

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

SKRIPSI

Oleh :

Frando Gabriel Situmorang

Nim. 175050107111108



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**





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

SKRIPSI

Oleh :

Frando Gabriel Situmorang

Nim. 175050107111108

**Skrripsi 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 LAMA *THAWING* TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO DENGAN
PENAMBAHAN GENISTEIN PADA PENGECER**

SKRIPSI

Oleh :

**Frando Gabriel Situmorang
Nim. 175050107111108**

Mengetahui,
Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,
MS., IPU., ASEAN Eng.

NIP. 196204031987011001

Tanggal Juli 2021

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,
MS., IPU., ASEAN Eng.

NIP. 196204031987011001

Tanggal Juli 2021





KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa 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 Lama *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 Universitas Brawijaya, yang telah memberikan fasilitas dan izin dalam melaksanakan penelitian.
2. Dr. Khothibul Umam Al Awwaly, 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. Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., IPU., ASEAN Eng., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan arahan dan masukan selama proses penelitian dan pembuatan skripsi.
5. Prof. Dr. Ir. Moch Junus, MS selaku Dosen Penguji satu yang telah menguji dan memberikan saran terhadap penulisan skripsi.



6. Dr. Ir. Purwadi, MS selaku Dosen penguji dua yang telah menguji dan memberikan saran terhadap penulisan skripsi.
7. Kepala dan seluruh staff jajarannya UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban yang telah banyak membantu dan menyediakan fasilitas untuk kelancaran proses penelitian.
8. Anggota tim skripsi yang telah bekerja sama dengan baik dalam penelitian dan pembuatan skripsi.
9. Orangtua yang selalu memberikan doa dan dukungan baik moril maupun material sehingga Penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan baik.
10. Semua pihak yang turut membantu sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

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 Tuhan Yang Maha Esa senantiasa memberikan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua.

Malang, 2021

Penulis



PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA

Yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa penelitian skripsi yang saya lakukan merupakan penelitian yang dilaksanakan secara kelompok dibawah bimbingan Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., IPU., ASEAN Eng. dengan tema **“Pengaruh Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer”** dengan perincian sebagai berikut:

No	Judul	Penelitian Mahasiswa
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 (175050100111184)	Efek Suplementasi Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur



		Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post Thawing
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 Thawing
6	Adhe Tya Purnomo (175050101111118)	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris Aminomethan Terhadap Kualitas Post Thawing Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Suhu Berbeda
7	Aisyah Nur Arifiyanti (175050101111156)	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris-Aminomethan dan Lama Thawing 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 Thawing Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO
11	Kristina Delvina Gultom (175050100111186)	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Lama Thawing 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 Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer
14	Frando Gabriel Situmorang (175050107111108)	Pengaruh Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer

Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 3 juni 2021
Mahasiswa Peneliti

(Frando Gabriel Situmorang.)
NIM.175050107111108



**THE EFFECT OF STRAW POSITION ON LIQUID
NITROGEN VAPOR EQUILIBRATION AND
THAWING TIME ON THE QUALITY OF FROZEN
SPERM OF PO COW WITH ADDITIONAL GENISTEIN
IN THE DILUTER**

Frando Gabriel Situmorang¹⁾ and 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 : Frandsitumorang0@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of straw position with liquid nitrogen during nitrogen vapor equilibration and thawing time on the quality of frozen semen of PO cattle with the addition of the antioxidant genistein in tris aminomethane diluent. The second factor is thawing time (30 seconds, 60 seconds, 90 seconds). Data analysis used a Completely Randomized Design with 5 replications with ANOVA, if there were differences, it was continued with Duncan's multiple distance test. The variables observed included post thawing individual motility, post thawing viability, post thawing abnormalities and post thawing membrane integrity. The research method used is a laboratory experiment. The design pattern used is a completely randomized design (CRD) with a 3x3 factorial pattern. The first factor was the distance between



the straws and liquid nitrogen (5 cm, 10 cm, 20 cm). Based on the results of data analysis showed that there was no significant effect ($p>0.05$) of the straw height treatment factor during Nitrogen vapor equilibration on motility, viability, abnormality and membrane integrity, but there was a significant effect of the thawing time factor on motility, viability, and membrane integrity. The straw height factor and the thawing time factor also did not have an interaction with all variables. The results of the study concluded that the straw height 5cm and thawing time of 30 seconds showed the highest motility, viability and membrane integrity so that it could provide the best quality frozen PO cattle semen.

Keywords: Motility, Viability, Abnormality, ROS, Spermatozoa



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

Frando Gabriel Situmorang¹⁾ dan Suyadi²⁾

¹⁾Mahasiswa Jurusan produksi Ternak, Fakultas Peternakan,
universitas Brawijaya

²⁾Dosen Jurusan Produksi Ternak, fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya

e-mail: Frandositumorang0@gmail.com

RINGKASAN

Program pembibitan yang terarah dan terencana seperti perbaikan mutu genetik dengan manajemen inseminasi buatan (IB) yang baik dapat meningkatkan populasi sapi PO. Keberhasilan IB ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah kualitas semen yang digunakan. Salah satu faktor yang mempunyai pengaruh terhadap kualitas semen adalah bangsa dari pejantan yang ditampung. Semen segar yang sudah ditampung harus segera dievaluasi kuantitas dan kualitasnya. Semen yang sudah dievaluasi kemudian dicampur pengencer agar tidak menurun kualitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh posisis¹⁾ straw dengan nitogen cair pada saat *equilibrasi* uap nitrogen dan lama *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein*



pada pengencer *tris aminometan*. Penelitian dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru Tuban. Penelitian dilaksanakan mulai Maret - April 2021.

Semen yang digunakan pada penelitian ini memiliki motilitas individu $> 70\%$ dan motilitas massa 2+. Variabel yang diamati meliputi motilitas individu *post thawing*, viabilitas *post thawing*, abnormalitas *post thawing* dan integritas membran *post thawing*. Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola factorial 3x3. Faktor pertama adalah posisistraw terhadap nitrogen cair (5 cm, 10 cm, 20 cm). Faktor kedua adalah lama *thawing* (30 detik, 60 detik, 90 detik). Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 kali ulangan dengan ANOVA, apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji posisiberganda *duncan*.

Berdasarkan hasil analisis data menunjukkan tidak terdapat pengaruh yang nyata ($p>0.05$) dari faktor perlakuan ketinggian *straw* saat ekuilibrasi uap nitrogen terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membrane namun terdapat pengaruh yang nyata dari faktor lama *thawing* terhadap motilitas, viabilitas, dan integritas membran. Faktor ketinggian *straw* dan faktor lama *thawing* juga tidak memiliki interaksi terhadap semua variabel. Hasil ppenelitian dapat disimpulkan bahwa ketinggian *straw* 5cm dan lama *thawing* 30 detik menunjukkan motilitas, viabilitas dan integritas membrane paling tinggi sehingga dapat memberikan kualitas terbaik semen beku sapi PO.

Kata Kunci: Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas, ROS, Spermatozoa



DAFTAR ISI

ISI

Halaman

RIWAYAT HIDUP i

KATA PENGANTAR ii

PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA iv

ABSTRACT viii

RINGKASAN x

DAFTAR ISI xii

DAFTAR TABEL xv

DAFTAR GAMBAR xvi

DAFTAR LAMPIRAN xvii

DAFTAR SINGKATAN xviii

BAB I PENDAHULUAN 1

1.1. Latar Belakang 1

1.2. Rumusan Masalah 4

1.3. Tujuan 4

1.5. Kerangka Pikir 5

1.6. Hipotesis 8

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 9



2.1.Sapi PO.....	9
2.2.Inseminasi Buatan (IB).....	10
2.3.Koleksi dan Evaluasi Semen.....	11
2.3.1.Penampungan Semen.....	11
2.3.2.Evaluasi Kualitas Semen Segar.....	12
2.4.Pengenceran Semen.....	12
2.5. <i>Equilibrasi</i>	13
2.6.Penyimpanan Semen.....	14
2.7.Struktur Membran Sel Spermatozoa.....	15
2.8.Reaksi Biogemis Selama Penyimpanan.....	17
2.9.Antioksidan Genestein.....	18
2.10. <i>Thawing</i>	20
BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	23
3.1.Lokasi Pelaksanaan Penelitian.....	23
3.2.Materi Penelitian.....	23
3.3.Metode Penelitian.....	24
3.4. Prosedur Penelitian.....	25
3.4.1.Pelarutan Genistein.....	25
3.4.2.Pembuatan Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur.....	25
3.4.3.Penampungan Semen Sapi PO.....	26
3.4.5.Evaluasi Kualitas Semen Secara Makroskopis dan Mikroskopis.....	27





3.4.6. Pengenceran Semen	31
3.4.7. Ekuilibrasi Suhu Dingin	32
3.4.8. Ekuilibrasi Uap Nitrogen	32
3.4.9. <i>Freezing</i> (Pembekuan)	33
3.4.10. <i>Thawing</i>	33
3.5. Variabel Pengamatan	33
3.6. Analisis data	34
3.7. Batasan Istilah	35
3.8. Kerangka Operasional	37
BAB IV PEMBAHASAN	38
4.1. Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi PO	38
4.2. Motilitas Individu	41
4.3. Viabilitas	45
4.4. Abnormalitas	50
4.5. Integritas Membran	54
BAB V Kesimpulan dan Saran	59
5.1. Kesimpulan	59
5.2. Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Hasil Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi PO	38
Tabel 2. Rataan Motilitas Individu Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan Post Thawing.....	41
Tabel 3. Rataan Viabilitas Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan Post Thawing.....	46
Tabel 4. Rataan Abnormalitas Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan Post Thawing.....	50
Tabel 5. Rataan Evaluasi Integritas Membran Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan Post Thawing.....	54



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Kerangka Pikir	7
Gambar 2. Sapi Peranakan Ongole	9
Gambar 3. Struktur Membran Sel	17
Gambar 4. Metabolisme Spermatozoa	18
Gambar 5. Struktur kimia Genistein	19
Gambar 6. Reaksi antioksidan dengan radikal bebas	20
Gambar 7. Kerangka Operasional	37
Gambar 8. Diagram Batang Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan Post Thawing	42
Gambar 9. Viabilitas Spermatozoa	46
Gambar 10. Diagram Batang Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan Post Thawing	47
Gambar 11. Diagram Batang Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan Post Thawing	51
Gambar 12. Abnormalitas Spermatozoa	53
Gambar 13. Integritas Membran Spermatozoa	54
Gambar 14. Diagram Batang Persentase Integritas membran Spermtozoa Sapi PO pada Pemeriksaan Post Thawing	55



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Data semen segar sapi PO	68
Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu Tinggi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing	69
Lampiran 3. Analisa Viabilitas Tinggi Straw pada Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing	74
Lampiran 4. Analisa Abnormalitas Tinggi Straw pada Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing	79
Lampiran 5. Analisa Integritas Membran Tinggi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing	98



DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	= <i>Analysis Of Variance</i>)
ATP	= Adenosin Triphospat
BBIB	= Balai Besar Inseminasi Buatan
cm	= centi meter
DHA	= dekosa-hekساenoat
dkk	= dan kawan-kawan
et al	= et alii
FSH	= <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
HOS Test	= <i>Hypoosmotic Swealing Test</i>
IB	= Inseminasi Buatan
K	= Kalium
kg	= kilo gram
LH	= <i>Luteinizing Hormone</i>
MAE	= <i>Microwave Assisted Extraction</i>
Mg	= Magnesium
ml	= mili liter
Na	= Natrium
PO	= Peranakan Ongole
pH	= Potential of Hydrogen
PK	= Putih kekuningan
ROS	= Reactive Oxygen species
rpm	= rotasi per menit
sd	= standar deviasi
SDS	= <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
WIB	= Waktu Indonesia Barat
Zn	= Seng
µm	= micrometer
°C	= derajat celcius



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan sapi persilangan antara sapi Sumba Ongole yang telah lama berkembang di Pulau Jawa. Sapi PO rnernpunyai keunggulan seperti tahan terhadap suhu tinggi, toleran terhadap beberapa pakan yang mengandung serat kasar tinggi, dan memiliki produktivitas yang baik antara lain seperti penambahan bobot badan harian yang baik. Sapi PO sudah menjadi favorit para peternak Indonesia dikarenakan sapi PO yang memiliki rekam jejak yang yang menggeser sapi-sapi lokal yang ada di Indonesia menjadi favorit para peternak di Indonesia.

Citra sapi PO tersebut dapat menjadi sebuah ancaman pengurangan stok terhadap sapi PO. Kondisi ini harus diatasi dengan peningkatan stok sapi PO melalui program pembibitan yang terarah dan terencana seperti perbaikan mutu genetik dengan manajemen inseminasi buatan (IB) yang baik. Menurut Amin, Umbang dan Nibras. (2019) Salah satu yang dapat ditempuh untuk meningkatkan produksi daging yaitu dengan meningkatkan jumlah pemilikan sapi potong dengan mutu genetik ternak yang baik. Hal ini dapat dilaksanakan dengan menerapkan inseminasi buatan (IB) pada sapi potong.

Menurut Irianto, Asep dan Muladno (2020) Sistem perkawinan IB memiliki kelebihan, yaitu adanya pencatatan yang dapat dipantau berdasarkan semen yang disuntikkan pada ternak. Sistem IB juga mampu meminimalisir terjadinya inbreeding pada populasi. Program tersebut baik sebagai informasi awal untuk memberikan data yang lengkap mengenai



sistem perkawinan dan keberhasilan reproduksi ternak. Keberhasilan IB ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah kualitas semen yang digunakan. Salah satu faktor yang mempunyai pengaruh terhadap kualitas semen adalah penanganan semen beku.

