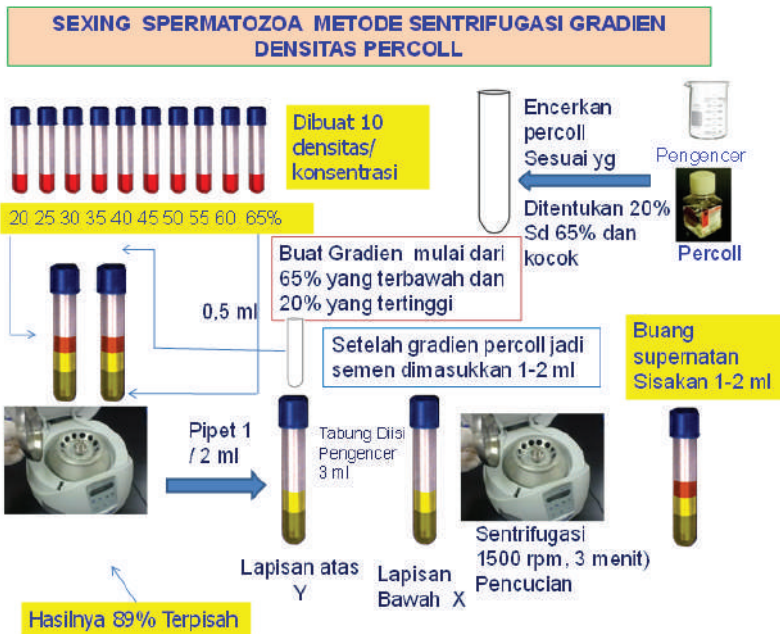
Gradien densitas yang digunakan adalah 1,036; 1,038; 1,043; 1,047; 1,052; 1,055; 1,057; 1,0605; 1,065 sampai 1,070 yang diperoleh dari pengenceran *Percoll* dengan “pengencer” menjadi 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% dan 65%, Kemudian larutan dari berbagai densitas tersebut disusun dalam tabung secara berurutan dari densitas tertinggi sampai terendah masing-masing 0,5 ml.

Tabel 4.1 Contoh perbandingan *Percoll* dengan pengencer untuk 10x ulangan (20 ml semen)

Persentase	<i>Percoll</i> (ml)	Pengencer (ml)	Total (ml)
20%	1	4	5
25%	1,25	3,75	5
30%	1,5	3,5	5
35%	1,75	3,25	5
40%	2	3	5

Persentase	Percoll (ml)	Pengencer (ml)	Total (ml)
45%	2,25	2,75	5
50%	2,5	2,5	5
55%	2,75	2,25	5
60%	3	2	5
65%	3,25	1,75	5
Total	21.25	28.75	50

2. Pelaksanaan Sentrifugasi



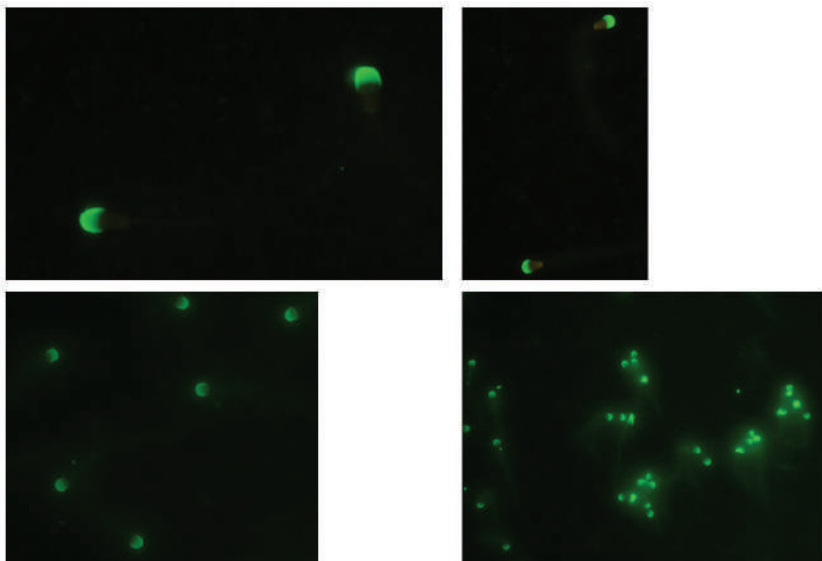
Gambar 4.4 Tahap Sexing dengan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll (Susilawati, 2000)

1–2 ml semen yang telah memenuhi syarat dimasukkan tabung yang telah berisi gradien densitas *Percoll*, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm (850 G) selama 5-7 menit. Hasil sentrifugasi menjadi enam lapisan pada lapisan teratas adalah seminal plasma dibuang dan pada lapisan kedua adalah yang banyak mengandung spermatozoa Y, sedangkan hanya pada lapisan bawah yang banyak mengandung spermatozoa

X diambil dan dimasukkan dalam tabung yang telah berisi “pengencer” sebanyak 3 ml, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm (380 G) selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan 2 ml cairan yang banyak mengandung spermatozoa. Tahap sexing dengan sentrifugasi gradient densitas *percoll* seperti terdapat pada Gambar 4.4

4.3 Analisa Intak acrosome pada spermatozoa pada perlakuan sentrifugasi gradien densitas *Percoll* dan sedimentasi Putih Telur

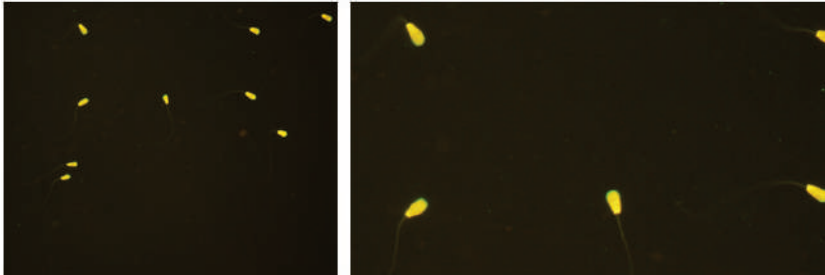
Pengamatan status reaksi akrosom dengan menggunakan fluorochrome fluoresceine isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) dengan menggunakan filter cubenya: WB -#2, dichroic mirror DM500, excitation filter BP450-480, barrierfilter BA 515.



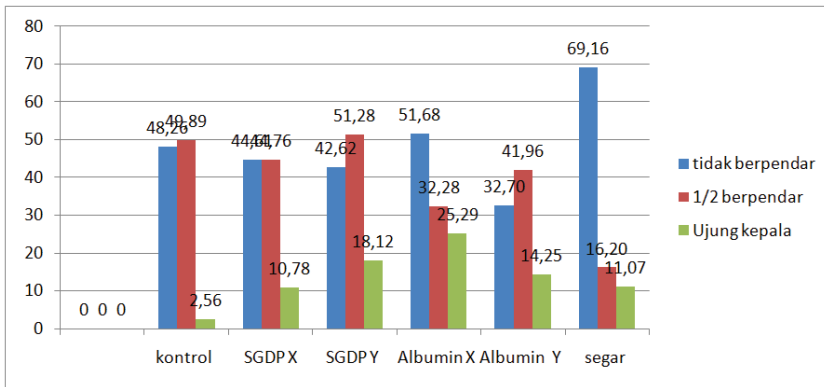
Gambar 4.5 Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom pada perlakuan *percoll*

Uji akrosom reaksi (AR) adalah variabel yang stabil untuk melihat fungsi spermatozoa akan tetapi tidak dapat digunakan untuk memprediksi keberhasilan fertilisasi, tetapi digunakan untuk penelitian kontrasepsi pria dan efek makanan dan obat terhadap

toxic pada gonad. Uji ini berdasar pada fisiologi spermatozoa dan melibatkan kapasitas dan reaksi akrosom. Saat kapasitas adalah suatu bagian dari reaksi akrosom yang disertai dengan keluarnya *enzyme oflytic* dan pemaparan pada reseptor membran yang akan penetrasi ke zona pelusida dan untuk fusinya oolema.



Gambar 4.6. Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom pada kontrol



Gambar 4.7. Hasil pewarnaan dengan FITC PNA pada berbagai perlakuan

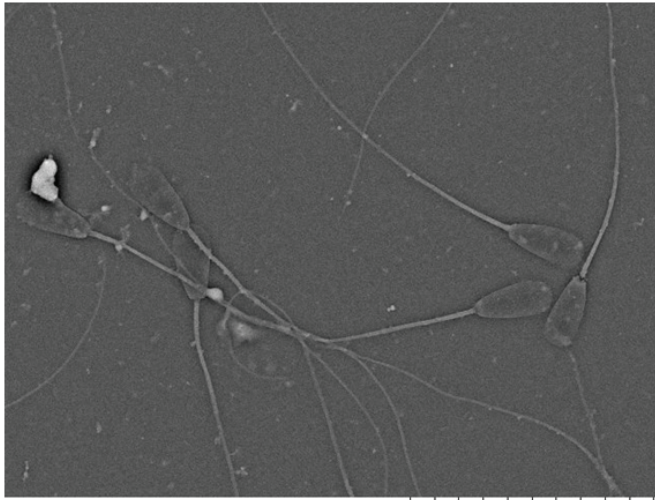
Untuk mengamati status akrosom dan viabilitas, dikembangkan suatu bahan reagen yang dapat mengamati status akrosom pada target bagian akrosom pada kepala spermatozoa yaitu fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin - FITC-PNA. Berdasarkan pewarnaan dengan menggunakan FITC - PNA pada masing-masing perlakuan seperti pada gambar 11. Hal ini menunjukkan bahwa pada semen segar terdapat $69,16 \pm 8,85$ spermatozoa yang utuh, hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa dalam keadaan segar masih banyak utuh tudung akrosomnya.

Sedangkan pada semen beku terjadi peningkatan jumlah sepertozoa yang pada ½ ujung kepalanya berpendar , hal ini menunjukkan bahwa pada proses pembekuan mentrigger terjadinya reaksi akroskom atau tidak intaknya tudung akrosom, walau hanya sedikit yang mengalami reaksi akrosom Diliyana dkk (2014). Metode pemisahan spermatozoa dengan metode sentrifugasi *gradient densitas percoll* menggunakan pengencer CEP-2 + kuning telur 10% lebih baik dibandingkan dengan pengencer andromed. Hal ini ditandai dengan spermatozoa yang belum kapasitasi dipertahankan tetap tinggi, sedangkan spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom tetap rendah.

Tabel 4.2. Rata-rata \pm SD gambaran Reaksi akrosom pada perlakuan sexing dengan metode sentrifugasi gradien densitas *percoll* dan sedimentasi putih telur (albumin)

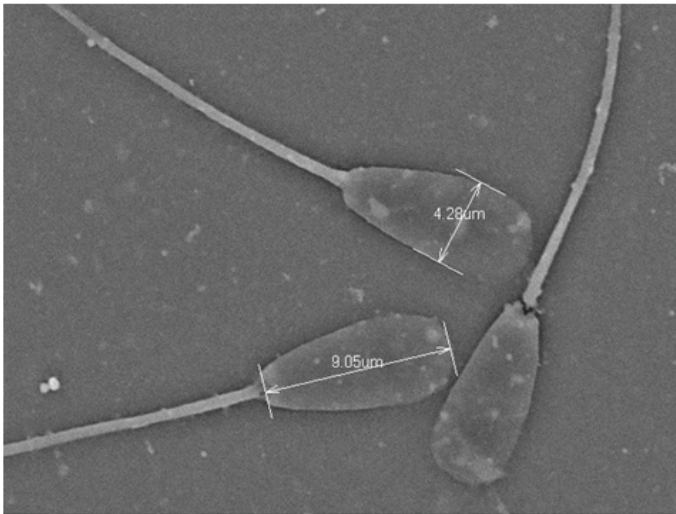
Perlakuan	Tidak berpendar	½ berpendar	berpendar diujungnya
Tanpa sexing	48,26 \pm 45,10	49,89 \pm 43,78	2,56 \pm 0,57
SGDP X	44,61 \pm 16,82	44,76 \pm 19,66	10,78 \pm 3,98
SGDP Y	42,62 \pm 19,92	51,28 \pm 20,94	18,12 \pm 26,21
Albumin X	51,68 \pm 10,02	32,28 \pm 19,22	25,29 \pm 18,86
Albumin Y	32,70 \pm 13,57	41,96 \pm 23,02	14,25 \pm 7,41
Segar	69,16 \pm 8,85	16,20 \pm 14,26	11,07 \pm 4,34

Spermatozoa hasil sexing dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas *percoll* juga mempunyai trend sama dengan tanpa sexing dan pada yang populasi spermatozoa Y yang spermatozoa utuh lebih sedikit dibandingkan yang reaksi akrosom atau tidak adanya tudung akrosom, tren yang sama terjadi pula pada perlakuan sexing dengan metode sedimentasi albumin putih telur, hal tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa lebih rentan dalam lepasnya tudung akroskom dibandingkan spermatozoa X, atau kemungkinan efek dari sentrifugasi lebih terasakan pada spermatozoa Y dibandingkan spermatozoa X.



