

**PENGARUH POSISI STRAW PADA EKUILIBRASI
UAP NITROGEN CAIR DAN SUHU *THAWING*
TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO
DENGAN PENAMBAHAN GENISTEIN PADA
PENGENCER**

SKRIPSI

Oleh :

**Kristina Sidabalok
175050100111158**



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2021



**PENGARUH POSISI STRAW PADA EKUILIBRASI
UAP NITROGEN CAIR DAN SUHU *THAWING*
TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO
DENGAN PENAMBAHAN GENISTEIN PADA
PENGENCER**

SKRIPSI

Oleh :

**Kristina Sidabalok
17505010011158**

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Peternakan pada Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

PROGRAM STUDI PETERNAKAN

FAKULTAS PETERNAKAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

**PENGARUH POSISI STRAW PADA EKUILIBRASI
UAP NITROGEN CAIR DAN SUHU *THAW WING*
TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO
DENGAN PENAMBAHAN GENISTEIN PADA
PENGENCER**

SKRIPSI

Oleh:

**Kristina Sidabalok
175050100111158**

Telah dinyatakan lulus dalam ujian Sarjana
Pada Hari/Tanggal : Jumat, 23 Juli 2021

Mengetahui,

Menyetujui,

Dekan Fakultas Peternakan

Dosen Pembimbing

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,

MS., IPU., ASEAN Eng.

MS., IPU., ASEAN Eng.

NIP. 196204031987011001

NIP. 196204031987011001

Tanggal Juli 2021

Tanggal Juli 2021

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian beserta skripsi dengan judul “Pengaruh Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Suhu *Thawing* Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Strata satu (S-1) Sarjana Peternakan pada Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis juga sangat berterimakasih kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., IPU., ASEAN Eng., selaku Dekan Fakultas Peternakan serta Dosen Pembimbing yang telah memberikan arahan dan masukan selama proses penelitian.
2. Dr. Khothibul Umam Al Awaly, S.Pt., M.Si., selaku Ketua Jurusan Peternakan atas saran dan bimbingannya.
3. Dr. Herly Evanuarini, S. Pt., MP., selaku Ketua Program Studi Peternakan yang telah banyak membina kelancaran proses studi.
4. Pimpinan dan staff UPT Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak Tuban yang telah mengizinkan dan membantu dalam proses penelitian.
5. Anggota tim skripsi yang telah bekerja sama dengan baik dalam penelitian dan pembuatan skripsi.
6. Dr. Ir. Tri Eko Susilorini, MP, IPM, ASEAN Eng., selaku Dosen Penguji Satu Ujian Sarjana yang telah memberikan nasehat, arahan, saran dan bimbingannya.



7. Artharini Irsyammawati, S.Pt, MP selaku Dosen Penguji Keduaa Ujian Sarjana yang telah memberikan nasehat,arahan, saran dan bimbingannya.
8. Orangtua yang selalu memberikan doa dan dukungan baik moril maupun material sehingga Penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan baik.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga karya tulis ini dapat memberikan manfaat bagi seluruh pihak yang membutuhkan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua.

Malang, 19 Juni 2021

Penulis



PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA

Yang Bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa penelitian Skripsi yang saya lakukan merupakan penelitian dalam kelompok mengambil tema **“Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris-aminomethan Kuning Telur pada penyimpanan cair dan beku samen sapi PO”** dengan perincian sebagai berikut:

No.	Nama	Judul
1	Hamida Madani Rosmiati (175050100111065)	Pengaruh Genistein dalam Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Penyimpanan Suhu Ruang pada Sapi Peranakan Ongole (PO) di Tuban
2	Diajeng Doyu Pangestu (175050100111179)	Pengaruh Kadar Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethane Terhadap Kualitas Semen Peranakan Ongole (PO) Selama Penyimpanan Suhu Dingin
3	Herjuna Aditama	Efek Suplementasi Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur





	(175050100111184)	Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post <i>Thawing</i>
4	Aik Awallikah (175050101111034)	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Dan Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole
5	Natalia Kristina Lubis (175050101111045)	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein Dalam Pengencer Dan Lama Ekuilibrasi Pada Uap Nitrogen Terhadap Kualitas Semen Sapi PO Setelah <i>Thawing</i>
6	Adhe Tya P.D.H (175050101111118)	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris Aminomethan Terhadap Kualitas Post <i>Thawing</i> Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Suhu Berbeda
7	Aisyah Nur Arifiyanti (175050101111165)	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris-Aminomethan dan Lama <i>Thawing</i> terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan

		Ongole
8.	Aulia Setyo Lazuardi (175050107111065)	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Dingin dan Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Setelah Pengenceran dengan Penambahan Genistein
9.	Dicky Ananta Kudori (175050107111143)	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole Yang Disuplementasi Dengan Genistein
10.	Calista Mega Herawati (175050100111115)	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Suhu <i>Thawing</i> Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO
11.	Kristina Delvina Gultom (175050100111186)	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Lama <i>Thawing</i> Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO

12.	Pandu Alif Utama (175050101111136)	Pengaruh Lama Waktu Dan Jarak Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer
13.	Kristina Sidabalok (175050100111158)	Pengaruh Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Suhu <i>Thawing</i> Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer
14.	Frando G. Situomorang (175050107111108)	Pengaruh Posisi straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Lama <i>Thawing</i> Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer

Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 19 Juni 2021

Penulis

(Kristina Sidabalok)

NIM.175050100111158



THE EFFECT OF STRAW POSITION ON LIQUID NITROGEN VAPOR EQUILIBRATION AND THAWING TEMPERATURE ON THE QUALITY OF FROZEN ONGOLE CROSSBREED WITH ADDITIONAL GENISTEIN IN DILUTER

Kristina Sidabalok¹⁾ dan Suyadi²⁾

¹⁾Student of Production Departement, Animal Science Faculty,
University of Brawijaya

²⁾Lecturer of Production Departement, Animal Science
Faculty, University of Brawijaya

e-mail : kristinasidabalok01@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of straw position on liquid nitrogen vapor and thawing temperature on the quality of PO cattle semen with the addition of genistein in the diluent. This research was conducted from March to April 2021 at UPT PT and HMT Karangwaru, Tuban. The material used in this study was fresh semen derived from 2 Ongole Crossbreed cattles with individual motility criteria 70% and mass motility 2+. The method used in this research is a laboratory experiment. The design pattern used is a Factorial Completely Randomized Design (FCRD) with a 3x3 pattern. The first factor was the position on liquid nitrogen from 3 treatment levels, namely 5 cm, 10 cm and 20 cm. The second factor is the thawing temperature from 3 treatment levels, namely 20°C, 30°C, 40°C. Each treatment was repeated 5 times. The variables observed included individual motility,



viability, abnormality and membrane integrity. The results of the analysis showed that the thawing temperature had a significant effect ($P < 0.05$) on individual motility, viability and membrane integrity but had no significant effect ($P > 0.05$) on abnormality. Meanwhile, straw position on liquid nitrogen vapor and the interaction between straw position on liquid nitrogen vapor by thawing temperature did not give significant effect ($P > 0.05$) on individual motility, viability, abnormality and membrane integrity. The results of this study concluded that the straw position on liquid nitrogen vapor was 5 cm and the thawing temperature of 40°C showed the highest motility, viability and membrane integrity to provide the best quality frozen semen for Ongole Crossbreed cattle.

Keywords: spermatozoa, ROS, motility, viability, abnormality, semen quality



**PENGARUH POSISI STRAW PADA EKUILIBRASI
UAP NITROGEN CAIR DAN SUHU *THAWING*
TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO
DENGAN PENAMBAHAN GENISTEIN PADA
PENGECER**

Kristina Sidabalok ¹⁾ dan Suyadi ²⁾

¹⁾Mahasiswa Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan,
Universitas Brawijaya

²⁾Dosen Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan,
Universitas Brawijaya

e-mail : kristinasidabalok01@gmail.com

RINGKASAN

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi ternak sapi PO adalah dengan pelaksanaan Inseminasi Buatan (IB). IB diharapkan mampu meningkatkan mutu genetic dan produksi ternak. Keberhasilan IB dapat tercapai salah satunya dengan penggunaan semen beku. Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas semen beku adalah pengencer yang dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa agar tidak mengalami kejut dingin (*cold shock*) dan kerusakan membran akibat radikal bebas pada saat penyimpanan semen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer. Penelitian ini dilakukan mulai Maret – April 2021 di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban. Materi yang digunakan dalam penelitian merupakan semen segar yang berasal dari 2 ekor sapi Peranakan Ongole (PO) dengan kriteria motilitas individu $\geq 70\%$ dan motilitas masaa



2+. Penampungan dilakukan 1 kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*). Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan pola 3x3. Faktor pertama adalah posisi straw pada nitrogen cair dari 3 taraf perlakuan 5 cm, 10 cm dan 20 cm. Faktor kedua adalah suhu *thawing* dari 3 taraf perlakuan yaitu 20°C, 30°C, 40°C. Masing masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Variabel yang diamati meliputi motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran. Analisa data yang digunakan adalah analisa ragam atau ANOVA (*Analysis Of Variance*). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial, jika terjadi perbedaan pada data yang diperoleh maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan.

Hasil analisa menunjukkan bahwa suhu *thawing* memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$) pada motilitas individu dengan nilai rata-rata secara berurut sesuai perlakuan yaitu $31 \pm 2,24$, $35 \pm 3,53$, $34 \pm 4,18$, viabilitas dengan nilai rata-rata secara berurut sesuai perlakuan yaitu $54,75 \pm 4,05$, $58,01 \pm 2,92$, $59,38 \pm 2,17$ dan integritas membran dengan nilai rata-rata secara berurut sesuai perlakuan yaitu $52,19 \pm 4,46$, $55,2 \pm 3,48$, $56,48 \pm 2,2$, namun tidak memberikan pengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas. Sedangkan posisi straw pada uap nitrogen cair dan interaksi antara posisi straw pada uap nitrogen cair dengan suhu *thawing* tidak memberikan pengaruh nyata ($P > 0,05$) motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa posisi straw pada uap nitrogen cair 5 cm dan suhu *thawing* 40°C



menunjukkan motilitas, viabilitas dan integritas membrane paling tinggi sehingga dapat memberikan kualitas terbaik semen beku sapi PO.



DAFTAR ISI

RIWAYAT HIDUP.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA.....	iv
ABSTRACT.....	viii
RINGKASAN.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Kerangka Pikir.....	5
1.6. Hipotesis.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Sapi Peranakan Ongole (PO).....	9
2.2. Struktur Spermatozoa.....	9
2.3. Struktur Membran Spermatozoa.....	11
2.4. Inseminasi Buatan.....	12
2.5. Koleksi dan Evaluasi Kualitas Semen.....	13
2.5.1. Penampungan Semen.....	13
2.5.2. Evaluasi Kualitas Semen.....	14
2.6. Pengenceran Semen.....	17
2.7. Ekuilibrasi.....	19





2.8. Penyimpanan Semen.....	20
2.9. Reaksi Biokemis Selama Penyimpanan.....	21
2.9.1. Metabolisme Sel Spermatozoa	21
2.9.2. Radikal Bebas (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	23
2.10. Antioksidan.....	24
2.11. Genestein.....	26
2.12. <i>Thawing</i>	27
BAB III MATERI DAN METODE.....	30
3.1. Lokasi dan Waktu Peneliatian.....	30
3.2. Materi Penelitian.....	30
3.3. Metode Penelitian.....	32
3.4. Prosedur Penelitian.....	32
3.4.1. Pelarutan Genestein.....	32
3.4.2. Menyiapkan Pengencer Tris Aminometan Kuning Telur	33
3.4.3. Penampungan Semen Sapi PO	34
3.4.5. Evaluasi Kualitas Semen secara Makroskopis dan Mikroskopis.....	35
3.4.6. Pengenceran Semen Segar.....	39
3.4.7. Ekuilibrasi Suhu Dingin.....	40
3.4.8. Ekuilibrasi Nitrogen Cair.....	40
3.4.9. <i>Freezing</i> (Pembekuan).....	40
3.4.10. <i>Thawing</i>	41
3.4.11. Variabel yang diamati.....	41
3.5. Analisis Data.....	42
3.6. Batasan Istilah	43
3.7. Kerangka Operasional.....	44
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
4.1 Kualitas Semen Segar.....	45

4.2 Pengaruh Posisi Straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu <i>Thawing</i> Terhadap Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO <i>Post Thawing</i>	48
4.3 Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu thawing Terhadap Viabilitas Spermatozoa Sapi PO <i>Post Thawing</i>	52
4.4. Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu thawing terhadap Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO <i>Post thawing</i>	57
4.5 Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu thawing terhadap Integritas Membran Spermatozoa <i>Post thawing</i>	61
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	66
5.1 Kesimpulan.....	66
5.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	98



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kualitas semen segar sapi PO.....	45
2. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO <i>Post thawing</i>	49
3. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi PO <i>Post thawing</i>	53
4. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO <i>Post thawing</i>	58
5. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Integritas Membran Spermatozoa Sapi PO <i>Post thawing</i>	62



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Pikir	7
2. Struktur internal spermatozoa sapi.....	10
3. <i>Lipid Bilayer Membrane</i>	12
4. Metabolisme spermatozoa.....	23
5. Reaksi antioksidan	26
6. Struktur kimia genistein	27
7. Kerangka Operasional.....	44
8. Diagram Batang Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan <i>Post thawing</i>	50
9. Viabilitas Spermatozoa Sapi PO	53
10. Diagram Batang Viabilitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan <i>Post thawing</i>	54
11. Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO.....	58
12. Diagram Batang Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan <i>Post thawing</i>	59
13. Integritas membran spermatozoa	62
14. Diagram Batang Integritas Membran Sapi PO pada Pemeriksaan <i>Post thawing</i>	63



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Semen Segar.....	98
2. Analisa Motilitas Individu Post Thawing.....	99
3. Analisa Vianilitas Post Thawing.....	98
4. Analisa Abnormalitas Post Thawing.....	102
5. Analisa Integritas Membran Post Thawing.....	98
6. Dokumentasi.....	98



DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	= <i>Analysis Of Variance</i>)
ATP	= Adenosin Triphospat
BBIB	= Balai Besar Inseminasi Buatan
dkk	= dan kawan-kawan
DNA	= asam deoksiribonukleat
et al	= et all
IB	= Inseminasi Buatan
ml	= mili liter
pH	= Potential of Hydrogen
PK	= Putih kekuningan
PO	= Peranakan Ongole
ROS	= <i>Reactive Oxygen species</i>
SD	= Standar Deviasi
μm	= mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	= derajat celcius





BABI

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan salah satu ternak yang memiliki produktivitas yang baik. Menurut Widjaja, Akhdiat dan Purwasih (2017) Sapi PO merupakan sapi persilangan antara sapi Ongole dengan sapi lokal. Sapi PO dimanfaatkan sebagai ternak pekerja dan sebagai ternak penghasil daging. Sapi PO mempunyai peranan penting dalam kehidupan masyarakat selain sebagai penghasil daging dan karkas yang baik juga dimanfaatkan sebagai ternak pekerja. Maka dari itu perlu dilakukannya upaya peningkatan populasi sapi PO untuk mendukung swasembada daging di Indonesia.

Salah satu usaha yang dapat dilakukan dengan melakukan Inseminasi Buatan (IB). Amin, Rokhayati, Laya(2019) menyatakan bahwa salah satu upaya yang dapat ditempuh untuk meningkatkan produksi daging yaitu dengan meningkatkan jumlah pemilikan sapi potong. Hal ini dapat dilaksanakan dengan menerapkan Inseminasi Buatan (IB) pada sapi potong. Fania, I Gusti dan I Ketut (2020) menambahkan bahwa cara untuk mempercepat peningkatan populasi sapi pedaging dengan mengoptimalkan teknologi IB. Keuntungan IB antar lain dapat menghemat biaya pemeliharaan pejantan lain, peningkatan mutu genetik lebih cepat karena menggunakan semen dari pejantan unggul dan dapat mencegah terjadinya penularan penyakit.

Kualitas semen mempengaruhi keberhasilan inseminasi buatan. Wiratri, Trinil dan Sri (2014) menyatakan bahwa semen yang telah ditampung harus segera di evaluasi



kuantitas dan kualitasnya agar segera dicampurkan dengan pengencer. Pengencer harus mengandung sumber nutrisi untuk sperma, mengandung antibiotik dan berfungsi sebagai *buffer*. Mumu (2009) menyatakan bahwa ada beberapa bahan pengencer yang biasa digunakan antara lain tris, kuning telur, susu skim dengan penambahan gliserol.

Salah satu jenis pengencer yang umumnya digunakan adalah *Tris Aminometane Kuning Telur*. Menurut Permatasari, Setiatin, Samsudewa (2013) kuning mengandung glukosa, vitamin yang larut dalam air dan larut dalam lemak sehingga menguntungkan spermatozoa. Kuning telur memiliki komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin.

Tubuh spermatozoa selalu mengalami metabolisme dan hasil samping metabolisme disebut radikal bebas yang dapat merusak struktur sel. Simbolon, Triva, Mulyadi (2013) menyatakan bahwa senyawa ROS akan menginduksi peroksidasi lipid yang merupakan agen penyebab perubahan morfologi spermatozoa dan menyebabkan kerusakan pada DNA spermatozoa. Senyawa ROS bersifat toksik yang dapat menyebabkan menurunnya kualitas spermatozoa hingga mengalami kematian spermatozoa. Produksi ROS yang berlebihan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan spermatozoa namun dapat dicegah dengan penambahan antioksidan.

Penambahan antioksidan berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan disebabkan oleh reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga proses metabolisme berlangsung dengan baik dan motilitas spermatozoa dapat dipertahankan. Antioksidan dapat mencegah terjadinya reaksi

lipid peroksida pada membran plasma spermatozoa selama pengolahan semen, sehingga membran plasma utuh (Rizal dan Herdis, 2010). Genistein adalah isoflavon dari senyawa tumbuhan yang memiliki sifat antioksidan yang dapat melindungi spermatozoa pada saat pembekuan. Penambahan genistein pada semen beku dapat meningkatkan motilitas dan vabilitas spermatozoa dan mengurangi terjadinya kerusakan DNA spermatozoa (Silvestre, Vicente-Fiel, Raga, Salvador, et al, 2015).