Semen segar yang sudah ditampung harus segera dievaluasi kuantitas dan kualitasnya. Semen yang sudah dievaluasi kemudian dicampur pengencer agar tidak menurun kualitasnya. Tujuan penambahan pengencer adalah untuk memenuhi nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa dan agar spermatozoa tidak mengalami *cold shock* pada saat prosesi semen beku. Spermatozoa juga akan selalu bermetabolisme dan menghasilkan suatu reaksi yang bernama ROS (*Reactive Oxygen Species*). Apabila ROS berikatan dengan dinding sel spermatozoa maka spermatozoa akan bolong dan rusak. Menurut Putri. (2015). ROS menyebabkan kerusakan pada DNA spermatozoa dan menyebabkan peningkatan apoptosis spermatozoa sehingga akan terjadi penurunan kualitas spermatozoa.

Kerusakan spermatozoa yang diakibatkan oleh ROS dapat diatasi dengan penambahan antioksidan. Antioksidan dalam hal ini berperan menghambat ROS mengikat dengan dinding sel spermatozoa. Antioksidan mempunyai sifat polaritas yang tinggi karena banyak mengandung gugus hidroksil sehingga mudah larut dalam air oleh karena itu, antioksidan mampu bereaksi dan menetralkan radikal bebas, baik dari segi kerusakan DNA maupun ROS yang berlebihan. Genistein merupakan salah satu contoh antioksidan. Genistein merupakan isoflavon dalam bentuk aglikon (non-gula) yang biasa terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti contoh kedelai. Rumus kimia genistein adalah $C_{15}H_{10}O_5$. Menurut



Astuti. (2008) Genistein dapat mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil kemudian terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif. Genestein juga dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung, dalam hal ini genestein dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal hidrosil dan peroksil dan menstabilkan kedua radikal tersebut, serta membentuk radikal flavonoid yang relatif stabil.

Equilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menyesuaikan diri sebelum dilakukan pembekuan. Equilibrasi dibagi menjadi 2 yaitu equilibrasi suhu dingin (gliserol) dan equilibrasi suhu beku (Nitrogen cair). Equilibrasi suhu dingin dilakukan dengan cara menempatkan *straw* pada temperatur 5 derajat celsius selama empat jam. Berdasarkan Peraturan Direktur Jenderal Peternakan Nomor :1220/HK.060/F/12/2007 Tentang Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku menunjukkan proses equilibrasi nitrogen cair dilakukan dalam storage kontainer, *straw* disusun dirak dan dilakukan 2-4 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 5-9 menit. Setelah semen mengalami penyimpanan pada suhu beku, semen harus melalui proses thawing sebelum digunakan untuk inseminasi buatan (IB). Thawing dilakukan untuk mencairkan kembali semen beku yang sudah mengalami pembekuan selama penyimpanan. Metode thawing di Indonesia sangat beragam pula, untuk menghasilkan kualitas semen yang baik Direktorat Jenderal Peternakan membuat standarisasi metode *thawing* yaitu penggunaan air suhu 37derajat Celcius selama 30 detik karena pada suhu ini sama dengan suhu fisiologis ternak dan sesuai standart Standart Operasional Pekerjaan (SOP) Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB).



Uraian diatas menjadi dasar dilakukannya penelitian ini agar mengetahui apa pengaruh posisi *straw* terhadap nitrogen cair pada ekuilibrasi nitrogen cair dan lama *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer *tris aminometan* kuning telur.

1.2. Rumusan Masalah

- Apakah interaksi antara posisi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen cair dan lama *thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer ?
- Apakah posisi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen cair berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer ?
- Apakah lama *thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer ?

1.3. Tujuan

- Untuk mengetahui pengaruh interaksi antara posisi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen cair dan lama *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer
- Untuk mengetahui pengaruh posisi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen cair terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer
- Untuk mengetahui pengaruh lama *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan *genistein* pada pengencer

1.4. Kegunaan

Kegunaan yang diharapkan dari penelitian ini:

- Dapat menjadi sumber informasi mengenai posisi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen cair dan lama *thawing* yang tepat dalam mempertahankan kualitas semen sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.
- Untuk mengetahui urutan perbedaan antara faktor posisi *straw* dengan lama *thawing* sesuai analisa data yang digunakan

1.5. Kerangka Pikir

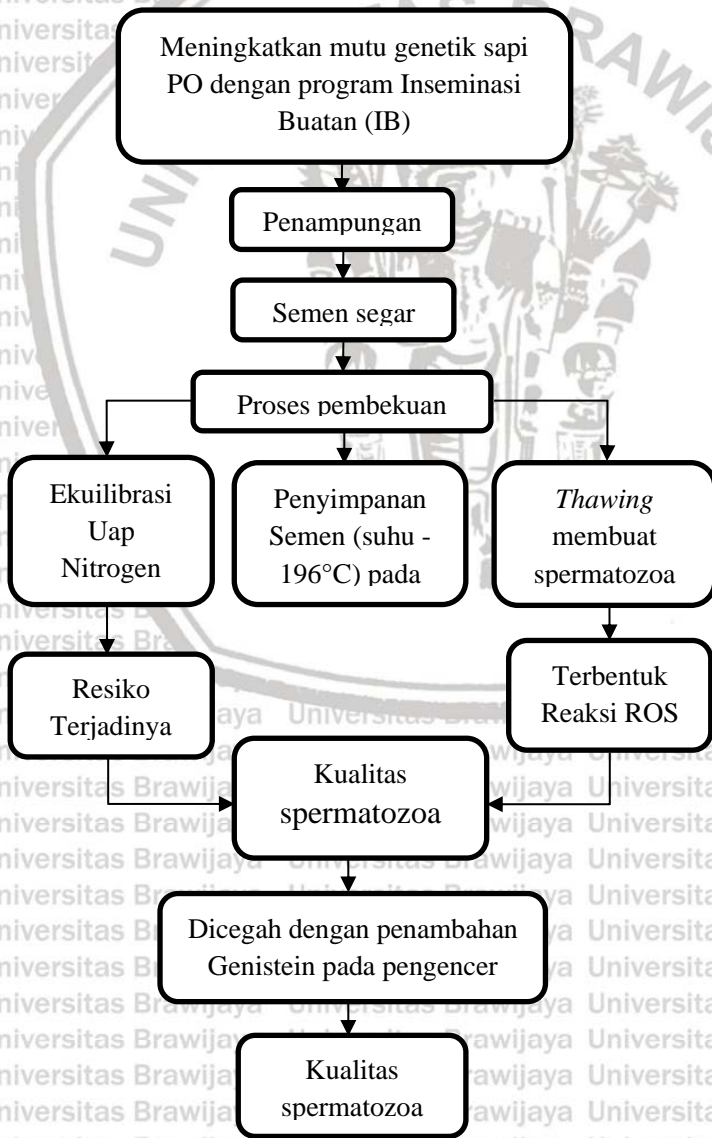
Sapi Peranakan Ongole (PO) sudah menjadi favorit para peternak di Indonesia. Citra sapi PO yang sudah menjadi favorit ancaman pengurangan stok. Hal ini harus diatasi dengan pengembangan sapi PO dengan manajemen yang baik. Cara pengembangan sapi PO dapat dengan menerapkan manajemen inseminasi buatan yang baik. Keberhasilan inseminasi buatan dipengaruhi banyak faktor seperti pejantan penghasil spermatozoa dan kualitas semen beku

Identifikasi pejantan menjadi sangat penting untuk menghasilkan kualitas semen segar yang baik. Pejantan Sapi PO yang lolos identifikasi kemudian dibawa ke kandang khusus untuk dilakukan penampungan semen. Semen yang sudah ditampung harus langsung dievaluasi kualitasnya baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Semen yang sudah dievaluasi kemudian harus melewati pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran berguna sebagai media tempat spermatozoa hidup, agar dapat melindungi spermatozoa terhadap efek bahaya pendinginan cepat (*cold shock*) dan perlindungan terhadap efek samping metabolisme spermatozoa.

Spermatozoa akan selalu bermetabolisme dan menghasilkan suatu reaksi yang bernama ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS menyebabkan kerusakan pada DNA spermatozoa dan menyebabkan peningkatan apoptosis spermatozoa sehingga akan terjadi penurunan kualitas spermatozoa. Maka itu perlu penambahan antioksidan untuk menangkali reaksi oksidasi. Genistein merupakan salah satu antioksidan yang dapat menangkali reaksi oksidasi dengan cara mendonorkan ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil kemudian terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif.

Ekuilibrasi uap nitrogen dilakukan dengan menempatkan straw diatas permukaan nitrogen cair. Hal ini bertujuan untuk menghindari *cold shock* pada semen saat dilakukannya tahap selanjutnya yaitu penyimpanan pada suhu -196°C. Semen beku yang sudah disimpan harus melalui proses *thawing* terlebih dahulu agar dapat digunakan untuk inseminasi buatan. *Thawing* merupakan proses pencairan kembali semen beku. Menurut Rofingi, M., Faruq I. dan Zulfanita. (2020) *thawing* dengan durasi selama 90 detik dengan suhu 27°C dapat mencairkan semen beku dengan sempurna dengan motilitas 50%.





Gambar 1. Kerangka Pikir



1.6. Hipotesis

- Interaksi antara Posisi *straw* pada ekuilibrase uap nitrogen cair dan lama *thawing* berpengaruh dan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa
- Posisi *straw* pada ekuilibrase uap nitrogen cair berpengaruh dan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa.
- Lama *thawing* sesuai perlakuan dapat mencairkan semen beku dengan sempurna dan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi PO

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan sapi persilangan antara sapi Sumba Ongole yang telah lama berkernbang di Pulau Jawa. Menurut Astuti (2004), sejak pembentukannya hingga menjadi suatu bangsa sapi yang mantap, sapi Peranakan Ongole (PO) memiliki karakteristik morfologi yang mudah dikenali. Keunggulan sapi Peranakan Ongole (PO) yaitu : daya adaptasi terhadap iklim tropis yang tinggi sangat baik, tahan terhadap panas, tahan terhadap gigitan nyamuk dan caplak, serta toleran terhadap pakan yang berserat kasar tinggi.

Profil genetik sapi PO dapat diketahui dari tingkat keturunan atau yang biasa dikenal dengan nilai heretabilitas dan juga dari nilai pemuliaannya. Untuk mengetahui profil genetiknya digunakan analisa bobot badan dan ukuran statistik vital pada keturunannya. (Supartini, Nonok dan Hariadi Darmawan. 2014)



Sumber: www.duniasapi.com
Gambar 2. Sapi Peranakan Ongole

Nilai heritabilitas dan nilai repeabilitas bobot lahir termasuk dalam kategori tinggi. Peringkat sapi PO jantan berdasarkan nilai pemuliaannya dapat digunakan sebagai dasar seleksi sapi PO jantan sebagai pejantan dan atau sumber semen untuk disebarakan kepada stakeholder yang membutuhkan atau dapat digunakan sendiri di UPBS. (Adinata, Yudi. 2013)

Upaya peningkatan populasi sapi potong dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya adalah meningkatkan mutu genetik melalui seleksi dan efisiensi reproduksi melalui Inseminasi Buatan (IB) dan penanganan gangguan reproduksi. Inseminasi buatan adalah salah satu teknologi reproduksi yang mampu meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam waktu singkat dapat menghasilkan anak dengan kualitas yang lebih baik dari induknya dalam jumlah yang besar dengan memanfaatkan pejantan unggul. (Susilawati. 2013)

2.2. Inseminasi Buatan (IB)

Inseminasi buatan sebagai teknologi merupakan suatu rangkaian proses yang terencana dan terprogram karena akan menyangkut kualitas genetik ternak dan meningkatkan populasi sehingga diharapkan dapat menghasilkan keturunan yang baik di masa yang akan datang. (Widjaja, Akhdiat, Purwasih. 2017)

Inseminasi Buatan merupakan program yang telah dikenal oleh peternak sebagai teknologi reproduksi ternak yang efektif. Secara umum teknik IB terdiri dari dua metode yakni metode inseminasi vaginaskop atau spekulum dan metode rectovaginal. (Susilawati. 2011)

Faktor-faktor yang memengaruhi IB adalah fertilitas, keterampilan inseminator, deteksi berahi, waktu inseminasi, jumlah spermatozoa, dosis inseminasi dan komposisi semen serta beberapa hal yang dapat mempengaruhi IB adalah kondisi



ternak, tingkat pendidikan peternak, pengalaman melahirkan untuk sapi, kualitas sperma yang baik dan tenaga inseminator yang berpengalaman. (Putri, Tria Deviana, Tongku Nizwan Siregar, Cut Nila Thasmi, Juli Melia, Mulyadi Adam. 2020)

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa performan reproduksi sapi PO lebih baik dari pada sapi PL. Nilai S/C PO ($1,42 \pm 0,70$ kali) dan S/C PL ($1,62 \pm 0,73$ kali), DO PO ($107,34 \pm 32,38$ hari) dan PL ($130,3 \pm 43,78$ hari), CI PO ($399,04 \pm 39,97$ hari) dan PL ($416,04 \pm 44,09$ hari), CR PO (70%) dan PL (52%), IF PO (66,96) dan PL (26,80). (Akriyono, Muhammad Luqman, Sri Wahyuningsih dan M. Nur Ihsan. 2017)

2.3. Koleksi dan Evaluasi Semen

2.3.1. Penampungan Semen

Proses penampungan dilakukan dengan menggunakan vagina buatan dan peralatan serta persiapan ternak pemancing. Penampungan semen dilakukan kira-kira pukul 07.00 pagi. (Khairi, Fitrah, Anis Mukhtiani, dan Yon Supri Ondho. 2014)

