

**PENGARUH ANTIOKSIDAN
GENISTEIN DALAM PENGENCER
TRIS AMINOMETHAN DAN POSISI
STRAW PADA EKUILIBRASI UAP
NITROGEN CAIR TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

Aik Awallikah

175050101111034



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



**PENGARUH ANTIOKSIDAN
GENISTEIN DALAM PENGENCER
TRIS AMINOMETHAN DAN POSISI
STRAW PADA EKUILIBRASI UAP
NITROGEN CAIR TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

Aik Awallikah

175050101111034

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

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



**PENGARUH ANTIOKSIDAN
GENISTEIN DALAM PENGENCER
TRIS AMINOMETHAN DAN POSISI
STRAW PADA EKUILIBRASI UAP
NITROGEN CAIR TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

**Aik Awallikah
175050101111034**

Telah Dinyatakan Lulus dalam Ujian Sarjana

Pada Hari/Tanggal: Senin, 19 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 :





ditahun 2019. Pada tahun 2018 penulis pernah mewakili Fakultas Peternakan dalam kegiatan Olimpiade Brawijaya dan meraih Juara 2 pada kejuaraan bola voli. Penulis seharusnya melaksanakan Praktek Kerja Lapangan di UD. Family Farm Blitar dengan laporan yang berjudul “Manajemen Pemeliharaan Sapi Potong di UD. Family Farm Blitar”, namun dengan adanya wabah pandemi covid-19 ini dari pihak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya tidak memperkenankan melakukan Praktek Kerja Lapangan di lapang. Untuk memutus mata rantai penyebaran covid-19, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya memberlakukan kebijakan Praktek Kerja Lapangan dengan melakukan wawancara secara *daring*. Sehingga penulis telah melakukan Praktek Kerja Lapangan di UD. Family Farm Blitar dengan judul “Manajemen Pemeliharaan Sapi Potong”. Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana (S1) Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, penulis menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Antioksidan *Genistein* dalam Pengencer *Tris Aminomethan* dan Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole”.



Surat Keterangan

Penelitian dengan tema “**Penambahan *Genistein* dalam Pengencer *Tris Aminomethan* pada Penyimpanan Cair dan Beku Semen Sapi Peranakan Ongole**” dilaksanakan secara berkelompok dibawah bimbingan Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., IPU., ASEAN Eng. dengan anggota sebagai berikut:

No	Nama/NIM	Judul Penelitian Mahasiswa
1	Hamida Madani Rosmiati/17505 0100111065	Pengaruh Penambahan <i>Genistein</i> Terhadap Kualitas Semen Cair di Suhu Ruang pada Sapi PO di Tuban
2	Diajeng Doyu Pangestu/17505 0100111179	Pengaruh Kadar <i>Genistein</i> Dalam Pengencer <i>Tris Aminomethane</i> Terhadap Kualitas Semen Peranakan Ongole (PO) Selama Penyimpanan Suhu Dingin
3	Herjuna Aditama/17505 0100111184	Efek Suplementasi <i>Genistein</i> Dalam Pengencer <i>Tris Aminomethan</i> Kuning Telur Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post Thawing
4	Aik Awallikah/1750 50101111034	Pengaruh Antioksidan <i>Genistein</i> dalam Pengencer <i>Tris Aminomethan</i> dan Posisi Straw Pada Ekuilibraasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole
5	Natalia Kristina Lubis/1750501 01111045	Pengaruh Lama Ekuilibraasi Uap Nitrogen Cair dan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengencer <i>Tris Aminomethane</i> Terhadap Kualitas Semen Beku
6	Adhe Tya Purnomo/17505 0101111118	Pengaruh Penambahan <i>Genistein</i> dalam Pengencer <i>Tris Aminomethan</i> Terhadap Kualitas Post Thawing Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Suhu Berbeda
No	Nama/NIM	Judul Penelitian Mahasiswa

7	Aisyah Nur Arifiyanti/175050101111156	Pengaruh Penambahan <i>Genistein</i> dalam Pengencer Tris-Aminomethan dan Lama Thawing terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole
8	Aulia Setyo Lazuardi/175050107111065	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Dingin dan Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Setelah Pengenceran dengan Penambahan <i>Genistein</i>
9	Dicky Ananta Kudori/175050107111143	Pengaruh Lama ekuilibrasi Suhu Dingin dan Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO yang Disuplementasi dengan 30 μ M <i>Genistein</i>
10	Calista Mega Herawati/175050100111115	Pengaruh Lama Ekuilibrasi dan Suhu Thawing dengan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO
11	Kristina Delvina Gultom/175050100111158	Pengaruh Lama Ekuilibrasi dan Thawing dengan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO
12	Pandu Alif Utama/175050101111136	Pengaruh Jarak dan Lama Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengenceran
13	Kristina Sidabalok/175050100111158	Pengaruh Jarak Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengencer
14	Frando Gabriel Situmorang/175050107111108	Pengaruh Jarak Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan <i>Genistein</i> pada Pengencer



Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 22 Juli 2021
Penulis

Aik Awallikah
NIM.175050101111034





KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan karunia, taufik serta hidayah-Nya, sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Penulisan ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Peternakan Universitas Brawijaya yang berjudul **“Pengaruh Antioksidan *Genistein* dalam Pengencer Tris Aminomethan dan Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole”**.

Penyelesaian penulisan laporan ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan serta dorongan motivasi dari beberapa pihak, penulis sampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr.Sc.Agr. Ir. Suyadi, MS, IPU., ASEAN Eng. Selaku Pembimbing Utama dan Dekan Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya yang memberikan saran, bimbingan, fasilitas baik ilmu, sarana dan prasarana yang membantu proses belajar di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
2. Dr. Khothibul Umam Al Awwaly, S.Pt., M.Si., selaku Ketua Jurusan Peternakan yang sudah memberikan segala macam informasi akademik dan bantuannya.
3. Dr. Herly Evanuarini, S.Pt., MP., selaku Ketua Program Studi Peternakan yang telah banyak membina kelancaran proses studi di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
4. Ir. Nur Cholis, M.Si., IPM., ASEAN Eng. selaku Ketua Minat Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan semangatnya bagi mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.



5. Dr. Ir. Hary Nugroho, MS dan Ir. Hari Dwi Utami, MS, M.Appl.Sc, PhD, IPM, ASEAN Eng selaku penguji atas kritik dan sarannya baik selama ujian sarjana maupun pada perbaikan skripsi.
6. UPT PT & HMT Karangwaru Tuban selaku tempat lokasi penelitian yang memberikan semua fasilitas dan semua materi yang sudah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
7. Bapak Suparno dan Ibu Ponisih selaku kedua orang tua saya, yang sangat saya sayangi yang sudah memberi dukungan dan doanya hingga saat ini
8. Teman sebimbingan skripsi saya Diajeng Doyu Pangestu dan Aisyah Nur Afrianti serta teman PKL saya Rizal Sauki, Aliffia Ayuning Dewi, Latifatur Robitoh, Khoerul Fatihin yang sudah menemani dan mendukung penulis selama menempuh pendidikan di Universitas Brawijaya.
9. Sahabat Sukses Dunia Akhirat yaitu Latifatur Robitoh, Ayu Novita Apriliani, Nita Ernawati, Elga Dwi Erfina, Dita Puspita Sari dan Efi Zulfita yang sudah memberikan semangat dan perhatiannya yang tidak akan dilupakan oleh penulis.

Penulis menyadari bahwa laporan ini merupakan sebuah proses pembelajaran yang harus dijalani dan masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran sebagai proses belajar sangat diperlukan untuk membangun agar di waktu yang akan datang penulis dapat lebih baik lagi. Selain itu, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca.

Malang, Juli 2021

Penulis

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT GENISTEIN ON TRIS AMINOMETHAN SOLUTION DILUENT AND STRAW POSITION ON LIQUID NITROGEN VAPOR EQUILIBRATION ON FROZEN QUALITY OF ONGOLE CROSSBREEDS

Aik Awallikah¹⁾ and Suyadi²⁾

¹⁾ Student of Animal Production Department, Faculty of Animal Science, Brawijaya University, Malang

²⁾ Lecture of Animal Production Department, Faculty of Animal Science, Brawijaya University, Malang

E-mail : aikawallikah11atr1@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of the addition of the antioxidant genistein in tris aminomethane diluent and straw position on liquid nitrogen vapor equilibration on the frozen semen quality of Ongole Peranakan cattle. The research was conducted in April 2021 at UPT PT and HMT Karangwaru, Tuban. The material used was fresh semen of Ongole Peranakan cattle which was accommodated using an artificial vagina. The research method used is a laboratory experiment using a completely randomized factorial design with 2 factors and 5 replications. The treatments in this study were P0 (Tris Aminomethan diluent without the addition of the antioxidant genistein); P1 (Tris Aminomethan + addition of 10 μ M antioxidant genistein); P2 (Tris Aminomethan + addition of 30 μ M antioxidant genistein) and P3 (diluent Tris Aminomethan + addition of 50 μ M antioxidant genistein). It was observed at different equilibration heights of liquid