Aini, Suharyati dan Hartono (2014) menyatakan bahwa ekuilibrase nitrogen cair dilakukan dengan menyusun straw yang berisi semen pada rak yang kemudian di tempatkan dalam uap nitrogen cair sekitar 4,5 di atas permukaan nitrogen cair selama 9 menit. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa dengan jarak 2-10 cm berkisar 40-50%. Setelah ekuilibrase uap nitrogen cair maka dilakukan pembekuan. Wulandari dan Prihatno (2014) menyatakan bahwa sebelum digunakan untuk melakukan Inseminasi Buatan maka dilakukan pencairan kembali (*Thawing*). *Thawing* membuat spermatozoa kembali hidup dan kembali ke temperatur tubuh sehingga *thawing* harus dilakukan secara hati-hati untuk menghindari kerusakan spermatozoa. Peningkatan temperatur saat *thawing* harus meningkat secara konstan sampai waktu digunakan. Hoesni (2013) menambahkan bahwa *thawing* merupakan proses pencairan kembali semen beku. Suhu *thawing* yang tidak tepat dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas spermatozoa.

Berdasarkan uraian diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui bagaimana pengaruh posisi staw pada nitrogen cair saat ekuilibrase nitrogen cair dan perbedaan suhu



pada saat *thawing* dengan penambahan genestein sebagai antioksidan terhadap kualitas semen beku sapi PO.

1.2. Rumusan Masalah

- Bagaimana pengaruh posisi straw pada ekuilibirasi uap nitrogen cair terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer ?
- Bagaimana pengaruh suhu *thawing* terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genestein pada pengencer ?
- Bagaimana pengaruh interaksi posisi straw pada ekuilibirasi uap nitrogen cair dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genestein pada pengencer ?

1.3. Tujuan Penelitian

- Untuk mengetahui pengaruh posisi straw pada ekuilibirasi uap nitrogen cair terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.
- Untuk mengetahui pengaruh suhu *thawing* terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genestein pada pengencer.
- Untuk mengetahui pengaruh posisi straw pada ekuilibirasi uap nitrogen cair dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharap menjadi sumber informasi bagi peternak, instansi pemerintah di bidang peternakan atau pertanian, inseminator, mahasiswa peternakan, maupun

masyarakat mengenai posisi straw uap nitrogen cair dan suhu thawing yang tepat dalam mempertahankan kualitas dari semen sapi PO dengan penambahan genestein pada pengencer *Tris Aminomentane* Kuning Telur.

1.5. Kerangka Pikir

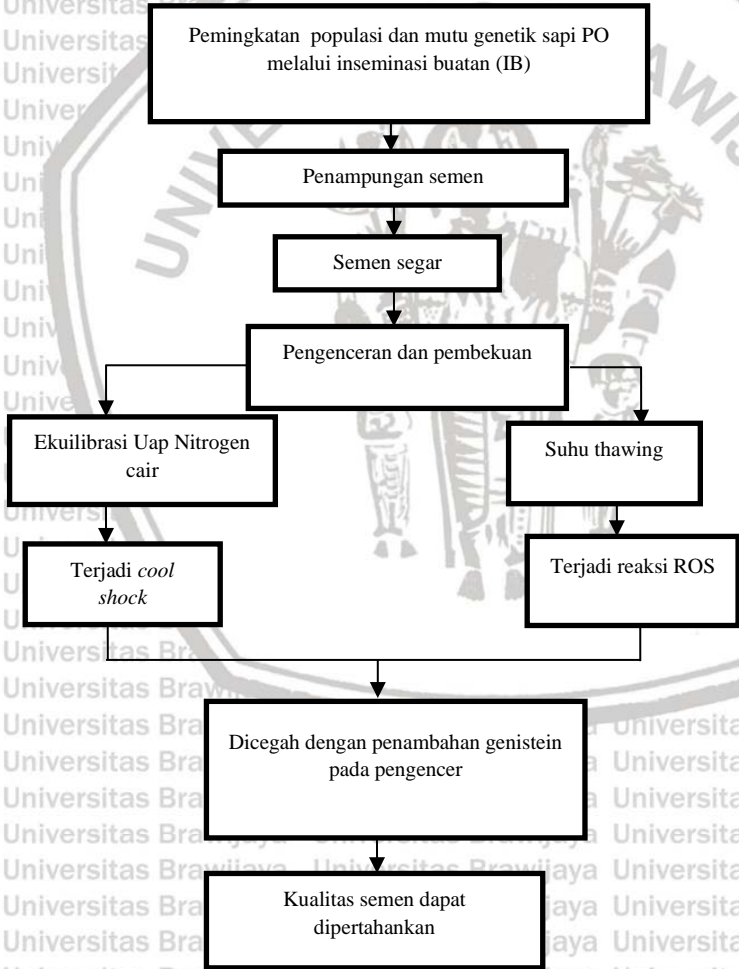
Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan sapi potong lokal yang berpotensi besar untuk terus dikembangkan. Salah satu cara dalam pengembangan sapi PO adalah dengan cara Inseminasi Buatan. Kualitas semen beku mempengaruhi keberhasilan IB.

Semen sapi PO yang telah melalui proses penampungan selanjutnya diencerkan dengan pengencer. Pengenceran dilakukan untuk melindungi spermatozoa dari perubahan suhu setelah penampungan dan untuk melindungi spermatozoa dari hasil samping metabolisme. Spermatozoa yang melakukan metabolisme akan menghasilkan senyawa radikal bebas yang dapat menurunkan kualitas semen. Menurut Suryadinata(2018) menambahkan bahwa radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah molekul yang membawa satu atau lebih elektron tak berpasangan dan mampu eksis secara independen. Radikal bebas memiliki jumlah elektron ganjil sehingga berumur pendek, sangat reaktif, dan tidak stabil. Radikal bebas dapat bereaksi dengan cepat dengan molekul lain dengan menangkap elektron untuk menjadi stabil. Oleh karena itu perlu dilakukan penambahan senyawa antioksidan untuk mengurangi oksidan yang di sebabkan oleh ROS. Berawidan Marini (2018) antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan dan menangkal pembentukan reaksi oksidasi yang disebabkan radikal bebas. Genestein merupakan salah satu



antioksidan yang dapat menghambat terjadinya pembelahan sel dan penurunan kualitas spermatozoa.

Ekuilibrasi nitrogen cair dilakukan dengan memasukkan straw di atas uap nitrogen cair sebagai proses adaptasi semen untuk tahap selanjutnya, agar tidak terjadi temperatur shock yang dapat menyebabkan abnormalitas atau kematian spermatozoa di dalam semen. Aini, Suharyati dan Hartono(2014) menyatakan bahwa posisi straw 10 cm dari permukaan nitrogen cair dengan volume nitrogen cair 8 liter menghasilkan motilitas spermatozoa sebesar 43%, spermatozoa hidup sebesar 39%. Sebelum semen beku digunakan harus dilakukan pencairan kembali yang disebut proses *thawing*. Hoesni(2013) menambahkan bahwa *thawing* merupakan proses pencairan kembali semen beku. Suhu *thawing* yang tidak tepat dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas spermatozoa.



Gambar 1. Kerangka Pikir

1.6. Hipotesis

- Posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair sesuai perlakuan berpengaruh dengan penambahan genistein pada pengencer.
- Suhu *thawing* sesuai perlakuan berpengaruh dengan penambahan genistein pada pengencer.
- Interaksi antara posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair dan suhu *thawing* sesuai perlakuan berpengaruh dengan penambahan genistein pada pengencer



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi Peranakan Ongole (PO)

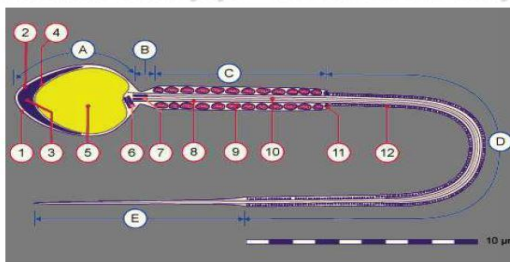
Fania,dkk(2020) menyatakan bahwa sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan hasil persilangan sapi Ongole dengan sapi Jawa. Sapi PO di Indonesia di pelihara dengan tujuan ganda selain sebagai sapi potong penghasil daging juga digunakan sebagai ternak pekerja. Keunggulan sapi PO sebagai sapi tropis yaitu tahan terhadap panas, tahan terhadap endoparasit seperti gigitan nyamuk, dan dapat bertahan terhadap pakan yang mengandung serat kasar tinggi. Menurut Supartini dan Hariadi (2014) sapi PO merupakan salah satu sapi lokal yang menjadi idola para peternak di Indonesia. Hal ini dapat mengancam populasi karena terjadinya pengurangan stok terhadap sapi PO. Rasyid dan Luthfi (2017) menambahkan bahwa sapi PO merupakan sapi potong lokal Indonesia yang perlu dilindungi dan dilestarikan karena populasi dan produktivitasnya mengalami penurunan. Penurunan populasi terjadi karena kegiatan persilangan tidak terprogram dengan baik sehingga memicu menurunnya produktivitas dan populasi dari sapi PO. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi dan produktivitas sapi PO yaitu dengan melakukan Inseminasi Buatan.

2.2. Struktur Spermatozoa

Spermatozoa terdiri atas dua bagian fungsional yang penting yaitu kepala dan ekor. Kepala spermatozoa bentuknya bulat telur dengan ukuran panjang 5 mikron, diameter 3



mikron dan tebal 2 mikron yang terutama dibentuk oleh genetic sifat penurunan ayah dalam molekul DNA. Pada bagian anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom, suatu struktur yang berbentuk topi yang menutupi dua per tiga bagian anterior kepala dan mengandung sejumlah enzim hidrolitik. Enzim tersebut terdiri dari; hialuronidase, akrosin, dan *Corona Penetrating Enzim* (CPE) yang semuanya penting untuk penembusan ovum (sel telur) pada proses fertilisasi. Ekor dibedakan atas 3 bagian yaitu bagian tengah (*midpiece*), bagian utama (*principle piece*) dan bagian ujung (*endpiece*). Panjang ekor seluruhnya sekitar 55 mikron dengan diameter yang makin ke ujung makin kecil: di depan 1 mikron, di ujung 0,1 mikron. Panjang bagian tengah: 5-7 mikron, tebal 1 mikron; bagian utama panjang 45 mikron, tebal 0,5 mikron dan bagian ujung panjang 4-5 mikron, tebal 0,3 mikron. Bagian ekor tidak bisa dibedakan dengan mikroskop cahaya tetapi harus dengan mikroskop *electron* (Syauqy, 2014). Susilawati(2011) menambahkan bahwa ekor spermatozoa dibagi menjadi leher, bagian tengah, pokok dan akhir.



- | | | |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 1. Plasma membran | 7. Rest of the distal centriole | A. Kepala |
| 2. membran akrosom luar | 8. Thick outer longitudinal fibers | B. Leher |
| 3. Akrosom | 9. Mitokondia | C. Mid piece |
| 4. membran akrosom dalam | 10. Aksoneme | D. Principle piece |
| 5. Nukleus | 11. Anulus | E. Endpiece |
| 6. sentriol proksimal | 12. Ring fibers | |

(Susilawati, 2011)

Gambar 2. Struktur internal spermatozoa sapi



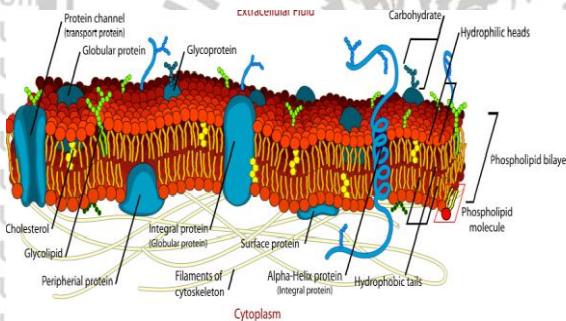
2.3. Struktur Membran Spermatozoa

Membran sel terdiri atas lipida, protein, dan karbohidrat. Rasio antara lipida, protein dan karbohidrat tergantung pada tipe sel dan spesiesnya. Umumnya lipida kurang lebih 49%, protein 40%, karbohidrat 1-10% dan air $\pm 20\%$. Lipida membran terdiri atas dua lapisan terorientasi ke arah luar dan lapisan yang lain terorientasi ke arah sitoplasma. Protein- protein tersebut terdistribusi secara tidak merata pada membran sel. Sebagian protein membran terletak pada bagian perifer dan sebagian tetapan pada setengah lapisan lipida. Bagian karbohidrat membran biasanya terikat pada lipida, sebagian lain terikat pada protein (Wizer.2007)

Lipid merupakan komponen penting dalam membran sel (fosfolipid, glikolipid dan kolesterol). Komponen dalam membran sel ini mengandung asam lemak tak jenuh ganda yang sangat rentan terhadap oksidasi yang menyebabkan terjadinya radikal bebas terutama radikal hidroksil (OH⁻). Radikal hidroksil ini dapat menimbulkan reaksi berantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid terjadi pada saat proses *thawing*, sehingga proses *thawing* yang terlalu lama akan menyebabkan peroksidasi lipid yang semakin banyak. Proses peroksidasi lipid ini akan mengubah struktur spermatozoa terutama pada bagian membran dan akrosom sehingga akan kehilangan motilitas, perubahan metabolisme dan pelepasan komponen intraseluler sehingga akan meningkatkan kerusakan spermatozoa yang mengakibatkan peningkatan kematian spermatozoa dan penurunan motilitas. Astuti,dkk(2009) menambahkan proses peroksidasi pada spermatozoa akan diikuti oleh perubahan struktur membran plasma spermatozoa sehingga mengubah kestabilan dan fungsi membran, serta menurunkan fluiditas



membran spermatozoa. Rusaknya membran plasma mitokondria spermatozoa mengakibatkan terganggunya metabolisme sel spermatozoa, sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.



(Ophardt, 2017)

Gambar 3. *Lipid Bilayer Membrane*

2.4. Inseminasi Buatan

Inseminasi Buatan (IB) merupakan suatu bioteknologi reproduksi yang dapat memberikan peningkatan populasi dan mutu genetik pada ternak dengan memanfaatkan pejantan unggul sebagai produsen semen, sehingga menghasilkan anak yang berkualitas baik. IB memanfaatkan sperma dari pejantan unggul yang dapat membuahi ribuan betina dalam waktu yang singkat dan tidak membutuhkan pejantan untuk melakukan perkawinan langsung. Keuntungan IB pada sapi antara lain dapat meningkatkan mutu genetik lebih cepat karena menggunakan semen dari pejantan unggul, menghemat biaya dan mencegah terjadinya penularan penyakit (Fania, I Gusti, I Ketut, 2020).

Teknik IB ada dua macam yaitu rektovaginal dan transervikal, untuk sapi menggunakan metode rektovaginal



dengan cara tangan dimasukan kedalam rektum, kemudian memegang bagian servik kemudian insemination gun dimasukan melalui vulva ke vagina hingga bagian servik, untuk domba dan kambing menggunakan metode transervikal dengan menggunakan spikulum untuk melihat posisi servik, kemudian insemination gun dimasukkan hingga mencapai servik (Susilawati, 2011). Faktor penentu keberhasilan IB antara lain pengetahuan peternak terhadap deteksi birahi yang tepat, kualitas semen beku, *body condition score* (BCS) sapi, waktu yang tepat untuk melakukan IB dan keterampilan inseminator (Herawati, Anggraeni, Praharani, dan Utami, dkk, 2012). Selain itu, Rosita, Susilawati dan Wahyuningsih (2014) menyatakan bahwa tingkat keberhasilan IB juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti cuaca, iklim, suhu dan manajemen pemeliharaan khususnya perkandangan. Sapi akseptor juga sangat jarang dikeluarkan dari kandang sehingga intensitas ternak memperoleh sinar matahari sangat rendah. Hal ini dapat memicu *silent heat* akibat gangguan sistem hormonal, sehingga mempengaruhi keberhasilan IB.

2.5. Koleksi dan Evaluasi Kualitas Semen

2.5.1. Penampungan Semen

Arifiantini, Yusuf, dan Riyadhi (2005) menyatakan salah satu kegiatan pada program Iseminasi Buatan adalah koleksi atau penampungan semen. Ada beberapa metode koleksi semen yang dapat dilakukan yaitu vagina buatan, massase, dan elektroejakulator. Koleksi semen pada ternak umumnya dilakukan menggunakan vagita buatan, karena aproses koleksi terjadi secara fisiologik, kualitas dan kuantitas semen yang dihasilkan juga lebih baik dibandingkan dengan metode lain.



Herdis (2012) menyatakan bahwa metode penampungan semen pada sapi antara lain dengan menggunakan metode Vagina Buatan(VB) dan metode elektroejakulator. Cara penampungan yang umum digunakan adalah dengan metode vagina buatan karena metode ini mudah dilakukan dan mendapat kualitas sperma yang baik dibandingkan dengan metode elektroejakulator yang akan menghasilkan konsentrasi spermatozoa yang sedikit. Luthfi, Susilawati, Isnaini(2015) menambahkan bahwa dengan menggunakan metode elektroejakulator akan menghasilkan volume semen yang lebih banyak dibandingkan penampungan vagina, hal ini karena terjadinya rangsangan yang optimal terhadap ereksi dan ejakulasi, akan tetapi konsentrasi spermatozoanya lebih rendah.

2.5.2. Evaluasi Kualitas Semen

Tahap pemeriksaan semen digolongkan kedalam dua kelompok, yakni pemeriksaan makroskopik meliputi: volume, warna, konsistensi, derajat keasaman (pH), dan bau semen. Pemeriksaan mikroskopis meliputi: konsentrasi, motilitas (gerak individu spermatozoa), gerak massa, persentase hidup dan persentase abnormalitas spermatozoa dan mengamati preparat tersebut dibawah mikroskop(Varasofiari, Setiatin dan Sutopo.2013). Semen yang telah ditampung harus segera dilakukan uji kualitas spermatozoa untuk menentukan layak atau tidaknya spermatozoa tersebut untuk dibekukan. Mumu (2009) semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Evaluasi secara makroskopis antara lain adalah :



1. Warna, penilaian langsung melihat semen yang di tampung, warna semen sapi pada umumnya putih kekuningan.
2. Volumen semen, volume semen dapat dilihat dari tabung penampung berskala
3. Konsistensi, penilaiannya bisa encer, sedang, pekat. Dapat diperiksa dengan cara memiringkan tabung reaksi yang berisi sperma secara perlahan. Semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti kemiringan tabung.
4. Ph, penilaiannya dengan mencelupkan kertas lakmus ke dalam semen. pH semen sapi normal 6,2 -6,8
5. Bau, semen mempunyai bau yang khas

Evaluasi secara mikroskopis anatara lain adalah :

1. Motilitas Massa, penilaian dilakukan dengan cara meletakkan semen segar di atas *object glass* ditutup dengan *cover glass* lalu diamati denngan mikroskop.