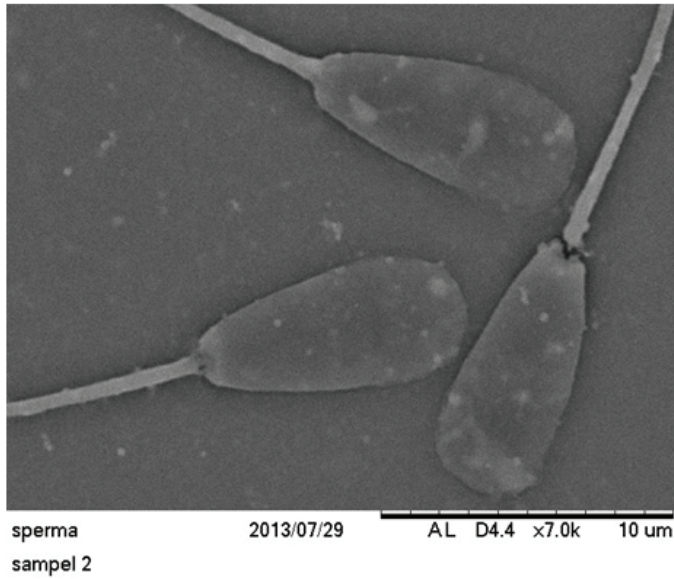
sperma 2013/07/29 AL D4.4 x2.0k 30 um
sampel 2

Gambar 4.8 . Hasil Pengamatan dengan SEM Spermatozoa dengan pembesaran 2000 kali

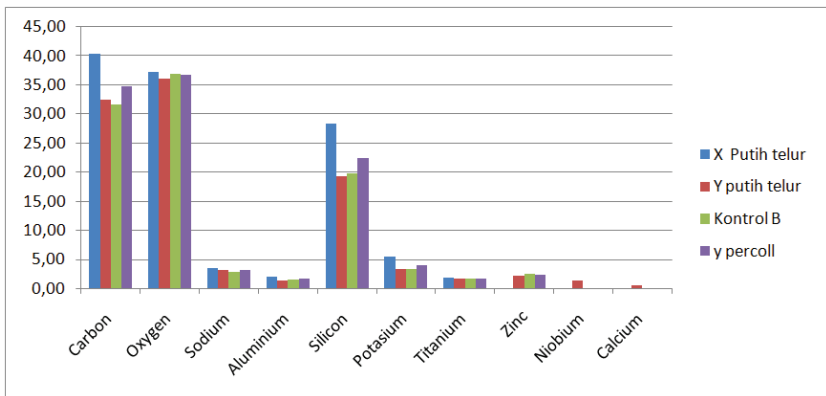


sperma 2013/07/29 AL D4.5 x5.0k 20 um
sampel 2

Gambar 4.9. Hasil pengamatan dengan SEM Spermatozoa dengan pembesaran 5000 kali dan hasil pengukuran panjang dan lebar kepala spermatozoa



Gambar 4.10. Hasil pengamatan menggunakan SEM spermatozoa dengan pembesaran 7 000 kali

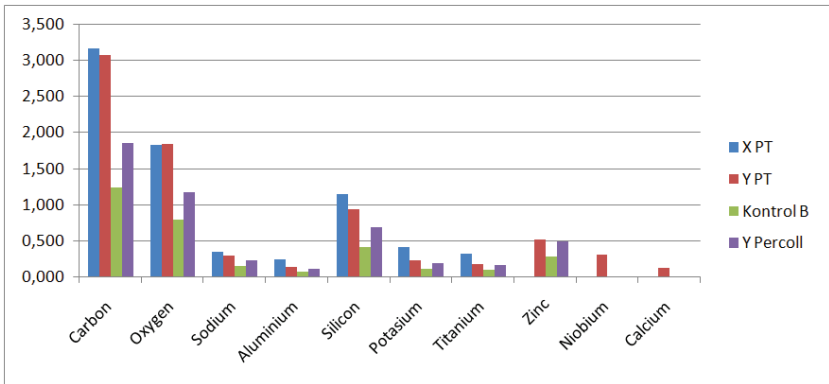


Gambar 4.11. Grafik Rataan Weight % pada berbagai perlakuan

Tabel 4.3. Rataan Weight % pada berbagai perlakuan

	X Putih telur	Y putih telur	Kontrol B	y percoll
Carbon	40,45	32,51	31,59	34,85
Oxygen	37,31	36,03	37,00	36,78
Sodium	3,53	3,13	2,73	3,13
Aluminium	1,94	1,36	1,41	1,57

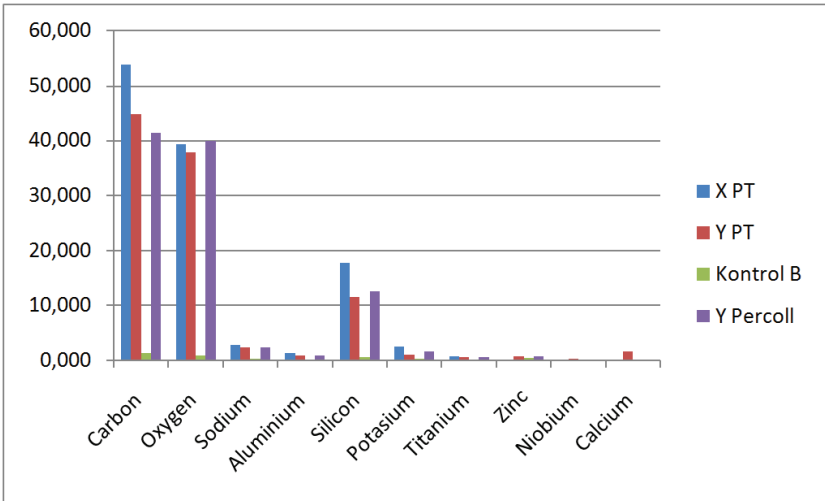
	X Putih telur	Y putih telur	Kontrol B	<i>y percoll</i>
Silicon	28,33	19,23	19,84	22,46
Potasium	5,38	3,31	3,26	3,99
Titanium	1,88	1,57	1,64	1,70
Zinc		2,22	2,53	2,37
Niobium		1,36		
Calcium		0,56		



Gambar 4.12. Rataan Weight % σ pada berbagai perlakuan

Tabel 4.4. Rataan Weight % σ pada berbagai perlakuan

	X PT	Y PT	Kontrol B	<i>Y Percoll</i>
Carbon	3,169	3,083	1,235	1,860
Oxygen	1,826	1,837	0,786	1,173
Sodium	0,343	0,291	0,147	0,229
Aluminium	0,240	0,126	0,068	0,102
Silicon	1,138	0,937	0,404	0,680
Potasium	0,409	0,219	0,106	0,182
Titanium	0,318	0,175	0,096	0,160
Zinc		0,511	0,281	0,493
Niobium		0,309		
Calcium		0,116		



Gambar 4.13. Rataan Atomic % pada berbagai perlakuan

Tabel 4.5. Rataan Atomic % pada berbagai perlakuan

	X PT	Y PT	Kontrol B	Y Percoll
Carbon	53,799	44,916	1,235/43.433	41,511
Oxygen	39,409	37,774	0,786/39.031	39,990
Sodium	2,782	2,284	0,147/2.232	2,309
Aluminium	1,258	0,847	0,068/0.833	0,895
Silicon	17,691	11,479	0,404/11.799	12,555
Potassium	2,512	0,982	0,106/1.439	1,546
Titanium	0,678	0,549	0,096/0.567	0,566
Zinc		0,598	0,281/0.669	0,627
Niobium		0,249		
Calcium		1,555		

Berdasarkan tabel 4.3, sexing menggunakan XPT membran sel spermatozoa memiliki persentase atom Carbon dan oxygen lebih tinggi dibandingkan kontrol, sexing YPT maupun Y Percoll. Di antara ketiga perlakuan (XPT, YPT dan Kontrol), sexing dengan menggunakan Y *percoll* menyebabkan membran sel spermatozoa memiliki persentase atom Carbon paling rendah. Atom Oxygen pada keempat perlakuan, menunjukkan bahwa perlakuan YPT memiliki atom oxygen lebih rendah. Molekul utama penyusun membran

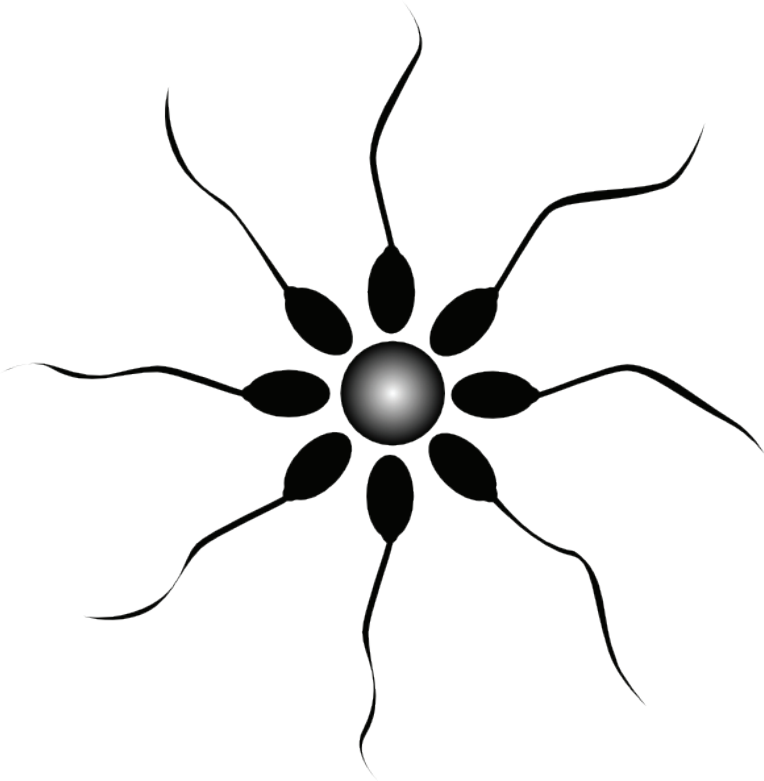
plasma adalah lipid dan protein, yang penyusun utamanya adalah atom Carbon dan Oxygen dan Hydrogen (Cooper, 2002).

Adanya perbedaan persentase atom yang terdapat pada membran sel masing-masing perlakuan bisa disebabkan karena adanya kerusakan molekul-moleku-moleku-moleku penyusun membran plasma. Pada penelitian terdahulu didapatkan bahwa sexing spermatozoa dapat meningkatkan terjadinya kapasitas dan reaksi akrosom. Bronson *et al* (2000) dalam penelitiannya menemukan bahwa Vibronectin merupakan salah satu protein yang diekspresikan lebih tinggi pada membran plasma spermatozoa manusia ketika reaksi akrosom terjadi. Sementara itu Grace *et al* (2002) menyatakan bahwa terdapat peningkatan ekspresi protein 33 kD ketika terjadi kapasitas pada. Penagruh fisik pada spermatozoa, sebagai contohnya pembekuan dapat menyebabkan relokasi beberapa protein antara lain protein GLUT 3 (Sancho, 2007) pada babi Iberian.

Berdasarkan uraian di atas dapat dikatakan bahwa perbedaan persentasi Carbon dan Oxygen bisa disebabkan karena adanya reaksi akrosom ataupun kapasitas selama proses sexing.

Tabel 4.6. Rincian Biaya untuk setiap proses sexing dengan metode sentrifugasi gradien densitas *percoll*

Rincian biaya setiap proses SGDP:				
1.	bahan & alat penampungan	=	101.500	
2.	bahan & alat pemeriksaan kualitas	=	52.250	
3.	<i>percoll</i>	=	119.500	
4.	andromed	=	32.500	
5.	Biaya operator penampungan	=	300.000	
6.	Biaya operator laboratorium	=	900.000	
			1.505.750	
	Perolehan straw X/proses	=	32	bh
	Perolehan straw Y/proses	=	32	bh
	Harga produksi	=	23.527	



BAB V

SEXING MENGGUNAKAN ALBUMIN (PUTIH TELUR)

Pemisahan spermatozoa dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai sumber albumin telah dilakukan sebelumnya. *Bovine Serum Albumin* merupakan bahan kimia yang berisi albumin berasal dari sapi, sedangkan kandungan albumin dalam senyawa BSA, yaitu 100 mg/ml. Pemisahan dengan menggunakan albumin merupakan metode yang cukup fleksibel dan mudah diterapkan di lapang. Metode ini didasarkan atas perbedaan motilitas sperma X dan Y sebagai implikasi dari perbedaan massa dan ukuran. Massa dan ukuran sperma Y yang lebih kecil dari sperma X menyebabkan sperma tersebut mampu bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan (Jaswandi, 1996). Beernink dan Ericsson (1984) yang disitir oleh Hafez and Hafez (2008) melaporkan bahwa lapisan pada kolom albumin, spermatozoa Y pada manusia akan bergerak ke bawah dan spermatozoa X akan tetap pada lapisan atas.

Percobaan yang telah dilakukan untuk meningkatkan proporsi kromosom Y pada spermatozoa manusia dapat diterapkan pada spermatozoa sapi. Medium yang digunakan untuk separasi spermatozoa adalah kolom albumin pada BSA. Separasi spermatozoa dianalisa dengan menggunakan *flow cytometry* untuk menentukan kromosom X dan Y yang didasarkan pada kandungan DNA.