nitrogen vapor, namely 5 cm, 10 cm and 20 cm. The variables observed were individual motility, viability, abnormalities and integrity of spermatozoa membranes. The results showed that the addition of the antioxidant genistein had a significant effect ($P < 0.05$) on individual motility, viability, abnormalities and membrane integrity of spermatozoa. The best treatment in this study was at P2 with the addition of the antioxidant genistein $30 \mu\text{M}$ with individual motility ($33 \pm 5.04\%$), abnormality ($10.97 \pm 2.21\%$), viability ($54.04 \pm 5.21\%$) and $37.82 \pm 2.67\%$ membrane integrity in maintaining spermatozoa quality of Ongole Crossbreed cattle at an equilibration height of 5 cm liquid nitrogen vapor.

Keywords : *tris aminomethane, genisteine, motility, viability, abnormalities, membrane integrity*

PENGARUH ANTIOKSIDAN *GENISTEIN* DALAM PENGECER *TRIS AMINOMETHAN* DAN POSISI STRAW PADA EKUILIBRASI UAP NITROGEN CAIR TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PERANAKAN ONGOLE

Aik Awallikah¹⁾ dan Suyadi²⁾

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya,
Malang.

²⁾ Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.

E-mail : aikawallikah11atr1@gmail.com

RINGKASAN

Rusaknya spermatozoa selama penyimpanan salah satunya disebabkan oleh Reactive Oxygen Species (ROS). Keadaan ini terjadi karena spermatozoa mamalia kaya akan asam lemak tidak jenuh dan sangat mudah terkena Reactive Oxygen Species (ROS) yang dapat mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa serta meningkatkan kerusakan morfologi yang berpengaruh terhadap kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom. Peroksidasi lemak pada membran plasma merupakan mekanisme kunci dari ROS yang mengakibatkan kerusakan spermatozoa dan infertilitas. Permasalahan ROS dapat diatasi yaitu dengan cara penambahan antioksidan kedalam pengencer semen. Antioksidan yang ditambahkan dalam pengencer salah satunya adalah genistein. Genistein adalah isoflavon yang termasuk dalam fitoestrogen yang banyak ditemukan pada kedelai. Fitoestrogen adalah senyawa alami yang berasal dari tanaman yang struktural dan fungsionalnya mempunyai efek mengikat reseptor estrogen. Genistein memiliki efek antioksidan terhadap integritas DNA



sel sperma, sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, dan senyawa anti kanker.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan antioksidan Genistein dalam pengencer Tris Aminomethan kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole yang diekuilibrasi pada posisi straw yang berbeda. Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2021. Penelitian dilaksanakan secara berkelompok di UPT dan HMT Karangwaru, Kabupaten Tuban.

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (experimental laboratory) dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial atas 2 faktor dan 5 ulangan dan data setiap perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan anova, yang apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji Duncan. Perlakuan penelitian ini yaitu P0 (Pengencer Tris Aminomethan tanpa penambahan antioksidan genistein); P1 (Pengencer Tris Aminomethan + penambahan 10 μM antioksidan genistein); P2 (Pengencer Tris Aminomethan + penambahan 30 μM antioksidan genistein) dan P3 (Pengencer Tris Aminomethan + penambahan 50 μM antioksidan genistein). Diamati pada ketinggian ekuilibrasia up nitrogen yang berbeda yaitu, 5 cm, 10 cm dan 20 cm. Variabel yang diamati adalah motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.

Ditinjau dari hasil penelitian semen sapi Peranakan Ongole menunjukkan kualitas yang baik uji makroskopis yaitu volume $9\pm 0,62$ ml, warna putih kekuningan dan pH $6,77\pm 0,21$ serta uji mikroskopis dengan motilitas massa ++, motilitas individu $81,25\pm 7,5\%$, konsentrasi sebesar $128,5\pm 7,32 \cdot 10^7$ spermatozoa/ml, viabilitas $87,38\pm 8,87\%$, dan abnormalitas $3,12\pm 1,57\%$.

