

**PENGARUH LAMA EKUILIBRASI SUHU DINGIN  
DAN SUHU *THAWING* DENGAN PENAMBAHAN  
GENISTEIN PADA PENGECER TERHADAP  
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Calista Mega Herawati  
NIM. 175050100111115**



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

**2021**



**PENGARUH LAMA EKUILIBRASI SUHU DINGIN  
DAN SUHU *THAWING* DENGAN PENAMBAHAN  
GENISTEIN PADA PENGENCER TERHADAP  
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO**

**SKRIPSI**

**Oleh :**

**Calista Mega Herawati  
NIM. 175050100111115**

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 LAMA EKUILIBRASI SUHU DINGIN  
DAN SUHU *THAWING* DENGAN PENAMBAHAN  
GENISTEIN PADA PENGECER TERHADAP  
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**Calista Mega Herawati**  
**NIM. 175050100111115**

Telah dinyatakan lulus dalam ujian Sarjana  
Pada Hari/Tanggal: Kamis, 22 Juli 2021

Mengetahui:  
Dekan Fakultas Peternakan  
Universitas Brawijaya

Menyetujui:  
Dosen Pembimbing

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,  
MS.,IPU.,ASEAN Eng.,  
NIP. 19620403 198701 1 001  
Tanggal:

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi,  
MS.,IPU.,ASEAN Eng.,  
NIP. 19620403 198701 1 001  
Tanggal:



## 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 Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin dan Suhu Thawing dengan Penambahan Genistein pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO”** dengan perincian sebagai berikut:

No	Judul	Penelitian Mahasiswa	NIM
1	Hamida Madani Rosmiati	Pengaruh Penambahan Genistein Terhadap Kualitas Semen Cair di Suhu Ruang pada Sapi PO di Tuban	175050100111065
2	Diajeng Doyu Pangestu	Pengaruh Kadar Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethane Terhadap Kualitas Semen Peranakan Ongole (PO) Selama Penyimpanan Suhu Dingin	175050100111179
3	Herjuna Aditama	Efek Suplementasi Genistein Dalam	175050100111184





		Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post <i>Thawing</i>	
4	Aik Awallikah	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein dalam Pengencer Tris Aminomethan dan Ketinggian Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole	175050101111034
5	Natalia Kristina Lubis	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Penambahan Genistein pada Pengencer Tris Aminomethane Terhadap Kualitas Semen Beku	175050101111045
6	Adhe Tya Purnomo	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris Aminomethan Terhadap Kualitas Post <i>Thawing</i>	175050101111118



		Semen Sapi Pernakan Ongole (PO) pada Suhu Berbeda	
7	Aisyah Nur Arifiyanti	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris- Aminomethan dan Lama <i>Thawing</i> terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole	175050101111156
8	Aulia Setyo Lazuardi	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Dingin dan Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Setelah Pengenceran dengan Penambahan Genistein	175050107111065
9	Dicky Ananta Kudori	Pengaruh Lama ekuilibrasi suhu dingin dan Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair terhadap kualitas semen beku sapi PO yang disuplementasi	175050107111143

		dengan 30 $\mu\text{M}$ genistein	
10	Calista Mega Herawati	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin dan Suhu <i>Thawing</i> dengan Penambahan Genistein pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO	175050100111115
11	Kristina Delvina Gultom	Pengaruh Lama Ekuilibrasi dan <i>Thawing</i> dengan Penambahan Genistein pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO	175050100111186
12	Pandu Alif Utama	Pengaruh Jarak dan Lama Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengenceran	175050101111136
13	Kristina Sidabalok	Pengaruh Jarak Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan	175050100111158

		Metode <i>Thawing</i> Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer	
14	Frando Gabriel Situmorang	Pengaruh jarak straw pada ekuilibirasi uap nitrogen dan lama <i>thawing</i> terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer	175050107111108

Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 3 juni 2021

Mahasiswa Peneliti

(Calista Mega Herawati)

NIM. 175050100111115



# **THE EFFECT OF COLD TEMPERATURE EQUILIBRATION TIME AND THAWING TEMPERATURE WITH GENISTEIN ADDITION IN DILUENT ON THE QUALITY OF PO BULL FROZEN SEMEN**

Calista Mega Herawati<sup>1)</sup> and Suyadi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Student of Animal Production, Faculty of Animal Science,  
Brawijaya University

<sup>2)</sup> Lecturer of Animal Production Departement, Faculty of  
Animal Science, Brawijaya University

**Email:** [calistamega10@student.ub.ac.id](mailto:calistamega10@student.ub.ac.id)

## **ABSTRACT**

The effect of cold shock and excessive ROS (Reactive Oxygen Species) production causes damage to spermatozoa cells. Appropriate equilibration and thawing methods with antioxidant genistein addition in the diluent are expected to maintain the quality of frozen semen. The material used is fresh semen from PO bull which is collected once a week using an artificial vaginal method. The method used is an experimental laboratory with a Complete Random Design Factorial (CRDF) consisting of 2 treatment factors with each factor having 3 treatments with 5 replications. The treatments used were cold temperature equilibration for 1 hour; 1.5 hours and 2 hours, as well as thawing at 20°C, 30°C and 40°C. The variables observed were individual motility, viability, abnormalities and membrane integrity. The result showed that the duration of cold equilibration and the interaction of cold equilibration time with

thawing temperature had no significant effect ( $P>0.05$ ), while thawing temperature had a significant effect ( $P<0.05$ ) on individual motility, viability and membrane integrity of PO bull semen. Thawing temperature had no significant effect ( $P>0.05$ ) on the abnormality of PO bull semen. The conclusion was addition of  $30\mu\text{M}$  genistein in diluent with equilibration for 2 hours and thawing for 15 seconds at  $40^{\circ}\text{C}$  can maintain the quality of PO bull frozen semen.

**Keyword:** Genistein, Cold temperature equilibration, Thawing, PO bull semen

# PENGARUH LAMA EKUILIBRASI SUHU DINGIN DAN SUHU THAWING DENGAN PENAMBAHAN GENISTEIN PADA PENGECER TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PO

Calista Mega Herawati<sup>1)</sup> dan Suyadi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

<sup>2)</sup> Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

**Email:** [calistamega10@student.ub.ac.id](mailto:calistamega10@student.ub.ac.id)

## RINGKASAN

Sapi PO merupakan salah satu jenis bangsa sapi potong yang tahan terhadap panas, ektoparasit dan endoparasit, serta pertumbuhannya relatif cepat dengan kualitas daging yang baik, sehingga dalam upaya meningkatkan produktivitas ternak dan mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul dapat dilakukan dengan meningkatkan mutu genetik ternak melalui program Inseminasi Buatan (IB). Keuntungan IB dapat disimpan dalam waktu lama tetapi pengaruh cekaman dingin (*cold shock*) dan produksi ROS yang berlebihan mengakibatkan kerusakan pada sel spermatozoa sehingga kualitas semen menurun. Metode ekUILIBRASI dan *thawing* yang tepat dengan penambahan antioksidan genistein dalam pengencer dapat mempertahankan kualitas semen beku. Metode ekUILIBRASI dan *thawing* yang tepat dengan penggunaan genistein sebagai antioksidan diharapkan dapat mengurangi dan mencegah reaksi peroksidasi lipid akibat aktivitas radikal bebas, sehingga antioksidan menjadi faktor pertahanan utama melawan reaksi oksidatif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama ekUILIBRASI dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi

PO dengan penambahan genistein pada pengencer. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat dengan penambahan genistein sebagai antioksidan dalam pengencer serta menjadi sumber informasi bagi penelitian selanjutnya dan memperkaya pengetahuan bioteknologi reproduksi khususnya bagi instansi pembuat semen beku.

Penelitian ini dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban, Jawa Timur pada tanggal 22 Maret - 22 April 2021. Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen segar dari 1 ekor Sapi PO dari UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban. Penampungan dilakukan sekali dalam seminggu menggunakan teknik vagina buatan. Syarat semen segar yang digunakan untuk pengenceran yaitu memiliki motilitas individu  $\geq 70\%$  dan motilitas massa 2+. Pengencer yang digunakan adalah pengencer tris aminomethan kuning telur dengan penambahan genistein  $30\mu\text{M}$ . Kuning telur untuk bahan pengencer menggunakan telur ayam kampung. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu percobaan laboratorium (*experimental laboratory*) dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) yang terdiri dari 2 faktor perlakuan dengan masing-masing faktor terdapat 3 perlakuan dan 5 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan yaitu ekuilibrasi suhu dingin selama 1 jam; 1,5 jam dan 2 jam, serta *thawing* dengan suhu  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  dan  $40^{\circ}\text{C}$ . Variabel yang diamati yaitu motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran yang dilakukan saat semen segar, setelah ekuilibrasi suhu dingin dan setelah *thawing*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa faktor lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata

( $P>0,05$ ) terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran semen sapi PO, sedangkan faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata ( $P<0,05$ ) terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran semen sapi PO. Persentase motilitas individu terendah yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1 jam dengan suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  yaitu  $31 \pm 2,24\%$  dan persentase motilitas individu tertinggi yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1,5 jam dan 2 jam dengan suhu *thawing*  $40^{\circ}\text{C}$  yaitu  $36 \pm 2,24\%$ . Persentase viabilitas terendah yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1,5 jam dengan suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  yaitu  $54,27 \pm 2,98\%$  dan persentase viabilitas tertinggi yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1,5 jam dengan suhu *thawing*  $40^{\circ}\text{C}$  yaitu  $60,44 \pm 2,85\%$ . Persentase integritas membran terendah yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1,5 jam dengan suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  yaitu  $53,25 \pm 3,30\%$  dan persentase integritas membran tertinggi yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 2 jam dengan suhu *thawing*  $40^{\circ}\text{C}$  yaitu  $59,96 \pm 1,72\%$ . Lama ekuilibrisasi suhu dingin dan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata ( $P>0,05$ ) terhadap abnormalitas semen sapi PO. Persentase abnormalitas terendah yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 1 jam dengan suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  yaitu  $10,86 \pm 0,39\%$  dan persentase abnormalitas tertinggi yaitu pada perlakuan ekuilibrisasi 2 jam dengan suhu *thawing*  $30^{\circ}\text{C}$  yaitu  $11,47 \pm 0,66\%$ .

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan genistein pada pengencer, faktor ekuilibrisasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrisasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas semen sapi PO, sedangkan faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas semen sapi PO. Perlakuan terbaik



pada semua pengamatan variabel yaitu ekuilibrasi suhu dingin selama 2 jam dengan suhu *thawing* 40°C selama 15 detik. Berdasarkan hasil penelitian untuk pembekuan semen sapi PO disarankan menerapkan penggunaan genistein dengan konsentrasi 30µM dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dengan metode ekuilibrasi suhu dingin selama 2 jam dan metode *thawing* selama 15 detik dengan suhu 37°C.



## DAFTAR ISI

Isi	Halaman
<b>PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA .....</b>	<b>iv</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>ix</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xxii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xxiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Rumusan Masalah .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Tujuan Penelitian .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Manfaat Penelitian .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5. Kerangka Pikir .....</b>	<b>5</b>
<b>1.6. Hipotesis .....</b>	<b>9</b>
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Sapi PO dan Pengembangannya .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Inseminasi Buatan (IB) .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Penampungan Semen .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Uji Kualitas Semen.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4.1. Uji Makroskopis .....</b>	<b>14</b>



2.4.2. Uji Mikroskopis.....	15
2.4.3. <i>Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test)</i> .....	17
2.5. Pengenceran Semen.....	19
2.6. Ekuilibrasi, Pembekuan dan Penyimpanan Semen 21	
2.7. Reaksi Biogemis selama Penyimpanan.....	22
2.7.1. Struktur Spermatozoa dan Lipid Bilayer Membran.....	22
2.7.2. Radikal Bebas ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ).....	25
2.8. Antioksidan.....	27
2.9. Pengaruh Genistein sebagai Antioksidan.....	29
2.10. <i>Thawing</i> .....	30
<b>BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	32
3.2. Materi Penelitian.....	32
3.3. Metode Penelitian.....	33
3.4. Prosedur Penelitian.....	34
3.4.1. Pelarutan Genistein.....	34
3.4.2. Pembuatan Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur + Genistein .....	35
3.4.3. Penampungan Semen.....	36
3.4.4. Pemeriksaan Kualitas Semen.....	37
3.4.5. Pengenceran Semen.....	42
3.4.6. Pembekuan Semen .....	43



3.4.7. <i>Thawing</i> .....	44
3.5. Variabel Penelitian .....	44
3.6. Analisis Data .....	44
3.7. Kerangka Operasional .....	47
3.8. Batasan Istilah .....	48
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>49</b>
4.1. Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi PO .....	49
4.2. Persentase Motilitas Individu Spermatozoa .....	55
4.3. Persentase Viabilitas Spermatozoa .....	59
4.4. Persentase Abnormalitas Spermatozoa .....	63
4.5. Persentase Integritas Membran Spermatozoa .....	67
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>72</b>
5.1. Kesimpulan .....	72
5.2. Saran .....	72
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>90</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Uji Kualitas Semen Segar Sapi PO.....	49
Tabel 2. Persentase Rataan Motilitas Individu Sebelum Pembekuan dan Setelah <i>Thawing</i> .....	58
Tabel 3. Persentase Rataan Viabilitas Sebelum Pembekuan dan Setelah <i>Thawing</i> .....	61
Tabel 4. Persentase Rataan Abnormalitas Sebelum Pembekuan dan Setelah <i>Thawing</i> .....	65
Tabel 5. Persentase Rataan Integritas Membran Sebelum Pembekuan dan Setelah <i>Thawing</i> .....	69

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian.....	8
Gambar 2. Pejantan Sapi Peranakan Ongole.....	11
Gambar 3. Struktur Internal Spermatozoa Sapi.....	23
Gambar 4. Struktur Membran Spermatozoa.....	24
Gambar 5. Lipid Bilayer.....	25
Gambar 6. Aktivitas Radikal Bebas .....	26
Gambar 7. Reaksi Antioksidan dengan Radikal Bebas .....	27
Gambar 8. Prosedur Pengenceran Semen .....	42
Gambar 9. Kerangka Operasional .....	47
Gambar 10. Motilitas Individu Semen Segar Sapi PO.....	52
Gambar 11. Viabilitas Spermatozoa Sapi PO .....	53
Gambar 12. Integritas Membran Spermatozoa Sapi PO .....	55
Gambar 13. Grafik Persentase Rataan Motilitas Individu Berbagai Kelompok Perlakuan .....	56
Gambar 14. Grafik Persentase Rataan Viabilitas Berbagai Kelompok Perlakuan .....	60
Gambar 15. Grafik Persentase Rataan Abnormalitas Berbagai Kelompok Perlakuan .....	63
Gambar 16. Grafik Persentase Rataan Integritas Membran Berbagai Kelompok Perlakuan .....	68



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Semen Segar Sapi PO.....	90
Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu <i>Thawing</i> .....	91
Lampiran 3. Analisa Viabilitas pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu <i>Thawing</i> .....	94
Lampiran 4. Analisa Abnormalitas pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu <i>Thawing</i> .....	98
Lampiran 5. Analisa Integritas Membran pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu <i>Thawing</i> .....	102
Lampiran 6. Dokumentasi .....	105



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Sapi Peranakan Ongole atau biasa yang dikenal dengan sapi PO merupakan salah satu jenis bangsa sapi potong lokal Indonesia. Sapi PO ini merupakan hasil persilangan antara pejantan sapi Sumba Ongole (SO) dengan sapi betina Jawa yang berwarna putih. Sapi Ongole (*Bos indicus*) sebenarnya berasal dari India, termasuk tipe sapi pekerja dan pedaging yang disebarkan di Indonesia sebagai sapi Sumba Ongole (SO). Sapi PO tersebar luas hampir ke seluruh wilayah sentra sapi potong, dengan populasi terbesar terdapat di pulau Jawa terutama di Jawa Timur (Prihandini, Hakim dan Nurgiartiningsih, 2011). Data Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2019 menunjukkan bahwa populasi sapi potong yang terbanyak berada di Jawa Timur sebanyak 4.763.182 (28,82%), dimana 16,55% merupakan jumlah sapi PO (Badan Pusat Statistik, 2020). Berdasarkan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan keunggulan yang dimiliki sapi PO antara lain tahan terhadap panas, ektoparasit dan endoparasit, pertumbuhan relatif cepat, serta memiliki persentase karkas, kualitas daging dan tampilan reproduksi yang baik (Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian, 2013).

Upaya meningkatkan produktivitas ternak dan mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul dapat dilakukan dengan meningkatkan mutu genetik ternak melalui program Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi buatan merupakan metode penempatan semen di dalam alat kelamin betina memakai alat buatan manusia. Susilawati (2013) menyatakan bahwa inseminasi

buatan berfungsi untuk memperbaiki mutu genetik, mencegah penyakit menular, menghemat biaya, dan menjadikan data rekording lebih akurat. Keberhasilan inseminasi buatan dipengaruhi oleh beberapa hal yang memegang peranan penting, yaitu mutu semen beku yang baik dari pejantan unggul, metode dan waktu inseminasi yang tepat, serta kondisi ternak betina.

Tampilan dan sifat gen ternak yang baik akan mewariskan tampilan yang baik pula terhadap keturunannya, sehingga seleksi pada pejantan maupun betina menjadi sangat penting. Pejantan yang unggul dapat dilihat dari performannya seperti bobot badan kisaran dari 700-750 kg, tampilan reproduksi seperti lingkaran skrotum serta kualitas semen yang dilihat dari warna, bau, volume, motilitas massa, motilitas individu, dan beberapa hal lainnya. Kualitas semen beku harus tetap terjaga agar fertilitasnya tetap baik, namun terdapat banyak faktor yang akan menurunkan kualitas semen selama proses pembekuan mulai dari pendinginan, pembekuan, pencairan, penyimpanan dan distribusi semen beku (Pinto, Almeida, Alves, Rodriguez, Júnior, Ahmed, Celeghini, Laskoki dan Souza, 2020).

Semen beku akan mengalami penurunan kualitas selama proses pembekuan yaitu mencapai 40-50%. Menurut Amidi, Pazhohan, Nashtaei, Khodarahmian dan Nekoonam (2016), selama proses pembekuan dan pencairan sperma mengakibatkan perubahan yang merugikan pada komposisi lipid membran, motilitas, viabilitas sperma dan juga menyebabkan peningkatan kerusakan DNA sperma. Hal ini terkait dengan reaksi osmotik, *cold shock*, pembentukan kristal es intraseluler, produksi berlebihan *reactive oxygen spesies* (ROS) dan perubahan dalam sistem pertahanan antioksidan.



Reaksi oksidatif terjadi ketika ada ketidakseimbangan antara produksi ROS dan reaksi proteksi dari sistem antioksidan, yang bertanggung jawab atas netralisasi, sehingga membentuk radikal bebas yang merupakan salah satu dari produk metabolisme spermatozoa.

Penggunaan antioksidan yang tepat dalam pengencer semen dapat mengurangi dan mencegah reaksi peroksidasi lipid akibat aktivitas radikal bebas, sehingga antioksidan menjadi faktor pertahanan utama melawan reaksi oksidatif (Silva, Soares, Batista, Almeida, Nunes, Peixoto dan Guerra, 2011). Genistein merupakan fitoestrogen yang termasuk dalam kategori isoflavon dengan sifat antioksidan. Penambahan genistein pada pengencer telah terbukti dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas sperma serta penurunan kerusakan DNA pada sperma, karena genistein memodifikasi hemodialisis membran dan menyebabkan pengurangan oksigen reaktif yang signifikan (Garcia, Guimaraes, Lopes, Rocha dan Fernandez, 2015). Pengencer harus memiliki daya preservasi tinggi, mengandung unsur yang sifat fisik dan kimiawinya hampir sama dengan semen. Tris aminomethan digunakan karena bersifat isotonis, sedangkan kuning telur dan gliserol sebagai krioprotektan atau pelindung dari suhu dingin.