Ericsson pada tahun 1973 telah melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y pada manusia berdasarkan pergerakan spermatozoa. Spermatozoa Y yang lebih cepat gerakannya dibanding spermatozoa X, yaitu dengan menggunakan medium BSA didapat lebih dari 85% spermatozoa Y. Spermatozoa sapi hasil seleksi dengan kolom albumin telah berhasil dibekukan dan dapat dilakukan secara komersial (Hafez, 2008)

Penelitian dengan menggunakan konsentrasi tunggal suspensi BSA 6% dalam kolom, dan cukup efektif untuk memisahkan spermatozoa X dan Y pada kambing. Inseminasi dengan spermatozoa yang masuk ke dalam suspensi BSA menghasilkan anak jantan yang lebih banyak dari anak betina, yaitu masing-masing sebesar 83,3% dan 16,7%, sedangkan inseminasi menggunakan semen bagian atas diperoleh anak betina lebih banyak dari anak jantan, yaitu masing-masing sebesar 61,5% dan 38,5%. Jaswandi (1992) menggunakan konsentrasi bertingkat larutan BSA 6% (lapisan atas) dan 10% (lapisan bawah) pada ternak sapi perah. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa inseminasi dengan lapisan semen bagian bawah didapatkan rasio jenis kelamin ternak jantan 62,5% dan betina 37,5%, sedangkan inseminasi dengan lapisan semen bagian tengah diperoleh jantan 22,2% dan betina 77,8%. Saili (1999) melakukan pemisahan dengan menggunakan konsentrasi putih telur secara bertingkat antara 10% pada lapisan atas serta 30% dan 50% pada lapisan bawah. Pada lapisan bawah dengan konsentrasi 30% dalam pengencer dapat mengisolasi 71,50% dan pada konsentrasi 50% dapat mengisolasi 73,50% spermatozoa Y.

Putih telur sering disebut albumen merupakan bagian dari telur yang berfungsi sebagai anti bakteri dan *buffer* untuk mempertahankan sifat fisik dan kimia telur. Putih telur terdiri dari tiga lapisan material, yaitu *inner thin albumin* berbentuk cairan agak kental yang terletak pada bagian paling dalam dari putih telur, *thick albumin* merupakan lapisan bagian tengah dan bersifat kental serta lapisan *outer thin albumin* yang merupakan kantung albumin yang terletak pada bagian paling luar putih telur. Albumin yang digunakan untuk sexing adalah albumin pada putih telur (albumin) yang juga banyak mengandung albumin. Komponen pokok yang terkandung dalam putih telur sebagai berikut: protein 12%, glukosa 0,4%, lemak 0,3%, garam 0,3% dan air 87%. Putih telur terdiri dari bermacam-macam protein, enzim inhibitor, anti bakteri, vitamin yang terikat dan mineral-mineral yang terikat. Protein merupakan bagian terbanyak, bahan organik yang menyusun putih telur terdiri atas *ovalbumin*, *ovotransferrin*, *ovomucin*, *lysozyme*, *avidin* dan

globulin sebagai komponen utamanya. Persentase protein yang terdapat pada putih telur seperti pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Kandungan Protein dalam Putih Telur

Protein	Kandungan (%)	Poin Isoelektrik	Berat Molekul (Dalton)
Ovalbumin	45	4,5	45000
Ovotransferrin	12	6,1	76000
Ovomucoid	11	4,1	28000
Ovomucin	3,5	5,5-5,0	5,5-8,3 x 10 ⁶
Lysozyme	3,4	10,7	14300
G ₂ -Globulin	4,0	5,5	3,0-4,5 x 10 ⁶
G ₃ -Globulin	4,0	4,0	-
Ovoinhibitor	1,5	5,1	49000
Ficin (cystatin) inhibitor	0,05	5,1	12700
Ovoglycoprotein	1,0	3,9	24400
Ovomacroglobulin	0,5	4,5	7,6-9,0 x 10 ⁵
Avidin	0,05	10	68300

Sumber : Powrie dan Nakai (1986) disitasi Froning (1994)

Sifat dan fungsi beberapa komponen penyusun putih telur (Froning, 1994; Hazelwood, 1983 dan McWilliams, 1997), yaitu :

1. *Ovalbumin* merupakan protein yang terdapat dalam putih telur yang berlimpah kurang lebih 45 % dan bersifat *phosphoglycoprotein*.
2. *Ovotransferrin* sering disebut *conalbumin* yang mengikat Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ dan Ni²⁺.
3. *Ovomucoid* merupakan kekuatan pelindung proteolisis, pelindung tripsin, dan pelindung spesies spesifik serta mengandung 22 % karbohidrat.
4. *Ovomucin* sebagai cadangan karbohidrat luar biasa tinggi yang tidak dapat dipecahkan, merupakan serat protein dan berfungsi menjaga viskositas putih telur.
5. *Lysozyme* menghidrolisis ikatan β (1-4) glycosidic dalam dinding sel bakteri *peptidoglycan*, membantu pembentukan *oligosaccharides* dari dinding sel bakteri *tetrasaccharide* oleh *transglycosylation*.

6. *Globulin* sebagai stabilitor.
7. *Ovoinhibitor* sebagai pelindung *proteolytic* bermacam enzim, misalnya tripsin, *chymotrypsin*, papain dan *ficin*.
8. *Ficin (cystatin) inhibitor* melindungi *thioprotease*.
9. *Ovoglycoprotein* sebagai sialoprotein.
10. *Ovomacroglobulin* sebagai antigenik kuat.
11. *Avidin* sebagai agen anti bakteri dan mengikat biotin.

5.1 Hasil Penelitian Sexing Menggunakan Kolom Putih Telur pada Sapi

Penentuan spermatozoa X dan Y didasarkan pada ukuran kepala spermatozoa, spermatozoa yang memiliki ukuran lebih kecil dari ukuran kepala rata-rata ($33,35 \pm 13,72 \mu\text{m}$) adalah spermatozoa Y. Persentase rata-rata spermatozoa Y pada lapisan atas adalah $28,4 \pm 10\%$, sedangkan pada lapisan bawah $75,8 \pm 13\%$ (Susilawati dkk., 2002).

Berdasarkan hasil penelitian Susilawati dkk. (2002) terlihat bahwa persentase spermatozoa Y lapisan atas lebih rendah dari persentase spermatozoa Y pada lapisan bawah. Hafez and Hafez (2008) menyatakan hal ini disebabkan oleh perbedaan masa dan ukuran spermatozoa Y yang lebih kecil dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga pergerakan spermatozoa Y lebih cepat dan mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan.

Penambahan kuning telur pada pengencer *Tris aminomethane* memberikan pengaruh nyata terhadap persentase spermatozoa Y baik pada lapisan atas maupun pada lapisan bawah. Hal ini menunjukkan bahwa kuning telur tidak menghambat kemampuan spermatozoa Y untuk menembus lapisan-lapisan pada putih telur dengan konsentrasi tinggi. Hal ini disebabkan oleh adanya asam sitrat pada pengencer, sehingga asam sitrat mengikat butir-butir lemak yang berasal dari kuning telur. Persentase spermatozoa Y tertinggi terdapat pada lapisan bawah $75,8 \pm 13\%$, karena spermatozoa Y memiliki pergerakan lebih cepat dari pada spermatozoa X (Susilawati dkk., 2002)

Motilitas rata-rata spermatozoa hasil pemisahan mengalami penurunan dibandingkan motilitas spermatozoa sebelum dipisahkan atau semen segar. Penurunan persentase motilitas ini sangat wajar terjadi, karena spermatozoa telah mengalami perlakuan mulai dari proses pemisahan sampai proses pencucian yang membutuhkan banyak energi untuk tetap mempertahankan kondisi fisiologi. Persentase motilitas spermatozoa setelah pemisahan dengan menggunakan Pengencer *Tris aminomethane* kuning telur pada lapisan atas sebesar $48 \pm 9,19\%$; sedangkan pada lapisan bawah sebesar $55 \pm 5,27\%$. Viabilitas sebesar $52,07 \pm 32,20\%$ pada lapisan atas dan pada lapisan bawah sebesar $76,84 \pm 12,62\%$. Sesuai dengan tingginya persentase motilitas lapisan bawah pada Pengencer *Tris aminomethane* kuning telur, maka persentase hidup spermatozoa juga tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa ada korelasi positif antara motilitas dengan persentase hidup spermatozoa. Hal ini disebabkan oleh pada lapisan bawah mempunyai kandungan putih telur yang tinggi, sehingga mempunyai kandungan albumin yang tinggi pula. Menurut Martin dkk. (1983) disitir oleh Pancahastana (1999) bahwa dalam albumin terdapat zat yang disebut *lysozyme* merupakan senyawa protein yang mengandung antibiotika yang dapat menghancurkan beberapa bakteri. Dalam hal ini, zat yang dapat membunuh spermatozoa yang mati. Disamping itu, kuning telur mampu melidungi membran kepala spermatozoa, sehingga dapat mengurangi penurunan persentase hidup spermatozoa.

Konsentrasi rata-rata setelah pemisahan pada tiap-tiap lapisan terdapat perbedaan yang besar, yaitu pada lapisan atas sebesar $44,4 \pm 21,71$ juta/ml, sedangkan lapisan bawah sebesar $139,7 \pm 40,82$ juta/ml. Konsentrasi tertinggi terdapat pada lapisan bawah. Hal ini disebabkan oleh spermatozoa diinkubasi selama 20 menit selama pemisahan. Spermatozoa akan berusaha menembus medium pemisah. Spermatozoa Y yang memiliki ukuran kepala lebih kecil akan mampu menembus sampai larutan 30% putih telur. Spermatozoa X yang memiliki ukuran kepala lebih besar berusaha menembus larutan 30% putih telur, tetapi tidak mampu

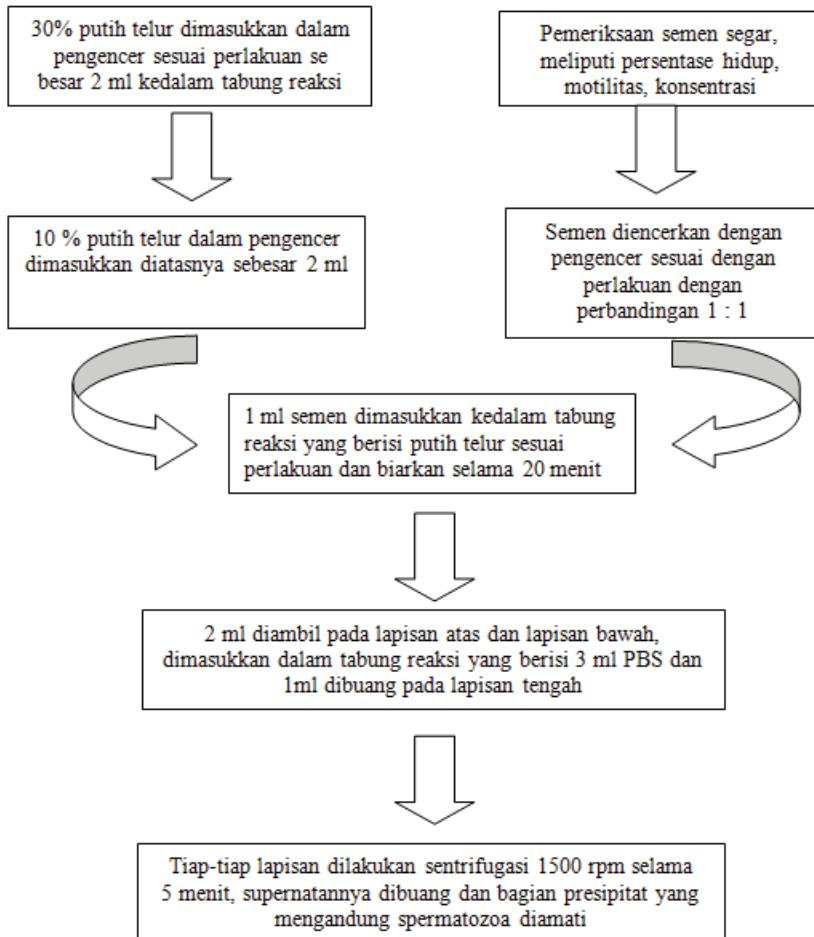
dan akhirnya berada pada lapisan tengah, sehingga pada lapisan atas konsentrasinya rendah (Susilawati dkk., 2002).

5.2 Hasil Penelitian pada Semen Kambing

Hasil pengamatan motilitas rata-rata spermatozoa hasil pemisahan dengan menggunakan Pengencer *Tris aminomethane* telur pada lapisan atas sebesar $50,5 \pm 5,50\%$, sedangkan lapisan bawah sebesar $41 \pm 6,99\%$ (Susilawati, 2002). Motilitas rata-rata spermatozoa lapisan bawah lebih rendah daripada motilitas spermatozoa lapisan atas. Hal ini karena spermatozoa lapisan bawah telah melewati dua lapisan, sehingga energi yang digunakan lebih banyak akibatnya akan menurunkan motilitas atau bahkan tidak bergerak sama sekali (Saili, 1999). Lapis bawah mengandung 30% putih telur dan akan meningkatkan viskositas pengencer, lebih lanjut Jaswandi (1992) menyebutkan bahwa kenaikan viskositas dalam pengencer cenderung untuk menurunkan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa.

Persentase hidup spermatozoa setelah pemisahan dengan Pengencer *Tris aminomethane* kuning telur pada lapisan atas sebesar $67,59 \pm 11,40\%$, sedangkan pada lapisan bawah sebesar $70,39 \pm 10,92\%$. Konsentrasi setelah pemisahan pada lapisan atas sebesar $1614 \pm 767,89$ ($\times 10^6/\text{ml}$), sedangkan pada lapisan bawah sebesar $1244,9 \pm 687,48$ ($\times 10^6/\text{ml}$). Hasil pengukuran besar kepala spermatozoa semen segar didapatkan rata-rata sebesar $32,23 \pm 2,21$ mm. Hasil pengukuran besar kepala spermatozoa tersebut digunakan sebagai dasar penentuan spermatozoa X dan Y. Spermatozoa yang memiliki ukuran lebih kecil dari ukuran kepala rata-rata adalah spermatozoa Y dan spermatozoa yang memiliki ukuran sama atau lebih besar dengan rata-rata adalah spermatozoa X. Persentase spermatozoa X pada lapisan atas sebesar $70,4 \pm 9,88\%$ dan pada lapisan bawah sebesar $28,4 \pm 14,04\%$, sedangkan spermatozoa Y kebalikannya, yaitu pada lapisan atas sebesar $29,6 \pm 9,88\%$ dan pada lapisan bawah sebesar $71,6 \pm 14,04\%$ (Susilawati, 2002). Purwoistri dkk (2014) dan Ervandi dkk (2013) Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga membran spermatozoa hasil *sexing* dengan gradien albumin

(putih telur). Pengencer tersebut dapat menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa yang belum terkapasitasi tetap tinggi, sedangkan spermatozoa yang terkapasitasi dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom dijaga tetap rendah.