- Sangat baik $\geq 90\%$, bergerak sangat aktif atau cepat, gelombang besar dan cepat

- Baik = 70-85%, bergerak aktif, gelombang besar

- Lumayan = 40-65%, bergerak agak aktif, gelombang tipis dan gerakan massa lambat

- Kurang baik = 20-30%, berakan kurang aktif, tidak terlihat gelombang, hanya gerakan individual sperma

- Buruk $\leq 10\%$, gerakan individual sperma yang lambat bahkan tidak ada gerakan (mati)

2. Konsentrasi, penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah sperma yang ada dengan menggunakan

haemocytometer dengan cara semen segar dihisap dengan pipet eritrosit sampai skala 0,5 kemudian larutan NaCl 3% dihisap sampai pada skala 101, lalu dicampurkan dan dihomogenkan selama 2-3 menit. Kemudian diletakkan pada kamar hitung dan ditutup *cover glass* dan diamati dengan mikroskop perbesaran 10 x 20

3. Persentase hidup sperma, penilaian dilakukan dengan pewarnaan diferensial menggunakan zat pewarna eosin dengan cara dua tetes zat warna ditempatkan pada suatu gelas obyek yang bersih dan hangat (suhu 37°C) yang kemudian satu tetes kecil semen ditambahkan dan dicampurkan lalu diulas dengan menggunakan gelas obyek lainnya. Perhitungannya berdasarkan perbandingan antara jumlah sperma hidup yang ditandai dengan kepala tidak berwarna dengan total sperma yang diamati dan dinyatakan dalam persen (%). Perlakuan preparat ulas untuk menghitung persentase sperma hidup dilakukan dalam waktu yang singkat maksimal 15 detik.

4. Muhammad, Susilawati dan Wahjuningsih (2016) menambahkan bahwa motilitas individu, dilihat berdasarkan pada spermatozoa yang bergerak progresif kedepan (pergerakan mundur dan melingkar tidak ikut disertakan) dibandingkan dengan spermatozoa yang diam di tempat

5. Abnormalitas, dilakukan terhadap preparat ulas dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa abnormal bisa dilihat dari bentuk morfologinya, bentuk-bentuk spermatozoa abnormal diantaranya adalah kepala yang terlalu besar, kepala dua dalam 1 ekor spermatozoa, ekor putus, ekor bercabang, ekor melingkar dan sebagainya. Perhitungan

persentase abnormalitas dapat dihitung dengan cara menghitung jumlah spermatozoa abnormal dibagi jumlah spermatozoa yang diamati kemudian dikalikan 100 %

Adinda, Darodja, Setiawan (2015) menyatakan bahwa warna, konsistensi, dan konsentrasi semen mempunyai hubungan yang erat satu sama lain, yaitu semakin encer suatu semen maka konsentrasinya akan semakin rendah begitu juga sebaliknya jika konsentrasinya tinggi maka warna semen akan semakin keruh dengan konsistensi tinggi atau kental. Purwoistri, Susilawati dan Rahayu (2013) konsentrasi spermatozoa pada setiap lapisan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap jumlah total spermatozoa karena konsentrasi akan berpengaruh secara langsung terhadap perhitungan total spermatozoa motil.

2.6. Pengenceran Semen

Danang, Isnaini, Trisunuwati (2012) menyatakan bahwa larutan pengencer semen yang memiliki kandungan komposisi kimia lengkap akan memberikan fungsi yang baik bagi spermatozoa, substrat-substrat nutrisi diperlukan spermatozoa untuk mempertahankan hidupnya, terutama bagi spermatozoa yang disimpan terlebih dahulu sebelum diinseminasikan. Cahyani, Ondho, Samsudewa (2020) menyatakan bahwa syarat bahan pengencer semen yang baik harus memiliki fungsi sebagai penyedia zat makanan untuk sperma, pelindung akibat pendinginan, memperlakukan pH, mengatur keseimbangan osmotik dan menghambat pertumbuhan kuman mikroorganisme patogen, mengandung antibakteri, bersifat isotonis dan dapat menjadi *buffer*. Hal tersebut sesuai juga dengan Coester, Sulaiman, Rizal (2018) menyatakan bahwa bahan yang digunakan sebagai pengencer

semen harus memenuhi beberapa persyaratan seperti memiliki sumber energi, penyangga, tidak toksik, mencegah kerusakan pada spermatozoa saat preservasi, dan tidak menurunkan daya fertilitas spermatozoa.

Safitri, Sardjito, Wibawati, Mustofa,dkk(2018) menyatakan bahwa bahan pengencer yang sudah banyak digunakan yaitu *tris aminometane* kuning telur. Pengencer *tris aminometan* kuning telur merupakan larutan *buffer* yang mengandung asam sitrat yang berperan sebagai penyangga (*buffer*) dan fruktosa sebagai bahan energi, untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat serta mempertahankan tekanan osmotik.Saifudin, Isnaini, Yekti, Susilawati(2018) menambahkan bahwa *tris aminometan* memiliki zat yang diperlukan oleh spermatozoa, yang terdiri dari fruktosa, laktosa, rafinosa, asam amino dan vitamin dalam kuning telur. Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya *cold shock* selama pendinginan. Kuning telur mengandung asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral untuk kebutuhan hidup spermatozoa. Kuning telur mengandung senyawa anti kejut yang berperan melindungi spermatozoa dari *cold shock*.

Winangun, Toha, Yusrina(2019) menyatakan bahwa penentuan komposisi antara *buffer tris* dengan kuning telur pada setiap jenis ternak dapat berbeda-beda sesuai dengan kebutuhannya. Pengencer *tris* terdiri dari beberapa jenis zat penyangga yang dapat mengurangi kerusakan akibat ion hidrogen yang dihasilkan dari aktivitas metabolisme spermatozoa. Teknik penyimpanan pengencer *tris* kuning telur yang tidak tepat dapat meningkatkan kerusakan pengencer dan kualitas sperma.

2.7. Ekuilibrasi

Hanifi, Ihsan dan Susilawati(2016) menyatakan bahwa ekuilibrasi dilakukan dengan dibiarkannya spermatozoa dalam suhu 5°C selama 2-6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan diluter yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai. Penambahan gliserol dalam pengencer melindungi spermatozoa terhadap efek lethal selama proses pembekuan serta dapat memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan, sehingga mampu menghambat kerusakan mekanis membran sel spermatozoa pada waktu penurunan suhu. Hal ini sesuai dengan Febriani, Hamdan dan Melia (2014) menyatakan bahwa suhu optimum untuk penyimpanan semen encer adalah 5°C atau lebih rendah lagi tergantung pada peningkatan pendinginan, sedangkan suhu di atas 5°C dapat menghambat aktivitas metabolisme dan motilitas spermatozoa. Waktu ekuilibrasi merupakan waktu penyesuaian diri spermatozoa dengan pengencer supaya pada waktu pembekuan tidak terjadi kerusakan spermatozoa yang berlebihan. Perbedaan waktu ekuilibrasi menyebabkan perbedaan motilitas spermatozoa setelah pembekuan. Pada waktu ekuilibrasi optimum akan dicapai motilitas spermatozoa tertinggi, karena ekuilibrasi yang optimum akan memberikan kesempatan terbaik bagi gliserol untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh *cold shock* selama proses pembekuan.

Jiyanto dan Anwar(2019) menyatakan bahwa tahapan proses pembekuan meliputi *pre freezing* dan *freezing*. *Pre freezing* atau ekuilibrasi nitrogen cair yaitu straw yang berisi semen disusun pada rak straw dan ditempatkan dalam uap N₂ cair sekitar 4,5 cm di atas permukaan nitrogen cair. Proses perlakuan *pre freezing* berfungsi sebagai tahapan-tahapan

proses dari suhu dingin hingga beku yang berlangsung dalam kontainer yang berisi nitrogen cair. Aini, Suharyati dan Hartono(2014) melaporkan bahwa motilitas spermatozoa setelah dilakukannya ekuilibrasi uap nitrogen cair pada jarak 4 cm sebesar 50%, jarak 6 cm sebesar 40%, jarak 8 cm sebesar 50%, dan jarak 10 cm sebesar 50%. Pada proses pre freezing, spermatozoa sedang beradaptasi dengan suhu dingin sebelum dimasukkan ke dalam N₂ cair (-196°C) sehingga akan mengurangi kerusakan spermatozoa akibat *cold shock*. Pada proses ini kerusakan akibat cold shock belum terlalu tinggi dibandingkan setelah *thawing* sehingga posisi straw tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa setelah pre freezing.

2.8. Penyimpanan Semen

Ardhani, Mufidah, Samsuriati, dkk(2020) menyatakan bahwa semen beku disimpan dalam kontainer berisi nitrogen cair dengan suhu -196°C. Faktor penyimpanan di bawah titik beku (-196°C) sangat berpengaruh terhadap aktifitas maupun gerakan spermatozoa sebagai akibat dari proses metabolisme dan penurunan pH. Ketersediaan energi dalam bahan pengencer makin berkurang dengan menuanya umur spermatozoa yang dapat diketahui dari gerakan spermatozoa yang semakin melemah. Rosadi, Sumarsono dan darmawan(2015) menyatakan bahwa penyimpanan semen beku dalam nitrogen cair dapat mempertahankan kualitas spermatozoa dalam jangka panjang. Pada penyimpanan dalam nitrogen cair dengan suhu -197°C metabolisme spermatozoa dapat dikatakan berhenti, diperkirakan laju metabolisme 0,02% dibanding laju metabolisme pada suhu fisiologis. Metabolisme akan meningkat dengan semakin meningkatnya

suhu. Penyimpanan semen beku dalam es dengan suhu berkisar di titik beku ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$), metabolisme tetap berjalan sangat lambat karena berada jauh di bawah suhu fisiologis (38°C). Walaupun demikian perubahan suhu dari $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$ ke sekitar $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ merupakan kenaikan suhu yang drastis, karena itu proses metabolisme juga diduga mengalami kenaikan yang tajam. Penyimpanan dalam es menyebabkan penurunan motilitas dibandingkan dalam nitrogen cair diduga karena sebagian sitoplasma mulai mencair, aktifitas metabolisme mulai berlangsung walaupun lambat, termasuk reaksi-reaksi yang melibatkan elektrolit terlarut yang menyebabkan kerusakan selubung lipoprotein di membran.

2.9. Reaksi Biokemis Selama Penyimpanan

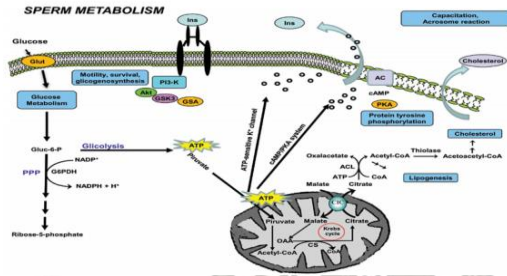
2.9.1. Metabolisme Sel Spermatozoa

Suohoka, Matatula, Nalley dan Rizal (2009) menyatakan bahwa membran plasma sel apabila dalam keadaan utuh maka metabolisme akan berlangsung baik. Hal ini dikarenakan membran plasma berfungsi untuk mengatur lalu lintas masuk dan keluarnya substrat dan elektrolit yang dibutuhkan proses metabolisme. Varasofitari, Setiatin, Sutopo(2013) menyatakan bahwa selama penyimpanan terjadi proses metabolisme spermatozoa terus berlangsung baik secara aerob maupun anaerob yang menyebabkan kualitas semen dapat menurun. Rahardhianto, Abdulgani, Trisyani(2012) menambahkan bahwa metabolisme spermatozoa dapat berlangsung secara aerob maupun anaerob. Ketika terdapat oksigen, metabolisme fruktosa 9 kali lebih efisien dalam menghasilkan energi dan dimetabolisir secara sempurna menjadi $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Sebaliknya, jika ketersediaan

oksigen tidak mencukupi maka metabolisme spermatozoa akan berjalan secara anaerob. Metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob menghasilkan asam laktat yang mengakibatkan penurunan pH di lingkungan sperma.

Simbolon dkk, (2013) menyatakan bahwa aktivitas metabolisme sel spermatozoa juga dapat menyebabkan kematian pada sel spermatozoa itu sendiri karena metabolisme sel akan menghasilkan asam laktat dan apabila tidak tersedia energi untuk merombak kembali asam laktat menjadi energi yang dibutuhkan untuk aktivitas gerak spermatozoa maka akan menyebabkan penumpukan asam laktat yang dapat menurunkan pH semen atau pengencer. Sandra, Bebas, Trilaksana (2016) menambahkan bahwa selain meningkatkan produksi asam laktat pada saat penyimpanan, radikal bebas merupakan hasil proses transport elektron dari mitokondria yang dapat menyebabkan peroksidasi lemak sehingga mematikan spermatozoa. Radikal bebas memiliki daya rusak yang tinggi terhadap asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen utama dalam pembentukan fosfolipid membran plasma spermatozoa, jika membran plasma rusak maka akan berlanjut pada internal sel sehingga dapat menurunkan daya hidup dan motilitas. Membran plasma yang rusak akan menyebabkan terganggunya metabolisme sehingga produksi ATP sebagai sumber energi berkurang. Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme.





(Cappello, Guido, Santoro, et al, 2012)
 Gambar 4. Metabolisme spermatozoa

2.9.2. Radikal Bebas (*Reactive Oxygen Species*)

Sari(2015) menyatakan bahwa radikal bebas adalah atom atau gugus apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Karena jumlah elektron ganjil, maka tidak semua elektron dapat berpasangan. Suatu radikal bebas dapat bermuatan positif atau negatif, maka spesies semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron tidak berpasangan. Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh kita sendiri (endogen) yang terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran). Suryadinata(2018) menambahkan bahwa radikal bebas didefinisikan sebagai molekul yang membawa satu atau lebih elektron tak berpasangan dan mampu eksis secara independen. Radikal bebas memiliki jumlah elektron ganjil sehingga berumur pendek, sangat reaktif, dan tidak stabil. Radikal bebas dapat bereaksi dengan cepat dengan molekul lain dengan menangkap elektron untuk menjadi stabil. Radikal bebas akan menjadi seimbang dengan mengambil elektron pada molekul terdekat. Sementara itu molekul yang diserang akan menjadi radikal bebas yang disebabkan kehilangan elektron dan memulai reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan pada sel.



Effendi, Wahjuningsih, Ihasa (2015) produksi ROS yang berlebihan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan, sehingga antioksidan pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak, khususnya asam lemak poli tak jenuh yang disebut lipid peroksidase. Lipid peroksidase merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa yang menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa. Terbentuknya radikal peroksida lipid dapat ditekan oleh antioksidan.

2.10. Antioksidan

Faramayuda, Alatas, Rayani(2013) menyatakan sumber antioksidan diperoleh dari 2 macam yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan. Sumber antioksidan alami seperti rempah-rempah, coklat, biji-bijian, buah-buahan seperti tomat, pepaya, jeruk dan sebagainya. Antioksidan buatan diperoleh dari hasil sintetik kimia.

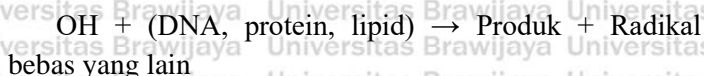
Berawi dan Marini (2018) menyatakan bahwa secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal dampak dari stress oksidatif. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan dan menangkal pembentukan reaksi oksidasi yang disebabkan radikal bebas. Christijanti, Utami dan Iswara (2010) menyatakan bahwa saat terdapat radikal bebas, lipid peroksida meningkat karena adanya reaksi antara lipid dengan radikal bebas. Pada tahap awal reaksi terjadi pelepasan hidrogen dari asam lemak tidak jenuh secara homolitik sehingga terbentuk radikal alkil yang terjadi karena adanya inisiator (panas, oksigen aktif, logam



atau cahaya). Pada keadaan normal radikal alkil cepat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi dimana radikal peroksi ini bereaksi lebih lanjut dengan asam lemak tidak jenuh membentuk hidroperoksida dengan radikal alkil, kemudian radikal alkil yang terbentuk ini bereaksi dengan oksigen. Demikian reaksi oksidasi adalah reaksi berantai radikal bebas. Malangngi, Sangi, Paendong (2012) menambahkan bahwa Antioksidan dalam pengertian kimia, merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas.

Pratama dan Busman(2020) menyatakan bahwa reaksi oksidasi akan menghasilkan radikal bebas (OH). Radikal bebas ini akan menyerang dan bereaksi dengan molekul-molekul lain di sekitarnya sehingga menimbulkan reaksi berantai yang membahayakan. Apabila ditambahkan dengan antioksidan, radikal bebas tadi akan bereaksi dengan antioksidan membentuk ikatan stabil dan menghasilkan molekul yang tidak berbahaya.

Reaksi tanpa adanya antioksidan:



Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya.

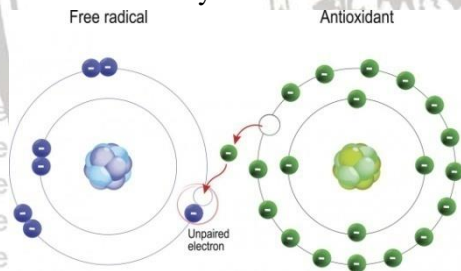


Reaksi dengan adanya antioksidan:

Reaktan \rightarrow Produk + OH

OH + antioksidan \rightarrow Produk yang stabil

Radikal bebas bersifat sangat mudah teroksidasi dibandingkan dengan molekul lain, sehingga radikal bebas akan cenderung bereaksi dengan antioksidan terlebih dahulu, dari pada molekul disekitarnya.



(Villines., 2017)

Gambar 5. Reaksi antioksidan

2.11. Genestein

Salahuddin, Saftri, Yunita, dkk(2019) menyatakan bahwa kedelai merupakan salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen cukup banyak dibandingkan dengan tanaman lain. Di dalam minyak kedelai terkandung enam asam lemak dan isoflavon berupa genistein dan daidzein yang termasuk ke dalam jenis fitoestrogen. Senyawa isoflavon yang memiliki aktifitas estrogenik atau dapat bekerja dengan reseptor estrogen, sedangkan genistein dapat menghambat pembelahan sel. Hasanah, Sukrasno, Hartati, dkk(2020) menambahkan bahwa genistein merupakan salah satu isoflavon utama pada kedelai dan merupakan salah satu flavonoid alami yang paling aktif. Hal ini dapat dilihat dari

berbagai efek biologis seperti menghambat pertumbuhan sel, antimikroba, antiproliferasi.