Metode yang digunakan dalam proses ekuilibrasi dan *thawing* juga mempengaruhi kualitas semen. Ekuilibrasi merupakan proses adaptasi semen terhadap suhu dingin dan pengencer. Ekuilibrasi (pendinginan) sebagai total waktu spermatozoa mulai beradaptasi dengan krioprotektan atau pengencer sebelum pembekuan yang membantu menjaga integritas membran spermatozoa dan sebagai kelangsungan hidup mereka (Dolezalova, Stadník, Biniova, Duchacek dan Stupka, 2016). Sedangkan *thawing* adalah proses mencairkan



kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menimbulkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku, oleh sebab itu diperlukan metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat agar kualitas semen tidak menurun (Salim, Susilawati dan Wahyuningsih, 2012).

Berdasarkan uraian diatas maka diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh lama ekuilibrasi suhu dingin dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein sebagai antioksidan pada pengencer tris aminomethan kuning telur, sehingga dengan penambahan genistein pada pengencer serta metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat diharapkan dapat mempertahankan kualitas semen.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan dapat dirumuskan permasalahannya sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh lama ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer?
2. Bagaimana pengaruh suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer?
3. Bagaimana pengaruh interaksi antara lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer?



### **1.3. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dikemukakan, penelitian ini bertujuan sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh lama ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.
2. Untuk mengetahui pengaruh suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.
3. Untuk mengetahui pengaruh interaksi antara lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah bahwa metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat dengan penambahan genistein sebagai antioksidan dalam pengencer dapat mempertahankan kualitas semen. Hasil dari penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah bagi penelitian selanjutnya dan memperkaya pengetahuan bioteknologi reproduksi khususnya bagi instansi pembuat semen beku.

### **1.5. Kerangka Pikir**

Sapi peranakan ongole (PO) merupakan salah satu jenis bangsa sapi potong lokal yang ada di Indonesia. Jenis sapi ini sangat cocok untuk kondisi lingkungan dan alam di Indonesia, sehingga sangat bagus untuk ditenakan dan dikembangkan.

Keunggulan sapi PO antara lain tahan terhadap panas, ektoparasit dan endoparasit, pertumbuhan relatif cepat walaupun adaptasi terhadap pakan kurang, persentase karkas dan kualitas daging baik, tampilan reproduksi baik karena aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak. Upaya meningkatkan produktivitas ternak dan mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul dapat dilakukan dengan meningkatkan mutu genetik ternak melalui program Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi buatan lebih unggul daripada kawin alami karena dapat memanfaatkan semen pejantan unggul untuk banyak sapi betina produktif. IB dapat dilakukan dengan berbagai macam metode, seperti IB menggunakan semen cair atau semen beku. Keberhasilan inseminasi buatan dipengaruhi oleh beberapa hal yang memegang peranan penting, yaitu mutu semen beku yang baik dari pejantan unggul, metode dan waktu inseminasi yang tepat, serta kondisi ternak betina (Susilawati, 2013).

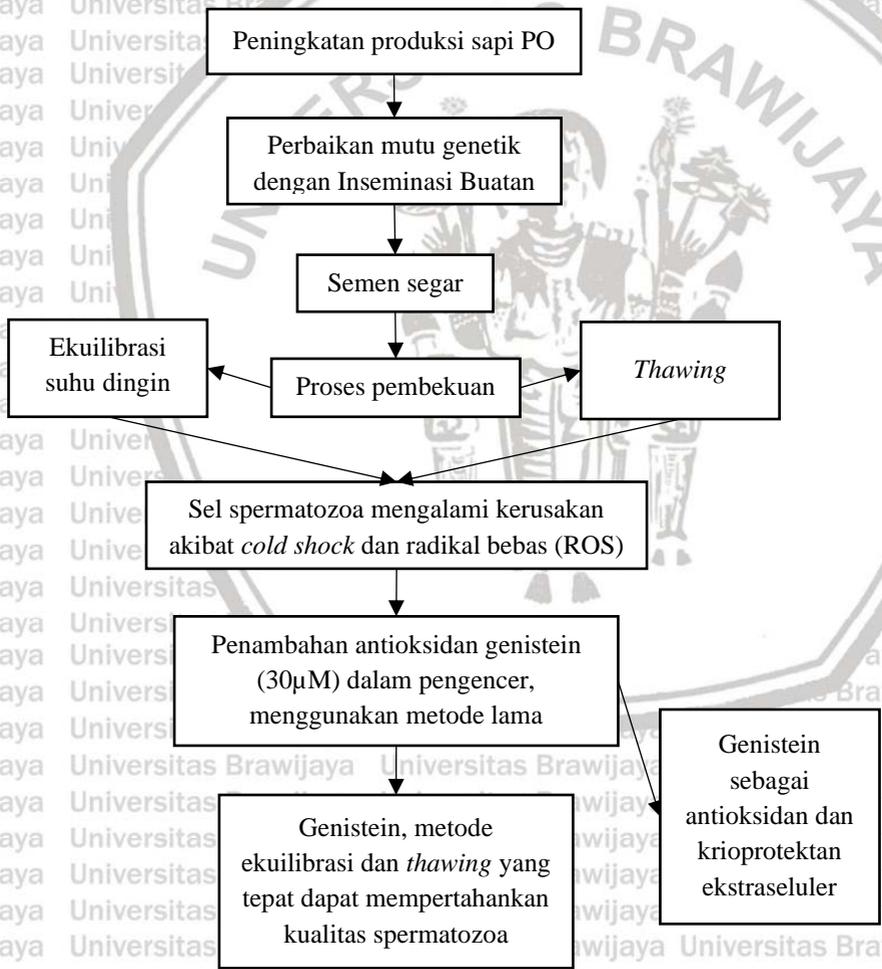
Kualitas semen beku dipengaruhi oleh pengencer dan metode pembekuan. Semen beku diperoleh menggunakan pengencer yang mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa. Salah satu pengencer yang sudah memenuhi persyaratan yaitu tris aminometan kuning telur. Pengencer tris aminometan kuning telur dapat mencegah terjadinya *cold shock* akibat proses pembekuan. Proses pembekuan dan pencairan semen mengakibatkan perubahan yang merugikan pada komposisi lipid membran, motilitas, vitalitas sperma dan juga menyebabkan peningkatan kerusakan DNA sperma. Hal ini terkait dengan reaksi osmotik, *cold shock*, pembentukan kristal es intraseluler, produksi berlebihan *reactive oxygen spesies* (ROS) (Amidi, Pazhohan, Nashtaei, Khodarahmian dan Nekoonam, 2016). Penggunaan antioksidan



seperti genistein dalam pengencer semen dapat mengurangi dan mencegah reaksi peroksidasi lipid akibat aktivitas radikal bebas, sehingga antioksidan menjadi faktor pertahanan utama melawan reaksi oksidatif (Silva, Soares, Batista, Almeida, Nunes, Peixoto dan Guerra, 2011).

Selain penambahan antioksidan dalam pengencer, diperlukan metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat agar kualitas semen beku tidak menurun, karena sampai saat ini masih banyak terdapat ketidakseragaman dalam metode ekuilibrasi dan *thawing*. Ekuilibrasi (pendinginan) sebagai total waktu spermatozoa mulai beradaptasi dengan krioprotektan atau pengencer sebelum pembekuan yang membantu menjaga integritas membran spermatozoa dan sebagai kelangsungan hidup mereka. Lama ekuilibrasi pada suhu 5°C yaitu 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam. Sedangkan *thawing* adalah proses mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Metode *thawing* dilakukan selama 15 detik pada berbagai suhu yaitu 20°C, 30°C dan 40°C. Kondisi ini menimbulkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku, oleh sebab itu diperlukan metode ekuilibrasi dan *thawing* yang tepat agar kualitas semen tidak menurun (Salim, Susilawati dan Wahyuningsih, 2012).





Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian



## 1.6 Hipotesis

2. Lama ekuilibrasi suhu dingin berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.
3. Suhu *thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.
4. Interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dan suhu *thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Sapi PO dan Pengembangannya**

Sapi potong memiliki banyak manfaat sehingga banyak dijadikan hewan ternak. Sapi PO adalah salah satu sapi potong terbanyak yang dternakkan dan dikonsumsi di Indonesia. Saat ini kebutuhan sapi potong lebih tinggi daripada ternak yang dihasilkan. Oleh karena itu diperlukan adanya pengembangan peternakan sapi potong. Sapi PO terkenal sebagai sapi pedaging dan sapi pekerja, memiliki tenaga yang kuat dan aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak (Widjaja, Akhdiat dan Purwasih, 2017). Sapi Peranakan Ongole sebagai salah satu rumpun sapi lokal, dan sebagai kekayaan sumber daya genetik ternak lokal Indonesia, harus dilindungi dan dilestarikan. Sapi PO adalah hasil persilangan antara sapi Jawa dengan sapi ongole yang didatangkan dari India sejak tahun 1904, selanjutnya dikembangkan secara turun temurun oleh masyarakat di Jawa Tengah dan Jawa Timur (Keputusan Menteri Pertanian No. 2841 Tahun 2012).

Karakteristik sapi PO (Gambar 2) yaitu warna tubuh putih sampai abu-abu, ujung ekor dan bulu sekitar mata berwarna hitam, berbadan besar, gelambir panjang menggantung dari leher sampai belakang kaki depan, berpunuk besar (jantan), berpunuk kecil (betina) dan leher pendek, memiliki tanduk, telinga kecil dan tegak kesamping. Pejantan sapi PO memiliki tinggi badan minimal 133 cm pada umur 2 tahun. Standar tinggi badan bibit sapi PO pada umur 24-36 bulan minimal sebesar 127 cm (SNI, 2015). Bobot maksimal sapi dewasa 600 kg dan sapi betina dewasa 400 kg. Persentase



karkas 45-58% dan perbandingan daging serta tulang 4,25:1 (BPTU-HPT Sembawa, 2015). Bangsa sapi ini disukai oleh peternak sebab memiliki beberapa keunggulan yaitu keragaman genetik yang cukup besar, performa reproduksi yang cukup efisien, pertumbuhan relatif yang cepat (dibandingkan sapi lokal lain), tenaga kerja yang kuat, mampu beradaptasi dengan kondisi lingkungan tropis Indonesia yang kering (udara panas dengan kelembapan rendah), mampu berkembang baik pada pemeliharaan ekstensif dan pakan yang terbatas, serta tahan serangan penyakit tropis dan parasit (Sitanggang, 2018).



Gambar 2. Pejalan Sapi Peranakan Ongole (SNI, 2015)

Sapi PO mempunyai potensi dan juga terancam sebagai sapi potong unggul yang menjadi idola peternak-peternak Indonesia. Pengembangan sapi potong terutama sapi PO memiliki posisi strategis dalam konteks pembangunan ketahanan pangan nasional. Ternak sapi potong merupakan salah satu kontributor terbesar produksi daging nasional, mengingat 98% penyediaan sapi potong dan daging sapi dalam negeri selama ini berbasis peternakan rakyat (Tulung, Pendong

dan Tulung, 2020). Menurut Supartini dan Darmawan (2014), citra sebagai idola tersebut menjadikan salah satu ancaman adanya pengurusan stok sapi PO. Kondisi tersebut perlu diatasi dengan cara meningkatkan produktivitas ternak. Hal ini dapat dilakukan melalui perbaikan mutu genetik yaitu Inseminasi Buatan (IB).

## **2.2. Inseminasi Buatan (IB)**

Inseminasi buatan adalah usaha manusia memasukkan sperma ke dalam saluran reproduksi betina dengan menggunakan peralatan khusus (Hastuti, 2008). Program IB merupakan salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil meningkatkan perbaikan mutu genetik dan produktivitas ternak, sehingga dalam waktu pendek dapat menghasilkan anak dengan kualitas baik dalam jumlah yang besar dengan memanfaatkan kapasitas reproduksi pejantan unggul secara maksimal (Sholikah, Isnaini, Yekti dan Susilawati, 2016).

Inseminasi buatan secara umum berfungsi untuk memperbaiki mutu genetik, mencegah penyakit menular, rekording lebih akurat, biaya lebih murah dan mencegah kecelakaan yang disebabkan oleh pejantan. Beberapa kelemahan dari IB jika tidak dikelola dengan baik yaitu apabila seleksi pejantan salah maka bisa menyebarkan sifat jelek, membutuhkan keterampilan yang tinggi dari balai inseminasi buatan, penyimpanan selama transport, inseminator dan peternaknya, serta bisa menghilangkan sifat bangsa lokal dalam waktu yang cepat (Kusumawati, 2017).

Teknik atau metode IB ada 2 macam yaitu metode rektovaginal contohnya pada ternak sapi dan metode transservikal contohnya pada ternak babi, kambing dan domba.

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan inseminasi buatan adalah kualitas semen, manusianya atau inseminator dan peternak yaitu ketepatan waktu IB dan penempatan semen (deposisi semen), serta fisiologi ternak betina (Susilawati, 2013).

### **2.3. Penampungan Semen**

Penampungan atau koleksi semen bertujuan untuk memperoleh semen yang volumenya banyak dan kualitasnya baik kemudian diproses lebih lanjut untuk keperluan inseminasi buatan, oleh sebab itu seleksi yang tepat pada pejantan sangat berperan penting dalam menentukan kualitas dan kuantitas semen. Banyaknya ejakulasi mempengaruhi volume semen, karena frekuensi penampungan dan ejakulasi yang terlalu sering akan menurunkan jumlah dan kualitas semen sehingga penampungan semen sebaiknya dilakukan 1-2 kali dalam seminggu (Saputra, Ihsan dan Isnaini, 2017). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas semen pejantan diantaranya genetik, umur, pakan, frekuensi ejakulasi, libido, faktor fisik, pengangkutan, besar skrotum dan kesehatan/penyakit (Ismaya, 2014). Terdapat 3 metode untuk menampung semen ternak, yaitu massage, vagina buatan, dan elektro ejakulator. Metode massage digunakan pada unggas, vagina buatan dilakukan pada ternak sapi, babi dan kambing untuk penampungan semen secara rutin, sedangkan elektro ejakulator digunakan untuk hewan langka atau ternak yang tidak dapat ditampung menggunakan vagina buatan karena kecelakaan misalnya (Kusumawati, 2017).

Metode vagina buatan menggunakan alat yang dikondisikan sebagaimana vagina asli dari ternak tersebut untuk menampung spermatozoa. Penggunaan vagina buatan untuk

menampung semen sapi telah dipakai secara luas. Pejantan akan menaiki sapi pemancing dan akan berejakulasi pada waktu penis dimasukkan ke dalam vagina buatan. Vagina buatan terdiri dari silinder karet tebal dan keras, di dalamnya dilapisi silinder karet tipis dan merupakan kantung yang dapat diisi air panas. Salah satu ujung vagina buatan dipasang karet berbentuk corong untuk menampung semen. Vagina buatan yang telah diisi air panas dan di bagian dalam diberi pelicin, akan berfungsi untuk menampung semen. Sterilisasi dalam pelaksanaan penampungan semen sangat diperlukan demi menjaga kebersihan semen (Adhitama, 2018).

#### **2.4. Uji Kualitas Semen**

Pemeriksaan semen atau uji kualitas semen bertujuan untuk menentukan apakah semen tersebut layak diproduksi menjadi semen beku atau tidak. Pemeriksaan semen pasca penampungan, harus segera dilakukan untuk menghindari kontaminasi terhadap semen (Saputra dkk., 2017). Uji kualitas semen segar dilakukan sesaat setelah penampungan atau sebelum dilakukan proses pengenceran. Uji kualitas semen segar terbagi menjadi uji makroskopis dan uji mikroskopis (Istanty, Salim, Isnaini dan Susilawati, 2017).

##### **2.4.1. Uji Makroskopis**

Uji kualitas semen secara makroskopis meliputi uji warna, bau, volume, pH, dan konsistensi (Nugroho, Susilawati dan Wahjuningsih, 2014). Rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4-7,8 dengan warna putih kekuningan atau hampir seperti susu dan memiliki bau khas (Firdausi, Susilawati dan Wahyuningsih, 2014). pH semen diukur menggunakan kertas lakmus atau pH meter. Warna semen yang tidak normal seperti



merah muda mengindikasikan terjadinya pendaharan pada penis saat penampungan. Warna semen sering dikacaukan apabila tercampur urine, oleh sebab itu dengan mencium bau semen dapat menilai dan membedakannya. Semen yang sudah ditampung dapat dihitung langsung volumenya pada tabung berskala. Volume semen sapi bervariasi setiap penampungan antara 5-10 ml (Susilawati, 2013).

Konsistensi berkolerasi dengan konsentrasi semen, sehingga penilaiannya yaitu encer ( $<1000 \times 10^6$  sperm/ml), sedang ( $1000-1500 \times 10^6$  sperm/ml) dan pekat ( $>1500 \times 10^6$  sperm/ml). Konsistensi dari semen dapat diperiksa dengan cara memiringkan tabung berisi spermatozoa secara perlahan-lahan. Semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti kemiringan tabung penampung, dimana hampir semua atau sedikit lebih kental dari susu (Wulandari, 2017).

#### **2.4.2. Uji Mikroskopis**

Uji kualitas semen secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi (Nugroho dkk., 2014). Motilitas merupakan salah satu kriteria penentu kualitas semen yang dilihat dari banyaknya spermatozoa yang motil progresif dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang ada dalam satu pandang mikroskop dengan perbesaran 100x. Motilitas massa adalah pergerakan dari sel-sel spermatozoa yang secara bersama-sama membentuk gelombang. Semakin tinggi skala gerakan atau motilitas massa, maka kualitas sperma semakin baik (Woli, Kusumawati dan Krisnaningsih, 2017). motilitas semen paling bagus yaitu 3+ yang menunjukkan pergerakan koloni spermatozoa sangat progresif dan pekat serta nilai 2+ yang menunjukkan

pergerakan koloni spermatozoa progresif namun tipis atau tidak terlalu pekat (Sunami, Isnaini dan Wahjuningsih, 2017). Evaluasi motilitas semen juga sangat penting untuk mengamati fungsi kelenjar asesoris di dalam menghasilkan seminal plasma. Pada semen segar dengan konsentrasi tinggi sulit untuk diamati sehingga perlu diencerkan. Gerak individu spermatozoa dapat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x (Susilawati, 2013). Motilitas inividu semen segar yaitu 50-80% spermatozoa progresif dan menghasilkan gerakan massa sedangkan motilitas semen segar sapi dikatakan baik yaitu berkisar antara 70-90% (Savitria, Suharyatib dan Siswanto, 2014).

Viabilitas adalah persentase spermatozoa yang hidup dan mati serta menjadi indikator penentu kualitas semen karena berhubungan daya hidup spermatozoa (Lestari, Ihsan dan Isnaini, 2014). Spermatozoa yang hidup dan mati dapat dibedakan dengan indikator warna eosin dan negrosin. Eosin dan negrosin adalah pewarna sel yang paling baik dipergunakan untuk prosedur ini, sehingga pengamatan sel spermatozoa menjadi jelas. Spermatozoa diklasifikasikan berdasarkan tidak bewarna yang artinya hidup dan merah artinya mati. Spermatozoa yang mati akan bewarna merah karena membrannya rusak dan menyerap warna eosin negrosin (Indriani, Susilawati dan Wahyuningsih, 2013).