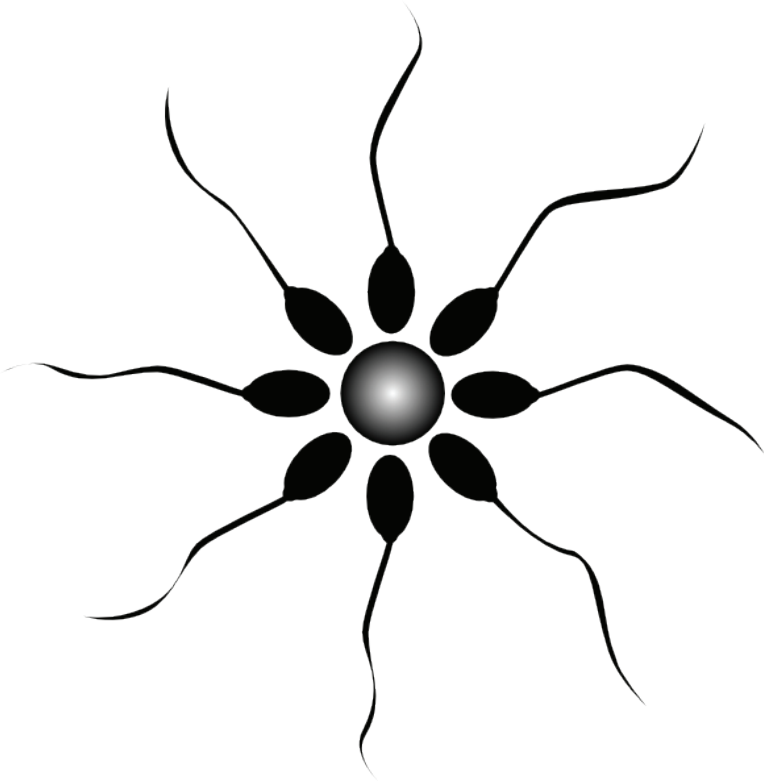
Gambar 5.1 Proses Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Menggunakan Putih Telur (Susilawati, 2002).



Gambar 5.2 Skema Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Menggunakan Putih Telur (Susilawati, 2002).

Tabel 5.2. Rincian Biaya untuk setiap proses sexing dengan metode sedimentasi putih telur

Rincian biaya setiap proses Albumin:				
1.	bahan & alat penampungan	=	101.500	
2.	bahan & alat pemeriksaan kualitas	=	52.250	
3.	albumin	=	4.500	
4.	andromed	=	32.500	
5.	Biaya operator penampungan	=	300.000	
6.	Biaya operator laboratorium	=	900.000	
			1.390.750	
	Perolehan straw X/proses	=	32	bh
	Perolehan straw Y/proses	=	32	bh
	Harga produksi	=	21.730	



BAB VI

APLIKASI TEKNOLOGI SEXING

6.1 Uji Keberhasilan Kebuntingan hasil IB dengan semen sexing menggunakan metode Sentrifugasi Gradien Densitas *Percoll*

Keberhasilan IB di Indonesia menggunakan semen beku tanpa sexing saat ini sudah tidak diragukan lagi, dengan standar semen beku yang digunakan mengacu kepada SNI (Standar Nasional Indonesia) 01 - 4869.2 - 1998 dengan konsentrasi spermatozoa 25 juta per *straw*. Sedangkan konsentrasi semen beku hasil *sexing* menggunakan sentrifugasi gradien densitas *percoll* adalah spermatozoa X sebesar 6 juta dan Y 12 juta (Susilawati, 2003).

Indikator keberhasilan IB dapat dilihat dari perolehan angka kebuntingan, *Service per Conception* (S/C) dan persentase kebuntingan pada IB I atau *Conception Rate* (CR). Salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan tersebut adalah deposisi semen pada alat reproduksi sapi betina, sehingga untuk dapat diaplikasikan secara luas perlu dilakukan uji keberhasilan kebuntingan, juga ketepatan jenis kelamin anak sapi (pedet) yang dilahirkan.

Kegiatan penelitian bertujuan untuk mengetahui perbedaan angka kebuntingan, *S/C* dan persentase kebuntingan pada IB ke I atau *CR* serta ketepatan jenis kelamin pedet yang dilahirkan pada sapi Peranakan Ongole (PO) melalui IB dengan deposisi semen beku hasil *sexing* yang berbeda konsentrasi di posisi 4 (korpus uteri) dan 4+ (pangkal kornua uteri).

Penelitian dilakukan dua tahap, tahap pertama adalah pembekuan spermatozoa hasil *sexing* di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari, tahap kedua berupa percobaan dilakukan di peternakan sapi PO milik rakyat di Kecamatan Pakis Kabupaten Malang. Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan dengan sampel sebanyak 60 ekor sapi PO induk yang diambil secara *purposive sampling* dengan kriteria: pernah beranak paritas 1-3, siklus birahi normal, tidak pernah mengalami gangguan reproduksi

atau *distokia*, anatomi alat reproduksinya normal, *Body Condition Scor* (BCS) antara 6–7 (skala 1–9) dan manajemen pemeliharaan yang relatif sama. Pelaksanaan penelitian menggunakan 6 (enam) perlakuan, dengan masing-masing ulangan 10 ekor sapi.

Variabel yang diamati adalah *Non Return Rate* (NRR), S/C, CR dan angka kebuntingan. NRR adalah persentase sapi betina akseptor IB yang tidak kembali lagi birahi selama 20–60 hari atau 60–90 hari pasca pelaksanaan IB (Partodihardjo, 1982). S/C adalah banyaknya dosis *straw* yang dipergunakan untuk memperoleh sejumlah kebuntingan pada kelompok akseptor IB. sedangkan CR merupakan jumlah akseptor yang bunting pada IB ke I dibagi jumlah semua akseptor kali 100%. Penjelasan S/C dan CR dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$S / C = \frac{\sum \text{service yang dipergunakan}}{\sum \text{akseptor bunting}}$$

$$C R = \frac{\sum \text{bunting IB ke I}}{\sum \text{akseptor}} \times 100 \%$$

Prosedur Kegiatan

- Pelaksanaan IB pada sapi yang terpilih dan benar-benar menunjukkan tanda-tanda birahi sempurna seperti: suara melenguh, *vulva* bengkak, keluar lendir transparan dan gelisah.
- IB dilakukan sesuai dengan perlakuan (posisi 4 dan 4⁺).
- IB dengan semen X dilakukan dengan dobel dosis (2 kali memasukkan *insemination gun* @ 6 juta/dosis), sedangkan semen Y dilakukan dosis tunggal (12 juta).
- Pengamatan kebuntingan melalui NRR dilakukan pada hari ke 21, 42, 63 setelah IB.
- Sapi yang kembali birahi setelah IB ulang 3 kali dianggap gagal.
- Sapi yang dianggap bunting karena tidak birahi lagi sampai dengan NRR ke-3, untuk lebih memastikan akurasinya dilakukan pemeriksaan kebuntingan dengan *palpasi rektal*.

Analisa Data

Data pengamatan yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan uji Chi-Kuadrat (X^2), yaitu tingkat kebuntingan dari masing-masing perlakuan IB pada sapi PO dengan semen beku hasil *sexing* metode sentrifugasi gradien densitas *percoll* berkromosom X, Y dan tanpa *sexing* (XY). Pengamatan kebuntingan dievaluasi melalui NRR (0–30) hari, (30–60) hari dan (60–90) dan *palpasi rektal*. Menurut Sudjana (1990), Uji X^2 pada dasarnya adalah pengujian yang membandingkan antara frekuensi observasi, yaitu data pengamatan yang diperoleh saat melakukan penelitian dengan frekuensi harapan.

Persentase motilitas spermatozoa hasil *sexing* menggunakan metode sentrifugasi gradien densitas *Percoll* ditampilkan pada, Tabel 6.1.

Tabel 6.1. Data Persentase Motilitas Spermatozoa

Variabel	Spermatozoa X (%)	Spermatozoa Y (%)	Kontrol (%)
Semen segar	75	75	75
Setelah <i>sexing</i>	55	55	-
Setelah <i>thawing</i>	35	40	40

Semen segar yang digunakan untuk *sexing* memiliki pH 6,5; volume 7,2 cc, dan konsentrasi 1.419,2 juta. Setelah dilakukan *sexing* dan pembekuan, spermatozoa mengalami penurunan motilitas. Persentase motilitas spermatozoa X dan Y setelah pemisahan adalah 55%. Setelah dilakukan *thawing*, persentase motilitas X menurun menjadi 35% sedangkan spermatozoa Y menjadi 40%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa hasil *sexing* mempunyai konsentrasi di bawah standar SNI, yang meliputi konsentrasi spermatozoa 25 juta dengan motilitas 40% dan abnormalitas < 20%.

Pelaksanaan IB menggunakan semen beku hasil *sexing* yang mengandung spermatozoa X dengan 10 ekor sapi pada posisi 4 menghasilkan 6 ekor (60%) yang bunting, sedangkan di posisi

4⁺ juga menghasilkan 6 ekor (60%). Tampak perlakuan deposisi semen tidak berpengaruh terhadap angka kebuntingan, berarti posisi doposisi tidak memengaruhi perjalanan spermatozoa X didalam proses fertilisasi, hal ini karena spermatozoa X mempunyai ketahanan hidup lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa Y karena materi genetic yang dikandung dalam kepala spermatozoa X lebih banyak dari pada spermatozoa Y. Sesuai dengan pendapat Hafez (2008) Spermatozoa lebih tahan hidup disbanding spermatozoa Y.

Deposisi semen beku hasil *sexing* yang mengandung spermatozoa Y di posisi 4 menghasilkan 7 ekor (70%) yang bunting, sedangkan di posisi 4⁺ menghasilkan 8 ekor (80%). Angka kebuntingan ini lebih tinggi dibandingkan dengan IB spermatozoa X, Hal ini karena pada spermatozoa X konsentrasi yang di-IB-kan lebih rendah yaitu 6 juta dengan doble dosis, sehingga fakta ini menunjukkan bahwa konsentrasi 12 juta/*straw* tidak sama dengan 6 juta/*straw* dengan dobel dosis, selain itu juga karena spermatozoa Y geraknya lebih cepat menuju tempat fertilisasi.

Sebagai perbandingan IB menggunakan spermatozoa tanpa *sexing* (XY) baik di posisi 4 atau 4⁺, menghasilkan kebuntingan yang sama dengan IB menggunakan spermatozoa Y. Hal ini dimungkinkan karena konsentrasi spermatozoa tanpa *sexing* (XY) jumlahnya mencapai 25 juta/*straw*, sehingga kompetisi spermatozoa dalam hal mengadakan pembuahan peluangnya lebih besar. Sedangkan spermatozoa Y dengan konsentrasi 12 juta/*straw* mempunyai kelebihan yaitu lebih ringan dan gerakannya lebih cepat menuju ovum. Selain itu waktu pelaksanaan IB, untuk sapi-sapi yang menggunakan spermatozoa Y mungkin lebih tepat dibandingkan dengan yang lain.

Analisa data dengan uji chi-kuadrat (X^2) menunjukkan bahwa angka kebuntingan dengan semen beku hasil *sexing* di posisi 4 dan 4⁺ tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan semen beku tanpa *sexing*. Hal ini menunjukkan bahwa angka kebuntingan melalui IB menggunakan semen beku hasil *sexing* dengan konsentrasi

rendah di posisi 4 dan 4⁺ dapat mendekati bahkan sama khususnya spermatozoa Y dibanding dengan hasil IB semen beku tanpa sexing. Data kebuntingan, perhitungan CR dan S/C dapat dilihat pada tabel 6.2.

Tabel 6.2 Hasil Angka Kebuntingan, Perhitungan CR dan S/C pada berbagai perlakuan

Pelaksanaan IB	Bunting	Tidak Bunting	CR (%)	S/C
Spermatozoa X (4)	6	4	50	2.00
Spermatozoa X (4 ⁺)	6	4	50	1.83
Spermatozoa Y (4)	7	3	70	1.42
Spermatozoa Y (4 ⁺)	8	2	80	1.25
Spermatozoa XY (4)	7	3	70	1.42
Spermatozoa XY (4 ⁺)	8	2	80	1.25

Hasil perhitungan CR untuk spermatozoa X sebesar 50% dengan S/C 2,00 di posisi 4, dan CR 50% dengan S/C 1,83 di posisi 4⁺ lebih rendah dibandingkan dengan CR dan S/C untuk spermatozoa Y. Pada posisi 4 CR 70% dengan S/C 1,42 dan di posisi 4⁺ CR 80% dengan S/C 1,25. Sama halnya dengan spermatozoa XY, CR pada posisi 4 sebesar 70% dengan S/C 1,42 dan pada posisi 4⁺ CR 80% dengan S/C 1,25.