Volume semen tergantung pada spesies ternak, sapi dan domba umumnya mempunyai volume ejakulat rendah, sedangkan semen babi dan kuda mempunyai volume ejakulat yang tinggi. Dari jenis ternak tersebut, volume semen juga dipengaruhi oleh bangsa, bobot badan, umur, pakan dan frekuensi penampungan. (Khairi. 2016)

Metode penampungan semen segar dengan alat elektroejakulator menghasilkan semen dengan volume yang lebih tinggi daripada dengan vagina buatan. Berdasarkan pengalaman, peningkatan volume berpengaruh terhadap warna semen yang dihasilkan sehingga cenderung berwarna bening, serta konsistensi semen yang lebih encer. (Ratnawati, Antari dan Pamungkas. 2020)

2.3.2. Evaluasi Kualitas Semen Segar

Evaluasi semen setelah penampungan terbagi menjadi 2, yaitu evaluasi makroskopis (volume, warna, pH, konsistensi) dan evaluasi mikroskopis (motilitas, mortalitas, normalitas, konsentrasi). (Dewi, Ondho dan Kurnianto. 2012)

Motilitas merupakan daya gerak individu sperma. Motilitas spermatozoa sapi dibawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik. Kebanyakan pejantan fertil mempunyai 50-80% spermatozoa motil aktif progresif. (Azzahra, Setiatin dan Samsudewa. 2016)

2.4. Pengenceran Semen

Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi serta menyediakan lingkungan yang sesuai bagi spermatozoa. Selain itu pengencer juga harus mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat suhu, dan dibuat dari bahan yang tidak mahal serta ketersediaanya mudah didapatkan. (Muhammad, Dedi, Nurul Isnaini, Kuswati, Aulia Puspita Anugra Yekti, Aryogi, Muhammad Lutfi, H.Y. Lukman, Trinil Susilawati. 2019) Keberadaan kuning telur pada pengencer tris aminomethan dapat memberikan perlindungan terhadap spermatozoa pada proses pendinginan, namun dapat menimbulkan efek toksik pada suhu tinggi. (Sulistyowati, Deny, Muhammad Azharil Faris, Aulia Puspita Anugra Yekti, Sri Wahjuningsih dan Trinil Susilawati. 2018)

Rata-rata persentase daya hidup spermatozoa sapi pada jam ke-0 dengan menggunakan semen segar dan dengan penambahan pengencer tris kuning telur masing-masing adalah 62% dan 52%. Sementara di jam ke-1 masing-masing adalah 30% dan 40%. Hal ini diduga karena pada semen segar atau semen tanpa pengencer masih mengandung nutrisi yang

dibutuhkan oleh spermatozoa untuk bertahan hidup sampai waktu tertentu, sedangkan setelah diberi pengencer persentase hidupnya rendah karena dimungkinkan spermatozoa mengalami adaptasi terhadap perbedaan kondisi pada pengencer. (Hartanti, Setiatin dan Sutopo. 2012)

Pembuatan pengencer tris-kuning telur dengan menimbang 3,87 g tris aminometan; 2,17 g asam sitrat; 1,56 g fruktosa, selanjutnya dicampur dan dilarutkan menggunakan aquabidessampai volumenya 100 ml, selanjutnya ditambahkan 20 ml kuning telur, kemudian ditambahkan 0,3 penisilin, 100 mg streptomisin, dan 6,5 ml gliserol dan diaduk sampai homogen. (Suharyati dan Madi hartono. 2011)

2.5. *Equilibrasi*

Spermatozoa diadaptasikan dengan gliserol pada suhu dingin (3-5°C). Proses ini dikenal juga dengan ekuilibrasi. Penambahan gliserol dalam pengencer melindungi spermatozoa terhadap efek- 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 (cooling rate). (Hanifi, Hirzi, Moh. Nur Ihsan dan Trinil Susilawati. 2016)

Pada penelitian Aini, Kurotul, Sri Suharyati dan Madi Hartono. (2014) Persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi mengalami penurunan dari motilitas semen segar 75% menjadi 50%. Proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi ini dapat bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa. Kemudian saat



Ulangan	Posisi Straw (cm)				
	2	4	6	8	10
1	40%	50%	40%	50%	50%
2	40%	50%	50%	40%	50%
3	40%	50%	50%	50%	40%
4	40%	50%	50%	40%	40%
Rataan	40%	50%	48%	45%	45%

Ekuilibrasi uap Nitrogen didapatkan data seperti berikut:

Hasil analisis ragam (Tabel 1) menunjukkan bahwa perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah Ekuilibrasi uap Nitrogen. Pada proses Ekuilibrasi uap Nitrogen, spermatozoa sedang beradaptasi dengan suhu dingin sebelum dimasukkan ke dalam N_2 cair ($-196^{\circ}C$) 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 Ekuilibrasi uap Nitrogen.

2.6. Penyimpanan Semen

Semen beku harus disimpan dalam temperatur dan kondisi tertentu untuk mempertahankan spermatozoa agar tetap hidup. Perubahan temperatur lingkungan akan mempengaruhi daya hidup spermatozoa, temperatur terlalu tinggi atau terlalu rendah akan merusak pertumbuhan dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi. Penyimpanan semen beku dalam nitrogen cair $-196^{\circ}C$ lebih baik dibanding pada dry ice dengan temperatur $-79^{\circ}C$ karena pada temperatur $-79^{\circ}C$ terjadi



perubahan pada sperma dan terbentuknya kristal elektrolit. (Wulandari, dan Surya. 2014)

Semakin lama waktu penyimpanan, abnormalitas makin meningkat. Selama satu menit penyimpanan nilai persentase abnormalitas naik sebesar 0,291%. Hasil penelitian juga menunjukkan adanya kerusakan abnormalitas sekunder yang ditemukan yaitu adanya ekor yang putus, kepala putus dan membran rusak. Abnormalitas spermatozoa dapat diakibatkan oleh terjadinya perubahan fisik media hidupnya, berupa perubahan tekanan osmotik. Peristiwa tersebut dapat menyebabkan perubahan struktur spermatozoa seperti bentuk spermatozoa dengan ekor yang bengkok atau kepala terlepas. (Varasofiari, Setiatin dan Sutopo. 2013)

2.7. Struktur Membran Sel Spermatozoa

Astuti, Muchtadi, Astawan, Purwantara dan Wresdiyati (2009) menyatakan bahwa membran plasma mitokondria spermatozoa tersusun oleh asam lemak tidak jenuh yang bersifat sangat rentan terhadap oksidasi. Menurut Susmiarsih (2010) mitokondria adalah organela yang terletak di dalam sitoplasma sel eukariota. Struktur organela ini berupa kantung yang selaputi oleh dua membran yaitu membran luar dan membran dalam. Membran luar mengandung sejumlah protein transpor (yang disebut porin) dan enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis lipid dan metabolisme mitokondria. Membran dalam memiliki struktur melekok, melipat ke bagian matriks mitokondria, yang dikenal sebagai krista. Struktur melekok ini sangat membantu dalam meningkatkan luas permukaan membran dalam sehingga meningkatkan kemampuannya menghasilkan ATP. Pada bagian luar membran plasma sel terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid)

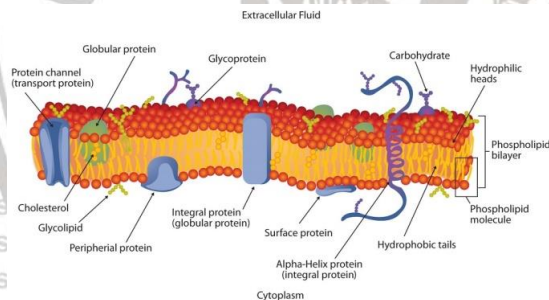


atau dengan protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (Suohoka dkk. 2009).

Astuti dkk, (2009) melaporkan bahwa sekitar 50% asam lemak tidak jenuh yang ditemukan dalam sebuah sel spermatozoa adalah deksa-heksaenoat (DHA) yang bersifat sangat rentan terhadap oksidasi dan mudah mengalami kerusakan akibat reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh sehingga meningkatkan peroksidasi lipida. Pernyataan tersebut sesuai dengan Bebas dan Desak (2015) yang menyatakan bahwa lipid terdapat pada plasma semen dan pada spermatozoa. Komposisi lipid dalam sel spermatozoa bersifat unik terdiri dari *poly unsaturated fatty acids* (PUFA) berantai panjang yang mempunyai peran penting dalam fungsi membran sel dan bioaktivasi biomolekul. Kadar PUFA yang tinggi dalam spermatozoa membuatnya sangat mudah mengalami kerusakan akibat adanya peroksidasi berupa serangan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS).

Bebas dan Desak (2015) melaporkan bahwa radikal bebas menyerang dan mengambil elektron dari asam lemak tak jenuh yang banyak menyusun fosfolipid membran plasma sel spermatozoa, jika tidak dicegah akan terjadi reaksi otokatalitik (reaksi rantai). Menurut Sukmaningsih, Ermayanti, Wiratmini dan Sudatri (2011) bila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh ganda dalam membran sel, akan terjadi reaksi peroksidasi lipid dari membran sel tersebut yang mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Astuti dkk, (2009) yang melaporkan bahwa 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. Kerusakan pada lipid ditiap oksidasi dan pada proses dasar oksidasi DNA sel akan mengganggu integritas sel, sehingga akan menimbulkan kematian pada sel (Putra., 2014)



(Ophardt C., 2017)

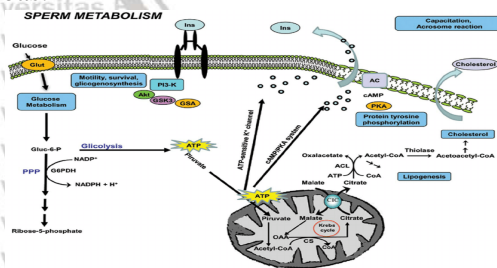
Gambar 3. Struktur Membran Sel

2.8. Reaksi Biogemis Selama Penyimpanan

Spermatozoa yang terlalu lama terpapar oksigen menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang menghasilkan peroksidasi lipid, sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Peningkatan radikal bebas berupa spesies oksigen reaktif (ROS) dapat merusak struktur membran mitokondria spermatozoa sehingga menginduksi terjadinya apoptosis yaitu kematian sel secara fisiologis karena adanya perubahan morfologi maupun biokomia sel. (Salim, Muhammad Ade, Trinil Susilawati dan Sri Wahyuningsih. 2012)

Metabolisme spermatozoa dapat mempengaruhi daya hidup spermatozoa karena pada spermatozoa yang memiliki

aktivitas metabolisme tinggi menghasilkan asam laktat yang tinggi yang dapat membunuh spermatozoa. (Prastika, Zeni, Suherni Susilowati, Bodhi Agustono, Erma Safitri, Faisal Fikri, Ragil Angga Prastiya. 2018). Christijanti dkk, (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.



(Cappello et al, 2012)

Gambar 4. Metabolisme Spermatozoa

2.9. Antioksidan Genestein

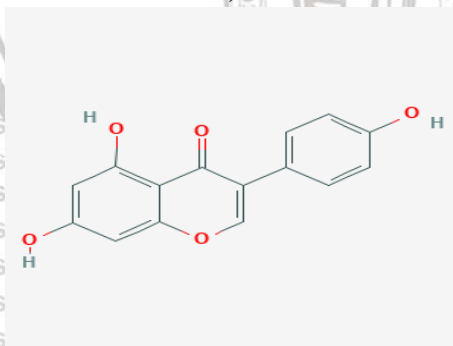
Antioksidan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid, dengan cara menunda atau mencegah terjadinya reaksi outoksidasi

radikal bebas dalam oksidasi lipid. (Bebas, Wayan, Made Kota Budiasa, Ika Yuni Astutik. 2015)

Pada penambahan 3,50 mM Antioksidan dapat lebih banyak menangkap reaksi radikal peroksida lipid ($R\bullet$) sehingga tidak terjadi reaksi radikal yang berkelanjutan. Reaksi penangkapan radikal peroksidasi lipid oleh antioksidan :



Reaksi tersebut menghasilkan antioksidan tereduksi ($A\bullet$) namun tidak memiliki cukup energi untuk membentuk reaksi radikal yang berbahaya. (Savitria, Faradina Kusuma, Sri Suharyatib dan Siswanto. 2014)

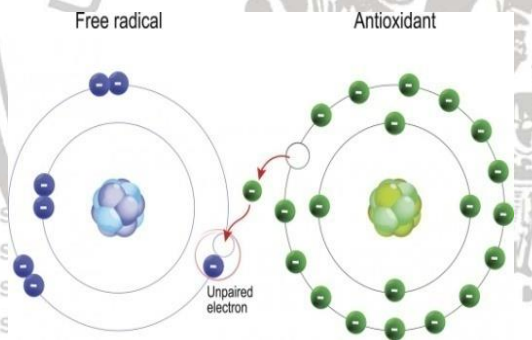


(Pubchem. 2004)

Gambar 5. Struktur kimia Genistein

Genistein merupakan salah satu contoh antioksidan. Genistein merupakan isoflavon dalam bentuk aglikon (non-gula) yang biasa terdapat pada tanaman kacang-kacangan seperti contoh kedelai. Rumus kimia genistein adalah $C_{15}H_{10}O_5$. Genistein dapat mencegah kerusakan sel akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil

kemudian terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif. Genestein juga dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung, dalam hal ini genestein dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal hidroksil dan peroksil dan menstabilkan kedua radikal tersebut, serta membentuk radikal flavonoid yang relatif stabil. (Astuti, 2008)



(Villines., 2017)

Gambar 6. Reaksi antioksidan dengan radikal bebas

2.10. *Thawing*

Pada penelitian Rofingi, M., Faruq I. dan Zulfanita. (2020). menyatakan bahwa

Perlakuan	Motilitas (%)		
	Minimum	Maksimum	Rerata ± Sd
Lama Thawing			
30 detik	0%	30%	22.50 ± 13.33 ^a
60 detik	30%	40%	35.00 ± 5.13 ^c
90 detik	35%	50%	43.75 ± 5.59 ^e
120 detik	10%	40%	32.50 ± 13.33 ^{bc}
150 detik	40%	40%	40.00 ± 0.00 ^d

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P \leq 0.05$)

Berdasarkan data diatas diketahui bahwa lama thawing dengan waktu yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan (T0;T1, T0;T2, T0;T3, T0;T4, T1;T2, T1;T4, T2;T3, T2;T4 dan T3;T4) terkecuali T1;T3 yang tidak berbeda nyata atau $P \geq 0.05$. Evaluasi motilitas sperma Post Thawing adalah salah satu parameter yang banyak digunakan untuk menentukan kualitas semen sapi yang akan digunakan untuk inseminasi buatan. Syarat minimal motilitas individu semen Post Thawing agar semen dapat digunakan dalam inseminasi buatan adalah 40 % (SNI, 2017). Berdasarkan rerata persentase motilitas T2 yaitu lama thawing 90 detik pada suhu lingkungan yang saat itu menunjukkan suhu 26,95°C menunjukkan persentase tertinggi yaitu 43,75 + 5,59%. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan lama Thawing 90 detik dengan suhu 26,95°C telah mencairkan spermatozoa secara sempurna, sedangkan persentase motilitas terendah yaitu pada TO yaitu lama Thawing 30 detik dengan suhu lingkungan 26,95°C, hal ini disebabkan oleh thawing yang singkat sehingga spermatozoa belum mencair secara sempurna.