Abnormalitas spermatozoa disebabkan oleh beberapa faktor antara lain penyakit, stres panas (manajemen pemeliharaan), proses kriopreservasi, perbedaan bangsa ternak serta musim. Selain itu tingkat abnormalitas juga bisa disebabkan oleh preservasi pasca koleksi dan pewarnaan (Ardhani, Raharja, Boangmanalu dan Handoko, 2018). Abnormalitas spermatozoa semen segar melebihi 20% dapat

menurunkan fertilitas dan dapat dilihat menggunakan indikator warna eosin negrosin untuk menghitung persentasenya (Hijriyanto, Dasrul, dan Thasmi, 2017). Abnormalitas sperma dikelompokkan menjadi 2 yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada testis saat proses spermatogenesis tepatnya di tubuli seminiferi. Abnormalitas primer ditandai oleh kepala yang terlampau kecil (*microcephalic*) atau terlalu besar (*macrocephalic*), kepala yang lebar, ekor atau badan berganda dan lain-lain. Abnormalitas sekunder terjadi di epididimis sewaktu ejakulasi. Abnormalitas sperma ditandai dengan adanya butiran protoplasma pada pangkal ekor sperma (Hafez, 2000). Konsentrasi semen yaitu jumlah spermatozoa yang terkandung dalam satu ml ejakulasi. Konsentrasi spermatozoa tiap milliliter semen sangat penting, karena faktor ini dipakai sebagai kriteria penentu kualitas semen dan menentukan tingkat pengencerannya. Konsentrasi semen dapat dihitung dengan menggunakan haemocytometer, calorimeter atau spectrophotometer (Susilawati, 2013).

#### **2.4.3. Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test)**

Evaluasi integritas membran sel umumnya diuji menggunakan larutan *Hypoosmotic Swelling Test* untuk membedakan selaput yang utuh dan yang mengalami kerusakan sel. Secara prinsip HOS Test untuk melihat status membran, karena integritas membran berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa ( Lenchniak, Kedziesski and Stainislawski, 2002). Prinsip dari *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS-Test) adalah memaparkan larutan hipoosmotik kedalam semen sampai tercapai equilibrium antara sitoplasma dengan lingkungan ekstraseluler. Membran plasma yang utuh akan ditandai dengan melengkungnya ekor spermatozoa sedangkan spermatozoa



dengan membran plasma yang rusak tidak terlihat pembengkakan ekor karena membran plasma tidak dapat mempertahankan larutan hipoosmotik (Pratiwi, Soeparna dan Solihati, 2015). Spermatozoa dengan membran utuh jika ditempatkan pada media hipoosmotik akan berusaha meningkatkan volume air di dalam tubunya agar cairan di dalam dan di luar spermatozoa tetap seimbang. Upaya ini menyebabkan terjadinya penyempitan pada membran yang menutupi ekor, sehingga memaksa ekor spermatozoa melingkar. Proses menggelembung diawali pada bagian ujung ekor, dilanjutkan bagian tengah dan kepala sehingga menyebabkan kepala menggelembung. Ekor yang melingkar atau menggelembung berarti membrannya utuh atau spermatozoa motil, biasanya untuk pengamatan diberi pewarna eosin (Indriani dkk., 2013).

Menurut Teja, Bebas dan Trilaksana (2018), Spermatozoa terpapar pada medium hipoosmotik, maka air akan mengalir ke dalam spermatozoa sampai tercapai keseimbangan osmotik antara larutan di dalam dan di luar spermatozoa sehingga spermatozoa bengkak. Kebengkakan ini berupa pembengkakan yang mudah dilihat. Peristiwa osmosis pada spermatozoa ini dapat terjadi karena membran plasmanya bersifat semipermeabel dan berfungsi normal. Jadi, spermatozoa yang terpapar pada medium hipoosmotik dan memperlihatkan pembengkakan ekor adalah spermatozoa yang normal. Casper, Meriano, Jarvi, Cowan and Lucato (1995) menambahkan HOS Test dikembangkan untuk melihat kemampuan membran spermatozoa sebagai sarana transport. Sperma dalam larutan hipoosmotik, apabila membran berfungsi dengan baik maka akan terjadi pembengkakan pada membran plasma dan pembengkakan ekor. Hal ini disebabkan karena



peranan low density lipoprotein (LDL) yang mampu melindungi spermatozoa.

## 2.5. Pengenceran Semen

Pengenceran semen memiliki prinsip dan tujuan untuk menambah volume semen dan memberi zat-zat makanan yang dibutuhkan selama pembekuan untuk mempertahankan kualitas, daya tahan hidup dan fertilitas sperma. Pengenceran juga berfungsi untuk melindungi sperma dari terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), mencegah tumbuhnya kuman dan sebagai penyanggah dalam menjaga kestabilan pH. Pengencer harus mempunyai sifat-sifat seperti plasma semen yaitu dapat menciptakan keadaan yang memungkinkan sperma tahan terhadap kondisi buatan selama penyimpanan. Beberapa bahan pengencer yang biasa digunakan adalah tris aminomethan, kuning telur, susu skim atau air kelapa, dan juga ditambah dengan gliserol atau etilen glikol atau *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Fahlevi, 2019).

Kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup lebih lama di dalam suatu medium pengencer dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimiawi pengencer. Bahan pengencer semen beku harus mengandung nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik dan krioprotektan. (Wiratri, Susilawati dan Wahyuningsih, 2014). Terdapat dua alasan pokok semen perlu diencerkan sebelum pembekuan yaitu alasan teknis dan alasan biologis. Alasan teknis adalah untuk dapat menginseminasi lebih banyak betina dari semen pejantan unggul, sedangkan alasan biologisnya agar memberikan medium yang cocok sebagai sumber nutrisi, kontrol pH serta mempertahankan tekanan osmotik spermatozoa. Beberapa syarat sebagai pengencer yaitu bahan tidak toksik terhadap spermatozoa,

mengandung sumber energy, bersifat isotonis, mengandung *buffer*, melindungi dari pengaruh pendinginan secara cepat, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume sehingga bisa digunakan beberapa kali IB. Persyaratan tambahan lain adalah mudah membuatnya, tidak menghalangi saat uji kualitas dan harganya terjangkau (Susilawati, 2013).

Uni Tris Aminomethan kuning telur merupakan pengencer yang telah diketahui memiliki kandungan yang dibutuhkan spermatozoa dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan suhu ruang dan dingin. Tris aminomethan kuning telur memberikan motilitas spermatozoa pasca *thawing* yang lebih tinggi dibandingkan dengan sitrat kuning telur. Tris aminomethan selain mempunyai sistem penyangah yang baik juga memiliki toksisitas yang rendah. Telah banyak dibuktikan bahwa penggunaan pengencer tris untuk pengenceran semen sapi baik untuk perlakuan cair maupun beku (Ardiansyah, Saili dan Rahadi, 2020). Komposisi pengencer tris aminomethan kuning telur yang digunakan meliputi tris aminomethan, asam sitrat, laktosa, fruktosa, raffinosa, kuning telur, penisilin, streptomycin dan aquabides (Siswandoko, Zaenab dan Husamah, 2017).

Pada pengencer tris aminomethan kuning telur mengandung krioprotektan ekstraseluler berupa kuning telur yang mengandung lipoprotein dan lesitin yang berfungsi sebagai pelindung (krioprotektan) pada pembekuan semen. Kuning telur sebagai bahan krioprotektan ekstraseluler berfungsi sebagai media penyedia makanan, sumber energi dan pelindung eskraseluler spermatozoa dari *cold shock* (Maulana, Isnaini dan Wahjuningsih, 2016). Tris aminomethan berfungsi sebagai *buffer* yang bersifat basa mampu mempertahankan pH larutan tetap stabil. Asam sitrat pada pengencer tris



aminomethan kuning telur berfungsi sebagai *buffer* pendispersi lemak pada kuning telur dan berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Laktosa berperan sebagai sumber energi sedangkan raffinosa sebagai sumber energi yang mencegah efek letal dari pembekuan. Selain itu ditambahkan juga gliserol untuk proses pembekuan, karena gliserol berfungsi sebagai krioprotektan atau pelindung dari efek letal pembekuan dan mencegah terjadinya dehidrasi karena memiliki daya pengikat air yang kuat (Fitriyati, 2019).

## **2.6. Ekuilibrase, Pembekuan dan Penyimpanan Semen**

Semen beku adalah semen yang telah diberi penambahan pengencer untuk memberikan nutrisi pada semen, dengan tujuan meningkatkan kualitas semen yang disimpan dengan keadaan beku dalam kontainer yang berisi nitrogen cair dengan suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Semen beku yang berkualitas baik ditunjukkan dengan persentase motilitas dan persentase hidup *post thawing* yang tinggi. Semen beku memiliki keunggulan yaitu dapat disimpan dalam jangka waktu lama, namun memiliki kelemahan penurunan kualitas semen selama proses pembekuan karena melewati berbagai suhu ekstrim yang dapat menurunkan kualitas. Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Malik, Fauzi, Zakir dan Sakiman, 2017).

Setelah pengenceran semen dilakukan proses gliserolisasi dan ekuilibrase. Gliserolisasi adalah proses penambahan gliserol ke dalam pengencer untuk melindungi spermatozoa dari efek lethal selama proses pembekuan. Penambahan gliserol dilakukan beberapa jam sebelum pembekuan agar spermatozoa dapat berekuilibrase atau



beradaptasi dengan pengencer. Ekuilibrasi ada 2 yaitu ekuilibrasi yang dilakukan pada suhu dingin dan pada nitrogen cair. Ekuilibrasi semen sapi umumnya dilakukan selama 1-2 jam pada suhu 4-5°C (Dolezalova et al., 2016). Sebelum dilakukan *pre freezing* perlu dilakukan uji motilitas setelah pengenceran atau disebut *before freezing*. Motilitas *before freezing* adalah motilitas individu setelah dilakukan pengenceran. Motilitas *before freezing* harus memiliki syarat minimal  $\geq 55\%$  agar dapat diproses menjadi semen beku sesuai standart (Sudarmanto, Susilawati dan Isnaini, 2015). Penyimpanan straw di dalam kontainer dapat bertahan lebih dari 20 tahun, dimana setiap 6 bulan sekali ditambahkan nitrogen cair secara berkelanjutan (susilawati, 2013).

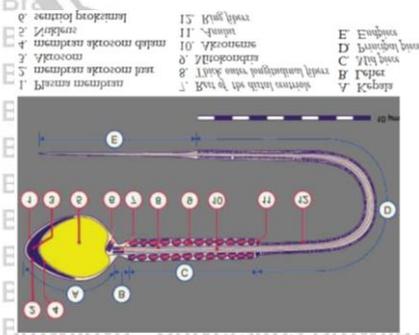
## **2.7. Reaksi Biogemis selama Penyimpanan**

### **2.7.1. Struktur Spermatozoa dan Lipid Bilayer Membran**

Spermatozoa dibentuk dalam tubuli seminiferi yang berada di dalam testes. Bentuk spermatozoa yang sempurna adalah sel yang memanjang, terdiri dari kepala yang tumpul dimana di dalamnya terdapat nukleus, leher, dan ekor. Pada kepala terdapat akrosom yang memiliki struktur dinding yang rangkap dan terletak diantara membran plasma bagian anterior nukleus (Susilawati, 2011). Bagian kepala sampai ekor spermatozoa dilapisi oleh membran dengan struktur yang sangat kompleks dan teratur serta memiliki peran yang spesifik pada permukaannya. Membran plasma merupakan bagian spermatozoa yang sangat berperan dalam proses fertilisasi. Struktur internal spermatozoa sapi dapat dilihat pada Gambar 3. Membran plasma sel spermatozoa (Gambar 4) kaya akan asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, dan arakidonat) sehingga rentan terhadap kerusakan akibat reaksi peroksidasi

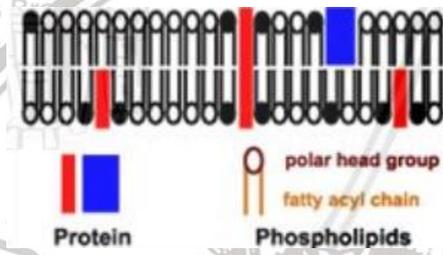
lipida. Komposisi membran plasma sel spermatozoa berhubungan dengan tingkat kerentanan spermatozoa terhadap cekaman dingin (*cold shock*), terutama kandungan lipida (Rizal dan Herdis, 2010).

Membran plasma membatasi isi sel dari lingkungan luarnya. Secara umum membran sel terdiri dari senyawa-senyawa lipida, protein dan karbohidrat, dengan kandungan lipida  $\pm 40\%$ , protein 40%, karbohidrat 1-10% dan air  $\pm 20\%$ . Lipida membran terdiri dari 2 lapisan, satu lapisan terorientasi ke arah luar, dan lapisan yang lain terorientasi ke arah sitoplasma. Setiap molekul lipida bersifat amfipatik, dimana mengandung komponen yang bersifat hidrofobik (non polar / tidak suka air) dan komponen yang bersifat hidrofilik (polar / suka air). Terdapat 4 kelas utama yang bersifat amfipatik pada lipida membran, yaitu fosfolipida, sfingolipida, glikolipida dan sterol (Herdis, 2015).



Gambar 3. Struktur Internal Spermatozoa Sapi (Susilawati, 2011).



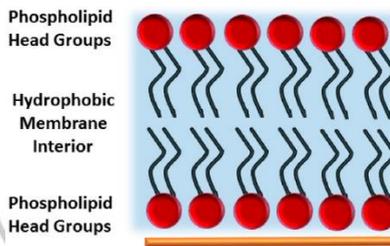


Gambar 4. Struktur Membran Spermatozoa (Fitriyati, 2019)

Lipid bilayer (Gambar 5) merupakan hidrofobik efek, artinya ketidakmampuan hidrokarbon menjadi ikatan hidrogen dengan air. Membran ini adalah lembaran datar yang membentuk penghalang terus menerus di sekitar semua sel. Lapisan lipid bilayer adalah penghalang yang menyimpan ion, protein dan molekul lain yang dibutuhkan dan mencegahnya berdifusi ke area yang tidak seharusnya. Lapisan lipid bilayer cocok untuk peran ini, meskipun lebarnya hanya beberapa nanometer, karena mereka tidak dapat ditembus oleh sebagian besar molekul yang larut dalam air (hidrofilik). Lapisannya sangat kedap terhadap ion, yang memungkinkan sel untuk mengatur konsentrasi garam dan pH dengan mengangkut ion melintasi membrannya menggunakan protein yang disebut pompa ion (Robertson, 2018).

Ketika fosfolipid terkena air, mereka berkumpul sendiri menjadi lembaran dua lapis dengan ekor hidrofobik mengarah ke tengah lembaran. Pengaturan ini menghasilkan dua selebaran yang masing-masing merupakan satu lapisan molekul. Bagian tengah lapisan ganda ini hampir tidak mengandung air dan tidak termasuk molekul seperti gula atau garam yang larut dalam air. Proses perakitan didorong oleh interaksi antara molekul

hidrofobik (disebut juga dengan efek hidrofobik). Peningkatan interaksi antara molekul hidrofobik (menyebabkan pengelompokan daerah hidrofobik) memungkinkan molekul air untuk lebih bebas terikat satu sama lain dan meningkatkan entropi sistem. Proses kompleks ini mencakup interaksi non-kovalen seperti gaya van der Waals, ikatan elektrostatik dan hidrogen (Andersson and Koper, 2016)

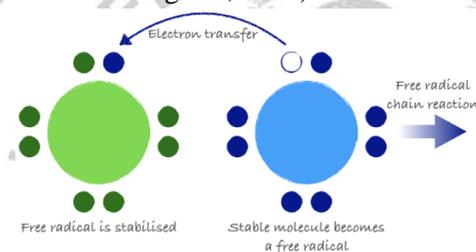


Gambar 5. Lipid Bilayer (Andersson and Koper, 2016)

### 2.7.2. Radikal Bebas (*Reactive Oxygen Species*)

Pembekuan semen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi produksi dan kualitas semen beku karena dalam proses pembekuan akan mengakibatkan terjadinya kerusakan (Aisah, Isnaini dan Wahyuningsih, 2017). Semen akan mengalami proses metabolisme selama penyimpanan pada suhu ruang maupun dingin. Metabolisme semen menghasilkan salah satunya reaksi peroksidatif lipid jika bereaksi dengan radikal bebas (Zaniboni, Rizzi and Cerolini, 2006). Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sifatnya sangat tidak stabil karena mempunyai satu elektron atau lebih yang tidak berpasangan, sehingga untuk memperoleh pasangan elektron, senyawa ini bereaksi dengan atom atau molekul lain seperti asam lemak tidak jenuh, protein, asam nukleat atau

lipopolisakarida, yang berakibat akan menimbulkan senyawa yang tidak normal (Triwulanningsih, Situmorang, Sugiarti, Sianturi dan Kusumaningrum, 2003).



Gambar 6. Aktivitas Radikal Bebas (Adcock, 2018)

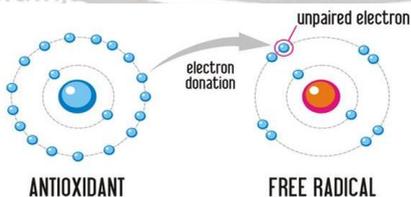
Radikal bebas berpartisipasi aktif dalam proses yang berbeda-beda, tidak hanya sebagai agen yang merusak, tetapi juga berperan dalam beberapa fungsi normal organisme hidup. Radikal bebas merupakan hasil berbagai proses metabolik dan fisiologik, dimana produksi yang berlebihan menyebabkan stress oksidatif (Tafari, Ciani, Lorio, Esposito and Cocchia, 2015). Radikal bebas yang terdapat pada spermatozoa ditandai dengan meningkatnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Sikka, 2004). Produksi ROS yang berlebihan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan, sehingga antioksidan pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang disebut lipid peroksidase. Lipid peroksidase merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran spermatozoa yang menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa. Senyawa ROS mengakibatkan peroksidasi lipid yang dapat memicu hilangnya integritas membran, menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, inaktivasi enzim, kerusakan



struktur DNA, dan kematian sel (Effendi, Wahjuningsih dan Ihsan, 2015)

## 2.8. Antioksidan

Terbentuknya radikal peroksida lipid dapat ditekan oleh antioksidan (Suyadi, dkk., 2012). Penambahan antioksidan pada bahan pengencer merupakan upaya untuk meminimalkan kerusakan membran spermatozoa akibat peroksidasi lipid selama pembekuan (Putri, Hermawan dan Suyadi, 2019). Antioksidan adalah suatu substansi yang dapat menunda, mencegah dan menyingkirkan kerusakan oksidatif pada molekul targetnya (Halliwelli dan Gutteridge, 2007 in Shebis et al., 2013). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas dengan jalan meredam aktivitas radikal bebas atau memutus rantai reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Miryanti, Lanny, Kurniawan dan Indra, 2011).



Gambar 7. Reaksi Antioksidan dengan Radikal Bebas (Jalali, 2017)

Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarti, 2010). Antioksidan merupakan substansi pada konsentrasi kecil secara signifikan dapat menghambat atau mencegah oksidasi

pada substrat. Antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik yang diijinkan dan umum digunakan untuk makanan yaitu *butyl hidroksilanisol* (BHA), *butyl hidroksitoluen* (BHT), profil galat dan tokoferol. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik yang dapat berupa flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik olifungsional (Isnindar, Wahyuono dan Setyowati, 2011).

Radikal bebas (OH) dihasilkan oleh reaksi oksidasi. Radikal bebas akan menyerang dan bereaksi dengan molekul-molekul lain di sekitarnya sehingga menimbulkan reaksi berantai yang membahayakan. Penambahan antioksidan akan menyebabkan radikal bebas bereaksi dengan antioksidan sehingga membentuk ikatan yang stabil dan menghasilkan molekul yang tidak berbahaya.

Reaksi tanpa adanya antioksidan:

Reaktan  $\rightarrow$  Produk + OH

OH + (DNA, protein, lipid)  $\rightarrow$  Produk + Radikal bebas yang lain

Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya.