Berdasarkan pengamatan tersebut, CR dan S/C pada hasil IB dengan spermatozoa Y dapat dikatakan baik dan masih dalam kisaran normal, sesuai dengan pendapat Hardjopranjoto (1995) yang menyatakan bahwa efisiensi reproduksi dikatakan baik jika CR dapat mencapai 65%–75%. Toelihere (1993), menambahkan bahwa S/C normal adalah 1,6–2,1 dan semakin rendah nilainya maka semakin tinggi pula nilai kesuburannya. Hasil tersebut menurut Susilawati (2003b) lebih baik dari pada menggunakan semen sexing dengan metode gradien putih telur.

Rendahnya CR dan S/C semen beku yang mengandung spermatozoa X kemungkinan disebabkan oleh angka motilitas daripada spermatozoanya, atau menurunnya kualitas *straw* akibat dari handling yang kurang baik sehingga untuk sampai di

tingkat peternak yang terlalu jauh pada saat pelaksanaan IB sudah menurun. Juga menurut Susilawati (2001b) spermatozoa setelah mengalami proses sentrifugasi banyak yang mengalami kerusakan membran, sehingga akan menurunkan kualitasnya.

Menurunnya kualitas *straw* tersebut terlihat pada saat dilakukan *thawing*, ada sebagian *straw* yang melayang di air yang menunjukkan bahwa volume udara di dalam *straw* tersebut lebih banyak dibanding dengan yang normal. Faktor lain yang memengaruhi rendahnya CR dan S/C adalah umur sapi. Hal ini sesuai dengan pendapat Hafez (2008) yang menyatakan bahwa semakin tua umur seekor sapi maka akan semakin menurun angka kebuntingannya. Hunter (1995), menambahkan bahwa sapi yang berumur 6–7 tahun dan lebih besar dari 7 tahun, memiliki fertilitas yang lebih rendah dibandingkan sapi yang lebih muda, dan memiliki persentase kegagalan kebuntingan sebesar 10%.

Hasil IB menggunakan semen beku *sexing* yang mengandung spermatozoa X lebih rendah bila dibandingkan dengan IB menggunakan spermatozoa tanpa *sexing* (XY). Akan tetapi IB menggunakan semen beku *sexing* yang mengandung spermatozoa Y menghasilkan kebuntingan yang sama dengan IB menggunakan semen beku tanpa *sexing*. Secara umum IB dengan spermatozoa X maupun Y, bila dibandingkan dengan XY dapat dikatakan lebih baik, karena semen beku hasil *sexing* tersebut konsentrasinya lebih rendah. Konsentrasi spermatozoa X hanya 6 juta dengan total spermatozoa motil 2,1 juta dengan pelaksanaan IB 2 dosis, dan konsentrasi spermatozoa Y hanya 12 juta dengan total spermatozoa motil 4,8 juta. Keadaan yang demikian mampu menghasilkan kebuntingan yang hampir sama dengan kebuntingan yang dihasilkan melalui IB menggunakan semen beku tanpa *sexing* yang berkualitas standart SNI yakni konsentrasi 25 juta dengan motilitas 40% sehingga mempunyai jumlah spermatozoa motil sebesar 10 Juta per dosis. Hal ini kemungkinan disebabkan karena daya fertilitas dan kemampuan bertahan hidup spermatozoa di dalam saluran alat kelamin betina yang lebih baik, tingkat kemahiran ketrampilan Inseminator, ketepatan diagnosa keberadaan folikel de

Graaf pada ovarium, dan ketepatan deposisi spermatozoa. Sehingga walaupun dengan jumlah spermatozoa yang motil hanya 2,1 juta dengan pelaksanaan IB 2 dosis dan 4,8 juta mampu menghasilkan kebuntingan. Hafez (2008) menyatakan bahwa walaupun jutaan spermatozoa dideposisikan pada saluran kelamin betina, hanya sedikit spermatozoa yang mampu bertahan hidup dan membuahi ovum di tempat fertilisasi. Keterampilan Inseminator dan rata-rata $9,67 \pm 2,005$ jam pelaksanaan IB setelah ternak menunjukkan birahi menggunakan spermatozoa X dan Y berpengaruh terhadap keberhasilan kebuntingan. Hafez (2008) menyatakan bahwa keberhasilan kebuntingan dengan IB dipengaruhi oleh kualitas semen, ketrampilan peternak, ketrampilan Inseminator dan ketepatan waktu mengawinkan sapi.

Kembali birahnya sapi setelah di IB disebabkan oleh beberapa faktor antara lain, karena kurangnya perhatian peternak terhadap deteksi birahi dan keterlambatan saat melapor sehingga dapat menyebabkan keterlambatan saat melaksanakan IB. Musim kemarau pakan yang diberikan kualitasnya jelek, sehingga dapat menyebabkan kembalinya sapi birahi lagi dan berakibat rendahnya CR dan S/C.

Jenis kelamin pedet yang dilahirkan sesuai dengan perlakuan terdapat pada tabel 6.3. Berdasarkan pada hasil jenis spermatozoa setelah dilakukan sexing dengan metode sentrifugasi gradient densitas *percoll* didapatkan 89% spermatozoa X pada lapisan bawah, sedangkan pada lapisan atas didapat spermatozoa Y 89%. Hal ini bila dibandingkan dengan data jenis kelamin anak yang dihasilkan masih sesuai dengan harapan atau perkiraan. Yaitu pada spermatozoa X pada posisi 4 didapatkan 100% betina, sedang posisi 4+ 83% betina.

Tabel 6.3 Jenis kelamin anak yang dilahirkan pada berbagai perlakuan

Pelaksanaan IB	Betina	Jantan
Spermatozoa X (4)	6 (100%)	0%
Spermatozoa X (4+)	5 (83%)	1 (17%)
Spermatozoa Y (4)	2 (29 %)	5 (71%)

Pelaksanaan IB	Betina	Jantan
Spermatozoa Y (4+)	2 (25%)	6 (75%)
Spermatozoa XY (4)	4 (57%)	3 (43%)
Spermatozoa XY (4+)	4 (50%)	4 (50%)

Pada spermatozoa Y pada posisi 4 didapatkan anak jantan 71%, sedangkan pada posisi 4+ didapatkan 75%, data menunjukkan ketepatan jenis kelamin jantan masih lebih rendah dibandingkan proporsi spermatozoa Y yaitu 87%.

Dari Hasil tabel 6.3 menunjukkan bahwa pada posisi 4+ mempunyai kecenderungan menghasilkan anak jantan, hal ini karena spermatozoa Y mempunyai motilitas lebih cepat disbanding spermatozoa X, sehingga apabila posisi IB lebih dekat dengan oosit (posisi 4+), maka akan memungkinkan terjadinya anak jantan, pernyataan ini ditunjang oleh pendapat Hafez (2008) bahwa spermatozoa Y mempunyai motilitas lebih cepat disbanding spermatozoa X.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa (1) IB menggunakan spermatozoa Y yang mempunyai konsentrasi 12 juta, menghasilkan kebuntingan yang sama dengan tanpa sexing dengan konsentrasi 25 juta, sedangkan spermatozoa X dengan konsentrasi 6 juta dengan doble dosis hasilnya lebih rendah, begitu juga dengan *cervix per conception*. (2) Hasil IB dengan spermatozoa X menghasilkan anak betina sesuai dengan proporsi spermatozoa X yaitu diatas 80% (dari masing-masing 10 ekor), sedangkan menggunakan spermatozoa Y dihasilkan anak jantan lebih rendah dari proporsi spermatozoa Y, yaitu hanya sekitar 75%. (3) Deposisi semen pada posisi 4+ meningkatkan keberhasilan kebuntingan dan jumlah anak yang jantan.

6.2 Uji keberhasilan kebuntingan IB semen hasil sexing dengan gradien putih telur

IB dengan menggunakan semen sexing dengan menggunakan putih telur pada lapisan atas yang mempunyai populasi spermatozoa X banyak berhasil memberikan kebuntingan sebanyak 80 persen.

Tampaknya antara spermatozoa X dan Y tidak terdapat perbedaan, yang menyebabkan masalah adalah pengemasan didalam strawnya, sehingga banyak straw yang rusak, dengan demikian menyebabkan penurunan motilitas.

Dalam penelitian ini menggunakan teknik *Deep Inseminasion* yaitu melakukan IB pada posisi di dalam uterus dan melihat hasilnya pada semen sexing beku maupun yang bukan sexing menghasilkan kebuntingan yang tinggi, walaupun hasil evaluasi motilitas spermatozoa hanya sekitar 30–40%. Sehingga dapat dikatakan bahwa IB dengan sexing tidak menjadi kendala keberhasilan kebuntingannya, sehingga memungkinkan untuk di aplikasikan di masyarakat.

Deteksi kebuntingan dapat dilakukan dengan beberapa cara namun yang sering digunakan adalah dengan NRR yakni suatu indikator ternak tidak menunjukkan berahi lagi setelah di IB dalam waktu 20–60 hari atau 60–90 hari. NRR yang digunakan dalam penelitian ini adalah NRR 21, 42, 63 hari. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) bahwa NRR 21, 41, 63 hari merupakan suatu perbandingan jumlah sapi PO yang di IB dengan jumlah sapi PO yang minta di IB lagi dalam periode tersebut. Hasil NRR 21, 42, 63 hari dapat dilihat pada Tabel 6.4.

Tabel 6.4 Evaluasi Keberhasilan Kebuntingan Menggunakan Metode NRR 21, 42, 63 hari. Hasil IB menggunakan semen sexing dengan sedimentasi putih telur

Semen	Jumlah (ekor)	NRR (%)		
		21	42	63
Spermatozoa Y	10	100	90	70
Spermatozoa X	10	40	30	20
Beku/Kontrol	10	100	100	90

Pengukuran keberhasilan kebuntingan dengan NRR 21, 42, 63 hari berpedoman pada asumsi sapi PO yang tidak kembali berahi lagi atau *Non Return Rate* dianggap telah bunting setelah di IB. Dari hasil tabel 6.5 memperlihatkan bahwa sapi PO yang di IB berjumlah 30 ekor. IB menggunakan spermatozoa Y 10 ekor didapatkan

NRR 21 hari 100% ternak bunting, NRR 42 hari didapatkan 90% ternak bunting dan NRR 63 hari didapatkan 70% ternak bunting. Sedangkan IB yang menggunakan spermatozoa X berjumlah 10 ekor didapatkan NRR 21 hari 40% ternak bunting, NRR 42 hari didapatkan 30% ternak bunting dan NRR 63 hari didapatkan 20% ternak bunting.

IB yang menggunakan spermatozoa Y pada NRR 42 hari terdapat 1 ekor sapi PO yang menunjukkan berahi lagi. Hal ini disebabkan sapi terpeleset dan jatuh saat naik ke tempat pakan, dimana faktor ini menjadi penyebab kegagalan kebuntingan. Faktor nutrisi dapat juga sebagai faktor timbulnya berahi lagi. NRR 63 hari terdapat 3 ekor sapi yang menunjukkan tanda-tanda berahi lagi. Hal ini dimungkinkan terjadinya abortus dan faktor pakan dimana selama pengamatan terhadap pakan yang diberikan kurang dalam hal kandungan nutrisi. Bearden and Fuquay (1989) mengungkapkan bahwa sapi yang bunting dapat mengalami kematian embrio, abortus, *mumificatio foetus* dan faktor nutrisi dimana kekurangan protein dalam ransum ternak betina dapat mengakibatkan timbulnya berahi yang lemah, kawin berulang, kematian embrio dini dan absorpsi embrio yang mati oleh dinding uterus. Kemungkinan lain disebabkan terjadinya berahi lagi meskipun ternak sedang bunting.

Pengamatan NRR setelah IB menggunakan spermatozoa X hasilnya lebih rendah daripada IB dengan spermatozoa Y. NRR 21 hari didapatkan 40% ternak yang bunting, NRR 42 hari didapatkan 30% ternak bunting dan NRR 63 hari didapatkan 20% ternak bunting. Faktor yang dapat memengaruhi kegagalan tersebut kemungkinan dikarenakan abortus dan mutu pakan yang diberikan pada sapi PO bunting kekurangan energi, vitamin, mineral dan protein sehingga dapat mengakibatkan anestrus, kondisi lingkungan dimana sanitasi kandang kurang baik. Kemungkinan lain yang terjadi disebabkan ternak berahi lagi meskipun sedang bunting. Hardjopranjoto (1995) menyatakan bahwa kawin berulang dapat terjadi pada ternak betina yang masih dara atau induk yang sudah beberapa kali dikawinkan dan 3-5% ternak yang

bunting menunjukkan kemunculan berahi lagi, hal ini disebabkan ada kelainan dalam sistem hormonal.

Diagnosa kebuntingan setelah pengamatan NRR yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan metode palpasi rektal. Palpasi rektal dilakukan pada umur kebuntingan 90 hari (3 bulan), hal ini merupakan cara yang paling cepat dan mudah dilakukan dalam deteksi kebuntingan. Palpasi rektal pada 35–40 hari kebuntingan lebih membutuhkan kemahiran pada fase berikutnya namun demikian bila ketepatan hasil yang diperoleh pada fase ini, maka akan memberikan nilai ekonomis yang lebih tinggi. Hasil pemeriksaan kebuntingan umur 3 bulan didapatkan 8 ekor (80%) sapi bunting dari 10 ekor yang di IB dengan semen beku sexing (spermatozoa Y), untuk sapi yang di IB dengan semen beku sexing (spermatozoa X) didapatkan 8 ekor (80%) sapi yang bunting dari 10 ekor sapi. Untuk mengetahui keberhasilan kebuntingan ini adanya suatu kontrol yaitu digunakan 10 ekor sapi yang di IB menggunakan semen beku tanpa sexing didapatkan hasil 9 ekor (90%) ternak bunting.