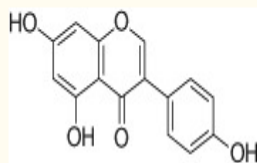


Fig. 1

Chemical structure of genistein (5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one

(Jurzak, Ramos and Pilawa, 2017)

Gambar 6. Struktur kimia genistein

2.12. *Thawing*

Hoesni (2013) menyatakan *thawing* semen beku merupakan prosedur yang paling penting dalam inseminasi buatan. Hal ini dikarenakan penggunaan suhu *thawing* yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen. Untuk menghasilkan kualitas semen yang baik Direktorat Jenderal Peternakan membuat standarisasi suhu *thawing* yaitu penggunaan air suhu 37°C selama 30 detik. Namun, faktor kemudahan pelaksanaan menjadi pertimbangan inseminator dalam pelaksanaan *thawing*.

Fatimah, Wurlina dan Wahjuni(2018) menyatakan bahwa pemeriksaan motilitas spermatozoa *post thawing* dilakukan berdasarkan persentase gerak individu spermatozoa yang progresif dan kecepatan gerak individu spermatozoa dari

minimal 5 lapang pandang. Penentuan presentase motilitas spermatozoa, dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ motilitas spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Pemeriksaan viabilitas spermatozoa *post thawing* dilakukan dengan pewarnaan. Pada spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna, sedangkan spermatozoa yang mati akan terwarnai. Spermatozoa yang mati berwarna merah keunguan dan yang hidup berwarna putih tanpa warna, dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100 \%$$

Pada penelitian Pratama, Sari dan Sigit (2018) menyatakan pengaruh suhu *thawing* terhadap motilitas semen beku sapi simental diperoleh hasil bahwa persentase motilitas spermatozoa pada suhu 26C sebesar 31,30%, pada suhu 37C sebesar 41.85% da pada suhu 42C sebesar 34,63% dalam waktu 10 detik. Hasil uji Duncan pada suhu *thawing* 26°C dan 42°C tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa dengan persentase 42,43% dan 42,40%, tetapi pada suhu *thawing* 37°C menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) dengan persentase motilitas spermatozoa lebih tinggi yaitu 58,40%. Suhu *thawing* yang terlalu rendah dan tinggi menyebabkan penurunan motilitas dari spermatozoa, karena terjadi tekanan osmotik pada spermatozoa sehingga konfigurasi lipid protein membran spermatozoa menjadi tidak seimbang dan tidak sesuai dengan kondisi fisiologis motilitas spermatozoa saat

thawing sehingga daya gerak atau motilitas spermatozoa menjadi rendah. Suhu *thawing* 37°C lebih ideal untuk spermatozoa hidup karena persentase motilitas spermatozoa lebih tinggi. (Aprilina, dkk.,2014) menyatakan rendahnya suhu *thawing* menyebabkan kristal-kristal es yang terbentuk setelah proses pembekuan belum mencair secara sempurna sehingga spermatozoa sulit bergerak yang mengakibatkan motilitas yang diperoleh rendah. Sedangkan suhu yang tinggi akan lebih lama menyesuaikan ke suhu lingkungan akibatnya akan terjadi *heat shock effect* pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen.



BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Unit Pelaksana Teknis Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak (UPT PT dan HMT) Karangwaru, Desa Sidorejo, Kecamatan Tuban, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Penelitian dilaksanakan mulai Maret – April 2021.

3.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian merupakan semen segar yang berasal dari 2 ekor sapi Peranakan Ongole(PO) yang berada di UPT PT dan HMT karangwaru Tuban. Sapi pertama(eartag 0076) berumur 6 tahun 6 bulan dengan bobot badan 625 kg dan sapi kedua (eartag 1102) berumur 2 tahun 11 bulan dengan bobot badan 377 kg. Sapi PO dipelihara dalam kandang individu dengan posisi *head to head* dengan diberi pembatas yang terbuat dari pipa besi dan atap kandang berbentuk *gable*.. Sapi PO diberi pakan hijauan berupa rumput gajah sebanyak 20 kg yang diberikan 2 kali pada pukul 06.00 dan 16.00 dan konsentrat sebanyak 10 kg dalam sehari. Penampungan semen dilakukan 1 kali tiap minggunya yakni pada hari Senin pukul 07.00 dengan metode vagina buatan dan dilakukan oleh petugas berpengalaman dari BBIB Singosari. Persyaratan semen segar yang digunakan yaitu semen yang memiliki motilitas individu $\geq 70\%$ dan motilitas masaa 2+.

Pengencer yang digunakan yaitu *Tris aminomethane* kuning telur dengan penambahan genistein. Kuning telur yang digunakan adalah kuning telur segar ayam kampung yang



diperoleh dari Pasar Besar Malang. Genistein diekstrak oleh perusahaan Sigma-Aldrich yang dibeli di Kota Surabaya, Jawa Timur.

Lokasi penelitian memiliki suhu lingkungan 31°C dengan kelembapan udara 59%. Suhu lingkungan pada lokasi penelitian sudah tergolong dalam suhu yang cukup panas.

Alat dan Bahan :

a. Pelarutan Genistein

Alat : *Beaker glass*, mikropipet, *mikrotube*, *freezer*

Bahan : Genistein(merk *Sigma Aldrich*), DMSO dan aquadest

b. Pembuatan pengencer *Tris Aminomethane* Kuning

Telur :

Alat : Tabung erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, aluminium foil, eggs parator, *magnetic stirrer* (merk Labinco), timbangan analitik, spuit, reftigator (merk Aqua dari Jepang), waterbath.

Bahan : Kuning telur, Larutan *Tris Aminomethane* (merk MERCK Jerman)

c. Penampungan Semen

Alat : Satu unit vagina buatan, thermometer (merk One Med), tabung penampungan semen, gunting, kandang jepit, karet pengikat

Bahan : Sapi jantan, sapi betina pemancing, air hangat, vaselin

d. Evaluasi Kualitas Spermatozoa:

Alat : Mikroskop (merk Olympus tipe CX 21), *object galss* (merk Sail China), *cover glass* (merk Sail China), tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose,



aluminium foil, pH meter atau kertas lakmus, water bath, pipet erythrocyte, *haemocytometer*

Bahan : Semen sapi PO, eosin negrosin, larutan hiposmotik

e. Pembekuan

Alat : Nitrogen cair, straw, rak straw, referigrator

Bahan : Semen + pengencer

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*). Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan pola 3x3. Faktor pertama adalah posisi straw pada nitrogen cair dari 3 taraf perlakuan (5 cm, 10 cm dan 20 cm). Faktor kedua adalah suhu *thawing* dari 3 taraf perlakuan (20°C, 30°C, 40°C). Masing masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pelarutan Genistein

Pelarutan genistein 10mg dilakukan sebagai berikut :

1. Dibuka botol genestein
2. Dilarutkan genistein dengan 7,4 ml DMSO (secara bertahap dalam botol genestein), diletakkan dalam beaker glass
3. Dilarutkan larutan genestein dengan aquadest hingga mencapai 74ml
4. Didapatkan larutan stock genistein dengan konsentrasi 500 μM



Pembuatan larutan genistein dengan konsentrasi yang diinginkan dilakukan sebagai berikut :

1. Dihitung kebutuhan larutan genistein (μl atau ml)
2. Diambil genistein (μM atau ml) sesuai kebutuhan menggunakan mikropipet atau spuit
3. Diletakkan larutan genistein dalam mikrotube atau wadah yang memadai
4. Dibekukan genistein dan disimpan pada freezer hingga saat akan digunakan

3.4.2. Menyiapkan Pengencer Tris Aminometan Kuning Telur

Pengencer yang digunakan dalam penelitian adalah pengencer Tris Aminometan kuning telur. Pembuatan pengencer dilakukan satu hari sebelum penampungan semen. Langkah-langkah pembuatan pengencer Tris Aminomethan kuning telur antara lain :

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan 80% tris aminomethan dan 20% kuning telur serta 30 μM genistein ke dalam Erlenmeyer
3. Dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer selama 10-15 menit
4. Disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit
5. Diambil supernatant
6. Ditutup aluminium foil dan disimpan kedalam refrigerator selama 24 jam
7. Setelah 24 jam diambil supernatant dan dibuang endapannya



3.4.3. Penampungan Semen Sapi PO

Penampungan semen dilakukan pada pagi hari pukul 07.00 WIB di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban Jawa Timur. Metode penampungan semen menggunakan vagina buatan yang dilakukan oleh petugas khusus dari BBIB Singosari, Malang.

Prosedur penyiapan vagina buatan antara lain yaitu :

1. Menyiapkan alat dan bahan untuk vagina buatan
2. Dimasukkan selongsong karet tipis (*inner liner*) ke dalam selongsong ebonit lalu diikat menggunakan karet pengikat.
3. Dimasukkan air hangat (55-60°C) ke dalam vagina tiruap melalui lubang yang tersedia. Volume air setengah dari volume vagina buatan, lalu di tutup dengan rapat.
4. Dimasukkan udara ke dalam vagina buatan dengan cara ditiup melalui katup sehingga selongsong tipis mengembang dan kedua permukaan bertemu satu sama lain.
5. Dioleskan vaselin sampai sepertiga panjang vagina buatan.
6. Dipasang corong karet pada ujung vagina buatan yang tidak diberi vaselin.
7. Diukur temperatur vagina buatan mencapai 41-44°C, bertujuan untuk membuat vagina buatan seperti kondisi asli yang ada pada ternak betina
8. Dipasang tabung penampungan semen pada ujung corong karet. Tabung penampung ditutupi dengan aluminium foil kemudian diikat dengan menggunakan karet pengikat.

Tahapan selanjutnya dengan menempatkan ternak betina pemancing dalam kandang jepit, lalu dikeluarkan ternak pejantan dari kandang dan didekatkan pada ternak betina. Kemudian dilakukan *false mounting* 2-3 kalidengan tujuan untuk mempertinggi libido pejantan sehingga semen yang dihasilkan memiliki volume yang lebih banyak. Kemudian ditampung semen dengan menggunakan vagina buatan yang telah disiapkan. Semen yang didapat dievaluasi kualitasnya secara makroskopis dan mikroskopis (Kartasudjana dan Santosa, 2001)

3.4.5. Evaluasi Kualitas Semen secara Makroskopis dan Mikroskopis

Evaluasi kualitas semen dilakukan secara makroskopis yang meliputi warna, bau, volume, konsistensi dan pH, serta secara mikroskopis yang meliputi motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, abnormalitas, viabilitas, intergasi membran.

- **Evaluasi Makroskopis**

1. **Warna** : Dilihat langsung warna semen pada tabung hasil penampungan. Warna semen sapi pada umumnya putih kekuningan.
2. **Bau** : Dilakukan evaluasi dengan mendekatkan semen ke hidung untuk dibaui.
3. **Volume** : Dilihat skala pada tabung penampungan semen yang digunakan saat proses penampungan
4. **Konsistensi** : Dimiringkan tabung berisi semen untuk mengetahui semen encer atau kental. Konsistensi kental ditandai dengan pergerakan semen yang lambat di dalam tabung dan

konsistensi encer ditandai dengan pergerakan semen yang cepat di dalam tabung.

5. pH : Diambil semen dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter untuk mengetahui derajat keasaman semen.

- **Evaluasi Mikroskopis**

1. Motilitas Massa

Evaluasi motilitas spermatozoa dengan cara meletakkan semen segar diatas *object glass* tanpa ditutup *cover glass* dan dilihat dengan perbesaran 100x.

Penilaian motilitas massa sebagai berikut :

- Sangat baik (+++) jika spermatozoa tersebut terlihat seperti kumpulan awan gelap yang bergerak aktif dan sangat cepat seperti awan gelap ketika akan turun hujan.
- Baik (++) jika spermatozoa tersebut terlihat seperti awan gelap tetapi gerakannya tidak terlalu cepat
- Kurang baik (+) jika hanya terlihat pergerakan individu saja dan tidak ada kumpulan spermatozoa
- Buruk (-) jika spermatozoa hanya sedikit ada gerakan-gerakan individual.

2. Motilitas Individu

Diambil semen satu tetes menggunakan ose dan diletakkan pada *object glass* yang kemudian ditutup dengan *cover glass*. Gerak individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Penilaian dilihat

berapa spermatozoa yang bergerak progresif kedepan(pergerakan mundur dan melingkar tidak diikuti sertakan)

3. Konsentrasi

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dilakukan menggunakan *haemocytometer*. Jumlah spermatozoa dihitung pada lima kotak besar (satu kotak besar ada 16 kotak kecil) yaitu pada empat kotak besar pojok dan satu kotak besar tengah.

4. Abnormalitas

Penentuan abnormalitas dilakukan dengan membuat ulasan eosin negrosin kemudian dihitung dalam bentuk persentase antara spermatozoa normal dan abnormal.

Cara membuat ulasan yaitu :

- Diletakkan semen diatas *object glass* menggunakan ose
- Diambil eosin negrosin dan diletakkan di samping semen
- Dihomogenkan semen dengan eosin negrosin menggunakan ose
- Diulas menggunakan *object glass* membentuk sudut 30°
- Dikeringkan ulasan dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Spermatozoa abnormal dapat dilihat dari bentuk morfologinya, bentuk-bentuk spermatozoa abnormal diantaranya adalah kepala yang terlalu besar, kepala dua dalam 1 ekor spermatozoa, ekor yang putus, ekor bercabang, ekor melingkar dan



lainnya. Abnormalitas primer : terjadi karena adanya kesalahan pada waktu spermatogenesis.

Contoh : *tape red head*, *microcephalic*.

Abnormalitas sekunder : disebabkan karena kesalahan pada waktu handling sperma, seperti pada waktu penampungan. Contoh : kepala/ekor putus, kepala pecah

5. Viabilitas

Penentuan viabilitas dilakukan dengan membuat ulasan eosin negrosin, perwarnaan eosin negrosin akan mewarnai spermatozoa yang mati karena lapisan lipid pada spermatozoa telah rusak, sedangkan untuk spermatozoa yang hidup tidak terwarnai atau transparan (Masyitoh, Suprayogi, Praja,dkk, 2018) Kemudian dihitung dalam bentuk persentase antara spermatozoa yang hidup dan mati.

Cara membuat ulasan yaitu :

- Diletakkan semen diatas *object glass* menggunakan ose
- Diambil eosin negrosin dan diletakkan di samping semen
- Dihomogenkan semen dengan eosin negrosin menggunakan ose
- Diulas menggunakan *object glass* membentuk sudut 30°
- Dikeringkan ulasan dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

6. Integritas Membran



Penentuan membran plasma utuh dilakukan dengan pengujian menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test*(HOST)

Pengujian dilakukan dengan cara :

- Dimasukkan 0,1 ml semen ke dalam 1 ml larutan hipoosmotik (7,35 g Natrium sitrat dan 13,52 g fruktosa dilarutkan dalam 1000 mL aquades)
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- Dibuat tetesan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass*
- Dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x

Spermatozoa dengan membran normal (integritas membran baik) ditandai dengan ekornya melingkar pada bagian ujung, sedangkan spermatozoa dengan membran tidak normal (integritas membran buruk) ditandai dengan ekor lurus (Indriani, Susilawati dan Wahyuningsih, 2013)

3.4.6. Pengenceran Semen Segar

Pengenceran semen bertujuan untuk memperbanyak volume semen. Dilakukan pengenceran terhadap semen segar yang telah dievaluasi kualitasnya secara makroskopis dan mikroskopis.

Prosedur pengenceran semen segar antara lain yaitu :

1. Disiapkan tabung reaksi yang telah berisi 30 μ M antioksidan genistein (tabung 1).

2. Diambil 0,1 ml cairan pengencer dengan menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke tabung reaksi yang lain (tabung pengencer 2).
3. Diambil semen segar sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi (tabung pengencer 2).
4. Diambil cairan pengencer dari tabung reaksi (tabung 1) kedalam tabung reaksi yang lain (tabung pengencer 2) sesuai dengan hasil perhitungan dari konsentrasi spermatozoa. Kemudian dilanjutkan pada tahapan penyimpanan dan evaluasi kualitas dari spermatozoa.

3.4.7. Ekuilibrase Suhu Dingin

Proses ekuilibrase dilakukan setelah semen dengan pengencer dicampurkan. Dan ditambahkan gliserol yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa saat pendinginan. Ekuilibrase dilakukan dengan suhu 5°C selama 4 jam di refrigator.

3.4.8. Ekuilibrase Nitrogen Cair

Proses ekuilibrase nitrogen cair dilakukan dengan meletakkan straw menggunakan rak diatas uap nitrogen dengan posisi 5 cm, 10 cm dan 20 cm dari permukaan nitrogen cair selama 10 menit. Kemudian dilakukan pengamatan mengenai kualitas spermatozoa.

3.4.9. Freezing (Pembekuan)

Proses freezing dilakukan dengan langsung memasukkan straw ke dalam kontainer nitrogen cair dengan suhu -196°C.

3.4.10. *Thawing*

Proses *thawing* dilakukan dengan menaikkan suhu semen beku dengan suhu 20°C, 30°C dan 40°C selama 30 detik. Kemudian dilakukan pengamatan mengenai kualitas spermatozoa.