Reaksi dengan adanya antioksidan:

Reaktan  $\rightarrow$  Produk + OH

OH + antioksidan  $\rightarrow$  Produk yang stabil

Radikal bebas bersifat sangat mudah teroksidasi dibandingkan dengan molekul lain, sehingga radikal bebas akan cenderung bereaksi dengan antioksidan terlebih dahulu, dari pada molekul disekitarnya (Pratama dan Busman, 2020).



## 2.9. Pengaruh Genistein sebagai Antioksidan

Genistein merupakan fitoestrogen yang termasuk dalam kategori isoflavon dengan sifat antioksidan. Penambahan genistein pada pengencer telah terbukti dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas sperma serta penurunan kerusakan DNA pada sperma, karena genistein memodifikasi hemodialisis membran dan menyebabkan pengurangan oksigen reaktif yang signifikan (Garcia, Guimaraes, Lopes, Rocha and Fernandez, 2015). Isoflavon berperan sebagai antioksidan mempunyai kemampuan untuk mencegah peroksidasi lipid. Isoflavon berfungsi sebagai antioksidan primer karena berperan sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menghambat reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Kemampuan antioksidan untuk mendonasikan hidrogen mempengaruhi aktivitasnya. Antioksidan senyawa flavonoid dapat mendonorkan hydrogen pada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal stabil berenergi rendah yang berasal dari senyawa flavonoid yang kehilangan atom hidrogen. Radikal antioksidan yang terbentuk menjadi lebih stabil melalui proses resonansi dalam struktur cincin aromatiknya, sehingga tidak mudah untuk terlibat pada reaksi radikal yang lain (Astuti, 2008).

Inovasi dalam penggunaan senyawa antioksidan seperti Genistein, fitoestrogen yang terdapat pada tanaman kedelai. Fitoestrogen merupakan senyawa kimia yang berasal dari tumbuhan dan mampu mengikat serta mengirimkan sinyal ke reseptor estrogen. Fitoestrogen memiliki aktivitas biologis yang mirip dengan estrogen, yang mempengaruhi proses reproduksi pada manusia dan hewan dengan mengoptimalkan perilaku reproduksi sesuai morfologi dan fungsi organ reproduksi. Genistein memiliki beberapa fungsi sebagai inhibitor,

angiogenesis, peroksidasi lemak, antioksidan, dan senyawa anti kanker. Sifat antioksidan dan anti-inflamasi genistein dapat memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan penurunan *reactive oxygen species* (ROS) yang signifikan. Dengan demikian, memiliki pengaruh langsung terhadap fungsi sel spermatozoa dewasa. Pengaruh genistein dapat mendukung seluruh proses reproduksi (Prihantoko, Yuliasuti, Haniarti, Kusumawati, Widayati dan Budiyanto, 2020).

## **2.10. Thawing**

*Thawing* merupakan proses pencairan kembali semen yang telah dibekukan sebelum digunakan untuk kegiatan inseminasi buatan. Lama waktu dan suhu *thawing* berpengaruh nyata terhadap kualitas spermatozoa, khususnya terhadap kelengkapan sel spermatozoa pada semen. Semen yang berkualitas sangat diperlukan pada program IB. Penilaian semen yang baik untuk inseminasi buatan tidak hanya dilihat secara kualitas tapi juga kuantitasnya, pada saat sebelum dibekukan maupun sesudah dibekukan. Suhu *thawing* yang sesuai di harapkan dapat mencegah kerusakan dari sel spermatozoa. Sehingga spermatozoa tetap memiliki kemampuan yang tinggi untuk membuahi ovum (Malinda, Santoso, dan Latuconsina, 2021). *Thawing* (pengenceran produk beku) atau proses pencairan kembali semen beku mempengaruhi kualitas spermatozoa, karena dengan faktor ini menentukan jumlah spermatozoa yang hidup dan mati serta dapat membuahi sel telur yang telah diovulasikan. Semen beku yang di *thawing* pada suhu yang tidak tepat akan mempengaruhi kualitas spermatozoa dan mempengaruhi fertilitas. Oleh karena itu perlu diperhatikan suhu *thawing* agar tingkat kematian



spermatozoa yang tinggi sesudah *thawing* melalui pengaruh panas yang berlebihan dapat dihindarkan (Hoesni, 2013).

Rodriguez, Almeida, Cuadras, Anchondo, Romo, Garcia, Sanchez, Jimenez, Alarcon dan Rojo. (2005), melaporkan bahwa proses *thawing* pada semen beku sapi dengan suhu 37°C selama 60 detik menyebabkan terjadinya beberapa kerusakan pada membran spermatozoa. Motilitas, viabilitas dan integritas membran tertinggi yaitu *thawing* pada air bersuhu 37°C selama 30 detik. Keperluan IB komersil pada sapi, sebaiknya *thawing* dilakukan pada air bersuhu 37°C selama 20 detik karena lebih praktis serta semen beku tidak boleh di *thawing* di bawah suhu 15°C. Perbedaan kualitas semen beku post *thawing* tersebut menunjukkan bahwa *thawing* pada suhu dan durasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pula pada kualitas semen beku post *thawing* (Salim dkk., 2012). Prinsip *thawing* yakni peningkatan suhu semen secara konstan, perubahan suhu yang mendadak akan menyebabkan kematian spermatozoa. Untuk Indonesia, metode *thawing* yang paling praktis adalah dengan menggunakan air kran atau sumur, dengan catatan semen yang sudah dicairkan harus diinseminasikan dalam waktu kurang dari 5 menit (Fauzan, Hartono dan Santosa, 2014).



## BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban, Jawa Timur pada tanggal 22 Maret - 22 April 2021.

### 3.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen segar dari 2 ekor Sapi PO (ear tag 858 dan 0048) yang berada di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban. Sapi tersebut berumur sekitar 6-7 tahun dengan estimasi bobot badan 350-400kg. Sapi PO di lokasi ini diberi pakan hijauan dan konsentrat sebanyak 10% dari total bobot badan serta dipelihara dalam kandang berbentuk *gable*. Penampungan dilakukan pada hari Senin, 12 April 2021 (sekali dalam 1 minggu) menggunakan teknik vagina buatan dan betina pemancing oleh tenaga ahli dari BBIB Singosari.

Persyaratan semen segar yang digunakan yaitu semen yang memiliki motilitas individu  $\geq 70\%$  dan motilitas massa  $2+$ . Pengencer yang digunakan adalah pengencer tris aminomethan (MERCK Jerman) yang didapat dari Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Kuning telur untuk bahan pengencer menggunakan telur ayam kampung yang dibeli langsung dari peternak di Pasar Besar Malang. Genistein sebagai antioksidan berasal dari Sigma Aldrich dengan nomor batch yang dibeli dari Kota Surabaya, Jawa Timur. Larutan untuk HOS Test (*Hypoosmotic Swelling Test*) didapat dari Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.



Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikroskop binokular (Olympus CX21), timbangan analitik, tabung reaksi, gelas ukur, *magnetic stirrer*, *sentrifuge*, spatula, termometer, spuit, mikro pipet, *erlenmeyer*, gunting, *haemocytometer*, bunsen, kawat ose, *beaker glass*, *object glass*, *cover glass*, *refrigerator*, *timer*, indikator pH, bluetip, pinset, vagina buatan dan *collection tube*.

### 3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*) menggunakan 2 faktor perlakuan dengan masing-masing faktor terdapat 3 perlakuan dan 5 kali ulangan. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial), dengan perlakuan penelitian sebagai berikut:

P1:

- Tris Aminomethan kuning telur (genistein  $30\mu\text{M}$ ) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1 jam + Suhu *Thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  (1 menit).
- Tris Aminomethan kuning telur (genistein  $30\mu\text{M}$ ) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1 jam + Suhu *Thawing*  $30^{\circ}\text{C}$  (1 menit).
- Tris Aminomethan kuning telur (genistein  $30\mu\text{M}$ ) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1 jam + Suhu *Thawing*  $40^{\circ}\text{C}$  (1 menit).

P2:

- Tris Aminomethan kuning telur (genistein  $30\mu\text{M}$ ) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1,5 jam + Suhu *Thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  (1 menit).



- Tris Aminomethan kuning telur (genistein 30 $\mu$ M) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1,5 jam + Suhu *Thawing* 30°C (1 menit).
- Tris Aminomethan kuning telur (genistein 30 $\mu$ M) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 1,5 jam + Suhu *Thawing* 40°C (1 menit).

### P3:

- Tris Aminomethan kuning telur (genistein 30 $\mu$ M) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 2 jam + Suhu *Thawing* 20°C (1 menit).
- Tris Aminomethan kuning telur (genistein 30 $\mu$ M) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 2 jam + Suhu *Thawing* 30°C (1 menit).
- Tris Aminomethan kuning telur (genistein 30 $\mu$ M) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin 2 jam + Suhu *Thawing* 40°C (1 menit).

## 3.4. Prosedur Penelitian

### 3.4.1. Pelarutan Genistein

Prosedur pelarutan genistein 10mg dilakukan sebagai berikut:

1. Dibuka botol genistein
2. Dilarutkan dengan 7,4 ml DMSO secara bertahap dalam botol genistein, diletakkan dalam beaker glass.
3. Dilarutkan larutan genistein dengan aquadest hingga mencapai 74ml.
4. Didapatkan larutan stock genistein dengan konsentrasi 500 $\mu$ M.



Prosedur pembuatan larutan genistein dengan konsentrasi yang diinginkan, dilakukan sebagai berikut:

1. Dihitung kebutuhan larutan genistein ( $\mu\text{M}$  atau ml).
2. Diambil genistein ( $\mu\text{M}$  atau ml) sesuai kebutuhan menggunakan mikropipet atau spuit.
3. Diletakkan larutan genistein dalam mikrotube atau wadah yang memadai.
4. Dibekukan genistein dan disimpan pada *freezer* hingga saat akan digunakan.

### **3.4.2. Pembuatan Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur + Genistein**

Pengencer tris aminomethan dibuat sehari sebelum melakukan penampungan semen, agar setelah penampungan semen, pengencer sudah siap dan dapat langsung digunakan. Alat dalam pembuatan pengencer yaitu erlenmeyer, pipet ukur, mikro pipet 1000 $\mu\text{l}$ , timbangan analitik, *beaker glass*, *magnetic stirrer*, *aluminium foil*, panci pemanas, spatula, *refrigerator*, termometer, kompor dan *disposable syringe* (spuit).

Prosedur pembuatan pengencer tris aminomethan kuning telur + genistein sebagai berikut:

1. Disiapkan alat dan bahan yang terdiri dari 80% tris aminomethan dan 20% kuning telur dari total pengencer yang dibuat, serta 30 $\mu\text{M}$  Genistein.
2. Dimasukkan tris aminomethan, kuning telur dan genistein ke dalam erlenmeyer.
3. Dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 10-15 menit, lalu pindahkan ke tabung reaksi.
4. Disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 1.500 rpm.



5. Diambil supernatant dan disimpan dalam refrigerator selama  $\pm 24$  jam. Setelah 24 jam diambil kembali supernatant dan dibuang endapannya.
6. Apabila langsung digunakan disentrifugasi kembali selama 30 menit dengan kecepatan 1.500 rpm.
7. Diambil supernatant dan pengencer siap digunakan

#### 3.4.3. Penampungan Semen

Penampungan semen sapi PO dilakukan sebanyak 1 kali dalam seminggu. Semen ditampung menggunakan metode vagina buatan yang dilakukan oleh petugas khusus. Vagina buatan dilengkapi dengan collection tube berskala yang diselimuti dengan kain hitam atau alumunium foil (bahan gelap) agar semen tidak terkena cahaya matahari langsung. Bagian dalam vagina buatan diisi menggunakan air dengan suhu  $45^{\circ}\text{C}$ , dan bagian luar diolesi vaselin agar tidak terjadi lecet pada penis. Penampungan semen pejantan sapi PO menggunakan pemancing sapi betina yang dimasukkan ke dalam *service create*. Sebelum dilakukan penampungan semen, dilakukan false mounting sebanyak 3-5 kali untuk meningkatkan libido pejantan. Setelah pejantan menaiki pemancing, vagina buatan dibawa dengan tangan kanan dengan sudut kemiringan  $35^{\circ}$  dengan lubang vagina buatan menghadap kebawah. Tangan kiri memegang preputium, lalu ditarik perlahan ke arah kolektor. Pada saat ereksi, penis diarahkan ke dalam lubang vagina buatan. Saat ejakulasi gerakan vagina buatan harus mengikuti arah dan kecepatan gerakan penis. Setelah ejakulasi dan semen terambil, *collection tube* diarahkan ke bawah dan lubang vagina buatan agak ke atas agar semen tidak tumpah (Susilawati, 2013).

### **3.4.4. Pemeriksaan Kualitas Semen**

#### **A. Uji Makroskopis**

##### **a. Volume**

Volume spermatozoa yang ditampung dapat langsung dilihat pada skala tabung penampung berskala.

##### **b. Warna**

Warna semen dilihat langsung dari tabung semen. Semen segar dapat berwarna putih susu, krem atau kekuningan.

##### **c. Bau**

Aroma spermatozoa diperiksa dengan cara mencium secara langsung spermatozoa segar hasil penampungan menggunakan indera penciuman.

##### **d. Konsistensi**

Konsisten semen ditetapkan berdasarkan tingkat kekentalan dan sangat terkait dengan konsentrasi, dengan dasar penentuan bahwa semen dengan krem kental mempunyai konsentrasi 1000 – 2000 juta sel/ml semen, konsistensi susu encer memiliki konsentrasi 500 – 600 juta sel/ml semen, sedangkan semen dengan konsistensi cair berawan hanya sedikit kekeruhan konsentrasi kurang dari 100 juta sel/ml semen; dan semen yang jernih seperti air konsentrasi spermatozoa kurang dari 50 juta sel/ml semen.

##### **e. pH**

Penentuan pH dengan melihat perubahan warna pada kertas lakmus yang ditetesi sample semen kemudian dicocokkan dengan warna pada kertas kalibrasi kemudian dibaca pHnya.

#### **B. Uji Mikroskopis**

##### **a. Motilitas Massa**

Prosedur pemeriksaan motilitas massa spermatozoa (Susilawati, 2013):

1. Diambil satu tetes semen segar menggunakan ose
2. Diletakkan pada object glass
3. Diamati menggunakan mikroskop tanpa menggunakan cover glass dengan perbesaran 100 kali.

Kriteria penilaian gerak massa spermatozoa yaitu:

- a. Sangat baik (+++), terlihat adanya kumpulan awan gelap yang bergerak aktif dan sangat cepat seperti awan gelap ketika akan turun hujan.
- b. Baik (++), bila terdapat gelombang-gelombang kecil, kelihatan seperti awan gelap tetapi gerakannya tidak terlalu cepat.
- c. Kurang baik (+), jika yang terlihat hanya pergerakan individu saja dan tidak ada kumpulan spermatozoa.
- d. Buruk (0), apabila tidak terjadi pergerakan pada spermatozoa.

**b. Motilitas Individu**

Prosedur pemeriksaan motilitas individu spermatozoa (Susilawati, 2011):

1. Diambil satu tetes semen segar menggunakan ose.
2. Diletakkan pada object glass dan ditutup menggunakan cover glass.
3. Diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali.

**c. Viabilitas**



Preparat viabilitas spermatozoa dibuat dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin. Susilawati (2011) menjelaskan bahwa cara kerjanya adalah:

1. Diambil semen satu tetes menggunakan ose.
2. Diletakkan pada ujung object glass.
3. Ditetaskan satu tetes larutan eosin-negrosin didekat semen dan dicampur dengan menggunakan kawat ose.
4. Diletakkan object glass lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik ke arah ujung lain sehingga akan menghasilkan preparat ulas yang merata pada seluruh permukaan object glass.
5. Preparat tersebut dikeringkan dengan diangin-anginkan.
6. Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Menghitung spermatozoa yang hidup, yaitu spermatozoa yang tidak berwarna dan spermatozoa yang mati yaitu spermatozoa yang berwarna merah. Jumlah spermatozoa yang hidup dan mati dihitung minimal 200 spermatozoa. Perhitungan tersebut menggunakan rumus sebagai berikut:

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

d. Abnormalitas

Berikut ini prosedur pemeriksaan abnormalitas spermatozoa (Susilawati, 2011):

1. Diambil semen satu tetes menggunakan ose.
2. Diletakkan pada ujung object glass.

3. Ditetaskan satu tetes larutan eosin-negrosin didekat semen dan dicampur dengan menggunakan kawat ose.
4. Diletakkan object glass lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik ke arah ujung lain sehingga akan menghasilkan preparat ulas yang merata pada seruh permukaan object glass.
5. Preparat tersebut dikeringkan dengan diangin-anginkan.
6. Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Pengamatan difokuskan pada bagian kepala, leher dan ekor yang abnormal. Pengamatan dilakukan terhadap minimal 200 spermatozoa. Terdapat lima kategori spermatozoa yang abnormal, yaitu tidak ada ekor spermatozoa, kepala abnormal, bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proximal dan bentuk abnormal ekor pada bagian distal droplet (Susilawati, 2011). Perhitungan tersebut menggunakan rumus sebagai berikut:

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

e. Konsentrasi

Penghitungan konsentrasi ini bertujuan untuk mengetahui jumlah spermatozoa per ml semen. Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang ada dengan menggunakan *haemocytometer* yaitu dengan cara semen segar dihisap dengan pipet eritrosit sampai pada skala 0,5 kemudian larutan NaCl 3% dihisap sampai pada skala 1,



larutan tersebut mengencerkan sekaligus meng-*immobilise* (membunuh) spermatozoa. Campuran ini dikocok hati-hati tetapi cukup cepat membentuk angka delapan selama 2 – 3 menit. Beberapa tetes dibuang dan satu tetes ditempatkan pada kamar hitung neubaeur lalu ditutup dengan *cover glass* (Mumu, 2009). Evaluasi konsentrasi spermatozoa digunakan alat haemositometer dengan ruang hitung Neubauer dimana konsentrasi diperoleh dengan menghitung jumlah spermatozoa yang terdapat dalam kotak kecil sebanyak 5 buah lalu dikalikan 10<sup>7</sup> (Pamungkas dkk, 2008).

### C. *Hypo Osmotic Swelling Test (HOS Test)*

Pengamatan Integritas Membran (IM) dilakukan dengan mencampurkan 0,5 ml semen ke dalam 1 ml larutan *hypoosmotis swelling osmotis test* dengan perbandingan 1:2. Selanjutnya direndam dalam air hangat suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian, ditetestan pada *object glass* dan diulas dengan larutan eosin negrosin. Diamati dan dihitung pada mikroskop perbesaran 400 kali total 200 sel spermatozoa. Spermatozoa dengan membran yang masih utuh akan menahan cairan hipoosmotik di dalam sel, sehingga ekornya terlihat melingkar atau bengkok serta menggelembung, sedangkan spermatozoa dengan ekor yang lurus dan tidak bergelembung menunjukkan membran plasma telah mengalami kerusakan (Khan dan Ijaz, 2008).

$$IM = \frac{\text{Jumlah ekor spermatozoa melingkar}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$



### 3.4.5. Pengenceran Semen

Semen diencerkan berdasarkan konsentrasinya. Pengencer dibagi menjadi 3 volume yaitu VA1, VA2 dan VB. VA1 adalah volume pengencer yang dicampurkan pada suhu 37 °C, sedangkan VA2 volume pengencer yang dicampurkan pada suhu 4-5 °C dan VB adalah volume pengencer yang sudah ditambahkan 13% gliserol. Prosedur persiapan pengenceran semen dapat dilihat pada Gambar 8.

Dimasukkan semen dan pengencer VA1 (1:1) dalam tabung reaksi kosong yang berada dalam *beaker glass* yang berisi air suhu 37 °C di *waterbath*.