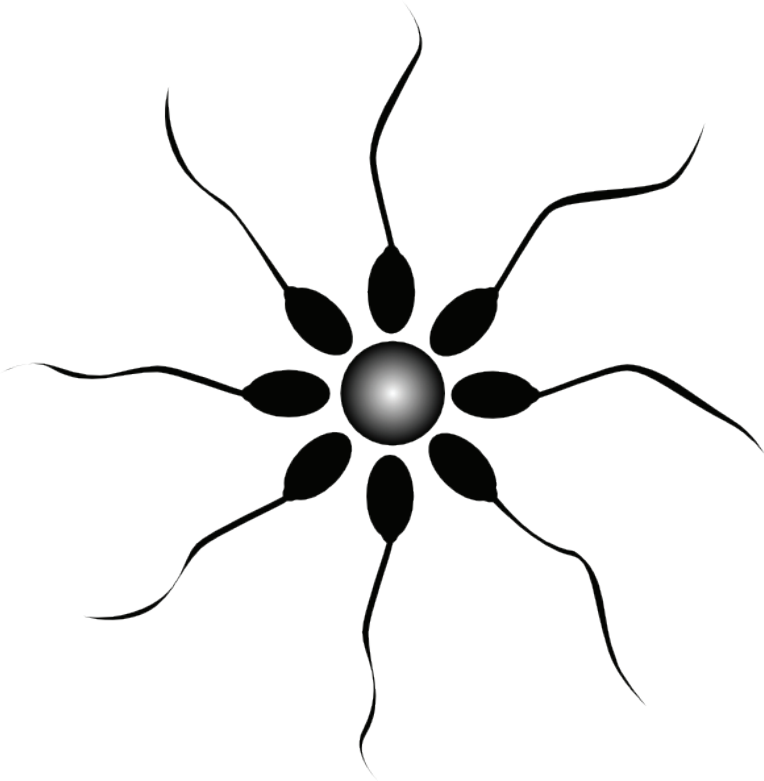
Hasil analisa data dengan uji *Chi-Square* (c^2) menunjukkan bahwa keberhasilan kebuntingan IB menggunakan semen beku hasil sexing dengan metode gradien putih telur dan IB menggunakan semen beku kontrol tidak berbeda nyata (P^3 0,01). Hal ini dapat ditunjukkan bahwa keberhasilan kebuntingan hasil IB semen beku hasil sexing sudah dapat mendekati hasil IB semen beku tanpa sexing. Data lebih jelas dapat dilihat pada Tabel 6.5.

Tabel 6.5. Evaluasi Kebuntingan dengan Angka Conception Rate (C/R) dan Service per Conception (S/C). Hasil IB menggunakan semen sexing dengan sedimentasi putih telur

Semen	Bunting (Ekor)	Tidak Bunting (Ekor)	C/R (%)	S/C
Spermatozoa Y	8	2	50	1,75
Spermatozoa X	8	2	20	2,10
Beku/Kontrol	9	1	80	1,20


Perhitungan C/R untuk spermatozoa Y 50% dan S/C 1,75% lebih rendah dari hasil spermatozoa X dimana C/R 20% dan S/C 2,1%. Untuk semen beku kontrol C/R 80% dan S/C 1,2%, hal ini kemungkinan adanya pengaruh pakan yang diberikan kurang, sehingga kondisi tubuh ternak menurun dan ada semen yang digunakan kualitasnya mengalami penurunan. Toelihere (1985) menyatakan bahwa besarnya nilai jumlah perkawinan per kebuntingan dipengaruhi oleh kurang terampilnya petugas inseminator di lapang dan rendahnya kualitas semen.

Pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal terdapat sapi yang tidak bunting, hal ini dikarenakan pengamatan di saat NRR kurang tepat adanya berahi pendek 2-3 jam dan kemungkinan sapi mengalami berahi tenang (*silent heat*). Hal ini sesuai dengan pendapat Hardjoprajoto (1995) bahwa rendahnya keberhasilan IB di daerah tropis disebabkan rendahnya ketepatan deteksi berahi, hal ini didukung juga oleh kenyataan bahwa sapi zebu kurang memberikan tampilan berahi yang nyata (*silent heat*) dan sering mengalami berahi pendek 2-3 jam.



BAB VII

METODE SEXING PADA UNGGAS: STUDI PUSTAKA DAN ROADMAP PENELITIAN



Sexing pada unggas merupakan salah satu teknologi yang sangat dibutuhkan oleh industri peternakan unggas terutama pada unit breeding, hal ini karena industri peternakan ayam dapat dibedakan untuk produksi daging dan produksi telur. Usaha peternakan ayam untuk produksi daging dibutuhkan ayam dengan jenis kelamin jantan karena memiliki kecepatan pertumbuhan badan lebih tinggi dibandingkan ayam yang berjenis kelamin betina, Sedangkan untuk industri peternakan ayam petelur dibutuhkan ayam betina yang nantinya akan sebagai penghasil telur. Oleh sebab itu sexing ayam sedini mungkin sangatlah dibutuhkan, sedangkan hingga saat ini sexing dilakukan pada ayam yang telah menetas. Pada bab ini dibahas kajian teori yang memungkinkan untuk dilakukan penelitian untuk menseleksi telur tetas agar didapatkan telur yang mengandung anak dengan jenis kelamin sesuai harapan, kajian teoritis ini diharapkan dapat memotivasi para peneliti untuk mewujudkan ide dilakukannya penelitian tentang sexing pada ayam.

7.1 Jenis-Jenis Ayam

Ayam berdasarkan fungsinya dikenal adalah : (1) ayam pedaging atau ayam potong (*broiler*), untuk dimanfaatkan dagingnya; (2) ayam petelur (*layer*), untuk dimanfaatkan telurnya; (3) ayam hias atau ayam timbangan (*pet, langenan*), untuk dilepas di kebun/taman atau dipelihara dalam kurungan karena kecantikan penampilan atau suaranya (misalnya ayam katai dan ayam pelung; ayam bekisar dapat pula digolongkan ke sini meskipun bukan ayam peliharaan sejati); (4) ayam sabung, untuk dijadikan permainan sabung ayam. Istilah *ayam sayur* dipakai untuk ayam kampung atau ayam aduan yang selalu kalah, dan tidak diseleksi khusus sebagai ayam pedaging.

Ayam peliharaan berasal dari domestikasi ayam hutan merah (ayam bangkiwa, *Gallus gallus*) yang hidup di India. Namun demikian, pengujian molekular menunjukkan kemungkinan sumbangan plasma nutfah dari *G. sonneratii*, karena ayam hutan merah tidak memiliki sifat kulit warna kuning yang menjadi salah satu ciri ayam peliharaan.

Berdasarkan ras, di Indonesia dikenal istilah *ayam ras* dan *ayam bukan ras* (buras atau kampung). Dalam pengertian “ayam ras” menurut istilah itu yang dimaksud sebenarnya adalah ras yang dikembangkan untuk usaha komersial masal, seperti Leghorn (“lehor”). Ke dalam kelompok ayam buras, terdapat pula ras lokal ayam yang khas namun tidak dikembangkan untuk usaha komersial masal. Ayam-ayam ras lokal sekarang mulai dikembangkan (dimurnikan) sebagai ayam sabung, ayam timangan (*pet*), atau untuk acara ritual. Berikut ini adalah ras lokal ayam di Nusantara yang telah dikembangkan untuk sifat/penampilan tertentu:

1. Ayam Pelung, ras lokal dan unggul dari Priangan (Kabupaten Cianjur) yang memiliki kokokan yang khas (panjang dan bernada unik), termasuk ayam hias;
2. Ayam Kedu (termasuk ayam cemani), ras lokal dan mulia dari daerah Kedu, dengan ciri khas warna hitam legam hingga moncong dan dagingnya, termasuk ayam pedaging dan ayam hias;
3. Ayam Nunukan, ras lokal dan mulia dari Nunukan (Kalimantan Timur), dengan bentuk badan tegap dan ukuran besar, keturunan ayam aduan, termasuk ayam pedaging dan hias.

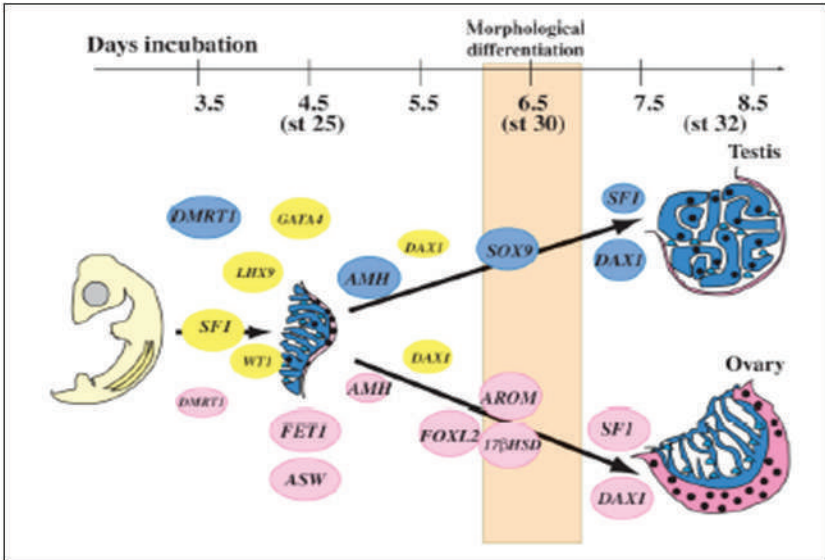
7.2. Identifikasi dan Pengaturan Jenis Kelamin Pada Ayam

Jenis kelamin ternak ditentukan oleh gen yang terdapat pada salah satu *sex chromosom*. Pada mammalia yang menentukan jenis kelamin adalah kromosom Y, sedangkan pada kelompok burung pada jantan berkromosom ZZ (homogametik), sedangkan betina ZW (hetero gemetik) (Ellegren, 2001 ; Hafez and Hafez, 2008; Froman, Kirby and Proudman, 2000). Gen yang menentukan jenis kelamin pada ternak jantan adalah gen SRY (*sex determining region Y gene*) (Griffiths, 1991). Sedangkan pada bangsa burung yang

menentukan jenis kelamin ada gen yang berada didalam *locus* yang belum diketahui fungsi pengaturannya (Ellegren, 2001).

Hingga saat ini belum diketahui dengan jelas gen mana yang mengatur jenis kelamin, dilain pihak telah berhasil diidentifikasi protein pada kelompok burung betina yaitu *W-linked PKC1W gene* yang dapat mengekspresikan pembentukan gonad betina. Akan tetapi belum jelas pengaturan pertumbuhan gonad oleh gen DMRT1 dan PKC1W (Ellegren, 2001) .

Gen DMRT1 mengekspresikan *genital ridge* dan saluran Wolffian pertumbuhan alat reproduksi jantan pada tahap ke 25 (Reymon *et al* ;1999), DMRT diekspresikan pada burung jantan yang telah dewasa (Shan *et al*, 2000). Biosintesis dan sekresi hormon gonadal berpengaruh terhadap differensiasi gonad. Pembentukan gonad (gonadogenesis) dipengaruhi oleh hormon exogenous. Pertumbuhan gonad pada burung lebih labill sehingga dapat dipengaruhi oleh manipulasi hormon. Perubahan jenis kelamin dapat dilakukan dengan injeksi telur dengan estrogen atau oleh produksi estrogen. Eksperimen banyak dilakukan pada *critical role* untuk sintesis estrogen dalam sex determinasi (Scheib *et al*, 1983). *Sinthetic inhibitors* pada enzim sintesis estrogen, aromatase, dapat menyebabkan betina menjadi jantan secara permanen (Elbrecht *et al.*, 1992) . Gonad sebelah kanan untuk pembentukan jantan dan gonad sebelah kiri akan membentuk testis (Vaillant *et al*, 2001) dan (Smith *et al* , 2003) . Unggas jantan yang berkromosom ZZ diberi perlakuan estrogen akan menjadi betina akan tetapi tidak permanen. Terdapat 2 tahap akhir suatu sintesis estrogen adalah P-450 aromatase dan 17 β HSD diekspresikan hanya pada ZW yang mempunyai gonad betina yang mengalami diferensiasi morfologi (hari ke 6-6,5, stage 29-30) (Kabayashi *et al* ,1998); (Smith *et al*, 1997) dan Nishikimi *et al* (2000). Enzim ini diekspresikan oleh *modulary cord* pada gonad betina, enzim yang lain pada *steroidogenic pathway* yang diekspresikan pada medula pada kedua jenis kelamin (Nishikimi *et al*, 2000). Aromatase dan 17 β HSD adalah kunci dari komponen *sexual dimorphic*, yang dapat dilihat pada Gambar 7.1.



Gambar 7.1. Gambaran gen selama proses diferensiasi gonad pada embrio ayam.

Secara logis bahwa gen *W linked* pada penentuan jenis kelamin betina yang mengaktifasi aromatase dan 17β HSD yang diekspresikan secara awal pada pembentukan alat kelamin betina. Akan tetapi tidak konsisten pada peran hormon androgen pada awal pembentukan jantan. Testosteron dan DHT tidak berpengaruh pada pembentukan telur dan reseptor androgen diekspresikan pada akhir dalam pembentukan gonad.

Estradiol berpengaruh selama perkembangan gonad dan terdapat reseptor yang menarik *estrogen receptor alpha* ($Er\alpha$) diekspresikan pada kedua jenis kelamin untuk diferensiasi sex dalam embrio ayam (smith *et al*, 1997). Ekspresi tampaknya dimulai dari *gonadal cortex*. Ekspresinya adalah pengaturan di dalam proses pertumbuhan jantan, pada betina juga di dalam gonad sebelah kiri (smith *et al*, 1997 dan Andrew *et al*, 1995). Pertumbuhan gonad selama proses embryogenesis tampaknya resisten terhadap sex steroid akan tetapi deferensiasi dapat terjadi tanpa adanya steroidogenesis (Jost , 1970;Hu *et al*, 2002).