3.4.11. Variabel yang diamati

- **Variabel Independen (Bebas)**

1. Tinggi posisi straw pada ekuilibrasi nitrogen cair
2. Suhu *thawing*

- **Variabel Dependen (Terikat)**

1. Motilitas individu

Presentase motilitas individu adalah presentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan dibandingkan dengan semua spermatozoa yang diamati. Presentase motilitas diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Penilaian diberikan dari angka 0% - 100%. Masyitoh, Suprayogi, Praja,dkk(2018) menjelaskan bahwa untuk menentukan motilitas individu, yaitu :

% motilitas spermatozoa =

$$\frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

2. Viabilitas

Presentase viabilitas adalah presentase spermatozoa yang hidup dan dihitung dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Masyitoh, Suprayogi, Praja,dkk(2018) menjelaskan bahwa untuk menentukan viabilitas, yaitu :

$$\% \text{viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$



3. Abnormalitas

Presentase abnormalitas yang dihitung meliputi abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Cahyadi, Christiyanto, Setiatin (2016) menjelaskan bahwa untuk menentukan abnormalitas, yaitu :

$$\% \text{ abnormalitas} = \frac{\text{jumlahspermatozoaabnormal}}{\text{jumlahspermatozoayangdiamati}} \times 100\%$$

4. Integritas Membran

Penentuan membran plasma utuh dilakukan dengan pengujian menggunakan uji pembengkakan atau *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST-Test) dengan menghitung spermatozoa yang ditandai dengan pembengkakan kepala dan ekor melingkar dengan pancaran warna terang. Spermatozoa dihitung dengan cara zig zag sampai 10 lapang pandang atau jumlah spermatozoa 100-200 dengan skala 0 sampai 100 persen (Lubis, Dasrul, Thasmi, dkk., 2013)

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam atau ANOVA (*Analysis Of Variance*). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial, jika terjadi perbedaan pada data yang diperoleh maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan (Sudarwati, dkk. 2019). Model matematis untuk Rancangan Acak Lengkap

Faktorial sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}(k)$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i dari faktor A dan taraf ke-j dari faktor B

μ = Nilai rata-rata

α_i = Pengaruh perlakuan faktor A (posisi straw) pada taraf ke-i

β_j = Pengaruh perlakuan faktor B (suhu *thawing*) pada taraf ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interaksi antara faktor A ke-i dan faktor B ke-j

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat perlakuan ke-i dan ke-j pada satuan percobaan ke-k

3.6. Batasan Istilah

a. Antioksidan : Senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan dan menangkal pembentukan reaksi oksidasi yang disebabkan radikal bebas.

b. Radikal bebas : Senyawa oksigen reaktif yang memiliki elektron yang tidak berpasangan dan mencari pasangannya dengan cara mengikat molekul elektron yang ada di sekitarnya.

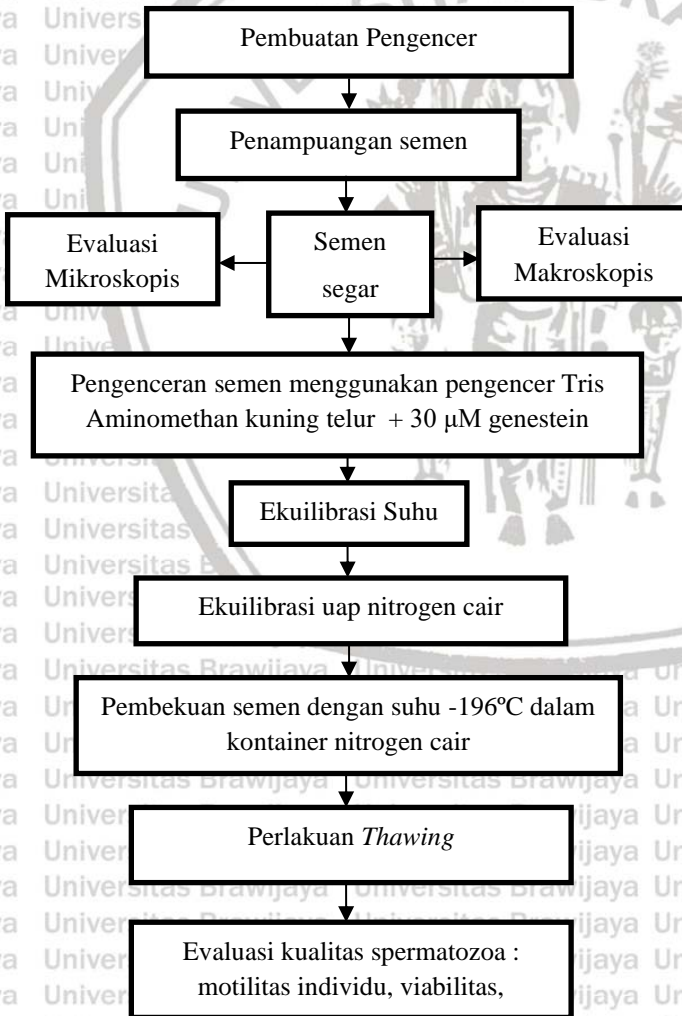
c. Ekuilibrisasi : suatu tahap awal proses penurunan suhu bertingkat spermatozoa untuk mencegah cold shock sampai semen dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair

d. *Cold shock* : Cekaman dingin akibat penuruan suhu

e. *Thawing* : Proses perceiran bahan(semen) yang telah dibekukan



3.7. Kerangka Operasional



Gambar 7. Kerangka Operasional

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Semen Segar

Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) yang telah ditampung kemudian dilakukan pemeriksaan secara makroskopis meliputi volume, konsistensi, pH, bau dan warna, sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas dan abnormalitas. Hasil pemeriksaan kualitas semen segar dapat dilihat pada Tabel 1.

Table 1. Kualitas semen segar sapi PO

Parameter	Rataan±SD(N=2)
Makroskopis	
Volume (ml)	5 ±0,0
Konsistensi	Sedang
Ph	6,8
Bau	Khas
Warna	Putih Kekuningan
Mikroskopis	
Motilitas massa	2+
Motilitas individu (%)	82,5±3,54
Viabilitas (%)	93,88±4,48
Abnormalitas (%)	1,8±0,78
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	1205±148,49
Integritas Membran	89,86 ± 3,46



Data diatas didapatkan dari dua sapi dengan eartag (0076) dengan umur 6 tahun 6 bulan dan bbot badan 625 kg dan sapi eartag (1102) dengan umur 2 tahun 11 bulan dan bobot badan 377 kg. Hasil evaluasi makroskopis volume semen segar sapi PO pada penelitian rata-rata adalah $5\pm 0,0$ ml. Hal tersebut menunjukkan bahwa volume semen yang digunakan termasuk dalam kisaran normal. Menurut Garner and Hafez(2008) dalam Nugroho, Susilawati dan Wahjuningsih (2014) volume semen sapi bervariasi setiap penampungan antara 5-8 mililiter perejakulasi. Dengan melihat pada skala tabung yang digunakan untuk menampung semen, maka dapat ditentukan volume semen yang diejakulasikan. Volume semen pada penelitian lebih besar bila dibandingkan dengan volume semen sapi PO pada penelitian Yekti, Tatulus, Ratnawati,dkk (2018) yang memiliki rataan volume semen segar yaitu 4.17 ± 1.17 ml. Kartasudjana(2001) dalam Adhyatma, Isnaini dan Nuryadi(2013) menyatakan bahwa volume semen tergantung pada spesies ternak, bangsa, bobot badan, umur, pakan dan frekuensi penampungan.

Konsistensi semen segar sapi PO pada penelitian sedang serta memiliki warna putih kekuningan dan bau yang khas sapi. Hasil penelitian sesuai dengan pernyataan Feradis(2010) dalam Komariah, Arifiantini, Aun dan Sukmawati(2020) semen sapi normal memiliki konsistensi semen berkisar sedang hingga kental. Semen dengan konsistensi sedang dan kental biasanya merupakan kriteria standar semen yang dapat diproses untuk selanjutnya dijadikan semen beku.

Semen segar sapi PO pada penelitian memiliki pH 6,8 yang menunjukkan bahwa semen bersifat normal. Garner and



Hafez(2008) dalam Rosary, Kuswati dan Susilawati(2018) menyatakan bahwa pH semen sapi normal berkisar 6,4-7,8. Semen segar sapi PO pada penelitian memiliki warna putih kekuningan dan bau yang khas sapi. Hasil penelitian sesuai dengan pernyataan Feradis (2010) dalam Prasetyo, Ondho dan Samsudewa(2020) bahwa normal semen sapi berwarna putih atau krem keputih – putihan sampai keruh dan kira – kira 10 % normal warna semen sapi berwarna kekuning – kuning yang disebabkan oleh riboflavin yang dibawa oleh satu gen autosom resesif dan tidak ada pengaruh terhadap fertilitas. Yendraliza, Abadi, Misrianti,dkk(2018) menyatakan bau semen sapi berbau khas semen yang menunjukkan bahwa semen tersebut normal dan tidak terdapat kontaminasi.Bau khas semen disertai dengan bau hewan tersebut.

Hasil evaluasi mikroskopis menunjukkan bahwa rataan motilitas massa semen segar sapi PO adalah 2+ dengan rataan presentase motilitas individu yaitu $82,5 \pm 3.54$. Campbell et al.(2003) dalam Komariah, dkk(2019) menyatakan normalnya gerakan massa spermatozoa berkisar dari pergerakan yang cepat 2+ hingga sangat cepat 3+. Gerakan massa spermatozoa dengan kriteria tidak cepat (1+) bukan termasuk pergerakan yang normal. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semen segar pada penelitian memiliki daya gerak yang cepat. Menurut Audia dkk., (2017) motilitas semen segar dengan nilai 70-85% dapat dikategorikan baik yang artinya spermatozoa bergerak aktif atau cepat.

Rataan presentase viabilitas semen segar sapi PO pada penelitian yaitu 93.88 ± 4.48 . Hal tersebut menunjukkan bahwa viabilitas semen segar pada penelitian dapat dikategorikan baik karena sesuai dengan pernyataan Hafez(2000) dalam Pubiandara, Suharyati dan Hartono(2016) menyatakan bahwa



semen yang normal biasanya mempunyai persentase hidup minimal 50%. Rataan presentase abnormalitas semen segar pada penelitian sebesar $1.8 \pm 0,78$. Hal tersebut menunjukkan bahwa persentase normalitas semen sapi PO yang digunakan memiliki kategori yang baik. Ismaya(2014) dalam Muhammad, Isnaini, Yekti, dkk(2018) menyatakan bahwa semen termasuk jelek dan daya fertilitasnya rendah jika persentase abnormalitasnya lebih dari 20%.

Konsentrasi semen segar yang digunakan pada penelitian memiliki rata-rata $1205 \pm 148,49$ juta/ml. Jumlah ini lebih kecil dari hasil penelitian Pubiandara, dkk(2016) yang memiliki rata-rata konsentrasi spermatozoa sebesar 2.124 juta/ml. Feradis (2010) dalam Pubiandara, dkk(2016) menyatakan bahwa konsentrasi semen segar sapi adalah 1.000 juta sampai 2.000 juta sel spermatozoa per ml.

4.2 Pengaruh Posisi Straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu *Thawing* Terhadap Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO *Post Thawing*

Salah satu faktor yang dapat dijadikan sebagai parameter kualitas dari spermatozoa adalah motilitas individu spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Prastika, Susilowati, Agustono, dkk(2018) bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan fertilitas spermatozoa adalah motilitas spermatozoa karena motilitas merupakan salah satu indikator penting dalam menentukan kualitas semen secara umum. Muhammad, dkk(2016) menambahkan bahwa motilitas individu dilihat berdasarkan pada spermatozoa yang bergerak progresif kedepan (pergerakan mundur dan melingkar tidak ikut disertakan) dibandingkan dengan spermatozoa yang diam

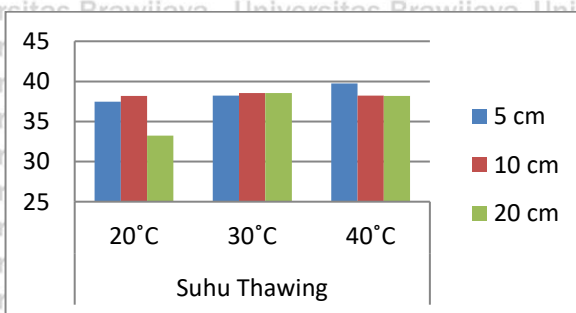
di tempat. Rataan motilitas individu spermatozoa sapi PO pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO *Post thawing*

Posisi Straw	Suhu <i>Thawing</i>			Rataan
	20°C	30°C	40°C	
5 cm	33 \pm 4,47	36 \pm 2,24	37 \pm 2,74	35,33 \pm 3,15
10 cm	34 \pm 4,18	35 \pm 3,53	36 \pm 2,24	35 \pm 3,32
20 cm	31 \pm 2,24	35 \pm 3,53	34 \pm 4,18	33,33 \pm 3,32
Rataan	32,67 ^a \pm 3,63	35,33 ^b \pm 3,1	35,67 ^b \pm 3,05	

Keterangan : Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Berdasarkan tabel 2. di atas, diagram batang rata-rata persentase motilitas individu spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 8. Diagram Batang Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan *Post thawing*

Hasil analisis statistik menggunakan ANOVA diketahui bahwa motilitas individu spermatozoa setelah *thawing* pada semua perlakuan posisi straw pada uap nitrogen cair tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas individu. Uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan posisi straw 5 cm tidak berbeda nyata dengan posisi straw 10 cm dan 20 cm. Pada posisi straw 5 cm pada uap nitrogen cair merupakan posisi straw yang terbaik terhadap persentase motilitas individu spermatozoa setelah *thawing* dengan hasil $35,33 \pm 3,15$, hal ini diduga pada posisi ini tidak terjadi penurunan suhu secara drastis sehingga spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock*. Pada posisi 10 cm dan 20 cm motilitas individu spermatozoa mengalami penurunan, hal ini dikarenakan penurunan suhu yang lebih lambat sehingga proses metabolisme tetap berjalan yang menyebabkan asam laktat meningkat. Aini, Suharyati dan Hartono(2014) menjelaskan bahwa konsentrasi asam laktat yang semakin tinggi menjadikan bahan pengencer semakin asam dan bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa. Sandra,dkk(2016) menambahkan bahwa metabolisme selain meningkatkan produksi asam laktat juga memiliki hasil samping yaitu radikal bebas yang merupakan proses transport electron dari mitokondria yang dapat menyebabkan peroksidasi lemak sehingga mematikan spermatozoa.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa semua perlakuan suhu *thawing* pada semen beku sapi PO memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap motilitas

individu spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing*. Pada hasil pengamatan suhu thawing dengan air suhu *thawing* 40°C tidak berbeda nyata dengan suhu *thawing* 30°C namun berbeda nyata secara signifikan dengan 20°C. Rataan persentase suhu thawing suhu 40°C memperlihatkan persentase motilitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dengan nilai $35,67 \pm 3,05$ dibandingkan dengan perlakuan suhu *thawing* 30°C dan 20°C. Hal ini diduga pada kisaran suhu 40°C metabolisme spermatozoa berjalan sempurna karena sesuai dengan suhu fisiologis yang normal pada sapi PO. Selanjutnya terlihat persentase motilitas individu cenderung mengalami penurunan pada suhu *thawing* 30°C dan 20°C dengan nilai secara berurutan $35,33 \pm 3,1$ dan $32,67 \pm 3,63$. Hal ini menunjukkan bahwa bila suhu *thawing* semakin rendah dapat menyebabkan terjadinya penurunan daya motilitas individu, hal ini diduga terjadi karena suhu yang terlalu rendah menyebabkan kristal-kristal es belum mencair secara sempurna sehingga spermatozoa akan kesulitan untuk bergerak sehingga di peroleh motilitas yang rendah. Menurut Fitriki dan Supartini(2012) bahwa suhu yang terlalu rendah menyebabkan kristal – kristal es belum mencair secara sempurna sehingga menghambat pergerakan sel spermatozoa secara aktif karena semen beku yang digunakan diambil dari container yang berisi nitrogen cair (N₂) dengan suhu -196°C berbentuk padatan. Watson (1996) dalam Aprilina, Suharyati dan Santosa (2014) menyatakan bahwa suhu *thawing* yang rendah akan mengakibatkan struktur fosfolipid membrane plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel sehingga akan menyebabkan motilitas yang rendah. Menurut Toelihere(1993) dalam Zelpina, Rosadi dan Sumarsono(2012) menyatakan bahwa *thawing* pada air bersuhu 38°C sampai

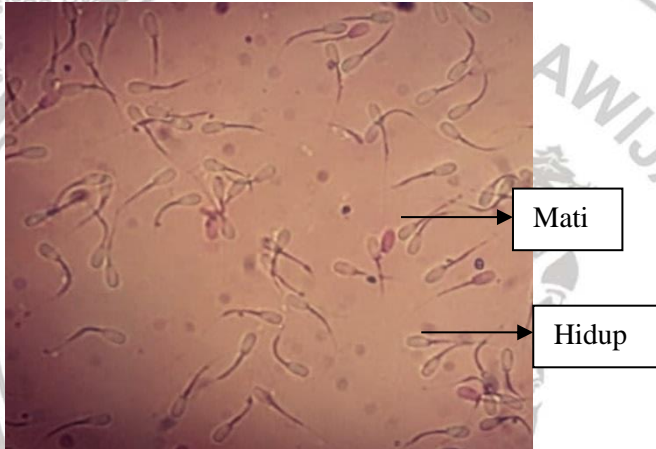


40°C menghasilkan daya tahan hidup sperma yang lebih baik bila dibandingkan dengan suhu rendah.

Analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($P > 0,05$) antara interaksi posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu thawing terhadap motilitas individu spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa posisi straw pada uap nitrogen cair belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap motilitas individu, sedangkan terhadap suhu thawing kisaran 30°C, 20°C merupakan suhu alami yang pasti akan dilalui selama proses pencairan menuju aktifitas optimal yang akan dicapai suhu 40°C.

4.3 Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu thawing Terhadap Viabilitas Spermatozoa Sapi PO Post Thawing

Viabilitas spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah spermatozoa hidup dari satu lapangan pandang dengan prinsip metode pewarnaan eosin – nigrosin yakni terjadinya penyerapan zat warna eosin pada spermatozoa yang mati pada saat pewarnaan tersebut dilakukan. Spermatozoa yang hidup akan berwarna putih (tidak menyerap warna), sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah (menyerap warna). Menurut Winarto dan Isnaini (2008) Hal ini karena membran pada spermatozoa yang mati tidak permeable (tidak selektif) terhadap zat warna atau memiliki afinitas yang rendah sehingga menyebabkan spermatozoa yang mati berwarna merah.