Menurut penelitian Ghopa, E., Dirwan M. dan Dance F. (2019) yang menyatakan bahwa

Viabilitas Spermatozoa (%)

Perlakuan		Ulangan					Rata-rata/SD
Suhu Thawing	Lama Thawing	U1	U2	U3	U4	U5	
32°C	30 detik	66	65	66	67	69	66.6 ± 1.5
35°C	30 detik	69	68	69	68	69	68.6 ± 0.5



38°C	30 detik	72	72	72	72	73	72.2 ± 0.4
41°C	30 detik	48	49	48	47	47	47.8 ± 0.8

Suhu 35°C selama 30 detik memiliki nilai presentasi yaitu 68.82%±1.45 dan yang suhu 32°C selama 30 detik yaitu 67.02%±0.74. Persentase spermatozoa hasil penelitian, menunjukkan bahwa suhu 41°C dengan lama thawing 30 detik tidak layak digunakan untuk proses thawing IB, hal ini dikarenakan persentase viabilitasnya tidak lebih dari 50%, viabilitas semen beku minimal 60% sampai 75%. Persentase hidup spermatozoa ditentukan oleh membran plasma yang utuh, membran plasma spermatozoa berfungsi untuk melindungi organel spermatozoa dan transport elektrolit untuk metabolisme spermatozoa. Metabolisme spermatozoa dapat mempengaruhi daya hidup spermatozoa karena pada spermatozoa yang memiliki aktivitas metabolisme yang tinggi menghasilkan asam laktat yang tinggi yang dapat membunuh spermatozoa.



BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru Tuban. Penelitian dilaksanakan mulai Maret - April 2021.

3.2. Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua sapi PO dengan *ear tag* 0076 dan 1102 yang berada di UPT PT dan HMT karangwaru Tuban. Masing-masing sapi tersebut berumur 6 tahun 6 bulan (bobot badan 625 kg) dan 2 tahun 11 bulan (bobot badan 377 kg). Sapi PO dipelihara dengan sistem kandang individu *head to head*. Sapi PO diberi pakan hijauan dan konsentrat sebanyak 10% dari bobot badan. Penampungan semen dilakukan oleh tenaga ahli dari BBIB Singosari, Malang. Penampungan Semen sapi PO diambil dengan menggunakan vagina buatan. Setiap seminggu semen sapi PO ditampung sebanyak 1-2 kali. Persyaratan semen segar yang digunakan yaitu semen yang memiliki motilitas individu $\geq 70\%$ dan motilitas masaa 2+.

Alat dan Bahan :

a. Pelarutan Genistein

Alat : beaker glass, mikropipet, mikrotube, freezer

Bahan : genistein, aquadest

b. Pembuatan pengencer Tris Aminomethan Kuning

Telur :

Alat : Tabung erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, aluminium foil, eggs parator, *magnetic stirrer* (Labinco), timbangan analitik, spuit,

Bahan : Kuning telur , *tris Aminomethane* (MERCK)

Bahan : Na Sitrat 0,31g, D-Fructose 0,569 g,
Aquabides 50 ml

c. Penampungan Semen

Alat : Satu unit vagina buatan, thermometer
(Arthermo – Italy) , tabung penampungan semen,
gunting, kandang jepit, karet pengikat

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

d. Evaluasi Kualitas Spermatozoa:

Alat : Mikroskop (Olympus – CX 21), object glass (Sail – China), cover glass (Sail-China), tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose, aluminium foil, pH meter atau kertas lakmus, water bath, pipet erythrocyte, haemocytometer (Neubauer)

Bahan : Semen sapi PO, eosin negrosin, larutan hiposmotik

e. Pembekuan

Alat : refrigerator (Aqua Japan), container, straw, rak straw

bahan : Semen sapi PO + Pengencer

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola factorial 3x3. Faktor pertama adalah posisi *straw* pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair (5 cm, 10 cm, 20 cm). Faktor kedua adalah lama *thawing* (30 detik, 60 detik, 90 detik). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pelarutan Genistein

Pelarutan genistein 10mg dilakukan sebagai berikut:

1. Dilarutkan genistein dengan 7,4 ml DMSO (secara bertahap dalam botol genistein), diletakkan dalam beaker glass
2. Dilarutkan larutan genistein dengan aquadest hingga mencapai 74ml
3. 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
4. Dibekukan genistein dan disimpan pada freezer hingga saat akan digunakan.

3.4.2. Pembuatan Pengencer Tris Aminomethan 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

3.4.3. Penampungan Semen Sapi PO

Penampungan semen dilakuakn 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 kali dengan 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, integritas 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 diikut 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

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 refrigerator. Kemudian dilakukan evaluasi motilitas massa dan individu dengan meneteskan satu tetes semen diatas object glass dan ditutup dengan cover glass, diamati dengan mikroskop perbesaran 200x.

3.4.8. Ekuilibrase Uap Nitrogen

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 perlakuan selama 30 detik, 60 detik, dan 90 detik pada suhu 37°C . Kemudian dilakukan pengamatan mengenai kualitas spermatozoa.

3.5. Variabel Pengamatan

Variabel Independen (Bebas) :

1. Tinggi posisi straw pada ekuilibrasi nitrogen cair
2. Metode *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 :

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

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 :

$$\% \text{abnormalitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

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)

$$\% \text{Integritas Membran} = \frac{\text{jumlah spermatozoa ekor melingkar}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.6. Analisis data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam dengan Rancangan acak Lengkap

(RAL) pola factorial 3 x 3. Jika data menunjukkan perbedaan maka dilanjutkan dengan ujiposisi *Duncan*. Model matematis :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \sum_{ij}(k)$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan pada satuan percobaan ke-k (1,2,3,4,5) yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-i (5cm,10cm,20cm) dari faktor A dan taraf ke-j (30s, 60s,90s) dari faktor B

μ = Nilai rata-rata

A_i = Pengaruh perlakuan faktor A (posisi straw) pada taraf ke-i (5cm,10cm,20cm)

B_j = Pengaruh perlakuan faktor B (lama thawing) pada taraf ke-j (30s, 60s,90s)

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor A ke-i (5cm,10cm,20cm) dan faktor B ke-j (30s, 60s,90s)

$\sum_{ij}(k)$ = Pengaruh galat perlakuan ke-I dan ke-j pada satuan percobaan ke-k (1,2,3,4,5)

Selanjutnya apabila perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda *Duncan* (UJBD)

3.7. Batasan Istilah

Abnormalitas : Kelainan pada spermatozoa

Cold shock : Kejutan dingin ketika mengalami penurunan suhu yang signifikan

Thawing : Proses pencarian kembali spermatozoa yang mengalami penyimpanan (pembekuan)

Viabilitas : Persentase hidup spermatozoa

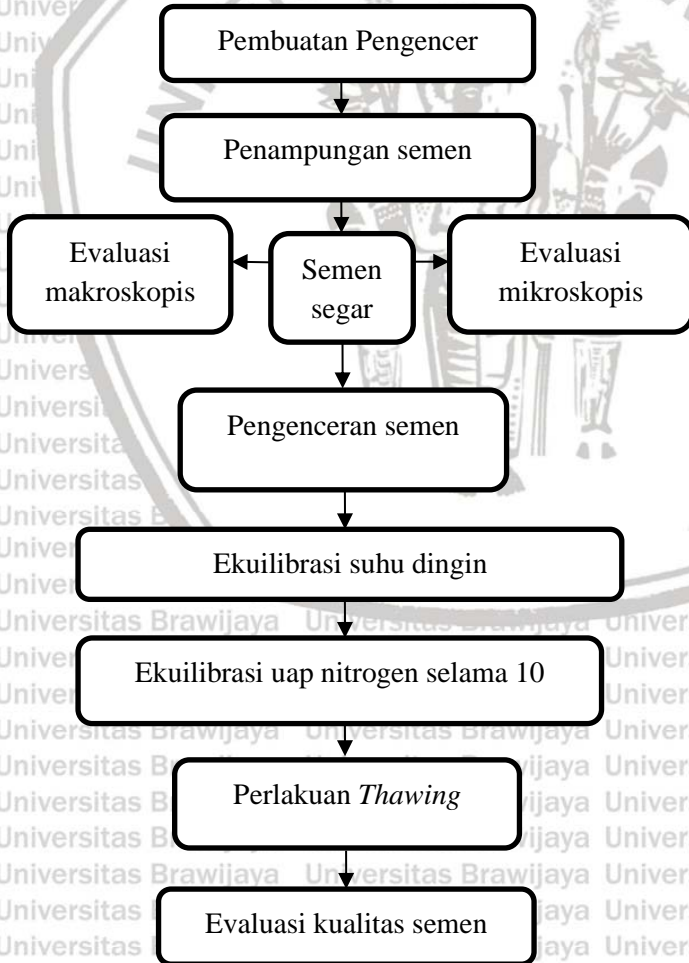


Reactive Oxygen Species: Reaksi radikal bebas yang berupa oksidasi dan turunannya yang sangat reaktif

Straw : Wadah spermatozoa saat pembekuan pada container nitrogen cair



3.8. Kerangka Operasional



Gambar 7. Kerangka Operasional



BAB IV

PEMBAHASAN

4.1. Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi PO

Setelah penampungan semen sapi po dilakukan, semen segar sapi PO langsung di uji secara makroskopis dan secara mikroskopis. Uji makroskopis yaitu pengamatan yang meliputi: warna, bau, konsistensi, pH, dan volume. Uji mikroskopis pengamatan yang meliputi: Motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi.

Hasil dari uji makroskopis dan uji mikroskopis semen segar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 1. Hasil Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi PO

Karakteristik Kualitas	Rata-rata \pm SD
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Konsistensi	Sedang
pH	6,8 \pm 0
Volume (ml)	5 \pm 0
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	82,5 \pm 3,54
Viabilitas(%)	93,88 \pm 4,48
Abnormalitas(%)	1,83 \pm 0,78
Konsentrasi(10 ⁶ /ml)	1205 \pm 148,49
Integritas Membran (%)	89,87 \pm 3,46

Data semen segar diatas diperoleh dari 2 kali penampungan dengan sapi yang berbeda yaitu sapi eartag 0076



dengan umur 6 tahun 6 bulan (396 kg) dan sapi eartag 1102 dengan umur 2 tahun 11 bulan (338 kg)

Berdasarkan tabel 3. warna semen segar yang ditampung adalah berwarna putih kekuningan (krem) sedangkan baunya khas semen. Menurut pendapat Wijayanto, Ondho, dan Setiatin (2019). Semen sapi yang normal yaitu berwarna seperti air susu, krem keputihan dan keruh. Bahwa umumnya semen sapi berwarna krem atau hampir putih susu dan berbau khas atau merangsang. Semen yang normal pada umumnya memiliki bau amis khas disertai dengan bau dari hewan tersebut.

Konsistensi atau kekentalan semen pada penelitian ini tergolong sedang. Menurut Sulistiawati (2013) konsistensi semen berkaitan dengan konsentrasi spermatozoa, konsistensi semen dinilai sedang apabila mengandung 1.000×10^6 - 1.500×10^6 spermatozoa /ml semen. Hasil pemeriksaan konsentrasi spermatozoa didapat rata-rata sebesar $1205 \pm 148,49 \times 10^6$ spermatozoa / ml semen.

Rataan derajat keasaman atau pH semen segar yang didapatkan pada saat penelitian adalah sebesar $6,8 \pm 0$. Hasil pH tersebut sebanding dengan pendapat Nursyam (2007) yang mengatakan bahwa pH semen yang berkualitas baik adalah 6,8-6,7.

Rataan volume semen Sapi PO yang diperoleh sebanyak 5 ± 0 ml. Hasil tersebut berada dalam kisaran kurang normal, karena menurut Feradis (2010) volume semen dalam sekali ejakulat berkisar 5-8 ml. Menurut Evans dan Savitri, Suharyati, dan Siswanto (2014) banyaknya volume semen yang dihasilkan per ejakulasi akan menentukan tingkat pengenceran untuk keperluan inseminasi buatan.