Jenis kelamin jantan atau betina pada saat embryo dapat berubah, sehingga bisa terjadi pembentukan testis saat embryo pada embryo betina kromosom ZW (Maraud, 1990). Pada embryo berkromosom ZW dapat berkembang testis, sehingga disekresikan *Anti-Mullerian Hormone* (AMH). AMH adalah hormon glikoprotein yang dihasilkan dan disekresikan oleh sel sertoli untuk pertumbuhan testis. AMH menyebabkan saluran muller pada jantan mengalami regresi, gen AMH tidak terekspresikan pada embryo betina (Behringer, 1994). Pada ayam AMH dari gonad mengekspresikan diferensiasi dikedua jenis kelamin dan pada jantan lebih tinggi (Nisikimi, 2000 dan Smith, 1999).

7.3. Metode Sexing Pada Ayam

Sexing Day Old Chicken (DOC) bisa dilakukan dengan dua metode: 1) sexing kloaka atau 2) sexing bulu. Setiap metode memiliki kesulitannya masing-masing sehingga jarang digunakan oleh pemilik peternakan skala kecil. Sexing kloaka didasarkan pada identifikasi visual jenis kelamin berdasarkan bentuk organ seksual. Sexing bulu didasarkan pada perbedaan antara karakteristik pada saat menetas.

Sexing kloaka pada ayam saat menetas memiliki tingkat kesulitan tersendiri yang menjadikannya cenderung lebih susah dibandingkan menentukan jenis kelamin jenis hewan lainnya. Alasannya karena organ seksual unggas terletak di dalam tubuhnya dan tidak mudah dibedakan. Organ kopulatori ayam bisa diidentifikasi apakah berjenis kelamin jantan atau betina dari bentuknya, namun ada lebih dari 15 perbedaan bentuk untuk diperhatikan. Sexing bulu berdasarkan adanya karakteristik yang membedakan antara ayam jantan dan betina. Metodenya sangat mudah dipelajari oleh anak kandang, namun kemunculan bulu ditentukan oleh sifat-sifat genetik terseleksi yang biasanya tampak pada strain ayam. Kebanyakan strain ayam tidak memiliki karakteristik sexing bulu dan pertumbuhan bulu dari kedua jenis kelamin muncul identikal (hampir sama).

Metode paling sesuai dari sexing ayam yang dilakukan oleh para pemilik peternakan yaitu memelihara unggas sampai mulai menunjukkan karakteristik sekunder alami dari jenis kelaminnya. Pada jantan, jengger dan pialnya akan lebih besar dibandingkan betina dan kepala jantan akan lebih cekung dan terlihat maskulin. Betina akan tumbuh lebih lambat dibanding jantan dan lebih jernih serta terlihat feminin. Pada beberapa varietas, bulu dari tiap jenis kelamin akan berkembang sesuai karakteristik pola warna yang mengidentifikasinya. Varietas unggas ini sama dengan strain sexing bulu yang disebutkan di atas. Sexing berdasarkan karakteristik seksual sekunder biasanya tampak saat ayam berumur 4 hingga 6 minggu (Anonimous, 2008)

Chick sexing adalah proses seleksi ayam berdasarkan jenis kelamin. Proses menyeleksi jenis kelamin anak ayam ini pertama kali ditemukan di Jepang pada tahun 1933 oleh Prof. Masui dan Hasimoto.

1. Vent Sexing

Vent sexing adalah membedakan jenis kelamin berdasarkan lubang alat kelamin atau cloaca. Untuk calon pejantan memiliki tonjolan seperti jerawat atau lubang jarum berwarna kuning, putih dan bahkan ada yang hitam sedangkan untuk calon betina tidak ada, sedangkan bagi betina memiliki ovarium yang merupakan sel telur yang berbentuk seperti *V*. Vent sexing sangat sulit dikarenakan membedakan tonjolan yang sangat kecil. Namun bagi yang sudah berpengalaman maka vent sexing sangat mudah. Pada kenyataannya tonjolan calon pejantan kadang tidak ada dan untuk betina malah ada tonjolan. Untuk itu mengapa peternakan besar yang memiliki sexer (petugas seleksi jenis kelamin) tidak bisa menjamin 100% ketepatan seleksi. Dengan metode ini masih menyisakan 5% ketidak pastian jenis kelamin.

Langkah-langkah sexing cara ini:

1. Anak ayam yang baru menetas dipegang dengan tangan kanan
2. Lehernya dijepit di antara jari tengah dan jari manis tangan kiri
3. Perut bagian bawah diraba dengan ibu jari dan kelingking tangan kiri. Hal ini untuk membersihkan feses yang terdapat

- pada anus
4. Punggung DOC diketuk-ketuk perlahan dengan jari tengah tangan kiri hingga kotoran terjatuh
 5. Bagian bawah lubang kloaka ditekan dengan ibu jari tangan mengarah ke atas
 6. Telunjuk tangan kanan juga ditaruh pada anus
 7. Ketiga jari- telunjuk kanan, ibu jari kanan, dan ibu jari kiri- digerakan bersama-sama sehingga anus terbuka dan kloaka bagian dalam menonjol keluar
 8. Kloaka dapat diamati di bawah lampu atau di penyinaran yang cukup. Jika ada tonjolan sebesar kepala jarum berarti DOC tersebut jantan.
 9. Anak ayam yang baru menetas dipegang dengan tangan kanan
 10. Lehernya dijepit di antara jari tengah dan jari manis tangan kiri
 11. Perut bagian bawah diraba dengan ibu jari dan kelingking tangan kiri. Hal ini untuk memberihkan feses yang terdapat pada anus
 12. Kemudian punggung DOC diketuk-ketuk perlahan dengan jari tengah tangan kiri hingga kotoran terjatuh
 13. Bagian bawah lubang kloaka ditekan dengan ibu jari tangan mengarah ke atas
 14. Telunjuk tangan kanan juga ditaruh pada anus
 15. Ketiga jari- telunjuk kanan, ibu jari kanan, dan ibu jari kiri- digerakan bersama-sama sehingga anus terbuka dan kloaka bagian dalam menonjol keluar
 16. Kloaka dapat diamati di bawah lampu atau di penyinaran yang cukup. Jika ada tonjolan sebesar kepala jarum berarti DOC tersebut jantan.

2. Feather Sexing

Pada tahun 1969 metode membedakan jenis kelamin diperbaharui yaitu dengan feather sexing yaitu menentukan jenis kelamin pada DOC dengan memerhatikan bagian bulu sayap pada anak ayam, yaitu bulu sayap primer dan bulu sayap sekunder. DOC jantan bulu penutup sama panjang dengan bulu primeris sedangkan betina bulu penutup lebih panjang dibandingkan bulu primer. Selain itu, bulu ayam betina lebih cepat tumbuh dari pada

ayam pejantan. Sementara untuk calon pejantan biasanya lebih cepat besar. Dengan metode ini maka seleksi ayam lebih mudah dan murah.



Gambar 1. Vent sexing



Gambar 2. Feather sexing

3. Alternatif Lain

Metode lain yang dapat dipakai adalah menunggu bulu ayam tumbuh sempurna. Biasanya ayam yang berwarna mencolok akan menjadi pejantan. Itu sebabnya pejantan mempunyai warna yang beragam dari betina untuk menarik pasangannya. Bulu pada ayam betina lebih sempurna dan lebih cepat tumbuhnya dari yang jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera, L.R., Johnson, L.A., Welch, G.R., Wang, W.H., Boquest, A.C., Cantley, T.C., Rieke, A., Day, B.N., 1998. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 50, 981-988.
- Adimoelja A, 1984. Separation of X- spermatozoa with the sephadex gel filtration method for female sex pre selection. Thesis submitted. Universitas Airlangga.
- Battacharya BC, Shone MS, Gunter AH, Evans BM, 1976. Successful separation of X and Y in human and bull semen. *Int. J. Fertil.* 22 : 23-25
- Bearden JH, Fuquay JW, 1984. Applied animal reproduction 2nd edition reston publishing company inc. A prentice Halls Company Virginia:341-345
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL 1994. Mullerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79 : 415-425.
- Bianchi NO, 1991. Sex determination in mammals. How many genes are involves?. *Biology of Reproduction* 44 : 393-397.
- Blecher, S.R., Howie, R., Li, S., Detmar, J., Blahut, L.M., 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52, 1309-1321.
- Cran, D.G., Johnson, L.A., Miller, N.G., Cochrane, D., Polge, C., 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm and in vitro fertilisation. *Vet. Rec.* 132, 40-41.
- Cran, D.G., Johnson, L.A., Polge, C., 1995. Sex preselection in cattle: a field trial. *Vet. Rec.* 136, 495-496.
- De Jonge CJ, Flaherty SP, Barness AM, Swann NJ, Mathew, 1997. Failure of multitube sperm swim-up for pre selection fertility and sterility Vol. 67 no. 6 : 1109-1114.

- Diliyana Y.F , Susilawati T dan Rahayu S. 2014 Keutuhan Membran spermatozoa Disekuensing Sentrifugasi Gradien Densitas *Percoll* Berpengencer Andromed dan CEP-2 yang Ditambahkan Kuning Telur Jurnal Veteriner . 15 . 1: 23-30
- Dowson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM, 1986. Data for biochemical research 3rd edition. Oxford Science. Publication. New York: 514-515
- Elbrecht A, Smith RG.1992. Aromatase Enzyme activity and sex determination in chickens. Science 255 : 467-470
- Ellegren.H. 2001 Hens, Cocs and Avian Sex determination aques for genes or Z or W. Embo Report. 2, 3 : 192-196
- Ervandi., M., T. Susilawati, dan S. Wahyuningsih. 2013. Pengaruh pengencer yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa sapi hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur). JITV 18(3): 177-184.
- Fugger, E.F, 1999. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. Theriogenology 52, 1435-1440.
- Fugger, E.F, Black, S.H., Keyvanfar, K., Schulman, J.D., 1998. Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intra-uterine insemination, in vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 13 _9., 2367-2370.
- Garner DL, Hafez ESE, 2008. Spermatozoa and seminal plasma in reproduction in farm animals 7th edition. Ed by ESE Hafez, and B Hafez. Edition Blackwell: 96-109
- Geier MR, Young JL, Kesster D, 1990. Too much or too little science in sex selection techniques? Fertil. Steril, 53: 1111-1112.
- Gledhill, B.L., Lake, S., Steinmetz, L.L., Gray, J.W., Crawford, J.R., Dean, P.N., Van Dilla, M.A., 1976. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. J. Cell. Physiol. 87, 367-376.
- Graves JAP, 1994. Mammalian Sex Determining Genes in the Differences Between The sexes ed by RV Short and E. Balaban. Cambridge University Press: 397-418.
- Hafez ESE and B Hafez 2008 X and Y Chromosome - Bearing

- Spermatozoa in Animal Reproduction in Farm Animal ed by ESE Hafez and B Hafez 7th Editon Black well : 390 -393
- Hardjopranjoto S, 1995. Ilmu Kemanjiran pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hendriksen, P.J.M., 1999. Do X- and Y- spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology* 52, 1295–1307.
- Hendriksen, P.J.M., Welch, G.R., Grootegoed, J.A., Van Der Lende, T., Johnson, L.A., 1996. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 342–350.
- Hunter R.H.F, 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Alih Bahasa Petro PKH Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Jaswandi, 1992. Pengaruh Lapisan Suspensi Bovine Serum Albumin 6 dan 10 Dalam Kolum Untuk Memisahkan Sperma Sapi Pembawa Kromosom X dan Y Sapi Guna Mengubah Rasio Seks Pada Pedet. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Johnson, L.A., 1988. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X or Y-bearing sperm. *Theriogenology* 29, 265.
- Johnson, L.A., 1991. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Domestic. Anim.* 26, 309–314.
- Johnson, L.A., 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. *J. Anim. Sci.* 70 _Suppl. 2., 8–18.
- Johnson, L.A., 1994. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. In: Charlton, H.H. _Ed., *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford Univ. Press, Oxford, UK, pp. 303–326.
- Johnson, L.A., 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 893–903.