Dimasukkan *beaker glass* yang berisi tabung reaksi + VA1 ke dalam *cool tube*.

Disimpan dalam refrigerator sampai suhu 12-15°C.

Dimasukkan pengencer VA2 dalam tabung reaksi yang berisi semen + VA1 pada suhu 12-15°C.

Dimasukkan pengencer VB dalam tabung reaksi yang berisi semen + VA pada suhu 4-5 °C

Diekuilibrasi selama 1; 1,5; 2 jam dan diamati kualitas *before freezing*

Gambar 8. Prosedur Pengenceran Semen

### 3.4.6. Pembekuan Semen

#### a. Ekuilibrasi

Ekuilibrasi atau tahap spermatozoa beradaptasi dengan pengencer dilakukan ketika semen dan pengencer telah homogen. Proses ini bertujuan untuk penyesuaian dari suhu 5°C menuju *prefreezing* -140°C dan *freezing* -196°C, oleh sebab itu proses gliserolisasi dilakukan di refrigerator bersuhu 5°C untuk selanjutnya dilakukan ekuilibrasi dengan tiga metode lama ekuilibrasi yang berbeda yaitu selama 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam. Setelah itu dilakukan uji kulitas dan HOS Test untuk melihat integritas membran spermatozoa.

#### b. Filling dan Sealing

Proses selanjutnya yaitu filling dan sealing. Filling dan sealing adalah proses pengisian straw dengan semen yang telah diencerkan dan diambil menggunakan pipet mikroliter yang ujung knop atasnya berwarna biru sampai straw terisi penuh (0,25 ml). Kemudian tutup ujung straw dengan menggunakan pinset yang sudah dipanaskan diatas bunsen. Proses ini dilakukan di dalam coll tube bersuhu 4-5°C. Straw yang akan digunakan harus steril.

#### c. Prefreezing

*Prefreezing* semen dilakukan secara manual menggunakan kontainer berisi nitrogen cair dengan memasukkan straw berisi semen ke dalam kontainer untuk diuapkan dengan nitrogen cair selama 10 menit dengan ketinggian 10 cm.

#### **d. Freezing**

Semen yang telah diturunkan suhunya pada tahanan *prefreezing*, selanjutnya akan dibekukan (*freezing*) dengan memasukkan atau merendam straw yang berisi semen ke dalam nitrogen cair dengan suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.4.7. Thawing**

*Thawing* adalah proses pencairan kembali zat yang dibekukan. Proses *thawing* dilakukan dengan merendam straw di dalam *waterbath* selama 15 detik dengan tiga metode suhu *thawing* yang berbeda yaitu  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  dan  $40^{\circ}\text{C}$ . Evaluasi kualitas semen dan integritas membran spermatozoa setelah pembekuan (*post thawing*) dilakukan untuk mengetahui kualitas semen.

#### **3.5. Variabel Penelitian**

Variabel yang diamati pada semen segar dan semen yang dibekukan meliputi volume (ml), warna, bau, konsistensi, pH, motilitas massa (+++), motilitas individu (%), konsentrasi (juta sperm/ml), viabilitas (%) dan abnormalitas (%). Variabel integritas membrane (%) spermatozoa diamati saat semen segar, setelah diekuilibrasi dan *thawing*.

#### **3.6. Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan analisis ragam (Analysis Of Variance / ANOVA) dengan metode Rancangan Acak Lengkap Faktorial. Apabila hasil yang diperoleh dari analisis RAL Faktorial menunjukkan perbedaan



pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) atau sangat nyata ( $P < 0,01$ ) maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Duncan's Multiple Range Test). Model matematis untuk RAL:

- Analisis Varian/Ragam (ANOVA)

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

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, r$$

$Y_{ijk}$  = Pengamatan dari faktor A level ke i, faktor B level ke j dan pada ulangan ke k

$\mu$  = Nilai tengah

$\alpha_i$  = Pengaruh faktor A pada level ke i

$\beta_j$  = Pengaruh Faktor B pada level ke j

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

$\varepsilon_{ijk}$  = Galat Percobaan untuk level ke i (faktor A) Level ke j (faktor B) ulangan ke k

$$FK = \frac{(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk})^2}{a \times b \times r}$$

$$JK_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk}^2 - FK$$

$$JK_N = \frac{\sum_{i=1}^a (\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk})^2}{b \times r} - FK$$

$$JK_P = \frac{\sum_{j=1}^b (\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^r Y_{ijk})^2}{a \times r} - FK$$

$$JK_{NP} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\sum_{k=1}^r Y_{ijk})^2}{r} - FK - JK_N - JK_P$$

$$JK_{galat} = JK_{total} - JK_N - JK_P - JK_{NP}$$

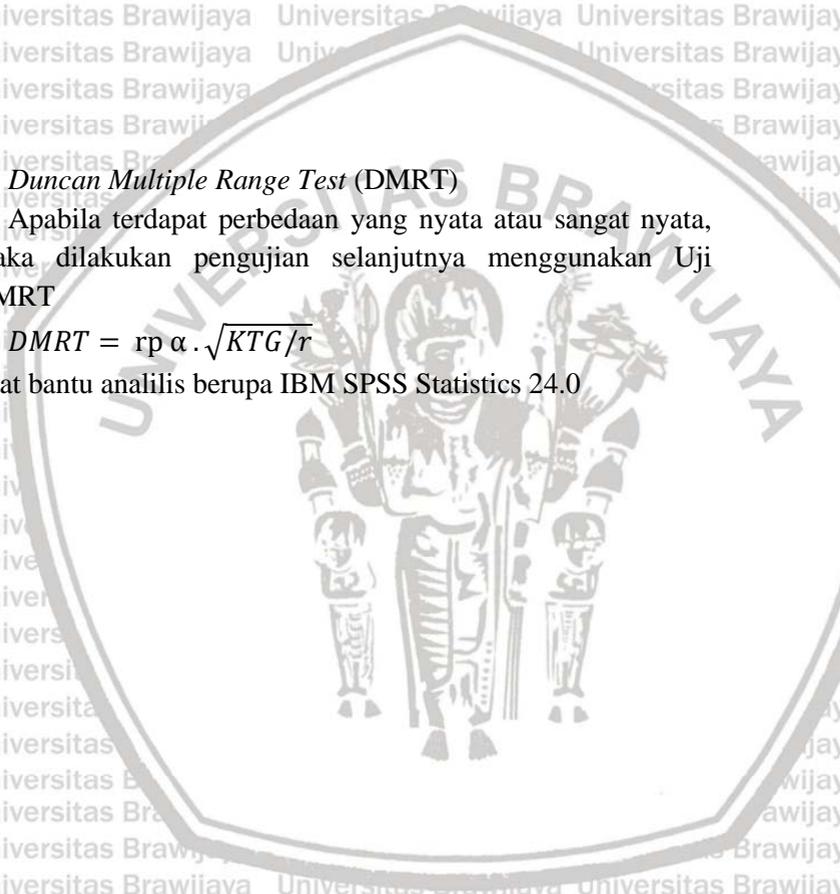


- *Duncan Multiple Range Test (DMRT)*

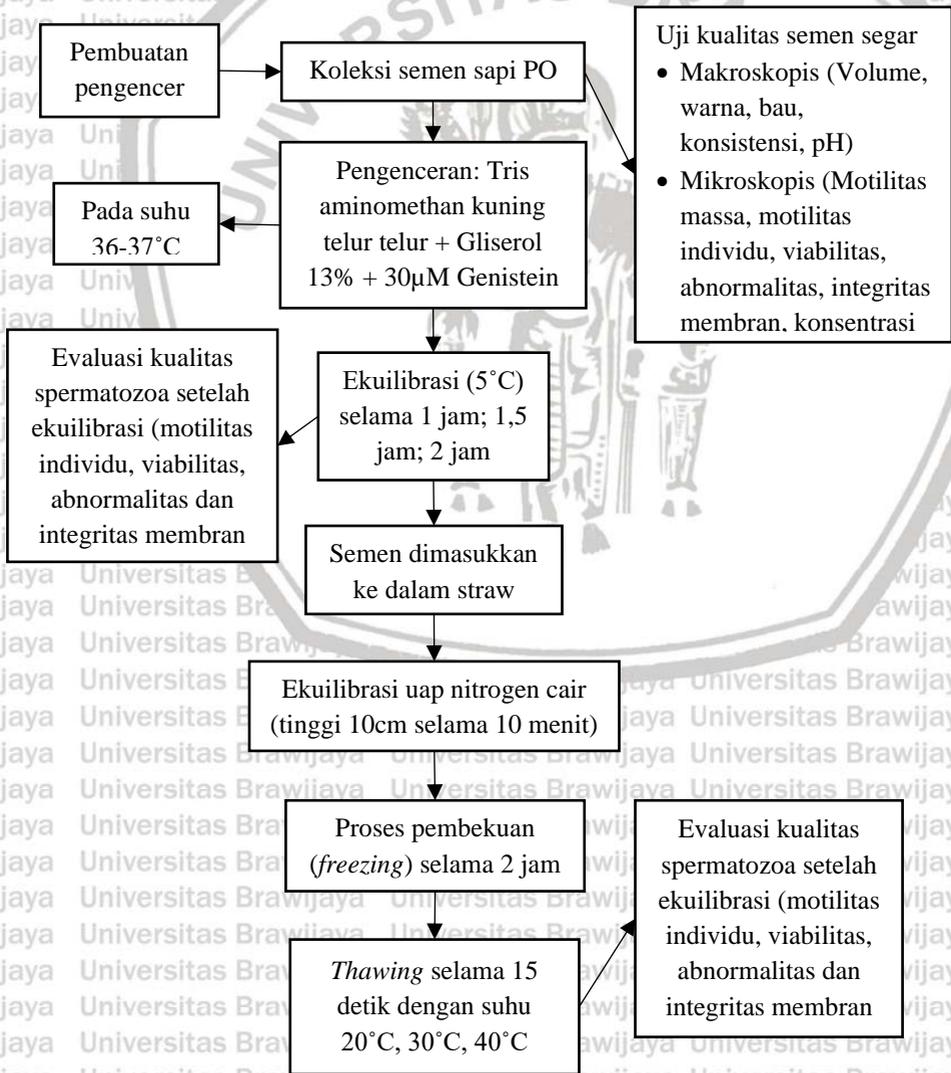
Apabila terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan Uji DMRT

$$DMRT = rp \alpha \cdot \sqrt{KTG/r}$$

Alat bantu analisis berupa IBM SPSS Statistics 24.0



### 3.7. Kerangka Operasional



Gambar 9. Kerangka Operasional

### 3.8. Batasan Istilah

- a. Antioksidan : Senyawa nukleofilik atau yang mempunyai kemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas.
- b. Flavonoid : Golongan senyawa polifenol yang diketahui memiliki sifat sebagai penangkap radikal bebas, penghambat enzim hidrolisis dan oksidatif.
- c. ROS : Reactive Oxygen Species (ROS) adalah radikal bebas yang berupa oksigen dan turunannya yang sangat reaktif. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap molekul protein, DNA, lemak membran sel dan komponen sel.
- d. *Cold shock* : Cekaman dingin yang terjadi akibat penurunan suhu.
- e. Peroksida Lipid : Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan Reactive Oxygen Species (ROS).
- f. Integritas Membran : Tingkat kemampuan sel dalam mempertahankan keutuhan membrannya.
- g. Krioprotektan : Zat kimia non elektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan.
- h. Ekuilibrisasi : Waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menyesuaikan diri sebelum dilakukan pembekuan.



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi PO

Semen segar sapi PO yang diperoleh dari hasil penampungan vagina buatan, kemudian dilakukan uji kualitas semen segar secara makroskopis meliputi volume, konsistensi, bau, pH dan warna serta secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, integritas membran dan konsentrasi sebelum dilakukan proses pengenceran. Kualitas semen segar menjadi parameter awal sebagai penentu semen layak atau tidak untuk diproses lebih lanjut. Hasil uji kualitas semen segar sapi PO dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kualitas Semen Segar Sapi PO

Parameter	Rataan $\pm$ SD
<b>Makroskopis</b>	
Volume (ml)	$6 \pm 2,83$
Konsistensi	Sedang
Bau	Khas
pH	$6,8 \pm 0,00$
Warna	Putih Kekuningan
<b>Mikroskopis</b>	
Motilitas Massa	2+
Motilitas Individu (%)	$82,50 \pm 3,54$
Viabilitas (%)	$86,00 \pm 6,60$
Abnormalitas (%)	$2,15 \pm 1,16$
Integritas Membran (%)	$81,68 \pm 3,32$
Konsentrasi ( $10^6$ sperm/ml semen)	$1240 \pm 11,31$



Hasil pengamatan menunjukkan rata-rata volume semen dari sapi PO yang digunakan untuk penelitian adalah  $6 \pm 2,83$  ml. Hasil tersebut tergolong dalam kategori normal karena menurut Garner *and* Hafez (2008), volume semen sapi hasil penampungan berkisar antara 5-8 ml. Menurut Adhyatma, Isnaini dan Nuryadi (2013) Perbedaan volume tersebut diduga karena ukuran testis yang berbeda-beda, sehingga mempengaruhi volume semen segar pada masing-masing kelompok bobot badan Sapi PO. Menurut Kartasudjana (2001), 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. Volume yang rendah tidak mengakibatkan kerugian apabila diikuti dengan konsentrasi dan motilitas yang tinggi.

Bau pada semen segar sapi PO yang digunakan yaitu berbau khas. Kartasudjana (2001) mengemukakan bahwa semen yang normal umumnya mempunyai bau yang khas disertai bau dari hewan tersebut. Bau semen segar sapi PO dari hasil penelitian tergolong normal dan tidak terdapat kontaminasi. Adapun pH semen rata-rata  $6,8 \pm 0,00$ . Hasil tersebut memperlihatkan bahwa pH semen yang digunakan untuk penelitian adalah normal. Ax, Dally, Didion, Lenz, Love, Varner, Hafez and Bellin (2008) menjelaskan bahwa pH semen sapi berkisar antara 6,4 sampai 7,8. pH semen diukur menggunakan kertas pH atau pH meter. pH semen merupakan salah satu faktor penting untuk kehidupan sel spermatozoa, semakin rendah atau tinggi pH berdampak pada kematian hidup spermatozoa (Sujuko, Setiadi dan Boediono, 2009). pH juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu adanya aktivitas



spermatozoa yang menguraikan fruktosa, sehingga pH menjadi naik dan proses dari penampungan semen (Sundari, Winda, Tagama dan Maidaswar, 2013).

Semen segar sapi PO yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsistensi sedang dan berwarna putih kekuningan. Konsistensi semen segar dapat dilihat dengan cara memiringkan tabung yang berisi spermatozoa secara perlahan-lahan. Semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti kemiringan tabung (Mumu, 2009). Warna semen putih kekuningan dapat dikatakan bagus karena mengikuti konsistensi semen yang sedang. Menurut Susilawati (2013), warna semen sapi pejantan adalah putih kekuningan atau putih susu. Warna merah muda menandakan terjadinya pendarahan pada penis saat penampungan, sedangkan warna abu-abu atau coklat menandakan terjadinya infeksi pada saluran reproduksi.

Suyadi dkk. (2012) menjelaskan bahwa warna, konsistensi dan konsentrasi spermatozoa mempunyai hubungan yang sangat erat satu dengan yang lain, artinya jika semen semakin encer maka konsentrasi spermatozoa semakin rendah dan warnanya semakin pucat begitupun sebaliknya. Ismaya (2014) menjelaskan bahwa konsistensi spermatozoa juga berkaitan dengan warna spermatozoa yang dapat digunakan untuk memprediksi konsentrasi spermatozoa. Ketika konsistensinya sedang hingga kental atau warna krem maka konsentrasi spermatozoa berkisar 1.000-2.000 juta spermatozoa/ml dan hal ini terbukti konsentrasi semen segar dalam penelitian ini sebanyak  $1240 \pm 11,31$  juta/ml. Konsentrasi semen yang tinggi lebih menguntungkan karena dapat menghasilkan semen beku dalam jumlah yang banyak.



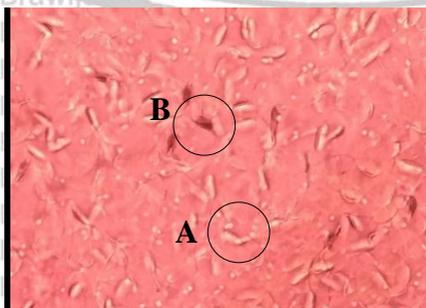
Evaluasi motilitas massa pada semen segar sapi PO dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100x, sedangkan motilitas individu diamati dengan perbesaran 400x. Rata-rata persentase motilitas massa semen sapi PO yang digunakan untuk penelitian adalah 2+. Persyaratan motilitas massa agar semen dapat diproses minimal 2+ (Ducha, Susilawati, Aulanni'am dan Wahjuningsih, 2013). Susilawati (2011) menjelaskan bahwa penilaian motilitas massa dapat dikatakan baik (++) bila terlihat gelombang-gelombang kecil tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban, sehingga semen yang digunakan dalam penelitian ini masih bisa dikatakan layak untuk dilakukan proses lebih lanjut. Rataan motilitas individu semen segar sapi PO yang digunakan adalah  $82,50 \pm 3,54\%$ . Muhammad, Susilawati, dan Wahjuningsih (2016) menyatakan bahwa syarat minimal nilai motilitas semen untuk diencerkan adalah 70%. Motilitas individu semen segar sapi PO dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Motilitas Individu Semen Segar Sapi PO

Menurut Muhammad, Isnaini, Kuswati, Yekti, Aryogi, Lutfi, Lukman dan Susilawati (2019), Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa yang dapat

diketahui dengan cara pewarnaan sel menggunakan eosin. Persentase viabilitas semen segar sapi PO yang digunakan sebesar  $86,00 \pm 6,60\%$ , hal ini termasuk kategori sangat baik karena persentase viabilitas  $>70\%$  atau persentase viabilitas harus diatas persentase motilitas. Lopes (2002) menjelaskan bahwa viabilitas semen masih dianggap baik jika memiliki kisaran nilai antara 50-69%. Nugroho dkk., (2014) menjelaskan bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa pada semen segar adalah  $83,09 \pm 2,22\%$ . Rata-rata persentase abnormalitas semen sapi PO yang digunakan untuk penelitian  $2,15 \pm 1,16\%$ . Angka tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa yang memiliki morfologi normal adalah 97,85%. Itu artinya persentase normalitas semen sapi PO yang digunakan memiliki kategori yang baik, sebagaimana dijelaskan oleh Ismaya (2014) bahwa semen termasuk jelek dan daya fertilisasinya rendah jika persentase abnormalitasnya lebih dari 20%. Viabilitas spermatozoa sapi PO dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Viabilitas Spermatozoa Sapi PO

Keterangan:

A = Spermatozoa hidup (tidak menyerap warna)

B = Spermatozoa mati (menyerap warna)

Persentase rata-rata integritas membran semen segar sapi PO yaitu  $81,68 \pm 3,32\%$ . Rataan persentase integritas membran tersebut tergolong sangat baik atau normal karena dilihat dari persentase viabilitas atau jumlah spermatozoa yang hidup hasil integritas membrannya mendekati. Hasil integritas membran ini lebih tinggi dibandingkan hasil Romadhoni, Rachmawati dan Suyadi (2014) sebesar  $78,83 \pm 10,61\%$ . Spermatozoa dengan membran yang masih utuh akan menahan cairan hiposmotik di dalam sel, sehingga ekornya terlihat melingkar atau bengkok, sedangkan spermatozoa dengan ekor yang lurus menunjukkan membran plasma telah mengalami kerusakan. Integritas membran plasma harus tetap terjaga keutuhannya untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas dan kemampuan fertilisasi. Hal ini disebabkan karena membran plasma berfungsi sebagai pembatas sel yang melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik dan mengatur lalu lintas keluar masuknya zat-zat makanan serta ion-ion yang diperlukan dalam proses metabolisme. Perbedaan integritas membran dapat terjadi juga pada saat lama inkubasi (Handayani, Dasrul, Akmal, Thasmi, Hamdan dan Adam, 2015). Integritas membran spermatozoa sapi PO dapat dilihat pada Gambar 12.