Motilitas massa semen yang didapat pada penelitian ini adalah (++)). Menurut Savitri, Suharyati, dan Siswanto (2014) motilitas massa semen segar baik (++) terlihat gelombang kecil, tipis, jarang, dan lambat. Motilitas massa yang normal harus terletak antara baik (++) sampai sangat baik (+++). Rataan motilitas individu dari semen yang yang ditampung adalah sebesar $82,5 \pm 3,54$. Rataan nilai motilitas individu semen segar yang digunakan pada penelitian ini sudah sesuai dengan standart. Susilawati (2013) menyatakan semen yang mempunyai persentase motilitas di atas 70% lebih tahan hidup dibandingkan bila lebih rendah dari 70 %. Banyak faktor yang mempengaruhi perbedaan nilai motilitas spermatozoa diantaranya umur, bangsa, kematangan spermatozoa, dan kualitas plasma spermatozoa (Komariah et al, 2013).

Rataan viabilitas dari semen segar yang didapatkan adalah sebesar $93,88 \pm 4,48$. Persentase viabilitas yang didapatkan masih tergolong baik hal ini sesuai dengan pendapat Garner and Hafez (2008) yang menyatakan bahwa viabilitas spermatozoa yang baik adalah minimum 80%. Rataan persentase abnormalitas yang didapat dari pengujian semen segar adalah sebesar $1,83 \pm 0,78$ menunjukkan bahwa semen segar yang digunakan untuk penelitian tergolong sesuai standard dan layak untuk diproses lebih lanjut. Hal ini sesuai dengan pendapat Sulistiawati (2011) yang menyatakan bahwa abnormalitas dari spermatozoa maksimum adalah sebesar 20%.

Konsentrasi semen segar yang didapatkan pada penelitian ini adalah sebesar $1205 \pm 148,49$. yang menunjukkan bahwa konsentrasi dari semen segar sudah sesuai standar yaitu diatas 1000 juta /mL. Garner and Hafez (2008) menyatakan bahwa konsentrasi semen sapi baragam dari 800-2000 juta

spermatozoa/mL semen atau 1000-1800 juta spermatozoa/ mL semen.

4.2 Motilitas Individu

Motilitas individu adalah indikator penting dalam penentuan kualitas semen. Motilitas merupakan gerakan progresif dari spermatozoa. Daya gerak yang progresif ini berperan penting dalam keberhasilan pembuahan. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa sapi PO *post thawing* dapat dilihat pada tabel 5.

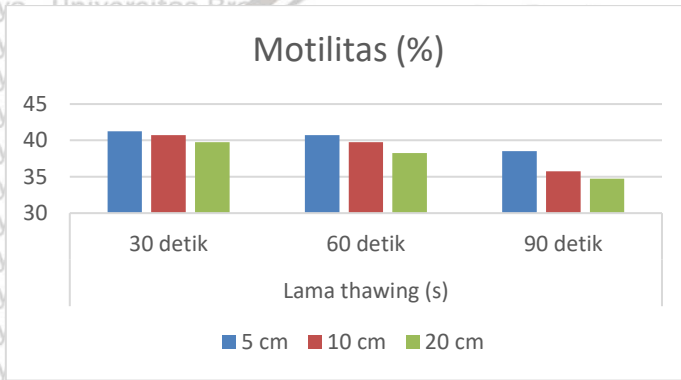
Tabel 2. Rataan Motilitas Individu Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Tinggi	Lama thawing (s)			Rataan ± SD
	30 detik	60 detik	90 detik	
5 cm	39 ± 2.74	38 ± 2.74	35 ± 3.53	37.33 ± 3.00
	38 ± 2.74	37 ± 2.74		
10 cm	37 ± 2.74	36 ± 2.24	33 ± 2.74	36 ± 2.74
	37 ± 2.74	36 ± 2.24	32 ± 2.74	35 ± 2.57
Rataan ± SD	38 ± 2.74 ^b	37 ± 2.57 ^b	33.33 ± 3.00 ^a	

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan tabel diatas, diagram batang rataan persentase motilitas individu spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :





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

Rataan motilitas individu berdasarkan ketinggian *straw* secara berurutan mulai dari 5cm, 10 cm, dan 20 cm adalah 37.33 ± 3.00 ; 36 ± 2.74 ; 35 ± 2.57 sedangkan berdasarkan lama *thawing* 30 detik, 60 detik, 90 detik secara berurutan adalah 38 ± 2.74 ; 37 ± 2.57 ; 33.33 ± 3.00 .

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap motilitas individu spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata ($p > 0,05$) pada perlakuan ketinggian *straw*. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan 5cm terhadap perlakuan 10 cm dan 20cm. Pada perlakuan 10cm juga menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan 20cm. Angka rata-rata dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 5 cm yaitu sebesar 37.33 ± 3.00 . Sedangkan angka rata-rata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 20cm yaitu sebesar 35 ± 2.57 . Sesuai dengan penelitian Aini dkk, (2014) yang menyatakan bahwa rata-rata

persentase motilitas spermatozoa tertinggi *post thawing* terdapat pada posisi *straw* 4cm – 6cm yaitu sebesar 37,50%.

Rendahnya rataan motilitas individu spermatozoa pada perlakuan ketinggian *straw* 10cm dan 20cm diduga karena penurunan suhu yang terlalu lambat sehingga metabolisme tetap terjadi yang kemudian menghasilkan suatu reaksi yaitu ROS (*Reactive Oxygen Species*). Menurut Nelson and Cox (2008). Proses oksidasi dalam metabolisme sel akan melepaskan radikal bebas yang memiliki efek merusak sel. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai keadaan yang stabil radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi akan terjadi terus menerus di dalam sel, sehingga apabila dibiarkan terus menerus akan mengakibatkan kerusakan dan kematian pada sel spermatozoa.

Dibutuhkan antioksidan dengan konsentrasi yang sesuai dalam menangkal radikal bebas hasil metabolisme yang tidak stabil karena antioksidan bekerja memberikan elektron pada radikal bebas, sehingga senyawa menjadi stabil dan dapat mencengah radikal bebas. Pengencer yang digunakan dalam penelitian ini sudah ditambahkan genistein dengan konsentrasi 30mM. Pada ketinggian *straw* 10cm dan 20cm konsentrasi genistein yang terdapat dalam pengencer diduga belum mampu menetralkan semua radikal bebas.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap motilitas individu spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada perlakuan lama *thawing*. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada



perlakuan lama *thawing* 30 detik terhadap perlakuan lama *thawing* 60 detik namun berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 90detik. Angka rata-rata dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan lama *thawing* 30detik yaitu sebesar 38 ± 2.74 . Sedangkan angka rata-rata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan lama *thawing* 90 detik yaitu sebesar 33.33 ± 3.00 . Perlakuan lama *thawing* 30 detik mendapatkan nilai motilitas paling tinggi karena suhu dan lama *thawing* memenuhi SNI Semen Beku (2017) bahwa *thawing* dilakukan dengan suhu 37°C - 38°C selama 30 detik.

Rendahnya nilai motilitas individu pada perlakuan lama *thawing* 90 detik diduga diakibatkan oleh durasi *thawing* terlalu lama. Durasi *thawing* yang terlalu lama menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal, terjadi peningkatan produksi asam laktat sehingga konsentrasi asam laktat yang bersifat *toxic* meningkat berakibat pada rendahnya daya gerak spermatozoa sampai terjadi kematian. Menurut Salim dkk, (2012) Durasi *thawing* yang terlalu lama mengakibatkan terjadinya penurunan motilitas individu sampai pada kualitas yang tidak bisa dipakai lagi untuk IB dan didukung oleh pendapat Datta et al,(2009), spermatozoa yang terlalu lama terpapar oksigen menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang menghasilkan peroksidasi lipid, sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Peningkatan radikal bebas berupa spesies oksigen reaktif (ROS) dapat merusak struktur membran mitokondria spermatozoa sehingga menginduksi terjadinya apoptosis yaitu kematian sel secara fisiologis karena adanya perubahan morfologi maupun biokimia sel. Pada perlakuan lama *thawing* 90 detik ini penambahan genistein dengan konsentrasi 30mM juga belum

dapat menetralkan radikal bebas akibat metabolisme yang tidak beraturan.

Berdasarkan analisis data juga menunjukkan bahwa interaksi antara faktor posisi *straw* dengan faktor lama *thawing* tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas individu spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa tinggi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap motilitas individu, sedangkan pada perlakuan lama *thawing* 30, merupakan durasi standar proses pencairan optimal yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 60detik.

4.3. Viabilitas

Viabilitas merupakan persentase hidup dari spermatozoa yang digunakan sebagai tolak ukur atau indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara. 2014). Pemeriksaan viabilitas menggunakan zat warna eosin negrosin yang di ulas pada objek glass dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang tidak menyerap warna dinyatakan spermatozoa yang hidup. Sebaliknya yang tidak menyerap warna adalah yang mati. Spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya menurun, sehingga menyerap warna eosin negrosin.





Gambar 9. Viabilitas Spermatozoa

Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa sapi PO *post thawing* dapat dilihat pada tabel 5.

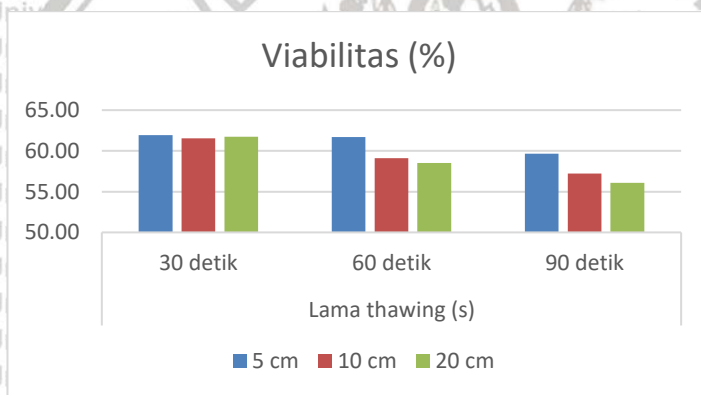
Tabel 3. Rataan Viabilitas Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Tinggi	Lama thawing (s)			Rataan ±
	30 detik	60 detik	90 detik	SD
5 cm	60.49 ± 1.43	59.01 ± 2.70	55.92 ± 3.74	58.47 ± 2.62 ^b
	59.21 ± 2.32	57.75 ± 1.35	54.03 ± 3.19	57.00 ± 2.29 ^{ab}
20 cm	59.07 ± 2.66	56.34 ± 2.19	52.01 ± 4.08	55.81 ± 2.98 ^a
	Rataan ±	59.59 ± 2.14 ^b	57.70 ± 2.08 ^b	53.99 ± 3.67 ^a
	SD			

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).



Berdasarkan tabel diatas, diagram batang rata-rata persentase viabilitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini:



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

Rataan viabilitas berdasarkan ketinggian *straw* secara berurutan mulai dari 5cm, 10 cm, dan 20 cm adalah 58.47 ± 2.62 ; 57.00 ± 2.29 ; 55.81 ± 2.98 sedangkan berdasarkan lama thawing 30 detik, 60 detik, 90 detik secara berurutan adalah 59.59 ± 2.14 ; 57.70 ± 2.08 ; 53.99 ± 3.67 .

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap viabilitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata ($p > 0,05$) pada perlakuan ketinggian *straw*. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan 5cm terhadap perlakuan 10 cm dan 20cm. Pada perlakuan 10cm juga menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan 20cm. Berdasarkan angka rata-rata dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan ketinggian

straw 5 cm yaitu sebesar 58.47 ± 2.62 . Sedangkan angka rata-rata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan ketinggian straw 20cm yaitu sebesar 55.81 ± 2.98 . Hal ini diduga karena pada ketinggian 5cm tidak terjadi penurunan suhu secara drastis sehingga spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock* (cekaman dingin). Menurut Pubiandara, Suharyati dan Hartono. (2016) *cold shock* terjadi karena adanya penurunan suhu yang signifikan sehingga memberikan efek perubahan terhadap fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan dari wujud cair ke wujud gel.

Pada perlakuan ketinggian 10cm terjadi penurunan viabilitas yaitu ke angka 57.00 ± 2.29 dan pada perlakuan ketinggian 20 cm kembali terjadi penurunan viabilitas ke angka 55.81 ± 2.98 . Hal ini diduga akibat penurunan suhu yang lebih lama sehingga metabolisme tetap terjadi yang menyebabkan asam laktat meningkat. Menurut Tuju, Ondho dan Samsudewa (2013) Akumulasi asam laktat sebagai produk akhir yang dikeluarkan terus-menerus berakibat pada tekanan osmotik cairan semen meningkat. Hal tersebut menyebabkan permeabilitas membran spermatozoa menurun sehingga terjadi pergerakan cairan sitoplasma (intraseluler) menuju larutan pengencer (ekstraseluler). Perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga selubung lipoproteinnya pecah dan membran sel mengalami kerusakan yang membuat turunnya viabilitas spermatozoa.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap viabilitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada perlakuan lama *thawing*. Kemudian uji lanjutan dengan uji

Duncan menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan lama *thawing* 30 detik terhadap perlakuan lama *thawing* 90 detik namun berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 60 detik. Berdasarkan angka rata-rata dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan lama *thawing* 30 detik yaitu sebesar 59.59 ± 2.14 . Sedangkan angka rata-rata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan lama *thawing* 90 detik yaitu sebesar 53.99 ± 3.67 . Kondisi ini disebabkan perlakuan dengan lama waktu *thawing* 30 detik belum menyebabkan terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permeabilitas membran utuh dan tidak terganggu. Menurut Novita (2020) permeabilitas membran yang utuh akan menjamin fluiditas dan keseimbangan homeostatis membrane sel karena pertukaran senyawa senyawa berlangsung secara normal.