- Johnson, L.A., Clarke, R.N., 1988. Flow sorting of X- and Y-chromosome-bearing mammalian sperm: Activation and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res.* 21, 335–343.
- Johnson, L.A., Pinkel, D., 1986. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7, 268–273.
- Johnson, L.A., Seidel, G.E., Jr. _Eds., 1999. Current Status of Sexing Mammalian Sperm. *Theriogenology* 52 _8., 217 pp., Elsevier Science Inc., New York.
- Johnson, L.A., Welch, G.R., 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X- and Y- sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52, 1323–1341.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V., 1987a. Flow cytometry of X- and Y-chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.* 17, 203–212.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V., Pinkel, D., 1987b. Flow sorting of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res.* 16, 1–9.
- Johnson, L.A., Flook, J.P., Hawk, H.W., 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X- and Y- sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41, 199–203.
- Johnson, L.A., Welch, G.R., Keyvanfar, K., Dorfmann, A., Fugger, E.F., Schulman, J.D., 1993. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X- and Y- spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Human Reprod.* 8 _10., 1733–1739.
- Johnson, L.A., Cran, D.G., Welch, G.R., Polge, C., 1996. Gender preselection in mammals. In: Miller, R.H., Pursel, V.G., Norman, H.D. _Eds., *Beltsville Symposium XX: Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals*. American Society of Animal Science, Savoy, IL, pp. 151–164.
- Johnson, L.A., Welch, G.R., Rens, W., 1999. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm

- output for IVF and AI. J. Anim. Sci. 77_Suppl. 2., 213–220.
- Johnson, L.A., Guthrie, H.D., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Garrett, W.M., 2000a. Cryopreservation of flow cytometrically sorted boar sperm: effects on in vivo embryo development. J. Anim. Sci. 78_Suppl. 1., Abstr., in press.
- Johnson, L.A., Guthrie, H.D., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., 2000b. Low dose artificial insemination of swine with sperm sorted for sex using an intrauterine technique in sows. Animal Reproduction Science. Proceedings of the ICAR, July 2000. Abstr., in press.
- Juniandri, Susilawati T, Isnaini N 2014 Perbandingan Pengencer Andromed dan CEP-2 terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Hasil Seksing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas *Percoll*. Jurnal Veteriner. 15 . 2 : 252-262
- Kaneko, Yamaguchi J, Kobayashi T, Lizuka R. 1983. Separation of human X and Y bearing sperm using *percoll* density gradient centrifugation. J. Fertil. Steril.40: 235-240.
- Kawarasaki, T, Welch, G.R., Long, C.R., Yoshida, M., Johnson, L.A., 1998. Verification of flow cytometrically sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization _FISH_ technique. Theriogenology 50, 625–635. Sex Ratio at Birth — Prospects for Control.
- Koopman P, 1995. Molecular biology of SRY and its Role in sex determination in mammals. Reprod.Fertil. Dev. 7: 712-722
- Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A., 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flowcytometric sorting, cooling, or cryopreservation. Mol. Reprod. Dev. 46, 408–418.
- Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Johnson, L.A., 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. Reprod. Fertil. Dev. 8, 1165–1168.
- Mc Clure RD, Nunes L, Tom R, 1989. Semen manipulation : Improved sperm recovery and function with a two layer *percoll* gradient. Fertil. Steril. 51 : 5
- Mohri H. 1997. New horizons in sperm cell research. Japan Scientific

- Societies Press. Tokyo: 474.
- Moruzzi, J.F., 1979. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 57, 319-323.
- Nishikimi H, Kansaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K. 2000. Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450 arom, and AMH in gonads of the chicken. *Molec reprod Dev* 55:20-30.
- Nur MA, Adijuwana H, 1989. Teknik pemisahan dalam analisis biologis departemen pendidikan dan kebudayaan. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor : 35-40
- Pancahastana H, 1999. Upaya mengubah sex rasio spermatozoa dengan melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan putih telur pada sapi Bali. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya Malang.
- Partodihardjo S, 1982. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Par KGL. 1998. Aspects of the regulation of human sperm motility. From the departments of woman & child health and laboratory science & technology. Karolinska Institut. Stockholm. <http://info.ki.se/form/bild/general/osynlig.gif>.
- Pinkel D, Johnson LA, 1986. Modification of a laser- based flow cytometry for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7: 268-273.
- Pinkel, D., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D., Watchmaker, G., 1982. High resolution DNA measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 3, 1-9.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40_1.: 99-102.
- Purwoistri R F , Susilawati T dan Rahayu S 2013 Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* Ditambahkan Kuning Telur. *Jurnal Veteriner* 14 3: 371-378

- Rath, D., Johnson, L.A., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., 1997. Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 47, 795–800.
- Reymon CS, Kettlewell JR, Hirsch JR, Bardwell B VJ and Zarkower D; 1999. Expression of DMRT in the genital ridge of mouse and Chicken embryos suggest a role in vertebrate sexual development. *Ev. Biol.* 215, 208-220.
- Ren, W., Welch, G.R., Johnson, L.A., 1998. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X- and Y-chromosome-bearing sperm. *Cytometry* 33, 476–481.
- Saili T, 1999. Efektifitas penggunaan albumin sebagai medium separasi dalam upaya mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Saili T, Toelihere MR, Boediono A, Tappa B. 2000. Keefektifan Albumen sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y. *Jurnal Hayati* 7(4):106-109.
- Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak
- Schenk, J.L., Suh, T.K., Seidel, G.E. Jr., 1999. Cryopreservation of bovine spermatozoa sexed by flow cytometry and cell sorting. *Theriogenology* 52, 1375–1391.
- Schiling E, Thormahlen A, 1976. Attempt for separation of X and Y Spermatozoa by density gradient centrifugation. *Int. Cong. Of Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Krakow: 90
- Schwerin M, Blottner S, Thomsen PD, Roschlau D, Brockmann, 1991. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. *Molecular Reproduction and Development* 30: 39-43
- Seidel Jr GE, Johnson LA, Allen CA, Welch GR, 1997. Artificial insemination With X and Y bearing bovine sperm. *Theriogenology* .47: 234-236.
- Seidel, G.E. Jr., 1999. Commercializing reproductive biotechnology — the approach used by XY. *Theriogenology* 51, 5, Abstr.

- Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L., Herickoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D., Cran, D.G., 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1407-1420.
- Shan Z, Nanda I, Wang Y, Scunid M, Vortkamp A and Haff T (2000). Sex specific expression of an evolutionary conserved male regulatory gene, DMRT1. In *Birds, Cytogenet*, 89, 252-257
- Steno O, Adimoelja A, Steno J, 1975. Separation of X and Y Bearing human spermatozoa with the sephadex gel- filtration method. *Andrologia*, 7: 95-97
- Susilawati T, Sumitro BS, Sri Rahayu, Ciptadi G, Isnaini N, 1996. Separation of X-Y Chromosome Bearing Sperm in Indonesia Native Bull with Sepahdex G-200 Presented 13th Congress Animal Reproduction. Sydney 29 Juni - 5 Juli
- Susilawati, T, 1997. Pemisahan spermatozoa X dan Y manusia dengan metoda filtrasi *sephadex* G100 dan sentrifugasi gradien densitas *percoll*. Dipresentasikan (Oral presentasi) pada Forum Komunikasi Reproduksi. Pengembangan reproduksi di Indonesia dalam visi 2020. Denpasar, 6-8 November 1997
- Susilawati T, Sumitro SB, Harjopranjoto S, Mantara Y, Nuryadi, 1999. Pola kapasitas spermatozoa X dan Y sapi hasil pemisahan menggunakan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas *percoll*. *Jurnal penelitian ilmu-ilmu hayati* 11: 29-40.
- Susilawati T, Hardjopranjoto S, Sumitro SB, Hinting A, 2000. Perubahan Fungsi Membran Spermatozoa Sapi Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas *Percoll* Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *J. Ternak Tropika*. Vol.1
- Susilawati T, Sumitro S.B, Hardjopranjoto, S, Hinting, A, 2001. Change of function and structure of Bull sperm membrane after *percoll* gradient centrifugation on sexing process. *Reprotech. The Indonesian Journal Reproductive Science and Technology*. Vol 1. No.1. July 2001.
- Susilawati T, 2001^b. Pengaruh Disposisi Semen pada Posisi 4 dan 4+ saat Inseminasi Buatan terhadap Keberhasilan Kebuntingan pada Sapi PO setelah Penyuntikan PGF2a. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Malang.

- Susilawati, T. 2002. Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Gradien Putih Telur. *Jurnal Widya Agrika*. 10 (2): 97-105.
- Susilawati, T., Hermanto, Srianto, P. dan Yulianti E. 2002. Pemisahan Spermatozoa Y dan Y pada Sapi Brahman Menggunakan Gradien Putih Telur pada Pegencer Tris dan Tris Kuning Telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 14 (2): 176-181.
- Susilawati 2003. *Inseminasi Buatan dengan spermatozoa Beku Hasil Sexing dengan spermatozoa Beku Hasil Sexing pada sapi*. Makalah dipresentasikan pada Kongres I Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI) Denpasar Bali
- Susilawati T, 2003^b. "Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur". *Jurnal Ilmu Peternakan dan Perikanan Fak. Peternakan Unmuh Malang "PROTEIN" No. 20. ISSN: 1410-3281, Juli-Desember 2003*
- Susilawati T** (2005) Tingkat Keberhasilan Kebuntingan dan Ketepatan Jenis Kelamin Hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku Sexing pada sapi Peranakan Ongole. *Animal Production. Jurnal Produksi Ternak. ISSN 1411-2027 Terakreditasi No 26/DIKTI/kep/2005. Volume 7, Nomor 3, September 2005 : 161-167.*
- Susilawati, T. 2003. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing Dengan Gradient Konsentrasi Putih Telur. *Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Jurnal Protein. No. 20. ISSN : 1410-3281*
- Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. UB press. Malang ISBN 978-602-8960-04-5
- Susilawati T, Rahayu S, Udrayana S, Sudarwati H and Nugroho E (2014) Effect of Different Centrifugation duration on *Simmental* Bull Sperm Quality and Membrane Status after Sexing, Cooling and Freezing Processes. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture Special*; 8(7): 28-34.
- Toelihere, Mozes R. 1985. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Cetakan ke-10. Penerbit Angkasa. Bandung.

- Toelihere MR, 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Vazquez, J.L., Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Lucas, X., Gil, M.A., Parrilla, I., Roca, J., 1999. Development of a non-surgical deep intra uterine insemination technique. Proceedings IV Inter. Conf. On Boar Semen Preservation August 8–11, 1999. Beltsville, MD P35. Abstr.
- Welch, G.R., Johnson, L.A., 1999. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 52, 1343–1352.
- Welch, G.R., Waldbieser, G.C., Wall, R.J., Johnson, L.A., 1997. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm. *Anim. Biotechnol.* 6, 131–139.
- Scheib D. 1983. Effect and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 23 :S87-S92
- Vaillant S, Dorizzi M, Pieau C. Richard Mercier N. 2001. Sex Reversal aromatase in chicken. *J Exp Zool* 290 : 727-740.
- Zaenuri.L.A, Susilawati T, Wahyuningsih S, and Sumitro S.B. 2013 Preservation Effect of Crude Fig Fruit Filtrate (*Ficus carica L*) Added In to Tris Egg Yolk Based Extender on Capacitating, Acrosome and Fertility of Half Blood Boer Buck Spermatozoa *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS. Volume 7, Issue 5 Ver. II (May. 2014) : 60-68*

RIWAYAT PENULIS



10

Penulis dilahirkan di kota Malang pada tanggal 12 November 1962.

Diawali dengan pendidikan TK

di TK Aisyiyah Bustanul Athfal 10 dan SD Muhammadiyah 9 Panglima Besar Djenderal Sudirman Malang, SMP negeri V Malang, Lulus SMA negeri III Malang ditahun 1981,

Lulus S1 di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang ditahun 1985, Lulus S2 kesehatan reproduksi Universitas Airlangga di tahun 1991, Lulus S3 PS kedokteran di Universitas Airlangga di tahun 2000 dan mendapatkan gelar Guru besar dibidang manajemen reproduksi di tahun 2006. Mengawali karirnya sebagai Dosen yang diwajibkan untuk melakukan penelitian, maka ditahun 1992 mulai meneliti tentang sexing spermatozoa hingga saat ini, maka hasil-hasil penelitiannya dirangkum di dalam buku sexing spermatozoa ini. Buku yang telah ditulis sebelumnya yang juga diterbitkan oleh UB Press adalah Spermatology, Agribisnis Kambing, Haji dan Umroh yang Nikmat (sebuah motivasi spiritual), dan Inseminasi Buatan.

SEXING SPERMATOZOA

Hasil Penelitian Laboratorium Dan Aplikasi Pada Sapi



Prof. Dr.sc.agr. Ir. Suyadi, MS. (Pakar dibidang Reproduksi Ternak)

Buku yang enak dibaca dan perlu. Menuntun para pembaca secara bertahap untuk memahami lebih dalam mengenai makna dan arti penting sexing spermatozoa, bahkan memberi arahan pembaca sampai kepada aspek praktis dan teknis, sehingga pembaca seolah-olah sedang menerima kuliah langsung di depan sang penulis. Buku ini sangat bermakna dalam mendukung program pengembangan peternakan khususnya ternak mamalia, karena dengan keberhasilan pre-seleksi jenis kelamin maka usaha peternakan akan semakin lebih efisien dan menguntungkan, semoga.....!



Dr. Ir. Sri Wahyuningsih, Msi (Doktor dibidang Reproduksi Ternak)

Buku Sexing spermatozoa ini perlu dibaca oleh para peneliti dibidang reproduksi ternak khususnya pada bidang sexing spermatozoa, karena didalam buku ini berisikan secara rinci teknik-teknik sexing spermatozoa yang dilakukan sendiri oleh peneliti dan merupakan hasil-hasil penelitian yang dilakukannya.



Dr. Ir. Kuswati, MS (Doktor dibidang produksi Ternak)

Buku sexing ini merupakan hasil-hasil penelitian yang ditekuni oleh peneliti secara berkesinambungan, sehingga dihasilkan banyak inovasi teknologi bidang sexing spermatozoa yang dapat diaplikasikan pada sapi potong, perah dan kambing pada skala peternakan rakyat maupun industri. Buku ini sangat bermanfaat bagi pembangunan peternakan yang selama ini terkendala oleh peningkatan produktivitas, sehingga buku ini layak dibaca oleh peneliti, pemerhati peternakan, mahasiswa Fakultas Peternakan dan Kedokteran Hewan.

ISBN 978-602-203-711-8



UB Press
Jl. Veteran Malang 65145 Indonesia
Telp. : +62-341-551611 - Pswt. 376
Fax. : +62-341-565420
E-mail : ubpress@gmail.com
Web : www.ubpress.ub.ac.id

UB Press
Penerbit Elektronik Pertama dan
Terbesar di Indonesia