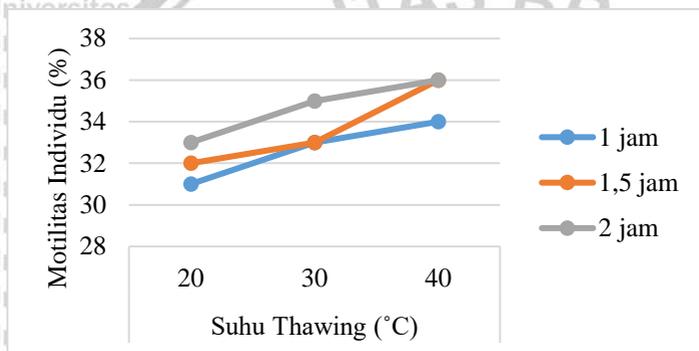
Gambar 12. Integritas Membran Spermatozoa Sapi PO

Keterangan: Terjadi reaksi ekor melingkar

#### 4.2. Persentase Motilitas Individu Spermatozoa

Motilitas (daya gerak) individu spermatozoa merupakan kemampuan bergerak spermatozoa. Pergerakan ini dijadikan tolak ukur sebuah fertilitas spermatozoa karena spermatozoa yang memiliki gerakan progresif dinilai mampu bergerak menuju saluran reproduksi betina dalam proses fertilisasi. Menurut Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara (2014), motilitas merupakan salah satu parameter yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi fertilitas spermatozoa. Prosesing Semen beku sapi PO pada penelitian ini perlu dilakukan evaluasi uji kualitas spermatozoa sebelum dilakukan pembekuan (*before freezing*) dan setelah pembekuan (*post thawing motility*). Penambahan genistein sebagai antioksidan sebanyak  $30\mu\text{M}$  dalam pengencer serta perlakuan lama ekuilibrasi (1; 1,5; 2 jam) dan suhu *thawing* (20; 30;  $40^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik) yang tepat diharapkan dapat menjaga kualitas atau persentase motilitas individu tetap baik. Grafik persentase rataan motilitas individu berbagai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 13.





Gambar 13. Grafik Persentase Rataan Motilitas Individu Berbagai Kelompok Perlakuan

Berdasarkan grafik pada Gambar 9 menunjukkan bahwa motilitas individu spermatozoa sapi PO setelah *thawing* mengalami peningkatan pada setiap suhu *thawing* 20°C, 30°C dan 40°C. Hal ini juga terjadi pada lama ekuilibrasi suhu dingin yaitu 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam, dimana motilitas individu mengalami peningkatan. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekuilibrasi suhu dingin maka persentase motilitas individu semakin tinggi dan perlakuan dengan suhu *thawing* 20°C menghasilkan persentase motilitas individu paling rendah. Motilitas individu tertinggi terdapat pada perlakuan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dan 1,5 jam dengan suhu *thawing* 40°C. Motilitas individu yang rendah diakibatkan karena *cold shock* dan metode yang kurang tepat. Hal ini sesuai dengan pendapat Feradis (2010) bahwa Motilitas individu yang terbaik yaitu pergerakan progresif spermatozoa atau gerakan aktif maju ke depan. Tanda-tanda *cold shock* atau media yang tidak isotonic dengan semen menyebabkan gerakan

melingkar dan gerakan mundur. Spermatozoa apabila telah berhenti bergerak maka dianggap telah mati. Waktu ekuilibrasi pada proses pembekuan semen berbeda-beda pada berbagai jenis semen, individu pejantan, bahan pengencer dan metode pembekuan yang digunakan (Afriantini dkk., 2005; Komariah dkk., 2013; Hanafi dkk., 2016).

Menurut Muzakkir, Dasrul, Wahyuni, Akmal dan Sabri (2017), semen harus berada dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 2 sampai 6 jam pada suhu 3-5°C sebelum dibekukan agar kerusakan mekanis pada spermatozoa dapat dihindari. Jika waktu ekuilibrasi dilakukan dengan cepat maka air yang ada dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit sehingga belum mencapai tahap *equilibrium*, dan apabila dilakukan dengan lambat sel akan waktu yang cukup untuk mengeluarkan air dari dalam sel sehingga konsentrasi intrasel meningkat akibatnya sel tidak mengalami pembentukan intraselular melainkan hanya terbentuk di luar sel (Mumu, 2009). Hasil analisis ragam dan persentase rataan motilitas individu sebelum pembekuan dan setelah *thawing* dapat dilihat pada Tabel 2.



Tabel 2. Persentase Rataan Motilitas Individu Sebelum Pembekuan dan Setelah *Thawing*

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan (%)	Suhu <i>Thawing</i> (°C)			Rataan (%)
		20	30	40	
1 jam	55 ± 3,54	31 ± 2,24 <sup>a</sup>	33 ± 2,74 <sup>ab</sup>	34 ± 2,24 <sup>ab</sup>	32,67 ± 2,58 <sup>a</sup>
		32 ± 2,74 <sup>ab</sup>	33 ± 2,74 <sup>ab</sup>	36 ± 2,24 <sup>b</sup>	
1,5 jam	57 ± 2,74	33 ± 2,74 <sup>ab</sup>	35 ± 3,54 <sup>b</sup>	36 ± 2,24 <sup>b</sup>	34,67 ± 2,97 <sup>a</sup>
		32,00	33,67	35,33	
2 jam	58 ± 2,74	± 2,54 <sup>a</sup>	± 2,97 <sup>ab</sup>	± 2,29 <sup>b</sup>	

Hasil analisis ragam pada Tabel 2 menunjukkan rataan motilitas individu spermatozoa sebelum pembekuan pada lama ekuilibrasi 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam secara berurutan yaitu 55 ± 3,54% ; 57 ± 2,74% dan 58 ± 2,74%. Motilitas individu sebelum pembekuan pada lama ekuilibrasi 1,5 dan 2 jam lebih baik daripada lama ekuilibrasi 1 jam. Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa faktor lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata ( $P>0,05$ ), sedangkan faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata ( $P<0,05$ ) terhadap motilitas individu semen sapi PO. Uji lanjutan dengan uji DMRT menunjukkan bahwa suhu *thawing* 40°C berbeda nyata dengan suhu *thawing* 20°C, sedangkan suhu *thawing* 30°C berbeda tidak nyata dengan suhu *thawing* 20°C dan suhu *thawing* 40°C.

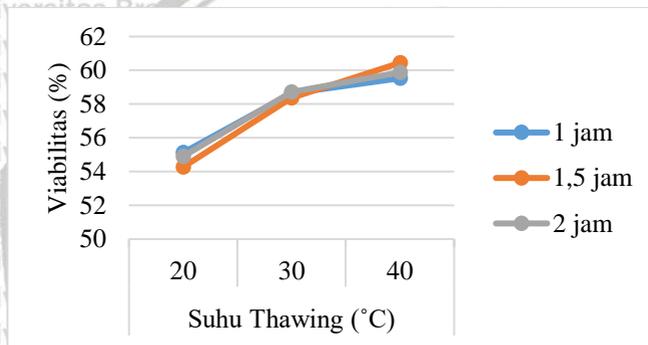


Hasil rata-rata motilitas individu tertinggi yaitu  $35,33 \pm 2,29\%$  terdapat pada perlakuan *thawing* dengan suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , sedangkan rata-rata motilitas individu terendah yaitu  $32,00 \pm 2,54\%$  terdapat pada perlakuan *thawing* dengan suhu  $20^{\circ}\text{C}$ . Hal ini sebanding dengan Abdurrahman, Saleh dan Haryoko (2019) yang menyatakan bahwa metode *thawing* yang baik untuk menghasilkan semen dengan motilitas tinggi yaitu *thawing* selama 15 detik dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  atau mendekati  $40^{\circ}\text{C}$ . Menurut Salim dkk. (2012) suhu *thawing* terlalu rendah, sehingga tidak sesuai dengan kondisi fisiologis pergerakan spermatozoa dan daya gerak spermatozoa rendah. Temperatur rendah juga akan mengakibatkan struktur fosfolipid membran plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel. Selain itu 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.

#### **4.3. Persentase Viabilitas Spermatozoa**

Viabilitas (daya hidup) spermatozoa dapat diketahui dengan teknik pewarnaan eosin-negrosin pada semen. Spermatozoa yang mati berwarna merah atau ungu karena akan menyerap warna eosin, sedangkan spermatozoa yang masih hidup berwarna transparan atau putih. Penyerapan warna eosin pada spermatozoa yang mati disebabkan oleh permeabilitas dinding sel spermatozoa atau membrannya tidak dapat berfungsi dengan baik akibat pengolahan semen (Susilawati, 2013). Grafik persentase rata-rata viabilitas berbagai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 14.





Gambar 14. Grafik Persentase Rataan Viabilitas Berbagai Kelompok Perlakuan

Berdasarkan grafik pada Gambar 10, viabilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* pada setiap perlakuan suhu *thawing* 20°C, 30°C dan 40°C mengalami peningkatan dan persentase viabilitas pada setiap perlakuan suhu *thawing* terlihat hampir mendekati. Berdasarkan grafik tersebut setiap perlakuan dengan suhu *thawing* 40°C menghasilkan persentase viabilitas paling tinggi. Viabilitas tertinggi terdapat pada perlakuan lama ekuilibrasi suhu dingin 1,5 jam dan 2 jam dengan suhu *thawing* 40°C. Menurut Anggarsari (2015), waktu ekuilibrasi 2 jam sudah cukup terjadi keseimbangan elektrolit dengan gliserol secara sempurna dan merata di dalam sel spermatozoa sehingga kerusakan selama proses pembekuan dapat diminimalisir. Membran plasma pada saat kondisi seperti ini menunjukkan kestabilan fungsi yang baik sehingga tidak mudah ditembus oleh zat warna pada saat uji viabilitas spermatozoa. Menurut Toelihere (1993), bahwa semen yang baik memiliki persentase viabilitas spermatozoa diatas 50%. Data hasil penelitian menunjukkan viabilitas spermatozoa yang diperoleh dari

beberapa metode lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase Rataan Viabilitas Sebelum Pembekuan dan Setelah *Thawing*

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan (%)	Suhu <i>Thawing</i> (°C)			Rataan (%)
		20	30	40	
1 jam	78.48 ± 0.85	55.12	58.64	59.53	57,76 ± 3,14 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		2.29 <sup>ab</sup>	2.97 <sup>b</sup>	2.60 <sup>b</sup>	
1,5 jam	79.79 ± 2.49	54.27	58.37	60.44	57,70 ± 3,86 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		2.98 <sup>a</sup>	3.24 <sup>b</sup>	2.85 <sup>b</sup>	
2 jam	81.04 ± 2.38	54.90	58.72	59.88	57,83 ± 3,53 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		2.66 <sup>ab</sup>	2.85 <sup>b</sup>	3.39 <sup>b</sup>	
Rataan (%)		54,76 ± 2,49 <sup>a</sup>	58,58 ± 2,80 <sup>b</sup>	59,95 ± 2,77 <sup>b</sup>	

Hasil analisis ragam pada Tabel 3 menunjukkan rataan viabilitas spermatozoa sebelum pembekuan pada lama ekuilibrasi 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam secara berurutan yaitu 78.48 ± 0.85% ; 79.79 ± 2.49 % dan 81.04 ± 2.38%. Viabilitas sebelum pembekuan pada lama ekuilibrasi 2 jam lebih baik daripada lama ekuilibrasi 1 dan 1,5 jam. Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa faktor lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata



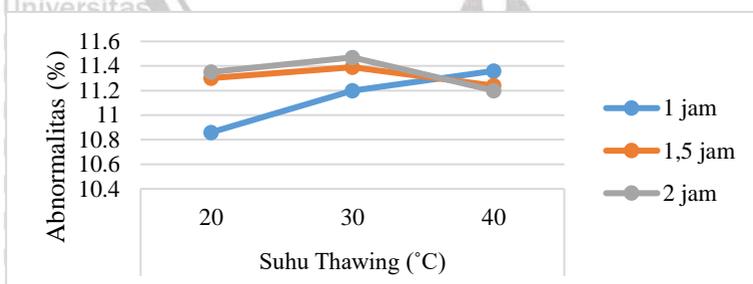
( $P > 0,05$ ), sedangkan faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap viabilitas semen sapi PO. Uji lanjutan dengan uji DMRT menunjukkan bahwa suhu  $20^{\circ}\text{C}$  berbeda nyata dengan suhu *thawing*  $30^{\circ}\text{C}$  dan  $40^{\circ}\text{C}$ . Hasil rata-rata viabilitas tertinggi yaitu  $59,95 \pm 2,77\%$  terdapat pada perlakuan dengan suhu *thawing*  $40^{\circ}\text{C}$ , sedangkan rata-rata viabilitas terendah yaitu  $54,76 \pm 2,49\%$  terdapat pada perlakuan dengan suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$ .

Hal ini sesuai dengan pernyataan Pratama, Sari dan Sigit (2018), bahwa suhu *thawing* yang rendah akan mengakibatkan substansial vital dalam spermatozoa bocor sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP, Kalium intraseluler dan fosfolipid berkurang dan menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa, sehingga persentase dari viabilitas spermatozoa menjadi menurun. Jika terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa (Datta, Sekar, Hembram and Dasgupta, 2009). Suhu dan 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. Genistein merupakan fitoestrogen yang termasuk dalam kategori isoflavon dengan sifat antioksidan. Penambahan genistein pada pengencer telah terbukti dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas sperma serta penurunan kerusakan DNA pada sperma, karena genistein memodifikasi hemodialisis membran dan menyebabkan pengurangan oksigen reaktif yang signifikan (Garcia, et al. 2015).



#### 4.4. Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan pada morfologi spermatozoa yang terjadi saat sebelum dan sesudah prosesing semen. Abnormalitas dapat terjadi selama proses spermatogenesis (abnormalitas primer) ataupun karena kesalahan penanganan setelah proses penampungan semen (abnormalitas sekunder). Morfologi abnormalitas pada spermatozoa berhubungan dengan fertilitas, karena spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi sel telur (Feradis, 2010). Menurut Hoesni (2013), selama abnormalitas sperma belum mencapai 20 % dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi buatan. Grafik persentase rata-ran abnormalitas berbagai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Grafik Persentase Rataan Abnormalitas Berbagai Kelompok Perlakuan

Berdasarkan grafik pada Gambar 11, abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* pada perlakuan ekuilibrasi 1 jam dengan suhu *thawing* 20°C, 30°C dan 40°C mengalami peningkatan, sedangkan pada perlakuan ekuilibrasi 1,5 dan 2 jam abnormalitas menurun pada suhu *thawing* 40°C.

Abnormalitas tertinggi terdapat pada perlakuan lama ekuilibrasi suhu dingin 1,5 jam dan 2 jam dengan suhu *thawing* 30°C. Abnormalitas spermatozoa karena pengolahan bisa terjadi karena pengaruh pengenceran dan pendinginan. Penambahan gliserol ke dalam pengencer mampu memberikan perlindungan terhadap kerusakan yang dapat menimbulkan abnormalitas spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami *cold shock* sering kali ekor dan bagian tubuhnya melingkari bagian kepala, hal ini menyebabkan abnormalitas. Setiap spermatozoa abnormal tidak akan mampu membuahi ovum tanpa memandang apakah abnormalitas primer atau sekunder (Alhuur, Soeparna dan Darodjah, 2020). Data hasil penelitian menunjukkan abnormalitas spermatozoa yang diperoleh dari beberapa metode lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 4.



Tabel 4. Persentase Rataan Abnormalitas Sebelum Pembekuan dan Setelah *Thawing*

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan (%)	Suhu <i>Thawing</i> (°C)			Rataan (%)
		20	30	40	
1 jam	7 ± 0.43	10.86	11.20	11,36	11,14 ± 0,40 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		0.39 <sup>a</sup>	0,35 <sup>ab</sup>	0,37 <sup>ab</sup>	
1,5 jam	7.44 ± 0.30	11.30	11.39	11,24	11,31 ± 0,71 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		0.69 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>ab</sup>	0,82 <sup>ab</sup>	
2 jam	7.18 ± 0.41	11.35	11.47	11,20	11,34 ± 0,58 <sup>a</sup>
		±	±	±	
		0.53 <sup>ab</sup>	0,66 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>ab</sup>	
Rataan (%)		±	±	±	
		0,56 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	

Hasil analisis ragam pada Tabel 3 menunjukkan rata-rata abnormalitas spermatozoa sebelum pembekuan pada lama ekuilibrasi 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam secara berurutan yaitu 7 ± 0.43% ; 7.44 ± 0.30 % dan 7.18 ± 0.41%. Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa faktor lama ekuilibrasi suhu dingin, faktor suhu *thawing* dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap abnormalitas semen sapi PO. Uji lanjutan dengan uji DMRT menunjukkan bahwa seluruh perlakuan berbeda tidak nyata satu sama lain. Hasil rata-rata abnormalitas tertinggi yaitu 11,35 ± 0,59% terdapat pada perlakuan *thawing* dengan suhu 30°C, sedangkan rata-rata



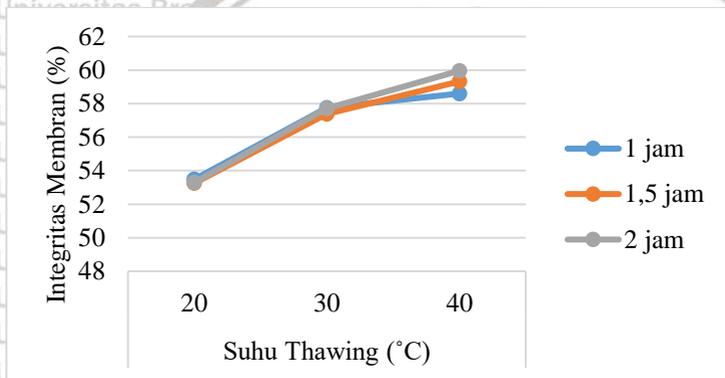
abnormalitas terendah yaitu  $11,14 \pm 0,40\%$  terdapat pada perlakuan lama ekuilibrasi 1 jam. Hal ini menunjukkan lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* pada semua perlakuan tidak menyebabkan abnormalitas yang tinggi pada spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa dikategorikan pada abnormalitas primer, sekunder dan tersier. Abnormalitas primer yaitu akibat kegagalan pada proses spermatogenesis dalam testis sedangkan abnormalitas sekunder akibat kegagalan pada saat perjalanan spermatozoa menuju epididimis (Mahesa, 2016).

Hasil pengamatan menunjukkan abnormalitas dari setiap perlakuan diperoleh angka persentase abnormalitas spermatozoa semen beku kurang dari 12% atau persentase spermatozoa normal masih di atas 85 % pada setiap jenis perlakuan. Hasil ini sudah sesuai dengan pendapat Toelihere (1981) dan Anonimous (2005) serta SNI Semen Beku Nasional (2005) yang merekomendasikan abnormalitas di bawah 20%, masih layak dipakai untuk IB. Hal ini mengindikasikan bahwa lama ekuilibrasi dan suhu pada semua perlakuan belum banyak menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal. Penyebabnya karena lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* pada semua perlakuan belum memberikan tekanan yang ekstrim secara mekanis sehingga spermatozoa menjadi abnormal seperti halnya ciri khas suatu spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier. Salah satu ciri spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier yaitu ekor atau kepalanya yang terputus. Sesuai hasil pengamatan kebanyakan abnormalitas yang terjadi yaitu spermatozoa yang ekor atau kepalanya terputus atau patah. Namun kondisi ini bukan disebabkan karena lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* melainkan diduga karena proses preparasi seperti pembuatan preparat ulas. Menurut Yulnawati, Herdis, Maheswari, Boediono dan Rizal

(2009), abnormalitas tersier terjadi kemungkinan karena pembuatan preparat ulas yang menyebabkan kepala atau ekor spermatozoa putus.