Hasil analisis pada motilitas individu spermatozoa sapi Peranakan Ongole menunjukkan bahwa tingkat penambahan

antioksidan genistein memberikan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Diketahui bahwa penambahan antioksidan genistein sebesar $30 \mu\text{M}$ memberikan hasil terbaik dibandingkan P0, P1 dan P3. Dapat dilihat bahwa persentase motilitas individu perlakuan P2 sebesar ($34 \pm 5,04\%$), lebih tinggi dibandingkan penambahan antioksidan genistein P0, P1 dan P3 yang berturut-turut didapatkan P0 ($27,33 \pm 3,21\%$), P1 ($31 \pm 4,13\%$), dan P3 ($28,33 \pm 3,32\%$). Motilitas individu spermatozoa sapi PO mengalami penurunan dengan ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair 10 cm dan 20 cm dengan empat perlakuan yang berbeda pada setiap ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair dengan hasil berturut-turut sebesar $29,5 \pm 2,23\%$ dan $28 \pm 2,11\%$. Hasil analisis terhadap viabilitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole menunjukkan bahwa kadar penambahan antioksidan genistein $30 \mu\text{M}$ memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Pada ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair 5 cm, 10 cm dan 20 cm dapat dilihat bahwa persentase viabilitas pada P2 dengan kadar genistein $30 \mu\text{M}$ sebesar ($54,04 \pm 5,21\%$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan penambahan kadar genistein $0 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ dan $50 \mu\text{M}$ yaitu secara berturut turut adalah ($36,29 \pm 2,65\%$), ($47,57 \pm 3,43\%$) dan ($39,18 \pm 3,21\%$). Hasil analisis terhadap abnormalitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole menunjukkan bahwa penambahan antioksidan genistein $30 \mu\text{M}$ memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan $0 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ dan $50 \mu\text{M}$. Pada ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair 5 cm, 10 cm dan 20 cm dapat dilihat bahwa persentase abnormalitas pada P2 dengan kadar antioksidan genistein $30 \mu\text{M}$ sebesar ($10,97 \pm 2,21\%$). Lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan penambahan antioksidan genistein $0 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ dan $50 \mu\text{M}$ yaitu berturut-turut adalah genistein $0 \mu\text{M}$ ($14,06 \pm 1,75\%$), genistein $10 \mu\text{M}$ ($12,67 \pm 1,43\%$) dan genistein $50 \mu\text{M}$ ($13,26 \pm 1,23\%$). Hasil analisis terhadap integritas



membran spermatozoa sapi Peranakan Ongole menunjukkan bahwa penambahan genistein 30 μM memberikan hasil terbaik yaitu sebesar $37,82 \pm 2,67\%$ namun tidak berbeda nyata dengan penambahan antioksidan genistein 10 μM yaitu sebesar $36,57 \pm 3,54\%$. Sedangkan penambahan antioksidan genistein 50 μM mampu mempertahankan integritas membran berkisar $34,75 \pm 1,45\%$ dan tidak berbeda nyata dengan penambahan antioksidan genistein 0 μM yaitu $34,4 \pm 2,43\%$.

Kesimpulan dari penelitian ini didapatkan bahwa Penambahan Antioksidan Genistein sebanyak 30 μM pada pengencer Tris Aminomethan kuning telur memiliki rataan tertinggi dengan nilai motilitas $33 \pm 5,04\%$, Abnormalitas $10,97 \pm 2,21\%$, Viabilitas $54,04 \pm 5,21\%$ dan Integritas Membran $37,82 \pm 2,67\%$ dalam mempertahankan kualitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole pada ketinggian ekuilibrasi 5 cm.

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
RIWAYAT HIDUP	i
KATA PENGANTAR	vii
ABSTRACT	ix
RINGKASAN	xi
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	5
1.3. Tujuan.....	5
1.4. Kegunaan.....	5
1.5. Kerangka Pikir.....	6
1.6. Hipotesis Penelitian.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1. Gambaran Umum Sapi Peranakan Ongole (PO).....	11
2.2. Pengembangan Sapi Peranakan Ongole.....	12
2.3. Spermatozoa.....	13
2.4. Inseminasi Buatan.....	15
2.5. Penampungan Semen.....	16
2.6. Uji Kualitas Semen.....	17
2.7. Pengenceran Semen.....	19
2.8. Integritas Membran.....	20
2.9. Ekuilibrasi dan Pembekuan.....	21
2.10. Reaksi Biochemist Selama Penyimpanan.....	24
2.11. Antioksidan.....	25
2.12. Antioksidan <i>Genistein</i>	27



BAB III MATERI DAN METODE29

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian29

3.2 Materi Penelitian29

3.2.1 Peralatan dan Bahan Penampungan29

3.2.2 Evaluasi Kualitas Semen30

3.2.3 Peralatan Pengenceran dan Penyimpanan.....31

3.2.4. Proses Pembuatan Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur31

3.3 Metode Penelitian32

3.4 Prosedur Penelitian33

3.4.1 Pembuatan dan Persiapan Pengencer.....33

3.4.2 Penampungan Semen35

3.4.3 Evaluasi Semen.....36

3.4.4. Pengenceran Semen39

3.4.5. Penyimpanan Semen.....40

3.5 Variabel Penelitian41

3.6 Analisis Data43

3.7 Batasan Istilah44

BAB IV PEMBAHASAN47

4.1 Kualitas Semen Segar47

4.2 Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibراسي Uap Nitrogen Cair yang Berbeda.....51