Gambar 9. Viabilitas Spermatozoa Sapi PO

Suyadi dkk, (2012) menyatakan bahwa viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen, karena berhubungan daya hidup spermatozoa. Rataan viabilitas spermatozoa sapi PO *post thawing* pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Table 3. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi PO *Post thawing*

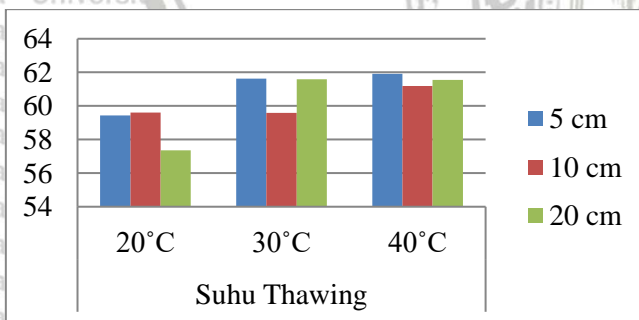
Posisi Straw	Suhu Thawing			Rataan
	20°C	30°C	40°C	
5 cm	55,45 \pm 3,99	59,69 \pm 1,93	60,31 \pm 1,61	58,48 \pm 2,51
10 cm	55,31 \pm	57,07 \pm	58,84 \pm	57,07 \pm 3,05



	4,29	2,52	2,34	
20 cm	53,49 ± 3,86	57,28 ± 4,3	59 ± 2,55	56,59 ± 3,57
Rataan	54,75 ^a ± 4,05	58,01 ^b ± 2,92	59,38 ^b ± 2,17	-

Keterangan : Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Berdasarkan tabel 3. di atas, diagram batang rata-rata persentase viabilitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 10. Diagram Batang Viabilitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan *Post thawing*

Berdasarkan analisis statistik menunjukkan bahwa posisi straw pada uap nitrogen cair tidak berpengaruh ($P > 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing*. Perlakuan posisi straw 5 cm pada uap nitrogen cair tidak berbeda nyata dengan posisi straw 10 cm dan 20 cm terhadap viabilitas spermatozoa. Rataan persentase viabilitas

tertinggi yaitu $58,48 \pm 2,51$ diperoleh pada perlakuan posisi straw 5 cm dan terendah $56,59 \pm 3,57$ diperoleh pada perlakuan posisi straw 20 cm.

Pada posisi straw 5 cm memiliki nilai viabilitas tertinggi $58,48 \pm 2,51$, kemudian pada posisi straw 10 cm mengalami penurunan viabilitas spermatozoa yaitu $57,07 \pm 3,05$ dan terjadi penurunan kembali pada posisi 20 cm yaitu $56,59 \pm 3,57$. Hal ini diduga karena posisi yang semakin tinggi maka suhu mengalami penurunan yang kurang maksimal sehingga menyebabkan rusaknya lipo-protein yang ada pada membran spermatozoa. Yulnawati dan Setiadi(2005) dalam Fatimah, Wurlina dan Wahjuni(2018) menyatakan bahwa apabila membrane plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan maka metabolisme spermatozoa akan terganggu dan mulai kehilangan motilitasnya dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi. Kejadian seperti ini dapat mengakibatkan spermatozoa mengalami kematian yang akan berdampak terhadap menurunnya viabilitas spermatozoa.

Caleghini et al(2008) dalam Fatimah,dkk(2018) menyatakan bahwa selama proses pembekuan hingga *thawing* spermatozoa terpapar *stressful environment* yaitu *cold shock*, *osmotic stress* dan kristalisasi, hal tersebut termasuk terjadinya penurunan suhu pada uap nitrogen cair dengan beberapa posisi yang berbeda. Paparan tersebut mengakibatkan kerusakan *irreversible* pada struktur dan fungsi sel yang mana dapat menurunkan hingga 50% viabilitas spermatozoa.

Hasil analisis menunjukkan bahwa semua perlakuan suhu thawing pada semen beku sapi PO memberikan pengaruh nyata($P<0.05$) terhadap viabilitas spermatozoa. Pada hasil pengamatan suhu thawing dengan air suhu *thawing* 40°C tidak berbeda nyata dengan suhu *thawing* 30°C namun berbeda



nyata secara signifikan dengan 20°C. Rataan persentase suhu thawing suhu 40°C selama 30 detik memperlihatkan persentase viabilitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dengan nilai 59,38% dibandingkan dengan perlakuan suhu thawing 30°C dan 20°C selama 30 detik dengan persentase 58,013% dan 54,15%. Hal ini diduga karena pada suhu thawing 40°C belum terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membrane spermatozoa, sehingga permeabilitas membrane utuh dan tidak terganggu sehingga persentase viabilitas spermatozoa tinggi. Oyeyemi dkk(2000) dalam Janur, Ihsan dan Isnaini(2015) menyatakan bahwa perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak dan menyebabkan fluiditas membrane terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa. Yudhaningsih(2004) dalam Pratama, Sari dan Sari(2018) menambahkan bahwa permeabilitas membrane dari spermatozoa utuh dan berfungsi baik, maka pewarna tidak akan bisa masuk ke dalam spermatozoa, sehingga persentase viabilitas spermatozoa tinggi. Selanjutnya terlihat persentase viabilitas cenderung mengalami penurunan pada suhu thawing 30°C dan 20°C dengan nilai secara berurutan 58,013% dan 54,15%. Hal ini menunjukkan bahwa bila suhu thawing semakin rendah maka spermatozoa mengalami kerusakan pada membrane plasma sehingga persentase dari viabilitas menurun. Pratama, dkk(2018) menyatakan bahwa suhu yang rendah akan mengakibatkan substansial vital dalam spermatozoa bocor sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP, Kalium intraseluler dan fosfolipid berkurang dan menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa sehingga persentase dari viabilitas spermatozoa menjadi menurun.



Hidayanti(2002) dalam Janur,dkk(2015) menyatakan bahwa dibutuhkan 50% spermatozoa yang hidup untuk digunakan pada Inseminasi Buatan. Maka viabilitas pada perlakuan *thawing* suhu 20°C, 30°C dan 40°C selama 30 detik menunjukkan bahwa persentase viabilitas dalam kisaran normal.

Faktor lain yang menyebabkan rendahnya persentase hidup spermatozoa pasca dilakukan *thawing* adalah akibat banyaknya asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa yang tidak dapat dioksidasi. Menumpuknya asam laktat mengakibatkan meningkatnya kadar keasaman larutan yang berakibat buruk bagi spermatozoa karena bersifat racun(Janur,dkk. 2015).

Analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh($P>0,05$) antara interaksi posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu *thawing* terhadap viabilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa posisi straw pada uap nitrogen cair belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap viabilitas spermatozoa, sedangkan terhadap suhu *thawing* kisaran 30°C, 20°C merupakan suhu alami yang pasti akan dilalui selama proses pencairan menuju aktifitas optimal yang akan dicapai hingga suhu 40°C.

4.4.Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu *thawing* terhadap Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO *Post thawing*

Spermatozoa yang abnormal dapat dilihat dari morfologinya yang tidak normal. Afiati, Yulnawati dan Riyadi,dkk(2015) menyatakan bahwa bentuk – bentuk abnormalitas spermatozoa diklasifikasikan menjadi dua yaitu abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer

terjadi karena factor keturunan dan pengaruh lingkungan yang buruk. Bentuk dari abnormalitas primer meliputi kepala besar(*macrocephalus*) atau kepala kecil(*microcephalus*), kepala pendek, lebar, dan ekor ganda. Adapun abnormalitas sekunder terjadi karena perlakuan pada saat pewarnaan dalam proses pembuatan preparat ulas. Bentuk abnormalitas sekunder meliputi bagian ekor ang melipat, adanya butiran-butiran sitoplasmik proksimal atau distal, selubung akrosom yang terlepas dari kepala tanpa adanya ekor dan ekor yang terputus.



Gambar 11. Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO

Putranti, dkk(2010) menyatakan bahwa tingkat abnormalitas spermatozoa merupakan salah satu faktor yang paling penting karena hanya spermatozoa normal atau utuh yang memiliki peluang besar dalam keberhasilan fertilisasi. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO *Post thawing* dapat dilihat pada Tabel 4.

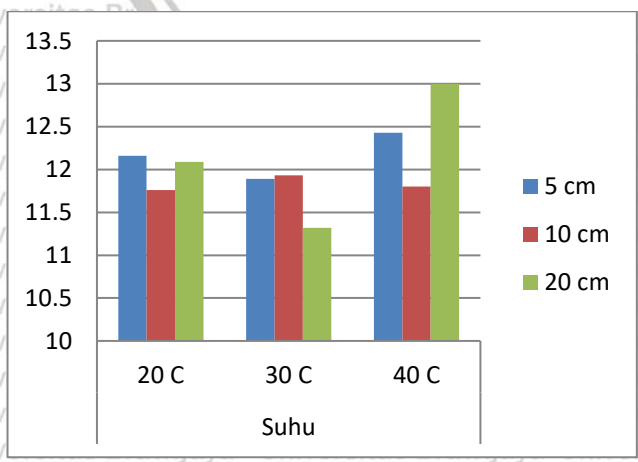
Table 4. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO *Post thawing*



Posisi Straw	Suhu Thawing			Rataan
	20°C	30°C	40°C	
Univer	11,51 ± 0,65	11,21 ± 0,68	11,80 ± 0,63	11,51 ± 0,65
5 cm	11,34 ± 0,42	11,48 ± 0,45	11,30 ± 0,5	11,37 ± 0,46
10 cm	11,21 ± 0,88	10,91 ± 0,41	12,06 ± 0,94	11,39 ± 0,74
20 cm	11,36 ± 0,65	11,2 ± 0,51	11,72 ± 2,07	
Rataan				

Keterangan : Pada baris dan kolom tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0.05$)

Berdasarkan tabel 4 di atas, diagram batang rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa setelah *thawing* dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 12. Diagram Batang Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan *Post thawing*



Hasil analisis statistik menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu thawing tidak terdapat pengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing*. Pada hasil pengamatan di atas bahwa rata-rata dan standar deviasi pada perlakuan posisi straw 20 cm memiliki persentase abnormalitas terendah dengan nilai $11,39 \pm 0,74$. Sedangkan rata-rata dan standar deviasi yang menunjukkan abnormalitas tertinggi terdapat pada posisi straw 5 cm yaitu $11,51 \pm 0,65$.

Berdasarkan hasil pengamatan di atas diketahui bahwa rata-rata dan standar deviasi pada perlakuan suhu thawing suhu 30°C memiliki persentase abnormalitas terendah dengan nilai $11,2 \pm 0,51$, sedangkan rata-rata dan standar deviasi yang menunjukkan abnormalitas tertinggi terdapat pada suhu thawing 40°C yaitu $11,72 \pm 2,07$. Hasil pengamatan menunjukkan abnormalitas dari semua perlakuan posisi straw pada uap nitrogen cair dan semua perlakuan suhu thawing masih layak digunakan untuk IB, diperoleh angka persentase abnormalitas spermatozoa kurang dari 15% atau persentase spermatozoa normal masih di atas 85% pada semua perlakuan. Hasil ini sesuai dengan Ihsan (2009) menyatakan bahwa abnormalitas di bawah 20% masih layak dipakai untuk Inseminasi Buatan (IB). Jika abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% akan menurunkan fertilitasnya.

Sesuai dengan hasil pengamatan kebanyakan abnormalitas yang terjadi yaitu spermatozoa yang ekor atau kepalanya terputus atau patah. Kondisi ini tidak disebabkan karena posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu thawing, melainkan diduga karena proses preparasi seperti pembuatan preparat ulas. Yulnawati, dkk (2009) dalam Janur, dkk (2015)



menyatakan bahwa abnormalitas dapat terjadi karena pembuatan preparat ulas yang menyebabkan kepala atau ekor spermatozoa putus. Suyadi,dkk(2012) menyatakan bahwa peningkatan angka abnormalitas disebabkan pada saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan dan juga disebabkan peroksidasi lipid.

Analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh($P>0,05$) antara interaksi posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu thawing terhadap abnormalitas spermatozoa. Hal ini disebabkan karena posisi straw pada uap nitrogen cair dan suhu thawing belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap abnormalitas spermatozoa.

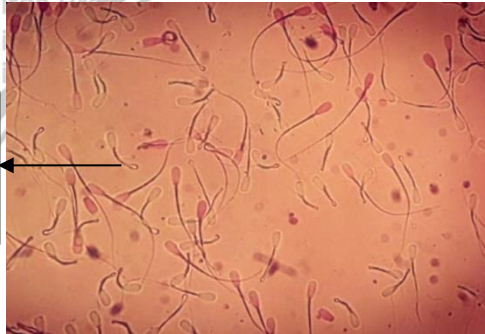
4.5 Pengaruh Posisi straw pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu thawing terhadap Integritas Membran Spermatozoa

Post thawing

Evaluasi integritas membran dilakukan untuk mengetahui tingkat kesuburan spermatozoa. Prinosilova, Kopecka, Hlavicova,dkk(2014) menyatakan bahwa integritas membran plasma spermatozoa dievaluasi dengan tes toleransi membran dan ketahanan terhadap kondisi hipo-osmotik(uji HOST). Tes HOS diperkenalkan oleh Jeyendran et al.(1984) yang digunakan untuk evaluasi semen manusia dan hewan. Pengujian ini didasarkan dengan asumsi setelah cairan HOS masuk kedalam selaput spermatozoa hidup yang tidak rusak akan terjadi penggulungan ekor spermatozoa. Rataan integritas membran sapi PO pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.



Terjadi
Penggulungan
ekor
spermatozoa



Gambar 13. Integritas membran spermatozoa

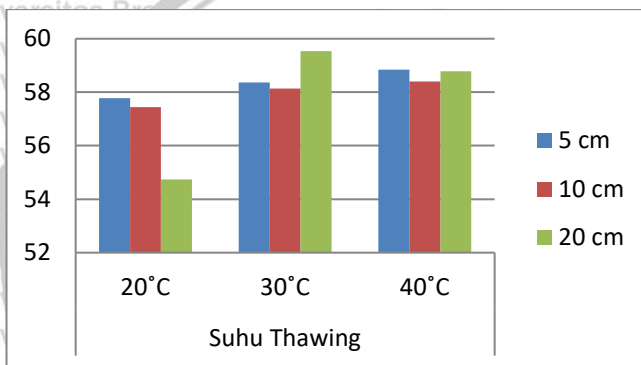
Table 5. Pengaruh Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Suhu Thawing Terhadap Rataan \pm SD Persentase Integritas Membran Spermatozoa Sapi PO *Post thawing*

Posisi Straw	Suhu Thawing			Rataan
	20°C	30°C	40°C	
5 cm	53.35 \pm 4.43	56.86 \pm 1.5	57.28 \pm 1.56	55.83 \pm 2.5
10 cm	52.68 \pm 4.76	54.10 \pm 4.04	56.16 \pm 2.24	54.31 \pm 3.68
20 cm	50.55 \pm 4.19	54.64 \pm 4.9	55.99 \pm 2.79	53.73 \pm 3.96
Rataan	52.19 \pm 4.46 ^a	55.2 \pm 3.48 ^b	56.48 \pm 2,2 ^b	

Keterangan : Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rata-rata integritas membran setelah *thawing* dapat dilihat pada gambar berikut :





Gambar 14. Diagram Batang Integritas Membran Sapi PO pada Pemeriksaan *Post thawing*

Berdasarkan analisis statistik rataan integritas membran spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata ($P>0,05$) pada perlakuan posisi straw pada uap nitrogen cair. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa posisi straw 5cm tidak berbeda nyata terhadap perlakuan 10 cm dan 20cm. Berdasarkan angka rataan yang tertinggi terdapat pada perlakuan posisi straw 5 cm yaitu sebesar 55.83 ± 2.5 . Sedangkan angka rataan terendah terdapat pada perlakuan posisi straw 20cm yaitu sebesar 53.73 ± 3.96 . Hal ini diduga karena pada posisi 5cm normal pada uap nitrogen cair sehingga tidak terjadi penurunan suhu secara drastis yang membuat spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock*. *Cold shock* yang terjadi pada spermatozoa menyebabkan kerusakan pada membrane sel sehingga integritas membrane spermatozoa menjadi turun. Pubiandra, dkk (2016) menyatakan bahwa apabila terjadi kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan

hilangnya enzim-enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sehingga tidak dihasilkan energi sehingga daya hidup juga akan rendah.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan suhu *thawing* pada semen beku sapi PO memberikan pengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap integritas membran plasma spermatozoa. Pada hasil pengamatan suhu *thawing* dengan air suhu *thawing* 40°C berbeda nyata dengan suhu *thawing* 30°C dan 20°C, namun suhu *thawing* 30°C tidak berbeda nyata dengan 20°C. Rataan persentase suhu *thawing* suhu 40°C memperlihatkan persentase integritas membran yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dengan nilai $56,48 \pm 2,2$, terjadi penurunan persentase integritas membran pada suhu 30°C dengan nilai 55.2 ± 3.48 dan kembali terjadi penurunan nilai integritas membran dengan nilai 52.19 ± 4.46 pada suhu 20°C. Hal ini diduga karena suhu 30°C dan 20°C terlalu rendah yang menyebabkan kristal es belum mencair secara sempurna. Aprilina, dkk (2014) menyatakan bahawa suhu yang rendah menyebabkan kristal es belum mencair secara sempurna, hal ini menyebabkan kerusakan pada membran sel. Apabila membran sel rusak dapat mengakibatkan metabolisme tidak berjalan dengan baik, kemudian dinding membran sel dapat ditembus oleh zat warna yang mengakibatkan persentase spermatozoa hidup menurun. Jika permeabilitas membran spermatozoa tidak berfungsi dengan baik maka pewarna dan larutan host bisa masuk tanpa terkontrol. Sedangkan pada suhu 40°C integritas membran tinggi diduga karena belum terjadi tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permeabilitas membran utuh atau tidak terganggu.

Berdasarkan analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($P > 0,05$) antara interaksi posisi straw pada

uap nitrogen cair dan suhu *thawing* terhadap integritas membran spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa posisi straw pada uap nitrogen cair belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap integritas membran spermatozoa, sedangkan pada perlakuan suhu *thawing* 30°C, 20°C merupakan suhu alami yang pasti akan dilalui selama proses pencairan menuju aktifitas optimal yang akan dicapai suhu 40°C.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata dari faktor perlakuan posisi straw pada uap nitrogen cair terhadap motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membrane namun terdapat pengaruh yang nyata dari faktor suhu *thawing* terhadap motilitas individu, viabilitas, dan integritas membran. Interaksi antara faktor posisi straw pada uap nitrogen cair dan faktor suhu *thawing* juga tidak berpengaruh nyata. Posisi straw pada uap nitrogen cair 5cm dan suhu *thawing* 40°C menunjukkan motilitas, viabilitas dan integritas membrane paling tinggi sehingga dapat memberikan kualitas terbaik semen beku sapi PO.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini, posisi straw 5 cm pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair dan suhu *thawing* 40°C merupakan hasil terbaik yang dapat diterapkan dan digunakan.