#### **4.5. Persentase Integritas Membran Spermatozoa**

Integritas membran atau Membran Plasma Utuh (MPU) diamati untuk mengetahui kualitas spermatozoa semen beku sapi PO. Menurut Tuhu, Ondho dan Samsudewa (2013), membran plasma yang utuh ditandai dengan adanya ekor yang melengkung, karena membran plasma dari spermatozoa masih berfungsi dengan baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Membran plasma yang mengalami kerusakan membuat metabolisme spermatozoa akan terganggu dan spermatozoa kehilangan kemampuan fertilitasnya dikarenakan komponen seluler lepas dan kehilangan daya inaktivasi komponen protein enzim penting di dalam akrosom. Kejadian ini membuat spermatozoa mengalami kematian dan akan berdampak pada viabilitas spermatozoa (Setyawan, Suprayogi, Prastiya, Restiadi, Saputro dan Agustono, 2019). Grafik persentase rataan integritas membran berbagai kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Grafik Persentase Rataan Integritas Membran Berbagai Kelompok Perlakuan

Berdasarkan grafik pada Gambar 11, integritas membran spermatozoa sapi PO setelah *thawing* pada setiap perlakuan suhu *thawing* 20°C, 30°C dan 40°C mengalami peningkatan dan persentase integritas membran pada setiap perlakuan suhu *thawing* terlihat hampir mendekati. Berdasarkan grafik tersebut setiap perlakuan *thawing* dengan suhu 40°C menghasilkan persentase integritas membran paling tinggi. Integritas membran tertinggi terdapat pada perlakuan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan suhu *thawing* 40°C. Data hasil penelitian menunjukkan integritas membran spermatozoa yang diperoleh dari beberapa metode lama ekuilibrasi dan suhu *thawing* yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 5.



UniLama	Sebelum Ekuilibrasi	Suhu <i>Thawing</i> (°C)			Rataan (%)
		20	30	40	
1 jam	73.16 ± 1.40	53,48 ± 2,46 <sup>ab</sup>	57,74 ± 3,78 <sup>b</sup>	58,60 ± 2,09 <sup>b</sup>	56,61 ± 3,53 <sup>a</sup>
	1,5 jam	74.87 ± 2.22	53,25 ± 3,30 <sup>a</sup>	57,39 ± 2,33 <sup>b</sup>	59,32 ± 2,41 <sup>b</sup>
2 jam		75.87 ± 2.32	53,29 ± 2,89 <sup>ab</sup>	57,72 ± 3,29 <sup>b</sup>	59,96 ± 1,72 <sup>b</sup>
	Rataan (%)		53,34 ± 2,69 <sup>a</sup>	57,62 ± 2,96 <sup>b</sup>	59,29 ± 2,02 <sup>b</sup>

Tabel 5. Persentase Rataan Integritas Membran Sebelum Pembekuan dan Setelah *Thawing*

Hasil analisis ragam pada Tabel 5 menunjukkan rata-rata integritas membran spermatozoa sebelum pembekuan pada lama ekuiliberasi 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam secara berurutan yaitu  $73.16 \pm 1.40\%$  ;  $74.87 \pm 2.22\%$  dan  $75.87 \pm 2.32\%$ . Integritas membran sebelum pembekuan pada lama ekuiliberasi 2 jam lebih baik daripada lama ekuiliberasi 1 dan 1,5 jam. Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa faktor lama ekuiliberasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuiliberasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ), sedangkan faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap integritas membran semen sapi PO. Uji lanjutan dengan uji DMRT menunjukkan bahwa suhu *thawing*  $20^{\circ}\text{C}$  berbeda nyata dengan suhu *thawing*  $30^{\circ}\text{C}$  dan  $40^{\circ}\text{C}$ . Hasil rata-rata integritas membran tertinggi yaitu  $59,29 \pm 2,02\%$  terdapat pada perlakuan dengan suhu *thawing*  $40^{\circ}\text{C}$ , sedangkan rata-rata integritas membran terendah yaitu  $53,34 \pm 2,69\%$  terdapat pada perlakuan *thawing* dengan suhu  $20^{\circ}\text{C}$ .

Penurunan persentase integritas membran dari sebelum pembekuan sampai setelah *thawing* dikarenakan terjadi kerusakan membran plasma sperma akibat penumpukan asam laktat dan zat-zat sisa metabolisme yang berakibat toksik bagi sperma, serta terbentuknya perioksida lipid yang menyebabkan kerusakan struktur membran sperma (Suherman, 2017). Penumpukan konsentrasi asam laktat yang tinggi tersebut dapat berpengaruh pada tekanan osmotik larutan. Sesuai dengan yang disampaikan oleh Tuhi dkk. (2013), bahwa peningkatan tekanan osmotik pada plasma semen mengakibatkan penurunan

permeabilitas membran sperma dan mengakibatkan peningkatan kerusakan membran. Masa ekuilibriasi yang terlalu lama juga menyebabkan zat radikal bebas yang berasal dari metabolisme sperma menumpuk di dalam larutan semen, sementara fosfolipid membran sel sperma domba sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (Solihati, Rasad, Setiawan dan Nurjanah 2018).

Kerusakan membran dapat diminimalisir karena penambahan genistein sebagai antioksidan. Genistein termasuk isoflavon berperan sebagai antioksidan mempunyai kemampuan untuk mencegah peroksidasi lipid. Isoflavon berfungsi sebagai antioksidan primer karena berperan sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menghambat reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Kemampuan antioksidan untuk mendonasikan hidrogen mempengaruhi aktivitasnya. Antioksidan senyawa flavonoid dapat mendonorkan hydrogen pada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal stabil berenergi rendah yang berasal dari senyawa flavonoid yang kehilangan atom hidrogen. Radikal antioksidan yang terbentuk menjadi lebih stabil melalui proses resonansi dalam struktur cincin aromatiknya, sehingga tidak mudah untuk terlibat pada reaksi radikal yang lain (Astuti, 2008).



## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dengan penambahan genistein dalam pengencer dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Faktor lama ekuilibrasi suhu dingin tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas semen sapi PO.
- Faktor suhu *thawing* berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas semen sapi PO.
- Faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan suhu *thawing* tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas semen sapi PO.
- Perlakuan terbaik pada semua pengamatan variabel yaitu ekuilibrasi suhu dingin selama 2 jam dengan suhu *thawing* 40°C selama 15 detik.

### 5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian untuk pembekuan semen sapi PO disarankan menerapkan penggunaan genistein dengan konsentrasi 30µM dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dengan metode ekuilibrasi suhu dingin selama 2 jam dan metode *thawing* selama 15 detik dengan suhu 37°C.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman, M., D. M. Saleh dan I. Haryoko. 2019. Pengaruh Lama *Thawing* dan Post *Thawing* dengan Air Hangat (37°C) Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole. *Journal of Animal Science and Technology*. 1(3): 234-240.
- Adcock, J. 2018. *What are Antioxidants? and are They Truly Good For Us?*. Research Fellow in Analytical Chemistry, Deakin University. Diakses 20 Februari 2021. <<https://theconversation.com/what-are-antioxidants-and-are-they-truly-good-for-us-86062>>.
- Adhitama, E. 2018. *Perbedaan Produksi Semen Segar, Recovery Rate, Semen Beku Sapi Simmental dan Sapi Peranakan Ongole di Balai Inseminasi Buatan Ungaran*. Tugas Akhir. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Adhyatma, M., N. Isnaini dan Nuryadi. 2013. Pengaruh Bobot Badan terhadap Kualitas dan Kuantitas Semen Sapi Simmental. *Jurnal Ternak Tropika*. 14(2): 53-62.
- Aisah, S., N. Isnaini dan S. Wahyuningsih. 2017. Kualitas Semen Segar dan Recovery Rate Sapi Bali pada Musim Yyng Berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 27(1): 63-79.
- Alhuur, K. R. G., Soeparna dan R. D. Darodjah. 2020. Efek Interaksi Masa Ekuilibrasi dan Laju Penurunan Suhu Terhadap Peningkatan Keutuhan Membran Plasma



Sperma Domba Priangan Pasca *Thawing*. *JITP*. 8(2): 72-78.

Amidi, F., A. Pazhohan, M. S. Nashtaei, M. Khodarahmian dan S. Nekoonam. 2016. The Role of Antioxidants in Sperm Freezing: A Review. *Cell and Tissue Banking*. 17(2): 1-14.

Andersson, J. and I. Koper. 2016. Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function. *Journal of Membranes*. 6(30): 1-14.

Anggarsari, L.Y. 2015. Pengaruh Waktu Equilibrasi terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer setelah *Thawing* dalam Pengencer yang Mengandung Lisitin Nabati. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Anonymous. 2005. *Standar Nasional Indonesia Semen Beku Sapi*. Badan Standar Nasional ICS. 65.020. 30.

Ardhani, F., I.M.U. Raharja, B.M. Boangmanalu, dan J. Handoko. 2018. Karakteristik Morfologik dan Morfometrik Spermatozoa Ayam Nunukan. *Jurnal Peternakan*. 15(2): 62-67.

Ardiansyah, T. Saili dan S. Rahadi. 2020. Kualitas Semen Kambing Peranakan Etawah dengan Penambahan Lesitin Kedelai dalam Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur pada Penyimpanan Suhu 3-5°C. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu Oleo*. 2(1): 30-35.

Arfiantini, I., T. L. Yusuf dan N. Graha. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca *Thawing* Semen Beku Sapi



Fresian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. *Buletin Peternakan*. 29 (2): 53-61.

Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2): 126-136.

Ax, R., M. Dally, B. Didion, R. Lenz, C. Love, D. Varner, Hafez and M. Bellin. 2008. *Semen Evaluation*. In *Reproduction in Farm Animal (7th edition)*. Edited by Hafez, E.S.E. Co. Director. Reproductive Health Kiawah Island. South Carolina. USA: 365-370.

Badan Pusat Statistik. 2020. *Populasi Sapi Potong menurut Provinsi (Ekor) tahun 2017-2019*. Jakarta.

Badan Standardisasi Nasional. 2015. *Bibit Sapi Potong - Bagian 5: Peranakan ongole*. SNI 7651.5. Jakarta.

Balai Pembibitan Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak Sembawa. 2015. *Sapi Peranakan Ongole*. Palembang.

Casper, R. F., J. S. Meriano, K. A. Jarvi, L. Cowan and M. L. Lucato. 1995. The Hypo-osmotic Swelling Test for Selection of Viable Sperm for Intracytoplasmic Sperm Injection in Men with Complete Asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*. 64(5): 972-976.

Datta, U., M. C. Sekar, M. L. Hembram and R. Dasgupta. 2009. *Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10°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.

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. 2013. *Sapi PO: Pedaging dan Pekerja*. Jakarta.

Dolezalova, M., L. Stadnik, Z. Biniova, J. Duchacek dan R. Stupka. 2016. Equilibration and Freezing Interactions Affecting Bull Sperm Characteristics after *Thawing*. *Czech J. Anim. Sci.* 61(11): 515–525.

Ducha, N., T. Susilawati, Aulanni'am dan S. Wahjuningsih. 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7(1): 5-8.

Effendi, F. I., S. Wahjuningsih dan M. N. Ihsan. 2015. Pengaruh Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur yang Disuplementasi Sari Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana*) terhadap Kualitas Semen Sapi Limousin Selama Penyimpanan Suhu Dingin 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25(3): 69-79.

Fahlevi, R. 2019. *Penambahan Ekstrak Semanggi Air (Marsilea crenata) dalam Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Boer*. Tugas Akhir. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Fauzan, M., M. Hartono dan P. E. Santosa. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama *Thawing* di Dataran Rendah Terhadap



Kualitas Semen Beku Sapi Brahman. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3): 1-7.

Feradis. 2010. *Reproduksi Ternak*. Bandung: Alfabeta.

Firdausi, P. A., T. Susilawati dan S. Wahyuningsih. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin Selama Pendinginan Menggunakan Pengencer Cep-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Santan. *J. Ternak Tropika*. 15(1): 21-30.

Fitriyati, A. 2019. *Pengaruh Ekstrak Daun Kemangi (Ocimum sanctum L.) Menggunakan Pengencer Tris Aminomethane Kuning Tekur dalam Pelarut Aseton 70% Tanpa Inaktivasi terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Selama Penyimpanan Suhu Ruang*. Tugas Akhir. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

Garcia, B.M., T. Guimaraes, G. Lopes, A. Rocha, and L. G. Fernandez. 2015. Effect of Genistein Addition to Equine Sperm Freezing Extender. *J Hellenic Vet Med Soc*. 66(4): 241-248.

Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In *Reproduction in Farm Animals* (7<sup>th</sup> edition). Edited by E.S.E Hafez and B. Hafez. 2008. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland. USA: 96-109.

Hafez, E. S. E. 2008. *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lea and Febiger.



Halliwelli, B. dan J. M. C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine, 4<sup>th</sup> Edition*. UK: Oxford University Press.

Hanafi, H., M.N. Ihsan dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Pada Proses Pembekuan Terhadap Kualitas Semen Sapi Wagyu Menggunakan Pengencer Andromed. *J. Ternak Tropika*. Vol. 17, No.1: 31-41.

Handayani, L., Dasrul, M. Akmal, C. N. Thasmi, Hamdan dan M. Adam. 2015. Pengaruh Metode Pencucian Spermatozoa Sapi Aceh Terhadap Motilitas, Persentase Hidup, dan Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa. *Jurnal Medika Veterinaria*. 9(2): 104-110.

Hastuti, D. 2008. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Sapi Potong Ditinjau dari Angka Konsepsi dan Service Per Conception. *Mediagro*. 4(1): 12- 20.

Herdis. 2015. Daya Motil dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Domba Garut (*Ovis aries*) pada Penambahan Kolesterol dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur. *JSTI*. 17(1): 16-23.

Hijriyanto, M., Dasrul dan C. N. Thasmi. 2017. Pengaruh Frekuensi Penampungan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa pada Ayam Bangkok. *JIMVET*. 1(1): 46-53.

Hoesni, F. 2013. Pengaruh Penggunaan Metode *Thawing* yang Berbeda Terhadap Kualitas Spermatozoa Semen Sapi Perah Berpengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal*





*Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*. 13(4): 118-126.

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

Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau (Biotechnology of Artificial Insemination on Cattle and Buffalo)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Isnindar, W. Wahyuono dan E. P. Setyowati. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan Metode DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL). *Majalah Obat Tradisional*. 16(3): 157-164.

Istanty, A. S., M. A Salim, N. Isnaini dan T. Susilawati. 2017. Pengaruh Penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan Putih Telur dalam Pengencer Dasar Cep-2 terhadap Kualitas Semen Kambing Boer pada Simpan Dingin. *Jurnal Ternak Tropika*. 18(1): 1-9.

Jalali, S. 2017. *Mengenai Fungsi Antioksidan dan Radikal Bebas pada Tubuh*. Diakses 22 Februari 2021. <<https://apotekeranda.com/fungsi-radikal-bebas-dan-antioksidan/>>.

Kartasudjana, R. 2001. *Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak*. Diakses pada tanggal 3 April 2021. <[http://mirror.com/ternak/teknik\\_inseminasi\\_pada\\_ternak.pdf/](http://mirror.com/ternak/teknik_inseminasi_pada_ternak.pdf/)>.

Keputusan Menteri Pertanian No. 2841. 2012. *Penetapan Rumpun Sapi Peranakan Ongole*. Jakarta.

Komariah, I. Arfiantini, dan W. Nugraha. 2013. Kaji Banding Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental, Limousin, dan Friesian Holstein Terhadap Proses Pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37 (3): 143-147.

Kusumawati, E. D. 2017. *Inseminasi Buatan*. Malang: Media Nusa Creative.

Lenchniak, D., A. Kedziesski and D. Stainislawski. 2002. The of HOS Test to Evaluate Membrane Functionality of Boar Sperm Capacitated in Vitro. *Reprod Domest. Animal*. 37(6): 379-380.

Lestari, T. P. S., M. N. Ihsan dan N. Isnaini. 2014. Pengaruh Waktu Simpan Semen Segar dengan Pengencer Andromd pada Suhu Ruang Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer. *J. Ternak Tropika*. 15(1): 43-50.

Lopes, F.P. 2002. *Semen Collection and Evaluation in Ram*. ANS 33161. University of Florida.

Malik, A., R. Fauzi, M. I. Zakir dan Sakiman. 2017. Subtitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca- Spermatozoa Sapi Bali. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 5(2): 98-104.

Mahesa, R. 2016. Pengaruh Lama *Thawing* Semen Beku Sapi Simental Terhadap Viabilitas dan Morfologi Abnormalitas Spermatozoa. *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.



Malinda, D., H. Santoso dan H. Latuconsina. 2021. Analisis Viabilitas Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (*Bos taurus*) Post *Thawing* Semen Beku Dengan Pengaruh Suhu dan Lama Waktu *Thawing* Berbeda. *e-Jurnal Ilmiah BIOSAIN TROPIS (BIOSCIENCE-TROPIC)*. 6(2): 46 – 51.

Maulana, R., N. Isnaini dan S. Wahjuningsih. 2016. Pengaruh Penambahan Glutathione pada Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Suhu Ruang. *J. Ternak Tropika*. 17(1): 57-65.

Miryanti, A., S. Lanny., B. Kurniawan dan S. Indra. 2011. Ekstraksi Antioksidan Dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). Universitas Katolik Parahyangan Bandung.

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

Muhammad, D., N. Isnaini, Kuswati, A. P. A. Yekti, Aryogi, M. Lutfi, H.Y. Lukman dan T. Susilawati. 2019. Pengaruh Berbagai Formulasi Pengencer Dasar Air Kelapa Terhadap Kualitas Semen Cair Sapi PO (Peranakan Ongole) Selama Simpan Dingin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 29(1): 1-8.



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

Muzakkir, Dasrul, S. Wahyuni, M. Akma dan M. Sabri. 2017. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 5 (2): 115-128.

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

Pinto, S.C.C., D.S. Almeida, M.B.R. Alves, S.A. Florez-Rodriguez, G.S. Abreu Júnior, N. Britto e Alves, E.C.C. Celeghini, L.M. Laskoki, dan F.A. Souza. 2020. Does Supplementation of Vitamin C, Reduced Glutathione or Their Association in Semen Extender Reduce Oxidative Stress n Bovine Frozen Semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 72(1): 9-17.

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

Pratama, J. W. A., D. A. K. Sari dan M. Sigit. 2018. Pengaruh Beberapa Metode *Thawing* Terhadap Kualitas Semen





- Beku Sapi Simental. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*. 3(2): 35-41.
- Pratiwi, D. N. E., Soeparna dan N. Solihati. 2015. Pengaruh Level Madu di dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Daya Hidup dan Keutuhan Membran Plasma Sperma Domba Lokal. *Skripsi*. Universitas Padjadjaran Bandung.
- Prihandini, P.W., L. Hakim dan V.M.A. Nurgiartiningasih. 2011. Seleksi Pejantan Berdasarkan Nilai Pemuliaan pada Sapi Peranakan Ongole (PO) di Loka Penelitian Sapi Potong Grati-Pasuruan. *Jurnal Ternak Tropika*. 12(1): 97-107.
- Prihantoko, K. D., F. Yuliasuti, H. Haniarti, A. Kusumawati, D. T. Widayati dan A. Budiyanto. 2020. The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade Bull Semen Based on Skim Milk – Soy Lecithin Extender. *International Conference: Improving Tropical Animal Production for Food Security*. 465: 1-11.
- Putri, R. F., D. H. Hermawan dan Suyadi. 2019. Kualitas Semen Cair Kambing Boer selama Penyimpanan Suhu Ruang dengan Penambahan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*). *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Hal. 334-344.
- Rizal, M. dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa*. 20(3): 139-145.