Perlakuan lama *thawing* 60 detik mengalami penurunan viabilitas walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 30 detik. Kemudian pada perlakuan lama *thawing* 90 detik juga semakin menurun viabilitasnya hingga berbeda nyata dibanding perlakuan lama *thawing* 30 dan 60 detik. Kondisi ini diduga akibat dari durasi *thawing* yang terlalu lama. Lama yang tidak sesuai mengakibatkan membrane spermatozoa mengalami kerusakan sebagai akibat cekaman panas dan kontak dengan oksigen. Membran spermatozoa yang tersusun dari fosfolipid mengalami reduksi karena timbulnya asam lemak dari proses peroksidasi sel. Hal ini diperkuat oleh pendapat Anwar dan Samsudewa. (2014) yang menyatakan bahwa spermatozoa akan bekerja aktif dalam kegiatan biomolekul kimia metabolisme substrat yang diperlukan untuk pergerakan sehingga hasil dari metabolisme berupa peningkatan asam laktat. Tingginya asam



laktat akan menurunkan pH pengencer yang akan menyebabkan toksin bagi kehidupan spermatozoa.

Berdasarkan analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($P > 0,05$) antara interaksi ketinggian *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen dan lama *thawing* terhadap viabilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa tinggi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap viabilitas spermatozoa, sedangkan pada perlakuan lama *thawing* 30, merupakan durasi standar proses pencairan optimal yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 60detik.

4.4. Abnormalitas

Abnormalitas spermatozoa diamati dengan membuat preparat berupa ulasan semen dengan penambahan eosin negrosin yang kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 x. Sesuai dengan pendapat Rahmiati, Eriani dan Dasrul. (2015) yang menyatakan bahwa pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan membuat preparat ulasan terlebih dahulu, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan objektif 400 x dengan jumlah spermatozoa minimal 100 dan maksimal 200 dari lima lapang pandang. Dilakukan pengamatan pada spermatozoa yang memiliki kelainan baik pada kepala maupun pada ekor spermatozoa. Hasil pemeriksaan abnormalitas spermatozoa sapi PO *post thawing* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rataan Abnormalitas Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan *Post Thawing*

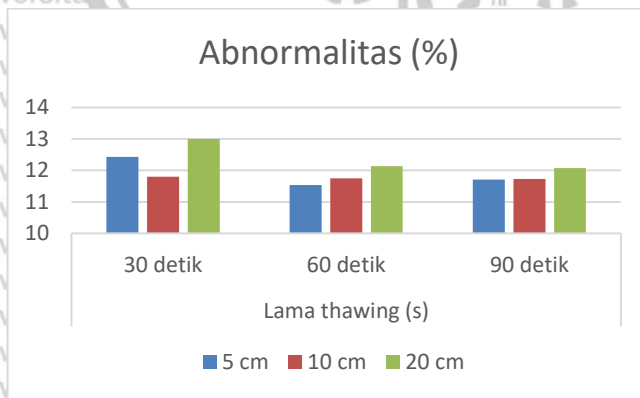
Tinggi	Lama thawing (s)			Rataan ± SD
	30 detik	60 detik	90 detik	



5 cm	11.80 ± 0.63	10.93 ± 0.61	11.20 ± 0.51	11.31 ± 0.58
10 cm	11.30 ± 0.50	11.10 ± 0.65	11.07 ± 0.66	11.16 ± 0.60
20 cm	12.06 ± 0.94	11.46 ± 0.68	11.41 ± 0.67	11.64 ± 0.76
Rataan ±	11.72 ± 0.69	11.16 ± 0.65	11.23 ± 0.61	
SD				

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan tabel diatas, diagram batang rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 11. Diagram Batang Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan *Post Thawing*

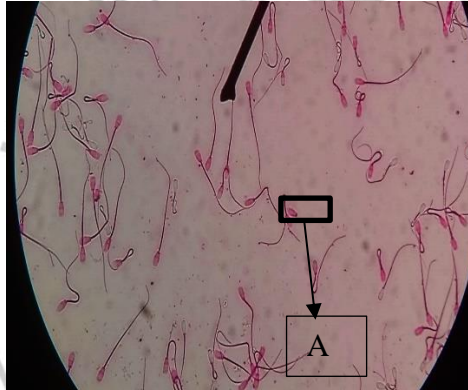
Rataan abnormalitas berdasarkan ketinggian *straw* secara berurutan mulai dari 5 cm, 10 cm, dan 20 cm adalah 11.31 ± 0.58 ; 11.16 ± 0.60 ; 11.64 ± 0.76 sedangkan berdasarkan lama

thawing 30 detik, 60 detik, 90 detik secara berurutan adalah 11.72 ± 0.69 ; 11.16 ± 0.65 ; 11.23 ± 0.61 .

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata ($p > 0.05$) pada perlakuan posisi *straw* dan lama *thawing* terhadap abnormalitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing*. Berdasarkan perlakuan posisi *straw*, rataan dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 10cm yaitu sebesar 11.16 ± 0.60 . Sedangkan rataan dan standar deviasi yang menunjukkan tingkat abnormalitas paling tinggi terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 20cm yaitu sebesar 11.64 ± 0.76 . Berdasarkan perlakuan lama *thawing*, rataan dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan lama *thawing* 60 detik yaitu sebesar 11.16 ± 0.65 . Sedangkan rataan dan standar deviasi yang menunjukkan tingkat abnormalitas paling tinggi terdapat pada perlakuan lama *thawing* 30 detik yaitu sebesar 11.72 ± 0.69 . Menurut Solihati (2008) dalam Pubiandra dkk, (2016). Abnormalitas spermatozoa dapat disebabkan oleh penurunan pH semen, tekanan osmotik dan stress dingin pada saat ekuilibrisasi uap nitrogen maupun pada saat *thawing*. Semakin rendah persentase abnormalitas maka semakin baik digunakan untuk inseminasi buatan.

Menurut Riyadhi. (2010) Abnormalitas pada spermatozoa ada 2 jenis yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer adalah abnormalitas yang disebabkan oleh kegagalan proses spermatogenesis, faktor genetik, penyakit dan kondisi lingkungan yang tidak sesuai. Sedangkan abnormalitas sekunder adalah kelainan pada spermatozoa tubulus seminiferus ditandai dengan kepala pecah dan kepala tanpa

ekor. Abnormalitas sekunder ini biasanya diakibatkan karena terjadi kesalahan pada saat penanganan semen. Spermatozoa yang abnormal dapat dilihat seperti gambar berikut:



Gambar 12. Abnormalitas Spermatozoa

Keterangan:

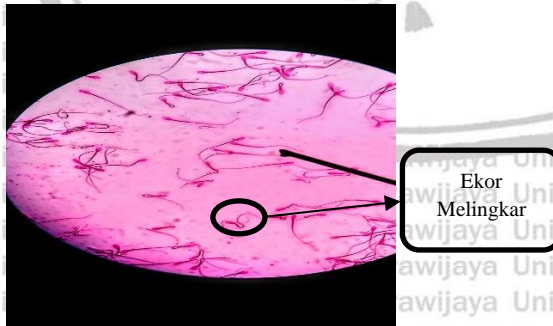
A: Spermatozoa tanpa ekor

Pada semua perlakuan baik itu posisi *straw* dan lama *thawing*, hasil pemeriksaan terhadap abnormalitas tidak ada yang melebihi angka 20%. Hasil ini dapat dikatakan masih baik karena menurut Pubiandara dkk, (2016) persentase abnormalitas yang baik untuk inseminasi buatan tidak lebih dari 20%.

Berdasarkan analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($P > 0,05$) antara interaksi posisi *straw* pada perlakuan ekuilibrisasi uap nitrogen dan lama *thawing* terhadap abnormalitas spermatozoa. Hal ini disebabkan karena tinggi *straw* pada ekuilibrisasi uap nitrogen dan lama *thawing* belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap abnormalitas spermatozoa.

4.5. Integritas Membran

Evaluasi integritas membrane dilakukan dengan menggunakan larutan *Hypo-Osmotic-Swelling* (HOS) untuk membedakan selaput yang utuh dan yang mengalami kerusakan sel. Pengamatan menggunakan HOS test dilakukan dengan menguji 0,1 ml semen pada 1 ml larutan HOS , kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan diamati pembengkakan ekor spermatozoa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 x. Menurut Lechniak *et al*, (2002)Prinsip HOS tes didasarkan pada pengangkutan cairan HOS ke selaput ekor sperma dibawah kondisi yang hipoosmotik. Ketidakstabilan membrane dan konsentrasi ion intraseluler akan mempengaruhi integritas membrane. Ekor spermatozoa yang melingkar mengidentifikasi keutuhan membrane plasmanya.



Gambar 13. Integritas Membran Spermatozoa

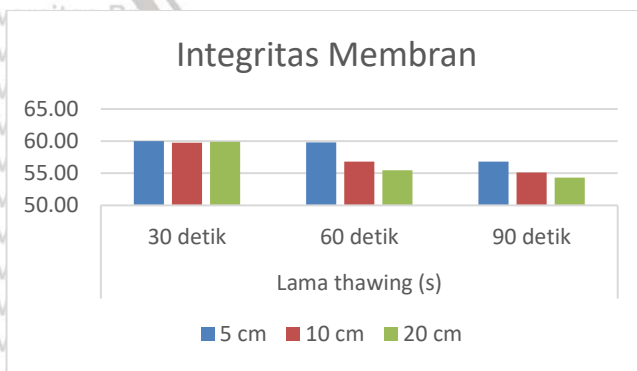
Hasil pemeriksaan evaluasi integritas membran spermatozoa sapi PO *post thawing* dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rataan Evaluasi Integritas Membran Semen Sapi PO Pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Tinggi	Lama thawing (s)			Rataan ± SD
	30 detik	60 detik	90 detik	
5 cm	57.63 ±	56.49 ±	53.85 ±	55.99 ±
	2.36	3.31	2.95	2.87 ^b
10 cm	56.15 ±	55.13 ±	51.96 ±	54.41 ±
	3.59	1.68	3.18	3.82 ^{ab}
20 cm	56.20 ±	53.52 ±	49.62 ±	53.11 ±
	3.72	1.95	4.70	3.46 ^a
Rataan ±	56.66 ±	55.05 ±	51.81 ±	
SD	3.22 ^b	2.31 ^b	3.61 ^a	

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan tabel diatas, diagram batang rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 14. Diagram Batang Persentase Integritas membran Spermatozoa Sapi PO pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Rataan hasil evaluasi integritas membran berdasarkan ketinggian *straw* secara berurutan mulai dari 5cm, 10 cm, dan

20 cm adalah 55.99 ± 2.87 ; 54.41 ± 3.82 ; 53.11 ± 3.46 sedangkan berdasarkan lama *thawing* 30 detik, 60 detik, 90 detik secara berurutan adalah 56.66 ± 3.22 ; 55.05 ± 2.31 ; 51.81 ± 3.61 .

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap evaluasi integritas membran spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang nyata ($p > 0,05$) pada perlakuan ketinggian *straw*. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan 5cm terhadap perlakuan 10 cm dan 20cm. Pada perlakuan 10cm juga menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan 20cm. Berdasarkan angka rataan dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 5 cm yaitu sebesar 55.99 ± 2.87 . Sedangkan angka rataan dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan ketinggian *straw* 20cm yaitu sebesar 53.11 ± 3.46 . Hal ini diduga karena pada ketinggian 5cm merupakan posisi yang ideal untuk proses ekuilibrasasi uap nitrogen sehingga tidak terjadi penurunan suhu secara drastis yang membuat spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock* (cekaman dingin). *Cold shock* yang terjadi pada spermatozoa menyebabkan kerusakan pada membran sel sehingga integritas membran spermatozoa menjadi turun dan dapat mengakibatkan kematian sel spermatozoa yang cukup tinggi. Rizal *et al*, (2003) dalam 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 motilitas menjadi rendah, serta daya hidup juga rendah.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan ANOVA terhadap evaluasi integritas membran spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) pada perlakuan lama *thawing*. Kemudian uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan lama *thawing* 30 detik terhadap perlakuan lama *thawing* 60 detik namun menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan lama *thawing* 90 detik. Berdasarkan angka rata-rata dan standar deviasi paling baik terdapat pada perlakuan lama *thawing* 30 detik yaitu sebesar 56.66 ± 3.22 . Sedangkan angka rata-rata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada perlakuan lama *thawing* 90 detik yaitu sebesar 51.81 ± 3.61 . Terjadi penurunan nilai integritas membran secara berturut-turut dari perlakuan lama *thawing* 30 detik; 60 detik; 90 detik. Hal ini diduga karena durasi perlakuan lama *thawing* yang semakin panjang. Durasi yang tidak sesuai mengakibatkan membran spermatozoa mengalami kerusakan sebagai akibat cekaman panas dan kontak dengan oksigen. Membran spermatozoa yang tersusun dari fosfolipid mengalami reduksi karena timbulnya asam lemak dari proses peroksidasi sel. Penurunan integritas membrane terjadi karena adanya kerusakan membran spermatozoa. Rusaknya membran sel akan meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga bahan-bahan yang semestinya tidak boleh melewati membran sel dapat dengan bebas keluar masuk sel dan akhirnya integritas spermatozoa terganggu (Agarwal et al, 2003). Menurut Lechniak et al, (2008) bahwa, ketidakstabilan membrane dan konsentrasi ion intraseluler akan mempengaruhi integritas membran.