DAFTAR PUSTAKA

- Adinda L.P., S. Darodja dan R. Setiawan. 2015. Pengaruh Level *Glutathionin* Dalam Pengencer Tris-Sitrat Kuning Telur Terhadap Motilitas Dan Abnormalitas Sperma Kambing Peranakan Etawah *Post thawing*. *Jurnal Peternakan*. 1-11
- Afiati, F., Yulnawati, M. Riyadi, R. I. Arifiantini. 2015. Abnormalitas Spermatozoa Domba dengan Frekuensi Penampungan Berbeda. *Pros SemNas Masy Biodiv Indon*. 1(4) : 930 – 934
- Aini, K., S. Suharyati dan M. Hartono. 2014. Pengaruh Posisi straw dengan Nitrogen Cair pada Proses Pre Freezing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. *Jurnal Peternakan*. 1(1) : 62-70
- Amin, M.N, U. A. Rokhayati dan N. K. Laya. 2019. Peran Inseminasi Buatan (BI) Terhadap Sistem Perkawinan Dikelompok Tani Ternak Lembu Karomah Kecamatan Taluditi Kabupaten Pohuwato. *Jambura Journal of Animal Science*. 1(2) : 52-56
- Aprilina, N., S. Suharyati dan P.E. Santosa. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama *Thawing* di Dataran Rendah terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental. *Jurnal Peternakan Lampung*. 1(1) : 96-102



Aprilina, N., S. Suharyati, P. E. Santosa. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama *Thawing* di Dataran Rendah terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental. *Jurnal Sain Peternakan*. 1(!) : 96 – 102

Ardhani, F., H. Mufidah, R. Samsuriati dan H.P. Putra. 2020. Efek Lama Penyimpanan Semen Beku Sapi Bali pada Pos Inseminasi Buatan Terhadap Membran Plasma, Tudung Akrosom Utuh, dan DNA Spermatozoa. *Jurnal Ilmu Peternakan Terapan*. 3(2) : 58-66

Arifiantini, R.I., T.L. Yusuf dan M. Riyadhi. 2005. Stimulasi Bailey Elektroejakulator pada Voltase yang Berbeda Terhadap Volume Semen dan Konsentrasi Spermatozoa Domba Lokal. *Journal Indonesia Tropical Animal Agricultur*. 30(3) : 135 -141

Berawi, K. N. dan D. Marrini. 2018. Efektivitas Kulit Batang Bakau Minyak (*Rhizophora apiculata*) sebagai Antioksidan. *Journal Agrmomedicine*. 5(1) : 412-417

Cahyadi, T.R.T., M Christiyanto dan E.T. Setiatin. 2016. Persentase Hidup dan Abnormalitas Sel Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (PE) dengan Pakan yang Disuplementasi Daun Binahong. *Animal Agriculture Journal*. 5(3) : 23-32

Cahyani, P., Y.S. Ondho, D. Samsudewa. 2020. Pengaruh Tarum (*Indigofera zollingeriana*) dalam Pengencer



Semen terhadap Viabilitas dan Tudung Akrosom Utuh Spermatozoa Kampung Peranakan Ettawa. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*. 15(3) : 259-264

Cappello, A.R., C. Guido, A. Santoro, M. Santono, dkk. 2012. The Mitochondrial Citrate Carrier (CIC) is Present and Regulates Insulin Secretion by Human Male Gamete. *Endocrinology*. 153(4) : 1743-1754

Christijanti W., N.R. Utami dan A. Iswara. 2010. Efek Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar Allethrin. *Biosaintifika*. 2(1) : 18-26

Coester, J. S., A. Sulaiman, M. rizal. 2018. Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Pengencer Tris dan Berbagai Konsentrasi Sari Kedelai. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 6(2) : 175-180

Danang, D.R., N. Isnaini dan P. Trisunuwati, 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung Dalam Pengenceran Ringer's pada Suhu 4°C. *Jurnal Ternak Tropika*. 13(1) : 47-57

Effendi F.I., S. Wahjuningsih dan M.N. Ihsan. 2015. Pengaruh pengencer *Tris aminomethane* kuning telur yang disuplementasi sari kulit Manggis (*Garcinia Mangostana*) terhadap kualitas semen Sapi Limousin selama penyimpanan suhu dingin 50C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25 (3): 69 – 79



Fania, B., I.Gusti dan I Ketut. 2020. Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) Pada Sapi Bali di Kecamatan Mengwi, Badung Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*. 9(2) : 177-186

Fatimah, S.N., Wurlina dan R. S. Wahjuni. 2018. Pengaruh Jarak dan Lama Waktu Proses Penghitungan Straw Sebelum Distribusi terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Mental *Post thawing*. *Ovozoa*. 7(2) : 126-130

Fatimah, S.N., Wurlina, R. S. Wahjuni. 2018. Pengaruh Jarak dan Lama Waktu Proses Penghitungan Straw Sebelum Distribusi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simental *Post thawing*. *Ovozoa*. 7(2) : 126-130

Febriani, G. D., Hamdan, J. Melia. 2014. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) Setelah *Thawing*. *Jurnal Mrdika Veterinaria*. 8(1) : 1-4

Fitrik dan N. Supartini. 2012. Pengaruh Suhu dan Lama *Thawing* terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa. *Buana Sains*. 12(1) :81- 86

Hanifa, H., M.N.Ihsan dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh Lama Ekuilibrasi pada Proses Pembekuan terhadap Kualitas Semen Sapi Wagyu Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ternak Tropika*. 17(1) : 31-41

Hanifi, H., M. N. Ihsan dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh Lama Ekuilibrasi pada Proses Pembekuan terhadap



Kualitas Semen Sapi Wagyu Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ternak Tropka*. 17(1) : 31-41

Hasanah, S. U., Sukrasno, R. Hartati, D. Prayugo. 2020. Perbandingan Kandungan Genistein pada Berbagai Varietas Kedelai di Indonesia. *Jurnal Pertanian Tanaman Pangan*. 4(2) : 113-118

Herawati, T., A. Anggraeni, L. Praharani, D. Utami dan A. Argiris. 2012. Peran Inseminator Dalam Keberhasilan Inseminasi Buatan Pada Sapi Perah. *Informatika Pertanian*. 21(2) : 81-88

Herdis. 2012. Pengaruh Waktu Penampungan Semen terhadap Gerakan Massa Spermatozoa dan Tingkah Laku Kopulasi Pejantan Domba Garut. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 14(1) : 38-43

Hoesni, F. 2013. Pengaruh Penggunaan Suhu thawing yang Berbeda Terhadap Kualitas Spermatozoa Semen Sapi Perah Berpengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmah Universitas Batanghari Jambi*. 13(4) :118-126

Ihsan, N.M.2009. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Universitas Brawijaya: Malang

Indriani, T. Susilawati dan S. Wahyuningsih.2013. Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Metode Water Jacket dan Free Water Jacket. *Jurnal Veteriner*. 14(3) : 379-386



Ionately, T., N. Solihati dan S. Wahyuni.2015. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Daya Hidup dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Itik Rambon. *Jurnal Universitas Padjadjaran*. 1(1) :1-14

Jiyanto dan P. Anwar. 2019. Efektivitas Sukrosa sebagai Proteksi Aktif Membran Ekstraseluler Spermatozoa Sapi Bali pada Zona Pre-Freezing. *Jurnal Agripet*. 19(1) : 77-83

Jurzak, M., P.Ramos dan B. Pilawa. 2017. The Influence of Genistein on Free Radical in Normal Dermal Fibroblasts and Keloid Fibroblasts Examined by EPR Spectroscopy. *Medicinal Chemistry Research*. 26(6) : 1297-1305

Kartasudjana, R. dan U. Santosa.2001. *Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung : Departemen Pendidikan Nasional

Komariah, R. I. Arifiantini, M. Aun dan E. Sukmawati.2020. Kualitas Semen Segar dan Produksi Semen Beku Sapi Pejantan Madura pada Musim yang Berbeda. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 8(1) ; 15-21

Lubis,T.M.,C.N. Thasmi dan Akbar.2013. Efektifitas Penambahan Vitamin C Dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer setelah Penyimpanan Dingin. *Jurnal S. Pertanian*. 3(1) :347-361



Luthfi, M., T. Susilawati, N. Isnaini. 2015. Perbedaan Kecepatan Pubertas Calon Pejantan Sapi PO yang Dipelihara pada Kelompok Sex yang Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 16(2) : 7-15

Malangngi, L.P., M.S.Sangi dan J.J.E. Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat(*Persea americana Mikk.*). *Jurnal MIPA unsrat Online*. 1(1) : 5-10

Masyitoh, H., T.W.Suprayogi, R.N. Praja,dkk. 2018. Persentase Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Kambing Sopera dalam Pengencer Tris Kuning Telur dan Susu Skim Kuning Telur *Before Freezing*. *Jurnal Medik Veteriner*. 1(3) : 105-112

Muhammad, D., N. Isnaini, A. P. Yekti, Kuswati, H. Y. Lukman, M. Lutfi, T. Susilawati. 2018. Kualitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dalam Pengencer Air Kelapa Selama Penyimpanan pada Suhu 4-5C. *Jurnal Sains Peternakan*. 6(2) : 1-9

Muhammad, D., T. Susilawati, S.Wahjuningsih. 2016. Pengaruh Penggunaan CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi FH(Frisian Holstein) Kualitas Rendah Selama Penyimpanan Suhu 4-5°C. *Jurnal Ternak Tropika*. 17(1) : 66-76



Mumu, M. I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland*. 16(2) : 172-179

Novita, R, T. Karyono dan Rasminah. 2019. Kualitas Semen Sapi Brahman pada Persentase Tris Kuning Telur yang Berbeda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 14(4) : 351-358

Nugroho, Y, T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin Selama Pendinginan Menggunakan Pengencer CEP-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Kuning Telur dan Sari Buah Jambu Biji. *Jurnal Ternak Tropika*. 15(1) ; 31-42

Ophardt C. 2017. Lipid Bilayer Membrans. <https://chem.libretexts.org>. Diakses tanggal 2 April 2020.

Permatasari, W.D., E.T. Setiatin, D. Samsudewa. 2013. Studi Tentang Pengenceran Kuning Telur dan Pengaruhnya Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Brebes. *Animal Agriculture*. 2(1) : 143 -151

Prasetyo, H. , Y. S. Ondho dan D. Samsudewa. 2020. Kualitas Makroskopis Semen Segar Pejantan Sapi Peranakan Ongole Kebumen pada Umum yang Berbeda. *Jornal of Animal Research Applied Sciences*. 2(1) : 1-5

Prastika, Z., S. Susilowati, B. Agustono, E. Safitri, F. Fikri, R. A. Prastiya. 2018. Motilitas dan Viabilitas



Spermatozoa Sapi Rambon di Desa Kemiren Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*. 1(2) : 38 – 42

Pratama, A. N. dan H. Busman.2020. Potensi Antioksidan Kedelai (*Glycine Max L*) Terhadap Penangkapan Radikal Bebas. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*. 11(1) : 497-504

Pratama, J. W. A., D. A. K. Sari dan M. Sigit. 2018. Pengaruh Beberapa Suhu thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simental. *Jurnal Ilmiah Filia Cendekia*. (3) : 39-45

Pratama, J.W.A., D.A.K.Sri, M. Sigit. 2018. Pengaruh Beberapa Suhu thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simental. *Jurnal Ilmiah Filia Cendekia*. 3(2) : 39-45

Pubiandara, S., S. Suharyati, M. Hartono. 2016. Pengaruh Penambahan Dosis Rafinosa Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 4(4) : 292-299

Pubiandara, S., S. Suharyati, M. Hartono.2016. Pengaruh Penambahan Dosis Rafinosa dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole. *Jurnal Ilmiah Pternakan Terpadu*. 4(4) : 292 = 299



Purwoistri R.F., T. Susilawati dan S. Rahayu. 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* Ditambahkan Kuning Telur. *Jurnal Veteriner*. 14(3) : 371-378

Rahardhianto,A.,N.Abdulgani dan N. Trisyani.2012. Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Ikan Patin selama Masa Penyimpanan. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1(1) : 58-63

Rasyid A. dan Luthfi M.. 2017. Uji Performa Calon Bibit Sapi Peranakan Ongole Berdasarkan Karakteristik Kuantitatif dan Kualitatif. *Jurnal Teknologi Peternakan*. 1(1) : 70-77

Rizal, M. dan Herdis.2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa*. 20(3) : 139-145

Rosadi, B., T. Sumarsono dan Darmawan.2015. Motilitas Spermatozoa Kerbau Lumpur pada Penyimpanan Semen Beku dalam Es. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 18(2) : 98-101

Rosary, R. A., Kuswati dan T. Susilawati 2018. Kualitas Semen Cair Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Pengencer CEP-3 Kuning Telur pada Media Simpan yang Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 19(2) : 87 – 94



- Rosita, E.A., T. Susilawati dan S. Wahyuningsih. 2014. Keberhasilan IB Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Metode Sedimentasi Putih Telur pada Sapi PO Cross. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 24 (1): 72 – 76.
- Safitri, A. M., T. Sardjito, P.A. Wibawati,dkk. 2018. Kualitas Semen Segar Sapi Rambon Banyuwangi Dalam Pengencer Tris Kuning Telur dan Susu Skim Kuning Telur. *Jurnal Medik Veteriner*. 1(3) : 62-67
- Saifudin, M, N. Isnaini, A.P.A Yekti,dkk. 2018. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair Menggunakan Media Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur pada Sapi Persilangan Ongole. *Jurnal Ternak Tropika*. 19(1) : 60-65
- Sari, A.N..2015. Antioksidan Alternatif untuk Menangkal Bahaya Radikal Bebas pada Kulit. *Journal of Islamic Science and Technology*.1(1) : 63-68
- Silvestre, M.A., S. Vicente-Fiel, E. RAGA, I. Salvador, et al. 2015. Effect of Genistein Added to Bull Semen After Thawing on Pronuclear and Sperm Quality. *Animal Reproduction Science*. 163(1) : 120-127
- Simbolon, I.S., T; M. Lubis, M. Adam. 2013. Persentase Spermatozoa Hidup pada Tikus Wister dan Sprague-Dawley. *Jurnal Medika Veterinaria*.7(2) : 79-83
- Suohoka, D.F., M.J. Matatul, W.M.M. Nalley dan M. Rizal. 2009. Laktosa Mempertahankan Daya Hidup



Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *Jurnal Veteriner*. 10(3) : 135-142

Supartini, N. dan H. Darmawan. 2014. Profil Genetik dan Peternakan Sapi Peranakan Ongole Sebagai Strategi Dasar Pengembangan Desa Pusat Bibit Ternak. *Buana Sains*. 14(1) : 71 - 84

Suryadinata, R.V..2018. Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Proses Inflamasi pada Penyakit Paru Obstruktif Kronis(PPOK). *SA License*. 19(1) : 317-324

Susilawati, T.. 2011. *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya UB Press. ISBN: 978-602-8960-04-5

Suyadi, A. Rachmawati, N. Iswanto.2012. Pengaruh α -Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar *Tris aminomethane* kuning Telur terhadap Kualitas Semen Kamping Boer yang Disimpan pada Suhu 5C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*. 22(3) : 1-8.

Syauqy, A. 2014. Evaluasi Kromatin Sperma Sebagai Indikator Kualitas Sperma. *JMJ*. 2(1) : 87-97

Varasofiari, L.N., E.T. Setiatin dan Sutopo. 2013. Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi Jawa Brebes Berdasarkan Lama Waktu Penyimpanan. *Animal Agriculture Journal*. 2(1) : 201-208

Villines Z. 2017. How do free radicals affect the body. <https://www.medicalnewstoday.com>. Diakses tanggal 21 Februari 2018



- Widjaja, N., T. Akhdiat, D. Purwasih. 2017. Pengaruh Deposisi Semen Terhadap Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) Sapi Peranakan Ongole. *Sains Peternakan*. 15(2) : 49 – 51
- Winangun, K. Toha dan A. Yusrina. 2019. Kualitas Larutan Pengencer dan Kualitas Semen Domba pada Temperature Penyimpanan yang Berbeda. *Kandaga*. 1(1): 1-7
- Wiratri, V.D.B., T.Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin Pada Pengencer Yang Berbeda Selama Pendinginan. *Jurnal Ternak Tropika*. 15(1) : 13 -20
- Wulandari, I. A. dan S. A. Prihatno. 2014. Pengaruh Berbagai Temperatur *Thawing* Semen Beku Terhadap Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Potong. *Jurnal Sain Veteriner*. 32(1) : 40-45
- Yekti, A. P. A., W. S. Tatulus, D. Ratnawati, L. Affandhy, Kuswati, A. N. Huda, T. Susilawati. 2018. Kualitas dan Kapasitasi Spermatozoa Sapi Bali, Madura, dan Peranakan Ongole. *JITRO*. 5(2) : 34-41
- Yendraliza, H. Abadi, R. Misrianti, A. Ali dan A. Effendi. 2019. Identifikasi Ukuran Tubuh dan Kualitas Semen Sapi Kuantan Jantan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 7(1) : 186 – 191
- Zelpina, E., B. Rosadi dan T. Sumarsono. 2012. Kualitas Spermatozoa *Post thawing* dari Semen Beku Sapi



Perah. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan. 15(2) : 94 – 102

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Semen Segar

Kualitas	Ulangan		Rataan	SD
	1	2		
Volume (ml)	5	5	5	0
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	
Ph	6.8	6.8	6.8	0
Bau	Khas	Khas	Khas	
Warna	PK	PK	PK	
Motilitas massa	2+	2+	2+	
Motilitas individu (%)	85	80	82.5	3.54
Viabilitas (%)	97.05	90.71	93.88	4.48
Abnormalitas (%)	1.27	2.38	1.825	0.78
Konsentrasi (10 ⁷ /ml)	1310	1100	1205	148.49

Keterangan : PK = Putih Kekuningan



Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu Post Thawing

Posisi straw	Ulangan	Suhu Thawing			Total
		20°C	30°C	40°C	
5 cm	U1	30	35	40	105
	U2	35	40	40	115
	U3	30	35	35	100
	U4	40	35	35	110
	U5	30	35	35	100
Sub Total		165	180	185	530
Rataan		33	36	37	
SD		4.47	2.24	2.74	
10 cm	U1	30	35	35	100
	U2	30	35	35	100
	U3	35	40	40	115
	U4	40	30	35	105
	U5	35	35	35	105
Sub Total		170	175	180	525
Rataan		34	35	36	
SD		4.18	3.53	2.24	
20 cm	U1	30	40	40	110
	U2	30	35	30	95
	U3	30	35	35	100
	U4	35	35	35	105
	U5	30	30	30	90
Sub Total		155	175	170	500
Rataan		31	35	34	
SD		2.24	3.53	4.18	
Total		490	530	535	1555



Keterangan: Faktor A = Posisi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu thawing