Robertson, J. L. 2018. The Lipid Bilayer Membrane and its Protein Constituents. *J. Gen. Physiol.* 10(1): 1-12.

Rodriguez, F. A., M. Almeida, A. Cuadras, S. Anchondo, Romo, B. E. Garcia, J. A. Sanchez, A. D. Jimenez, Alarcon and Rojo. 2005. Heparin Level Effect on Sperm Capacitation of Fresh an Frozen - Thawed Bovine Semen. *Proceedings American Society of Animal Science. Western Section.* Vol. 56. Mexyco City.

Romadhoni, I., A. Rachmawati dan Suyadi. 2014. Kualitas Semen Sapi Madura Setelah Pengenceran dengan Tris Aminomethane Kuning Telur yang Disuplementasi A-Tocopherol pada Penyimpanan Suhu Ruang. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan.* 24(1): 39-44.

Salim, M. A., T. Susilawati dan S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh Metode *Thawing* terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet.* 12(2): 14-19.

Saputra, D. J., M. N. Ihsan dan N. Isnaini. 2017. Korelasi Antara Lingkar Skrotum Dengan Volume Semen, Konsentrasi dan Motilitas Spermatozoa Pejantan Sapi Bali. *Jurnal Ternak Tropika.* 18(2): 59-68.

Savitria, F. K., S. 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.* 2(3): 30-36

Setyawan, F., T. W. Suprayogi, R. A. Prastiya, T. I. Restiadi, A. L. Saputro dan B. Agustono. 2019. Pengaruh



Perbedaan Waktu Ekuilibrasi Sebelum Pembekuan Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Rambon Banyuwangi Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur. *Jurnal Medik Veteriner*. 2(2): 101-107.

Sholikah, N., N. Isnaini, A. P. A. Yekti dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh Penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan Putih Telur pada Pengencer CEP-2 terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole pada Suhu Penyimpanan 3-5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 26 (1): 7-15.

Sikka, S. C. 2004. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal Androl*. 25(2): 5-18.

Silva, S., A. Soares, A. Batista, F. Almeida, J. Nunes, C. Peixoto, dan M. Guerra. 2011. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-Yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. *Reprod Domest Anim*. 46: 874–881.

Siswandoko, B., S. Zaenab dan Husamah. 2017. Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga ke dalam Pengencer Tris Kuning Telur untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Ettawa. *Scripta Biologica*. 4(4): 247–251.

Sitanggang, G. 2018. Pengaruh Lingkungan dan Nilai Ripitabilitas pada Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole Jantan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 23(2): 88-92.



Solihati, N., S. D. Rasad, R. Setiawan dan S. Nurjanah. 2018. Pengaruh Kadar Gliserol Terhadap Kualitas Semen Domba Lokal. *Jurnal Biodjati*. 3(1): 63-71.

Sudarmanto, Trinil Susilawati dan Nurul Isnaini. 2015. Pengaruh Lama Gliserolisasi terhadap Keberhasilan Produksi Semen Beku Sapi Simmental. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 25(2): 43-48.

Suherman, H. 2017. Kualitas Semen Beku Domba Garut (Ovis Aries) pada Penambahan Sukrosa dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 16(1): 31-38.

Sujoko, H., M. A. Setiadi dan A. Boediono. 2009. Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas PerColl. *Jurnal Veteriner*. 10(3): 125-132.

Sukmawati, E., R. I. Arifiantini dan B. Purwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa Terhadap Proses Pemebeakuan pada Berbagai Jenis Sapi Penjantan Unggul. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner*. 19(3): 168-175.

Sunami, S., N. Isnaini dan S. Wahjuningsih. 2017. Kualitas Semen Segar dan Recovery Rate (RR) Sapi Limousin pada Musim yang Berbeda. *J. Ternak Tropika*. 18(1): 36-50.

Sundari, T. Winda, T. R. Tagama dan Maidaswar. 2013. Korelasi Kadar pH Semen Segar dengan Kualitas Semen Sapi Limousin di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1(3): 1043-1049.



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

Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. Malang: UB Press.

Susilawati, T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak*. Malang: UB Press.

Suyadi, A. Rachmawati dan N. Iswanto. 2012. Pengaruh A-Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 22(3): 1-8.

Tafari, S., F. Ciani, E. L. Lorio, L. Esposito and N. Cocchia. 2015. Reactive Oxygen Species and Male Fertility. *Intech*. Chapter 2: 19-40.

Teja, D. N. G. S., W. Bebas dan I G. N. B. Trilakasana. 2018. Pengencer Kuning Telur Berbagai Jenis Unggas Mampu Mencegah Abnormalitas dan Kerusakan Membran Spermatozoa Ayam Pelung. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(3): 262-270

Toelihere, M. R. 1981. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung: Angkasa.

Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.

Triwulanningsih, E., P. Situmorang, T. Sugiarti, R.G. Sianturi, dan D.A. Kusumaningrum. 2003. Pengaruh



Penambahan Glutathione pada Medium Pengencer Sperma terhadap Kualitas Semen Cair (Chilled Semen). *JITV*. 8(2): 91-97.

Tuhu, A. D., Y. S. Ondho dan D. Samsudewa. 2013. Pengaruh Perbedaan Waktu Pelepasan Water Jacket dalam Proses Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa pada Tahap Before Freezing dan Post Thawing. *Animal Agricultural Journal*. 2(1): 466 – 477.

Tulung, Y. L. R., A.F. Pendong dan B. Tulung. 2020. Evaluasi Nilai Biologis Pakan Lengkap Berbasis Tebon Jagung dan Rumput Campuran terhadap Kinerja Produksi Sapi Peranakan Ongole (PO). *Zootec*. 40(1): 363 – 379.

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

Winarti, S. 2010. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.

Wiratri, V.D.B., T. Susilawati san S. Wahyuningsih. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin pada Pengencer yang Berbeda Selama Pendinginan. *Jurnal Ternak Tropika*. 15(1): 13-20.

Woli, S.L., E. D. Kusumawati dan A. T. N. Krisnaningsih. 2017. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ayam Kampung pada Suhu 5°C Menggunakan Pengencer dan Lama Simpan yang Berbeda. *Jurnal Sains Peternakan*. 5(2): 138-144.



Yulnawati, Herdis, H. Maheswari, A. Boediono dan M. Rizal. 2009. Potensi Reproduksi dan Upaya Pengembangbiakan Kerbau Belang Tana Toraja. *Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau*.

Zaniboni, L., R. Rizzi and S. Cerolini. 2006. Combined Effect Of DHA and A-Tocopherol Enrichment on Sperm Quality and Fertility in The Turkey. *Theriogenology*. 65(1): 1813-1827.



## LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Semen Segar Sapi PO

Kualitas	Ulangan		Rataan	SD
	1	2		
Volume (ml)	4	8	6	2,83
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 (%)	80	85	82,5	3,54
Viabilitas (%)	81,33	90,66	86	6,60
Abnormalitas (%)	2,97	1,33	2,15	1,16
Konsentrasi (10 <sup>7</sup> /ml)	116	132	124	11,31

Keterangan: PK = Putih Kekuningan

Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20°C	30°C	40°C	
1 Jam	1	30	30	35	95
	2	30	35	30	95
	3	30	35	35	100
	4	35	35	35	105
	5	30	30	35	95
Sub Total		155	165	170	490
1,5 Jam	1	35	30	40	105
	2	30	35	35	100
	3	30	35	35	100
	4	35	30	35	100
	5	30	35	35	100
Sub Total		160	165	180	505
2 Jam	1	35	30	40	105
	2	30	35	35	100
	3	35	35	35	105
	4	30	40	35	105
	5	35	35	35	105
Sub Total		165	175	180	520
TOTAL		480	505	530	1515

Keterangan:

Faktor A = Lama ekuilibrasi pada suhu dingin (5°C)

Faktor B = Suhu *thawing*

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{(\sum y_{ij})^2}{a.b.c} \\
 &= \frac{(1515)^2}{3 \times 3 \times 5} \\
 &= 51005
 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (30^2 + 30^2 + 30^2 + \dots + 35^2) - 51005 \\ &= 370 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(155^2 + 165^2 + 170^2 + \dots + 180^2)}{5} - 51005 \\ &= 120 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK} \\ &= \frac{(490^2 + 505^2 + 520^2)}{5 \times 3} - 51005 \\ &= 30 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKB} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{ra} - \text{FK} \\ &= \frac{(480^2 + 505^2 + 530^2)}{5 \times 3} - 51005 \\ &= 83,33 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 120 - 30 - 83,33 \\ &= 6,67 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 370 - 120 \\ &= 250 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\ &= 120 / 8 \\ &= 15 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dbA} \\ &= 30 / 2 \end{aligned}$$



$$= 15$$

$$KT_B = JKB / dbB$$

$$= 83,33 / 2$$

$$= 41,67$$

$$KTA*B = JKA*B / dbA*B$$

$$= 6,67 / 4$$

$$= 1,67$$

$$KT_G = JKG / dbg$$

$$= 250 / 36$$

$$= 6,94$$

$$F\text{-hit P} = KTP / KT_G = 15 / 6,94 = 2,16$$

$$F\text{-hit A} = KTA / KT_G = 1,67 / 6,94 = 0,24$$

$$F\text{-hit B} = KT_B / KT_G = 41,67 / 6,94 = 6$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA*B / KT_G = 1,67 / 6,94 = 0,24$$

Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					0,05	0,01
P	120	8	15	2,16		
A	30	2	15	2,16 *	3,26	5,25
B	83,33	2	41,67	6 **	3,26	5,25
A*B	6,67	4	1,67	0,24 *	2,63	3,89
G	250	36	6,94			
Total	370	44				

Keterangan: \*\*) berpengaruh nyata (F hit > 0,05)

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



Lampiran 3. Analisa Viabilitas pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20°C	30°C	40°C	
1 Jam	1	51,30	56,90	61,01	169,21
	2	55,21	57,84	56,94	169,99
	3	55,64	62,09	61,24	178,97
	4	57,45	61,30	56,50	175,25
	5	55,99	55,09	61,97	173,05
Sub Total		275,59	293,22	297,66	866,47
1,5 Jam	1	56,17	57,09	63,89	177,15
	2	55,43	58,51	58,94	172,88
	3	50,61	60,57	61,25	172,43
	4	57,49	53,66	61,71	172,86
	5	51,66	62,03	56,42	170,11
Sub Total		271,36	291,86	302,21	865,43
2 Jam	1	56,18	55,70	63,00	174,88
	2	50,63	61,13	62,18	173,94
	3	57,01	56,92	61,80	175,73
	4	53,99	62,31	56,62	172,92
	5	56,67	57,54	55,81	170,02
Sub Total		274,48	293,6	299,41	867,49
TOTAL		821,43	878,68	899,28	2599,39

Keterangan:

Faktor A = Lama ekuilibrasi pada suhu dingin (5°C)

Faktor B = Suhu *thawing*

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



$$= \frac{(2599,39)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 150151,74$$

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

$$= (51,30^2 + 55,21^2 + 55,64^2 + \dots + 55,81^2) - 150151,74$$

$$= 521,40$$

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

$$= \frac{(275,59^2 + 271,36^2 + 274,48^2 + \dots + 299,41^2)}{5} - 150151,74$$

$$= 221,31$$

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

$$= \frac{(866,47^2 + 865,43^2 + 867,49^2)}{5 \times 3} - 150151,74$$

$$= 0,14$$

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

$$= \frac{(821,43^2 + 878,68^2 + 899,28^2)}{5 \times 3} - 150151,74$$

$$= 216,95$$

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

$$= 221,31 - 0,14 - 216,95$$

$$= 4,22$$

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

$$= 521,40 - 221,31$$

$$= 300,09$$

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

$$= 221,31 / 8$$





$$= 27,66$$

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

$$= 0,14 / 2$$

$$= 0,07$$

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

$$= 216,95 / 2$$

$$= 108,47$$

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

$$= 4,22 / 4$$

$$= 1,06$$

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

$$= 300,09 / 36$$

$$= 8,34$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 27,66 / 8,34 = 3,32$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 0,07 / 8,34 = 0,01$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 108,47 / 8,34 = 13,01$$

$$\text{F-hit A} * \text{B} = \text{KTA} * \text{B} / \text{KTG} = 1,06 / 8,34 = 0,13$$



Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	221,31	8	27,66	3,32		
A	0,14	2	0,07	0,01 *	3,26	5,25
B	216,95	2	108,47	13,01 **	3,26	5,25
A*B	4,22	4	1,06	0,13 *	2,63	3,89
G	300,09	36	8,34			
Total	521,40	44				

Keterangan:

\*\*\*) berpengaruh nyata ( $F_{hit} > 0,05$ )

\*) tidak berpengaruh nyata ( $F_{hit} < 0,05$ )



Lampiran 4. Analisa Abnormalitas pada Lama Ekuilibrasi dan Suhu *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20°C	30°C	40°C	
1 Jam	1	10,43	11,03	11,32	32,78
	2	11,20	10,74	11,46	33,40
	3	11,27	11,52	10,75	33,54
	4	10,49	11,15	11,66	33,30
	5	10,92	11,58	11,62	34,12
Sub Total		54,31	56,02	56,81	167,14
1,5 Jam	1	11,36	11,49	11,90	34,75
	2	11,99	10,15	11,59	33,73
	3	11,02	11,79	10,00	32,81
	4	11,85	12,22	11,90	35,97
	5	10,28	11,28	10,81	32,37
Sub Total		56,50	56,93	56,20	169,63
2 Jam	1	11,31	11,81	11,67	34,79
	2	10,46	11,29	10,61	32,36
	3	11,84	11,92	11,73	35,49
	4	11,64	10,38	10,40	32,42
	5	11,48	11,93	11,61	35,02
Sub Total		56,73	57,33	56,02	170,08
TOTAL		167,54	170,28	169,03	506,85

Keterangan:

Faktor A = Lama ekuilibrasi pada suhu dingin (5°C)

Faktor B = Suhu *thawing*

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



$$= \frac{(506,85)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 5708,82$$

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

$$= (10,43^2 + 11,20^2 + 11,27^2 + \dots + 11,61^2) - 5708,82$$

$$= 14$$

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

$$= \frac{(54,31^2 + 56,50^2 + 56,73^2 + \dots + 56,02^2)}{5} - 5708,82$$

$$= 1,21$$

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

$$= \frac{(167,14^2 + 169,63^2 + 170,08^2)}{5 \times 3} - 5708,82$$

$$= 0,33$$

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

$$= \frac{(167,54^2 + 170,28^2 + 169,03^2)}{5 \times 3} - 5708,82$$

$$= 0,25$$

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

$$= 1,21 - 0,33 - 0,25$$

$$= 0,63$$

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

$$= 14 - 1,21$$

$$= 13,21$$

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

$$= 1,21 / 8$$



$$= 0,15$$

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

$$= 0,33 / 2$$

$$= 0,17$$

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

$$= 0,25 / 2$$

$$= 0,13$$

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

$$= 0,63 / 4$$

$$= 0,16$$

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

$$= 13,21 / 36$$

$$= 0,37$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 0,15 / 0,37 = 0,41$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 0,17 / 0,37 = 0,46$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 0,13 / 0,37 = 0,34$$

$$\text{F-hit A} * \text{B} = \text{KTA} * \text{B} / \text{KTG} = 0,16 / 0,37 = 0,43$$



Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	1,21	8	0,15	0,41		
A	0,33	2	0,17	0,46 *	3,26	5,25
B	0,25	2	0,13	0,34 *	3,26	5,25
A*B	0,63	4	0,16	0,43 *	2,63	3,89
G	13,21	36	0,37			
Total	14,42	44				

Keterangan:

\*\*\*) berpengaruh nyata ( $F_{hit} > 0,05$ )

\*) tidak berpengaruh nyata ( $F_{hit} < 0,05$ )



Lampiran 5. Analisa Integritas Membran pada Lama  
Ekuilibrasi dan Suhu *Thawing*

Faktor A	Ulangan	Faktor B			Total
		20°C	30°C	40°C	
1 Jam	1	49,63	54,74	59,34	163,71
	2	53,98	55,88	55,83	165,69
	3	53,57	62,50	60,18	176,25
	4	56,50	61,11	57,00	174,61
	5	53,72	54,46	60,64	168,82
Sub Total		267,40	288,69	292,99	849,08
1,5 Jam	1	56,25	56,70	62,50	175,45
	2	54,21	57,73	57,73	169,67
	3	48,85	58,37	60,40	167,62
	4	56,14	53,91	59,71	169,76
	5	50,82	60,23	56,28	167,33
Sub Total		266,27	286,94	296,62	849,83
2 Jam	1	55,56	54,44	61,47	171,47
	2	48,54	60,67	61,17	170,38
	3	55,14	55,26	60,87	171,27
	4	52,57	61,76	57,55	171,88
	5	54,63	56,48	58,74	169,85
Sub Total		266,44	288,61	299,80	854,85
TOTAL		800,11	864,24	889,41	2553,76

Keterangan:

Faktor A = Lama ekuilibrasi pada suhu dingin (5°C)

Faktor B = Suhu *thawing*

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



$$= \frac{(2553,76)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 144926,45$$

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

$$= (49,63^2 + 53,98^2 + 53,57^2 + \dots + 58,74^2) - 144926,45$$

$$= 563,95$$

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

$$= \frac{(267,40^2 + 266,27^2 + 266,44^2 + \dots + 299,80^2)}{5} - 144926,45$$

$$= 287,87$$

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

$$= \frac{(849,08^2 + 849,83^2 + 854,85^2)}{5 \times 3} - 144926,45$$

$$= 1,31$$

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

$$= \frac{(800,11^2 + 864,24^2 + 889,41^2)}{5 \times 3} - 144926,45$$

$$= 282,68$$

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

$$= 287,87 - 1,31 - 282,68$$

$$= 3,87$$

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

$$= 563,95 - 287,87$$

$$= 276,09$$

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

$$= 287,87 / 8$$



$$= 35,98$$

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

$$= 1,31 / 2$$

$$= 0,66$$

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

$$= 282,68 / 2$$

$$= 141,34$$

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

$$= 3,87 / 4$$

$$= 0,97$$

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

$$= 276,09 / 36$$

$$= 7,67$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 35,98 / 7,67 = 4,69$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 0,66 / 7,67 = 0,09$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 0,97 / 7,67 = 18,43$$

$$\text{F-hit A} * \text{B} = \text{KTA} * \text{B} / \text{KTG} = 2,97 / 7,67 = 0,13$$



Tabel ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	F Hit	F Tabel	
					5	1
P	287,87	8	35,98	4,69		
A	1,31	2	0,66	0,09 *	3,26	5,25
B	282,68	2	141,34	18,43 **	3,26	5,25
A*B	3,87	4	0,97	0,13 *	2,63	3,89
G	276,09	36	7,67			
Total	563,95	44				

Keterangan: \*\*) berpengaruh nyata (F hit >0,05)

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

Lampiran 6. Dokumentasi



Vagina Buatan



Koleksi semen segar sapi PO





Semen segar sapi PO



Pengamatan pada mikroskop



Sentrifugator



Preparat ulasan



Genistein (merk Sigma Aldrich)



Waterbath





Refrigerator



Proses pembekuan



Mikroskop binokular  
(Olympus CX21)



Tris aminomethan dari Lab.  
Reproduksi Ternak Fapet UB  
(MERCK Jerman)



Haemocytometer