Berdasarkan analisis data juga menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh ($P > 0,05$) antara interaksi ketinggian *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen dan lama *thawing* terhadap integritas membran spermatozoa. Hal ini disebabkan bahwa tinggi *straw* pada ekuilibrasi uap nitrogen belum cukup memberikan pengaruh signifikan terhadap integritas membran spermatozoa, sedangkan pada perlakuan lama *thawing* 30, merupakan durasi standar proses pencairan optimal yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan lama *thawing* 60detik.



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 ketinggian *straw* saat ekuilibrasi uap nitrogen terhadap motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membrane namun terdapat pengaruh yang nyata dari faktor lama *thawing* terhadap motilitas, viabilitas, dan integritas membran. Interaksi antara faktor ketinggian *straw* pada uap nitrogen cair dan faktor metode *thawing* juga tidak berpengaruh nyata. Faktor posisi *straw* 5cm dan lama *thawing* 30 detik menunjukkan motilitas individu, viabilitas dan integritas membrane paling tinggi sehingga dapat memberikan kualitas terbaik semen beku sapi PO.

5.2. Saran

Proses ekuilibrasi dengan ketinggian *straw* 5 cm dan lama *thawing* 30 detik menghasilkan kualitas spermatozoa yang baik. Sehingga disarankan untuk menerapkannya pada saat proses pembekuan semen sapi PO.



DAFTAR PUSTAKA

Adinata, Yudi. 2013. Estimasi Nilai Pemuliaan Bobot Lahir Sapi Peranakan Ongole Pada Unit Pengelolaan Bibit Sumber Di Loka Penelitian Sapi Potong. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*.

Aini, Kurotul, Sri Suharyati dan Madi Hartono. 2014. Pengaruh Jaraj Straw Dengan Nitrogen Cair Pada Proses Ekuilibrasi uap Nitrogen Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. Vol 2(3) : 62-70.

Agarwal, Saleh and Bedalwy. 2003. Role of Sperm Parameter to level of Reactive Opecies in Semen Specimens. Vol. 152 : 107-110.

Akryono, Muhammad Luqman , Sri Wahyuningsih dan Nur Ihsan. 2017. Performans Reproduksi Sapi Peranakan Ongole dan Peranakan Limousin di Kecamatan Padang Kabupaten Lumajang. *J. Ternak Tropika*. Vol 18(1) : 77-81

Amin, Uambang dan Nibras. 2019. Peran Inseminasi Buatan (IB) Terhadap Sistem Perkawinan Dikelompok Tani Ternak Lembu Karomah Kecamatan Taluditi Kabupaten Pohuwato. *Jambura Journal of Animal Science*. Vol 1(2) : 52-56.

Astuti, Sussi. 2008. Isoflvon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi*



Industri dan Hasil Pertanian. Vol 13 (2) : 126-136.

Azzahra, Setiatin dan Samsudewa. 2016. Evaluasi Motilitas dan Persentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*. Vol 11(2) : 99-107.

Bebas, Wayan, Made Kota Budiasa, Ika Yuni Astutik. 2015. Penambahan Vitamin C Pada Pengencer Spermatozoa Babi Landrace Yang Disimpan Pada Suhu 15°C. *Buletin Veteriner Udayana*. Vol 7 (2) : 179-185. Cappello A.R., C. Guido, A. Santoro, M. Santoro, L. Capobianco, D. Montanaro, M. Madeo, S. Ando, V. Dolce and S. Aquila. 2012. The Mitochondrial Citrate Carrier (CIC) Is Present and Regulates Insulin Secretion by Human Male Gamete. *Endocrinology*. 153 : 1743-1754

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

Datta, Sekar, Hembram dan Dasgupta. 2009. Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10o C. *Proceedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Kolkata West Bengal, India.*



Dewi, Ondho dan Kurnianto. 2012. Kualita Semen Berdasarkan Umur Pada Sapi Jantan Jawa. *Animal Agriculture Journal*. Vol 1(2) : 126-133.

Garner dan Hafez. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In: *Reproduction In Farm Animals*. Hafez and Hafez (Edit). 7th ed. Blackwell Publishing. Australia: 96-109.

Ghopa, Dirwan dan Dance. 2019. Pengaruh Suhu Pada Proses Thawing Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi PO. *Musamus Journal of Livestock Science*. Vol 2(1) : 28-32

Hanifi, Hirzi, Moh. Nur Ihsan dan Trinil Susilawati. 2016. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Pada Proses Pembekuan Terhadap Kualitas Semen Sapi Wagyu Menggunakan Pengencer Andromed. *J. Ternak Tropika*. Vol 17 (1) : 31-41.

Hartanti, Setiatin dan Sutopo. 2012. Perbandingan Percobaan Pengencer Semen Sitrat Kuning Telur dan Tris Kuning Telur Terhadap Persentase Daya Hidup Spermatozoa Sapi Jawa Brebes. *Animal Agricultural Journal*. Vol 1(1) : 33-42.

Irianto, Asep dan Muladno. 2020. Perbaikan Mutu Genetik Melalui Sistem Grading Ternak dalam Upaya Menunjang Program Pemuliaan Berbasis Digital. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. Vol 7(1) : 35-41.



Khairi. 2016. Evaluasi Produksi dan Kualitas Semen Sapi Simental Terhadap Tingkat Bobot Badan Berbeda. *Jurnal Peternakan*. Vol 13(2) : 54-58.

Khairi, Fitrah, Anis Muktiani, dan Yon Supri Ondho. 2014. Pengaruh Suplementasi Vitamin E, Mineral Selenium dan Zink Terhadap Konsumsi Nutrien, Produksi dan Kualitas Semen Sapi Simental. *Agripet*. Vol 14 (1) : 6-16.

Muhammad, Dedi, Nurul Isnaini , Kuswati , Aulia Puspita Anugra Yekti , Aryogi , Muhammad Lutfi , H.Y. Lukman , Trinil Susilawati. 2019. Pengaruh Berbagai Formulasi Pengencer Dasar Air Kelapa Terhadap Kualitas Semen Cair Sapi PO (Peranakan Ongole) Selama Simpan Dingin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. Vol 29 (1) : 1-8.

Nelson and Cox. 2008. Principles of Biochemistry. WH Freeman and Company. New York. 105 – 115.

Novita. 2020. Pengaruh lama Waktu Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Secara Mikroskopis. *Tropical Animal Science*. vol 2(2) : 66 – 73.

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

2019.
Prastika, Zeni , Suherni Susilowati , Bodhi Agustono , Erma Safitri , Faisal Fikri , Ragil Angga Prastiya. 2018.



Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Rambon di Desa Kemiren Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*. Vol 1(2) : 38-42.

Pubchem. 2004. Chemical Structure of Genistein. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Diakses tanggal 27 Mei 2021.

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

Putri, Tria Deviana, Tongku Nizwan Siregar, Cut Nila Thasmi, Juli Melia, Mulyadi Adam. 2020. Faktor- Faktor Yang Mempengaruhi Keberhasilan Inseminasi Buatan Pada Sapi di Kabupaten Asahan, Sumatera Utara. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. Vol 8 (3) : 111-119.

Putri, Aryati Pratama. 2015. Efek Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa yang Diberi Paparan Asap Rokok. *J. Majority*. Vol 4(1) : 1-4.

Ratnawati, Antari dan Pamungkas D. 2020. Profil Kualitas Semen Sapi Bali pada Berbagai Umur. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner Virtual*. Vol 1(1) : 105-112.

Riyadhi. 2010. Jenis dan Tingkat Abnormalitas Primer pada Spermatozoa Sapi Pejantan di Beberapa Balai



Inseminasi Buatan di Indonesia. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Rofingi, Faruq dan Zulfanita. 2020. Pengaruh lama Thawing Terhadap Kualitas Sperma Sapi Peranakan Ongole (PO) Kebumen Yang Digunakan Untuk Inseminasi Di Kabupaten Kebumen. *Prosiding Seminar Teknologi dan Agribisnis Peternakan (STAP) Fakultas Peternakan Universitas Jendral Soedirman*. Vol 7(1) : 320:327

Salim, Muhammad Ade, Trinil Susilawati dan Sri Wahyuningsih. 2012. Pengaruh Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet*. Vol 12(2) : 14-19.

Savitria, Faradina Kusuma, Sri Suharyatib dan Siswanto. 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali Dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C Pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. Vol 2(3) : 30-36.

Sitepu, dan Putra. 2017. Pengaruh Penambahan Minyak Atsiri Kulit Jeruk Manis Pada Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Post-thawing Sapi Simmental. *Jurnal Peternakan Indonesia*. Vol 19(3) : 149-155.

Suharyati dan Madi hartono. 2011. Preservasi dan Kriopreservasi Semen Sapi Limousin Dalam Berbagai Bahan Pengencer. *Jurnal Kedokteran Hewan*. Vol 5(2) :53-58.



Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa Terhadap Proses Pembekuan Pada Berbagai Jenis Pejantan Unggul. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. *JITV*, 19(3):168-175.

Sulistyowati, Deny, Muhammad Azharil Faris, Aulia Puspita Anugra Yekti, Sri Wahjuningsih dan Trinil Susilawati. 2018. Kualitas Semen Cair Sapi Peranakan Ongole Pada Pengencer Tria Aminomethan Kuning Telur Tanpa Raffinosa Yang Disimpan Pada Media Yang Berbeda Suhu. *Jurnal Ternak Tropika*. Vol 19(1) : 38-45.

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

Susilawati. 2011. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Dengan Kualitas dan Deposisi Semen yang Berbeda Pada Sapi Peranakan Ongole. *J. Ternak Tropika*. Vol 12 (2) : 15-24.

Susilawati. 2013. *Pedoman inseminasi buatan pada ternak*. Malang (Indonesia): Penerbit Universitas Brawijaya Press.

Tuhu, Ondho dan Samsudewa. 2013. Pengaruh Perbedaan Waktu Pelepasan Water Jacket Dalam Proses Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Pada Tahap Berfore Freezing dan Post



Thawing. *Animal Agricultural Journal*. Vol 2(1) : 466- 477.

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

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

Widjaja, Akhdiat dan Purwasih. 2017. Pengaruh Deposisi Semen Terhadap Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) Sapi Peranakan Ongole. *Sains Peternakan*. Vol 15(2) : 49-51.

Wijayanto, Ondho, dan Setiatin. 2019. Pengaruh Frekuensi Penampungan Terhadap Kualitas Semen Segar Sapi PO Kebumen Yang Dievaluasi Secara Makroskopis dan Mikroskopis. *Agromedia*. Vol. 37(2) : 28-33.

Wulandari, dan Surya. 2014. Pengaruh Berbagai Temperatur Thawing Semen Beku Terhadap Keberhasilan Inseminasi Buatan Pada Sapi Potong. *Jurnal Sains Veteriner*. Vol 32(1) : 40-45.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data semen segar sapi PO

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	1,83	0,78
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	1310	1100	1205	148,49
Integritas Membran (%)	92,31	87,42	89,87	3,46
Keterangan	PK	=	Putih	Kekuningan



Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu Tinggi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Lama *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		30	60	90	
5	1	40	35	30	105
	2	40	40	35	115
	3	40	40	40	120
	4	35	35	35	105
	5	40	40	35	115
Sub Total		195	190	175	560
10	1	35	40	35	110
	2	40	35	35	110
	3	40	40	30	110
	4	40	35	35	110
	5	35	35	30	100
Sub Total		190	185	165	540
20	1	40	35	30	105
	2	35	35	30	100
	3	40	40	35	115
	4	35	35	35	105
	5	35	35	30	100
Sub Total		185	180	160	525
		570	555	500	1625

Keterangan : Faktor A = Tinggi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*

$$FK = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{a.b.c}$$

$$= \frac{(1625)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 58680,56$$



$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (40^2 + 40^2 + 40^2 + \dots + 30^2) - 58680,56 \\ &= 494,44 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(195^2 + 190^2 + 185^2 + \dots + 160^2)}{5} - 58680,56 \\ &= 224,44 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{r \cdot b} - \text{FK} \\ &= \frac{(560^2 + 540^2 + 525^2)}{5 \times 3} - 58680,56 \\ &= 41,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKB} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r \cdot a} - \text{FK} \\ &= \frac{(570^2 + 555^2 + 500^2)}{5 \times 3} - 58680,56 \\ &= 181,11 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 224,44 - 41,11 - 181,11 \\ &= 2,22 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 494,44 - 224,44 \\ &= 270 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\ &= 224,44 / 8 \end{aligned}$$

$$= 28,05$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dbA} \\ &= 41,11 / 2 \end{aligned}$$

$$= 20,55$$

$$\begin{aligned} \text{KTB} &= \text{JKB} / \text{dbB} \\ &= 181,11 / 2 \end{aligned}$$

$$= 90,55$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} * \text{B} &= \text{JKA} * \text{B} / \text{dbA} * \text{B} \\ &= 2,22 / 4 \end{aligned}$$

$$= 0,55$$

$$\begin{aligned} \text{KTG} &= \text{JKG} / \text{dbg} \\ &= 4270 / 36 \end{aligned}$$

$$= 7,5$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 28,05 / 7,5 = 3,74$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 20,55 / 7,5 = 2,74$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 90,55 / 7,5 = 12,07$$



$$F\text{-hit } A*B = KTA*B/KTG = 0,55/7,5 = 0,07$$

Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	Db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	224.44	8	28.06	3.74		
A	41.11	2	20.56	2.74	3.26	5.25
B	181.11	2	90.56	12.07 **	3.26	5.25
A*B	2.22	4	0.56	0.074	2.63	3.89
G	270	36	7.50			
Total	494.44	44				