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{a.b.c} \\ &= \frac{(1555)^2}{3 \times 3 \times 5} \\ &= 53733,89 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum (Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (30^2 + 35^2 + 40^2 + \dots + 30^2) - 53733,89 \\ &= 541,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum (\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(165^2 + 180^2 + 185^2 + \dots + 170^2)}{5} - 53733,89 \\ &= 131,11 \\ &= 131,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum (\sum y_i)^2}{r.b} - \text{FK} \\ &= \frac{(530^2 + 525^2 + 500^2)}{5 \times 3} - 53733,89 \\ &= 34,44 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKB} &= \frac{\sum (\sum y_j)^2}{r.a} - \text{FK} \\ &= \frac{(490^2 + 530^2 + 535^2)}{5 \times 3} - 53733,89 \\ &= 81,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 131,11 - 34,44 - 81,11 \\ &= 15,56 \end{aligned}$$

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP}$$



$$= 541,11 - 131,11$$

$$= 410$$

$$\text{KTP} = \text{JKP} / \text{dbp}$$

$$= 131,11 / 8$$

$$= 16,38$$

$$\text{KTA} = \text{JKA} / \text{dba}$$

$$= 34,44 / 2$$

$$= 17,22$$

$$\text{KTB} = \text{JKB} / \text{dbb}$$

$$= 81,11 / 2$$

$$= 40,55$$

$$\text{KTA} * \text{B} = \text{JKA} * \text{B} / \text{dba} * \text{b}$$

$$= 15,56 / 4$$

$$= 3,89$$

$$\text{KTG} = \text{JKG} / \text{dbg}$$

$$= 410 / 36$$

$$= 11,38$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 16,38 / 11,38 = 1,44$$



$$F\text{-hit A} = KTA/KTG = 17,22/11,38 = 1,51$$

$$F\text{-hit B} = KTB/KTG = 40,55/ 11,38 = 3, 56$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA*B/KTG = 3,89/11,38 = 0,34$$

Tabel ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
Perlakuan	8	131,11	16,38	1.44		
Posisi	2	34,44	17,22	1.51	3.26	5.25
Suhu	2	81,11	40,55	3.56*	3.26	5.25
Posisi*Suhu	4	15,56	3,89	0.34	2.63	3.89
Galat	36	410	11,38			
Total	44	541,11				

Keterangan : *) berpengaruh nyata (P<0,05)

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

$$SE = \sqrt{\frac{KT\ Galat}{r}} = \sqrt{\frac{11,38}{15}} = 0,87$$

Duncan 0,05 2 3

JND 2,868 3,015

JNT 2,5 2,63

Suhu
Thawing Rataan Notasi

20 C 32.67 A

30 C 35.33 B

40 C 35.67 B





Lampiran 3. Analisa Vianilitas Post Thawing

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20	30	40	
5	U1	51.23	58.84	62.46	172.53
	U2	56.92	62.88	61.4	181.2
	U3	55.73	59.82	58.39	173.94
	U4	61.19	59.12	59.49	179.8
	U5	52.16	57.79	59.82	169.77
Sub Total		277.23	298.45	301.56	877.24
Rataan		55.44	59.69	60.3	
SD		3.99	1.93	1.61	
10	U1	50.99	55.24	57.79	164.02
	U2	51.06	56.07	61.09	168.22
	U3	56.27	61.35	61.4	179.02
	U4	61.01	55.41	58	174.42
	U5	57.2	57.3	55.92	170.42
Sub Total		276.53	285.37	294.2	856.1
Rataan		55.30	57.07	58.84	
SD		4,29	2.52	2.34	
20	U1	55.79	62.09	62.04	179.92
	U2	51.5	56.15	56.69	164.34
	U3	50.54	58.39	61.26	170.19
	U4	59.18	59.18	58.45	176.81
	U5	50.42	50.59	56.54	157.55
Sub Total		267.43	286.4	294.98	848.81
Rataan		53.48	57.28	58.99	
SD		3.86	4.3	2.55	
Total		821.19	870.22	890.74	2582.15



Keterangan: Faktor A = Posisi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*

$$\begin{aligned}FK &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{a.b.c} \\ &= \frac{(2582,15)^2}{3 \times 3 \times 5} \\ &= 148166,63\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}JKT &= \sum(Y_{ijk})^2 - FK \\ &= (51,23^2 + 58,84^2 + 62,46^2 + \dots + 56,54^2) - 148166,63 \\ &= 579,97\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}JKP &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - FK \\ &= \frac{(277,23^2 + 298,45^2 + 301,56^2 + \dots + 294,98^2)}{5} - 148166,63 \\ &= 209,96\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}JKA &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - FK \\ &= \frac{(877,24^2 + 856,1^2 + 848,81^2)}{5 \times 3} - 148166,63 \\ &= 29,08\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}JKB &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{ra} - FK \\ &= \frac{(821,19^2 + 870,22^2 + 890,74^2)}{5 \times 3} - 148166,63 \\ &= 170,28\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}JKA*B &= JKP - JKA - JKB \\ &= 209,96 - 29,08 - 170,28 \\ &= 10,6\end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 579,97 - 209,96 \\ &= 370,01 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbp} \\ &= 209,96 / 8 \\ &= 26,245 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dba} \\ &= 29,08 / 2 \\ &= 14,54 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTB} &= \text{JKB} / \text{dbb} \\ &= 170,28 / 2 \\ &= 85,14 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} * \text{B} &= \text{JKA} * \text{B} / \text{dba} * \text{b} \\ &= 10,6 / 4 \\ &= 2,65 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTG} &= \text{JKG} / \text{dbg} \\ &= 370,01 / 36 \\ &= 10,28 \end{aligned}$$



$$F\text{-hit P} = \text{KTP/KTG} = 26,245/10,28 = 2,55$$

$$F\text{-hit A} = \text{KTA/KTG} = 14,54/10,28 = 1,41$$

$$F\text{-hit B} = \text{KTB/KTG} = 85,14/10,28 = 8,28$$

$$F\text{-hit A*B} = \text{KTA*B/KTG} = 2,65/10,28 = 0,26$$

Tabel ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
Perlakuan	8.00	209.92	26.24	2.55		
Posisi	2.00	29.07	14.54	1.41	3.26	5.25
Suhu	2.00	170.27	85.14	8.28**	3.26	5.25
Posisi*Suhu	4.00	10.58	2.64	0.26	2.63	3.89
Galat	36.00	370.02	10.28			
Total	44.00	579.94				

Keterangan : *) berpengaruh sangat nyata ($P < 0.05$)

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

$$SE = \sqrt{\frac{KT\ Galat}{r}} = \sqrt{\frac{10,28}{15}} = 0,83$$

Duncan 0,05	2	3
JND	2.868	3.015
JNT	2.37	2.49

Suhu	Rataan	Notasi
20 C	54,75	A
30 C	58,02	B
40 C	59,38	B



Lampiran 4. Analisa Abnormalitas Post Thawing

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20	30	40	
5	U1	11.89	10.27	11.63	33.79
	U2	10.69	10.69	12.87	34.25
	U3	11.87	11.6	11.8	35.27
	U4	10.95	11.61	11.25	33.81
	U5	12.16	11.86	11.46	35.48
Sub Total		57.56	56.03	59.01	172.6
Rataan		11.51	11.20	11.802	
SD		0.65	0.68	0.63	
10	U1	10.67	11.89	11.76	34.32
	U2	11.27	11.48	11.6	34.35
	U3	11.79	11.04	11.58	34.41
	U4	11.36	11.26	10.56	33.18
	U5	11.6	11.74	11.02	34.36
Sub Total		56.69	57.41	56.52	170.62
Rataan		11.33	11.48	11.30	
SD		0.42	0.45	0.5	
20	U1	10.67	11.37	13.22	35.26
	U2	10.15	11.3	11.27	32.72
	U3	11.83	10.87	11.86	34.56
	U4	12.36	10.44	12.84	35.64
	U5	11.02	10.59	11.11	32.72
Sub Total		56.03	54.57	60.3	170.9
Rataan		11.206	10.914	12.06	
SD		0.88	0.41	0.94	
Total		170.28	168.01	175.83	514.12



Keterangan: Faktor A = Posisi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*

$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c} \\ &= \frac{(514,12)^2}{3 \times 3 \times 5} \\ &= \frac{264319,3744}{45} \end{aligned}$$

$$= 5873,76$$

$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum (Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (11,89^2 + 10,27^2 + 11,63^2 + \dots + 11,11^2) - 5873,76 \\ &= 5893,179 - 5873,76 \\ &= 19,42 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum (\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(56,69^2 + 57,41^2 + 56,52^2 + \dots + 60,3^2)}{5} - 5873,76 \end{aligned}$$

$$= 5878,441 - 5873,76$$

$$= 4,651$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum (\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK} \\ &= \frac{(172,6^2 + 170,62^2 + 170,9^2)}{5 \times 3} - 5873,76 \end{aligned}$$

$$= \frac{88108,7544}{15} - 5873,76$$

$$= 5873,92 - 5873,76$$



$$= 0,16$$

JKB

$$= \frac{\sum(\Sigma y)^2}{ra} - FK$$

$$= \frac{(170,28^2 + 168,01^2 + 175,83^2)}{5 \times 3} - 5873,76$$

$$= \frac{88138,8274}{15} - 5873,76$$

$$= 5875,92 - 5873,76$$

$$= 2,16$$

JKA*B = JKP - JKA - JKB

$$= 4,651 - 0,16 - 2,16$$

$$= 2,331$$

JKG

$$= JKT - JKP$$

$$= 19,42 - 4,651$$

$$= 14,769$$

KTP

$$= JKP / dbp$$

$$= 4,651 / 8$$

$$= 0,58$$

KTA

$$= JKA / dba$$

$$= 0,16 / 2$$

$$= 0,08$$



$$KTB = JKB / dbb$$

$$= 2,16 / 2$$

$$= 1,08$$

$$KTA*B = JKA*B / dba*b$$

$$= 2,331 / 4$$

$$= 0,58$$

$$KTG = JKG / dbg$$

$$= 14,769 / 36$$

$$= 0,41$$

$$F\text{-hit P} = KTP / KTG = 0,58 / 0,41 = 1,42$$

$$F\text{-hit A} = KTA / KTG = 0,08 / 0,41 = 0,18$$

$$F\text{-hit B} = KTB / KTG = 1,08 / 0,41 = 2,63$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA*B / KTG = 0,58 / 0,41 = 1,44$$

Tabel ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	8	4.68	0.58	1.43		
Posisi	2	0.15	0.08	0.19	3.26	5.25
Suhu	2	2.16	1.08	2.64	3.26	5.25
Posisi*Suhu	4	2.37	0.59	1.44	2.63	3.89
G	36	14.74	0.41			
Total	44	19.42				

Keterangan: F hitung tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$)



Lampiran 5. Analisa Integritas Membran Post Thawing

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20	30	40	
5	U1	48.48	56.81	59.52	164.81
	U2	56.7	59.18	58.24	174.12
	U3	53.6	56.7	55.7	166
	U4	58.62	56.66	56.38	171.66
	U5	49.36	54.94	56.54	160.84
Sub Total		266.76	284.2	286.38	837.43
Rataan		53.352	56.85	57.276	
SD		4.43	1.5	1.56	
10	U1	47.36	55.34	55.06	157.76
	U2	48.05	54.65	58.51	161.21
	U3	54.74	58.51	58.51	171.76
	U4	58.32	47.47	55.17	160.96
	U5	54.94	54.55	53.54	163.03
Sub Total		263.41	270.52	280.79	814.72
Rataan		52.68	54.104	56.158	
SD		4.76	4.04	2.24	
20	U1	52.54	59.09	59.25	170.88
	U2	48.02	53.01	52.63	153.66
	U3	47.05	55.78	57.7	160.53
	U4	57.02	58.32	56.78	172.12
	U5	48.12	47.01	53.57	148.7
Sub Total		252.75	273.21	279.93	805.89
Rataan		50.55	54.64	55.98	
SD		4.19	4.9	2.79	
Total		782.92	828.02	847.1	2458.04

Keterangan: Faktor A = Posisi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*



$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c} \\
 &= \frac{(2458,04)^2}{3 \times 3 \times 5} \\
 &= \frac{6041960,64}{45} \\
 &= 134265,79
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKT &= \sum (Y_{ijk})^2 - FK \\
 &= (48,48^2 + 56,81^2 + 59,52^2 + \dots + 53,57^2) - 134265,79 \\
 &= 134929,53 - 134265,79 \\
 &= 663,74
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKP &= \frac{\sum (\sum y_{ji})^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(266,76^2 + 284,29^2 + 286,38^2 + \dots + 279,93^2)}{5} - 134265,79 \\
 &= 134458,24 - 134265,79 \\
 &= 192,448
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKA &= \frac{\sum (\sum y_i)^2}{rb} - FK \\
 &= \frac{(837,43^2 + 814,72^2 + 805,89)}{5 \times 3} - 134265,79 \\
 &= \frac{2014516,375}{15} - 134265,79 \\
 &= 35,29
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKB &= \frac{\sum (\sum y_j)^2}{ra} - FK \\
 &= \frac{(720,24^2 + 828,02^2 + 847,1^2)}{5 \times 3} - 120461,1
 \end{aligned}$$



$$= \frac{2016159.257}{15} - 120461,1$$

$$= 144,82$$

$$JKA * B = JKP - JKA - JKB$$

$$= 192.448 - 35.29 - 144,82$$

$$= 12,32$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 663.74 - 192,448$$

$$= 471.28$$

$$KTP = JKP / dbp$$

$$= 192.448 / 8$$

$$= 24.05$$

$$KTA = JKA / dba$$

$$= 35.29 / 2$$

$$= 17.41$$

$$KTB = JKB / dbb$$

$$= 144,81 / 2$$

$$= 72,41$$

$$KTA * B = JKA * B / dba * b$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



$$= 12,32 / 4$$

$$= 3,08$$

$$\text{KTG} = \text{JKG} / \text{dbg}$$

$$= 471,28 / 36$$

$$= 13,09$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 24,05 / 13,09 = 1,84$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 17,4115 / 13,09 = 1,34$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 72,41 / 13,09 = 5,53$$

$$\text{F-hit A*B} = \text{KTA*B} / \text{KTG} = 3,08 / 13,09 = 0,23$$

Tabel ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	8	192.45	24.06	1.84		
A	2	35.30	17.65	1.35	3.26	5.25
B	2	144.83	72.41	5.53**	3.26	5.25
A*B	4	12.32	3.08	0.24	2.63	3.89
G	36	471.29	13.09			
Total	44	663.74				

Keterangan : **) berpengaruh sangat nyata ($P < 0,05$)

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

$$\text{SE} = \sqrt{\frac{\text{KT Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{13,09}{15}} = 0,93$$

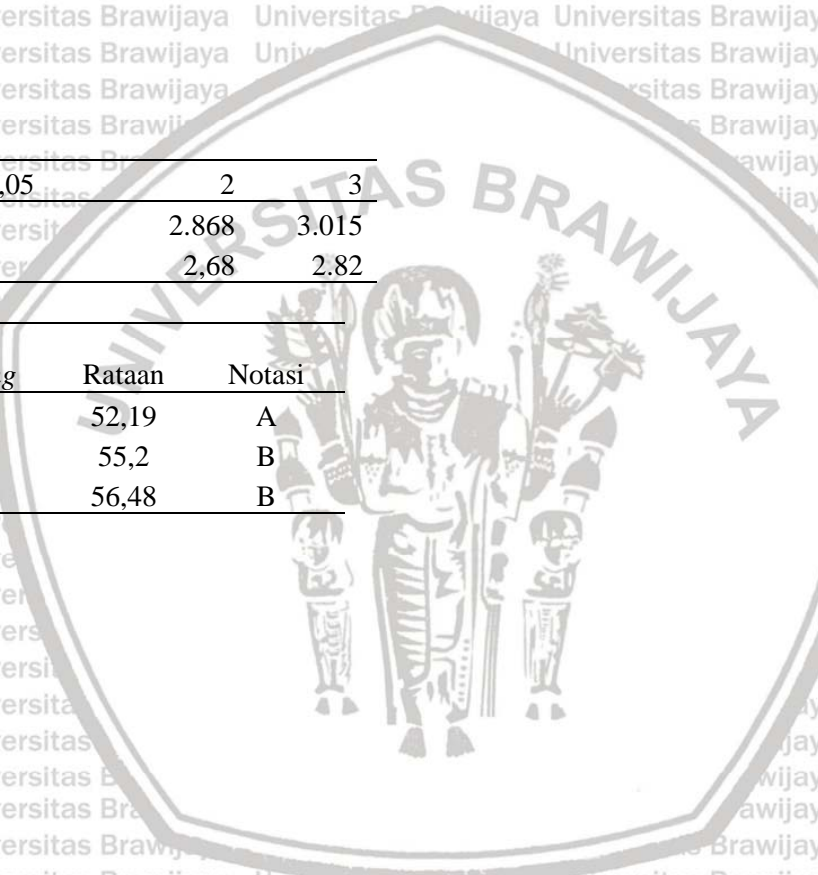


Duncan 0,05	2	3
-------------	---	---

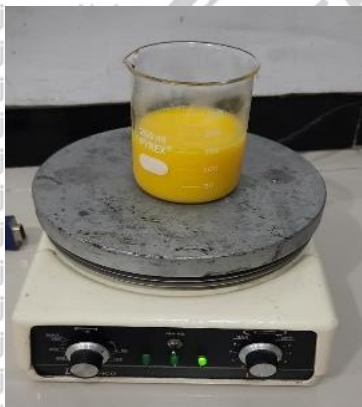
JND	2.868	3.015
-----	-------	-------

JNT	2,68	2.82
-----	------	------

Suhu <i>Thawing</i>	Rataan	Notasi
20 C	52,19	A
30 C	55,2	B
40 C	56,48	B



Lampiran 6. Dokumentasi



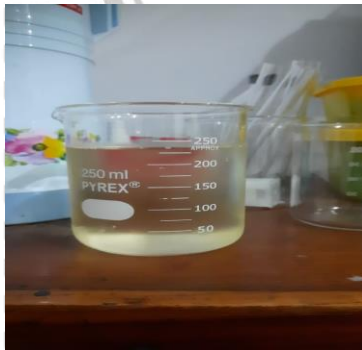
Pengencer *Tris*
Aminomethane dan
Kuning Telur



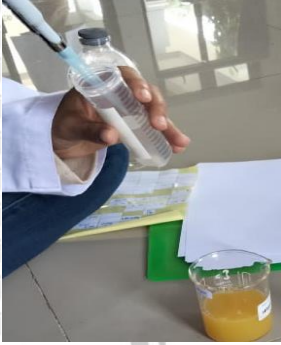
Penampungan
Semen Sapi PO



Genistein



Tris Aminomethan



Penambahan pengencer
pada semen