Keterangan : **) berpengaruh sangat nyata (F hit > F 0,01)

*) berpengaruh nyata (F hit > F 0,05)

) tidak berpengaruh nyata (F hit < F 0,05)

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{7,5}{15}} = 0,71$$

Duncan 0,05 2 3

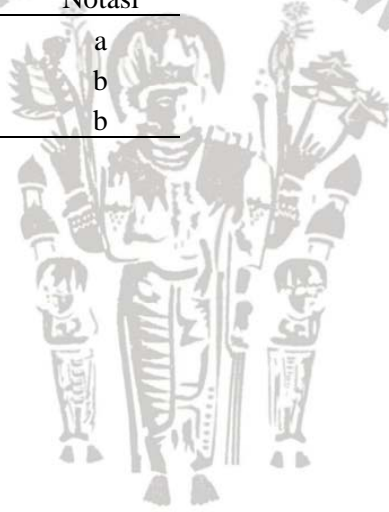
JND 2.868 3.015

JNT 2.0 2.14

Posisi straw	Rataan	Notasi
20 cm	35	a
10 cm	36	ab
5 cm	37	b



Lama	Rataan	Notasi
<i>Thawing</i>		
90 detik	33.33	a
60 detik	37	b
30 detik	38	b



Lampiran 3. Analisa Viabilitas Tinggi *Straw* pada Uap Nitrogen Cair dan Lama *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		30	60	90	
5	1	62.46	55.65	51.60	169.71
	2	61.40	60.95	54.13	176.48
	3	58.97	60.43	61.76	181.16
	4	59.49	56.54	56.19	172.22
	5	60.13	61.46	55.92	177.51
Sub Total		302.45	295.03	279.60	877.08
10	1	57.79	58.54	56.55	172.88
	2	61.09	56.98	55.95	174.02
	3	61.40	59.75	50.61	171.76
	4	59.87	56.67	56.57	173.11
	5	55.92	56.79	50.48	163.19
Sub Total		296.07	288.73	270.16	854.96
20	1	62.40	55.80	49.01	167.21
	2	56.69	55.94	48.89	161.52
	3	61.26	60.12	56.06	177.44
	4	58.45	54.43	56.88	169.76
	5	56.54	55.43	49.23	161.20
Sub Total		295.34	281.72	260.07	837.13
		893.86	865.48	809.83	2569.17

Keterangan : Faktor A = Tinggi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*



$$FK = \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c}$$

$$= \frac{(2569,17)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 146680,77$$

$$JKT = \sum (Y_{ijk})^2 - FK$$

$$= (62,46 + 61,40^2 + 58,97^2 + \dots + 49,23^2) - 146680,77$$

$$= 582,84$$

$$JKP = \frac{\sum (\sum y_j)^2}{r} - FK$$

$$= \frac{(302^2 + 296,07^2 + 295,34^2 + \dots + 260,07^2)}{5} - 146680,77$$

$$= 305,64$$

$$JKA = \frac{\sum (\sum y_l)^2}{rb} - FK$$

$$= \frac{(877,08^2 + 854,96^2 + 837,13^2)}{5 \times 3} - 146680,77$$

$$= 53,40$$

$$JKB = \frac{\sum (\sum y_l)^2}{ra} - FK$$

$$= \frac{(893,86^2 + 865,48^2 + 809,83^2)}{5 \times 3} - 146680,77$$

$$= 243,63$$

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

$$= 305,64 - 53,40 - 243,63$$

$$= 8,60$$

$$JKG = JKT - JKP$$



$$= 582,84 - 305,64$$

$$= 277,20$$

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

$$= 305,64 / 8$$

$$= 38,20$$

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

$$= 53,40 / 2$$

$$= 26,70$$

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

$$= 243,63 / 2$$

$$= 121,81$$

$$\text{KTA} * \text{B} = \text{JKA} * \text{B} / \text{dbA} * \text{B}$$

$$= 8,60 / 4$$

$$= 2,15$$

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

$$= 277,20 / 36$$

$$= 7,70$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 38,20 / 7,70 = 4,97$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



$$F\text{-hit A} = KTA/KTG = 26,70 / 7,570 = 3,47$$

$$F\text{-hit B} = KTB/KTG = 121,81 / 7,70 = 15,82$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA*B/KTG = 2,15/7,70 = 0,28$$

Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	305.64	8	38.20	4.96		
A	53.40	2	26.70	3.47 *	3.26	5.25
B	243.63	2	121.82	15.82 **	3.26	5.25
A*B	8.60	4	2.15	0.279	2.63	3.89
G	277.19	36	7.70			
Total	582.84	44				

Keterangan : **) berpengaruh sangat nyata (F hit >F 0,01)

*) berpengaruh nyata (F hit >F 0,05)

) tidak berpengaruh nyata (F hit <F 0,05)

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

$$SE = \sqrt{\frac{KT Galat}{r}} = \sqrt{\frac{7,7}{15}} = 0,76$$

$$\frac{Duncan\ 0,05}{2 \quad 3}$$

$$\frac{JND}{2.868 \quad 3.015}$$

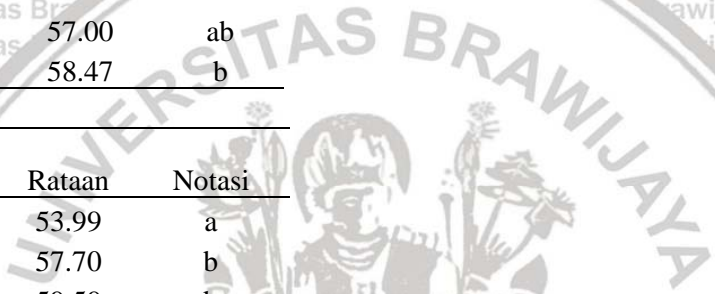
$$\frac{JNT}{2.18 \quad 2.29}$$

$$\frac{Posisi\ straw \quad Rataan \quad Notasi}{20\ cm \quad 55.82 \quad a}$$



10 cm	57.00	ab
5 cm	58.47	b

Lama	Rataan	Notasi
<i>Thawing</i>		
90 detik	53.99	a
60 detik	57.70	b
30 detik	59.59	b



Lampiran 4. Analisa Abnormalitas Tinggi *Straw* pada Uap Nitrogen Cair dan Lama *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		30	60	90	
5	1	11.63	10.12	10.80	32.55
	2	12.87	11.75	11.31	35.93
	3	11.80	11.25	11.48	34.53
	4	11.25	10.78	10.57	32.6
	5	11.46	10.76	11.84	34.06
Sub Total		59.01	54.66	56	169.67
10	1	11.76	11.50	11.70	34.96
	2	11.60	10.85	10.54	32.99
	3	11.58	10.14	11.28	33
	4	10.56	11.86	11.62	34.04
	5	11.02	11.15	10.22	32.39
Sub Total		56.52	55.5	55.36	167.38
20	1	13.22	11.88	11.92	37.02
	2	11.27	10.29	12.22	33.78
	3	11.86	11.96	11.27	35.09
	4	12.84	11.62	11.11	35.57
	5	11.11	11.55	10.54	33.2
Sub Total		60.3	57.3	57.06	174.66
		175.83	167.46	168.42	511.71

Keterangan : Faktor A = Tinggi-*straw* pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu *thawing*

$$FK = \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c}$$



$$= \frac{(511,71)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 5818,82$$

$$\text{JKT} = \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK}$$

$$= (11,63 + 12,87^2 + 11,80^2 + \dots + 10,54^2) - 5818,82$$

$$= 21,03$$

$$\text{JKP} = \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK}$$

$$= \frac{(59,01^2 + 56,52^2 + 60,3^2 + \dots + 57,06^2)}{5} - 5818,82$$

$$= 5,30$$

$$\text{JKA} = \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK}$$

$$= \frac{(169,67^2 + 167,38^2 + 174,66^2)}{5 \times 3} - 5818,82$$

$$= 1,85$$

$$\text{JKB} = \frac{\sum(\sum y_j)^2}{ra} - \text{FK}$$

$$= \frac{(175,83^2 + 167,46^2 + 168,42^2)}{5 \times 3} - 5818,82$$

$$= 2,80$$

$$\text{JKA} * \text{B} = \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB}$$

$$= 5,30 - 1,85 - 2,80$$

$$= 0,65$$

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



$$= 21,08 - 5,30$$

$$= 15,74$$

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

$$= 5,30 / 8$$

$$= 0,66$$

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

$$= 1,85 / 2$$

$$= 0,92$$

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

$$= 2,80 / 2$$

$$= 1,40$$

$$\text{KTA} * \text{B} = \text{JKA} * \text{B} / \text{dbA} * \text{B}$$

$$= 0,65 / 4$$

$$= 0,16$$

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

$$= 15,74 / 36$$

$$= 0,48$$



$$F\text{-hit P} = \text{KTP}/\text{KTG} = 0,66 / 0,48 = 1,51$$

$$F\text{-hit A} = \text{KTA}/\text{KTG} = 0,92 / 0,48 = 2,11$$

$$F\text{-hit B} = \text{KTB}/\text{KTG} = 1,40 / 0,48 = 3,20$$

$$F\text{-hit A*B} = \text{KTA*B}/\text{KTG} = 1,16 / 0,48 = 0,37$$

Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	5.30	8	0.66	1.51		
A	1.85	2	0.92	2.11	3.26	5.25
B	2.80	2	1.40	3.20	3.26	5.25
A*B	0.65	4	0.16	0.373	2.63	3.89
G	15.740	36	0.44			
Total	21.04	44				

Keterangan : **) berpengaruh sangat nyata (F hit >F 0,01)

*) berpengaruh nyata (F hit >F 0,05)

) tidak berpengaruh nyata (F hit <F 0,05)





Lampiran 5. Analisa Integritas Membran Tinggi Straw Pada Uap Nitrogen Cair dan Lama Thawing

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		30	60	90	
5	1	58.89	52.63	49.92	161.44
	2	60.71	57.89	52.75	171.35
	3	55.98	57.76	57.88	171.62
	4	54.70	53.57	55.17	163.44
	5	57.87	60.61	53.54	172.02
Sub Total		288.15	282.46	269.26	839.87
10	1	52.24	57.58	55.06	164.88
	2	59.62	55.13	54.55	169.30
	3	59.92	55.78	48.97	164.67
	4	55.97	53.41	53.00	162.38
	5	52.98	53.76	48.21	154.95
Sub Total		280.73	275.66	259.79	816.18
20	1	60.71	53.33	46.11	160.15
	2	52.97	53.33	46.09	152.39
	3	59.57	56.67	54.65	170.89
	4	54.97	53.01	54.88	162.86
	5	52.78	51.28	46.35	150.41
Sub Total		281	267.62	248.08	796.7
		849.88	825.74	777.13	2452.75

Keterangan : Faktor A = Tinggi straw pada uap nitrogen cair

Faktor B = Suhu thawing

$$FK = \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c}$$



$$= \frac{(2452,75)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 133688,50$$

$$\text{JKT} = \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK}$$

$$= (58,89^2 + 60,71^2 + 55,98^2 + \dots + 46,35^2) - 133688,50$$

$$= 620,74$$

$$\text{JKP} = \frac{\sum(\sum y_i)^2}{r} - \text{FK}$$

$$= \frac{(288,15^2 + 280,73^2 + 281^2 + \dots + 248,08^2)}{5} - 133688,50$$

$$= 257,25$$

$$\text{JKA} = \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK}$$

$$= \frac{(5839,87^2 + 816,18^2 + 796,70^2)}{5 \times 3} - 133688,50$$

$$= 62,32$$

$$\text{JKB} = \frac{\sum(\sum y_i)^2}{ra} - \text{FK}$$

$$= \frac{(849,88^2 + 825,74^2 + 777,13^2)}{5 \times 3} - 133688,50$$

$$= 183,07$$

$$\text{JKA} * \text{B} = \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB}$$

$$= 257,25 - 62,32 - 183,07$$

$$= 11,85$$

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



$$= 620,74 - 257,25$$

$$= 363,49$$

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

$$= 257,25 / 8$$

$$= 32,16$$

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

$$= 62,32 / 2$$

$$= 31,16$$

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

$$= 183,07 / 2$$

$$= 91,53$$

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

$$= 11,86 / 4$$

$$= 2,97$$

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

$$= 363,49 / 36$$

$$= 10,09$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 32,16 / 10,09 = 3,18$$



$$F\text{-hit A} = KTA/KTG = 31,16 / 10,09 = 3,09$$

$$F\text{-hit B} = KTB/KTG = 91,53 / 10,09 = 9,07$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA*B/KTG = 2,97/10,09 = 0,29$$

Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	257.26	8	32.16	3.18		
A	62.32	2	31.16	3.09	3.26	5.25
B	183.07	2	91.54	9.07 **	3.26	5.25
A*B	11.87	4	2.97	0.294	2.63	3.89
G	363.48	36	10.10			
Total	620.74	44				

Keterangan : **) berpengaruh sangat nyata (F hit >F 0,01)

*) berpengaruh nyata (F hit >F 0,05)

) tidak berpengaruh nyata (F hit <F 0,05)

$$SE = \sqrt{\frac{KT Galat}{r}} = \sqrt{\frac{10,10}{15}} = 0,82$$

<u>Duncan 0,05</u>	2	3
JND	2,868	3,015
JNT	2,35	2,47

Posisi straw Rataan Notasi

20 cm 53.11 a



10 cm	54.41	ab
5 cm	55.99	b

Lama	Rataan	Notasi
<i>Thawing</i>		
90 detik	51.81	a
60 detik	55.05	b
30 detik	56.66	b