4.3 Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibراسي Uap Nitrogen Cair yang Berbeda55

4.4 Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan



	Antioksidan <i>Genistein</i> dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair yang Berbeda.....	61
4.5	Persentase Integritas Membran Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan <i>Genistein</i> dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair yang Berbeda.....	66
BAB V PENUTUP.....		72
5.1	Kesimpulan.....	72
5.2	Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA.....		74
LAMPIRAN.....		82



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Komposisi Pengencer <i>Tris</i> <i>Aminomethan</i>	34
2	Kualitas Semen Segar Sapi PO	47
3	Rata-rata motilitas individu spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan <i>Genistein</i> dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda	51
4	Rata-rata viabilitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan <i>Genistein</i> dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda	57
5	Rata-rata abnormalitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan <i>Genistein</i> dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda	63
6	Rata-rata integritas membran spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan <i>Genistein</i> dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda	68

DAFTAR GAMBAR



Gambar**Halaman**

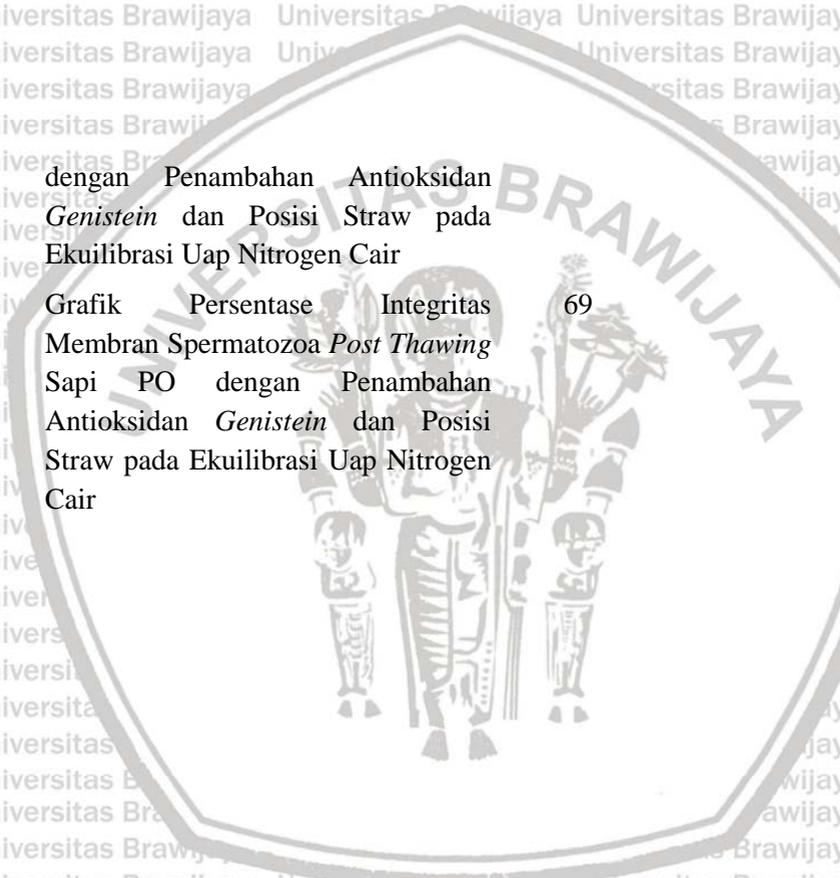
1	Skema Kerangka Pikir Penelitian	9
2	Sapi Peranakan Ongole	12
3	Spermatozoa Pada Beberapa Ternak	14
4	Penampungan Semen dengan Vagina Buatan	17
5	Mekanisme Masuknya Krioprotektan ke Sel	22
6	Pembentukan ROS	25
7	Reaksi Radikal Bebas dengan Antioksidan	26
8	Prosedur Pengenceran Semen	40
9	Grafik Persentase Motilitas Individu Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Sapi PO dengan Penambahan Antioksidan <i>Genistein</i> dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair	54
10	Viabilitas Spermatozoa Sapi PO	56
11	Grafik Persentase Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Sapi PO dengan Penambahan Antioksidan <i>Genistein</i> dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair	59
12	Abnormalitas spermatozoa sapi PO	62
13	Grafik Persentase Abnormalitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Sapi PO	64



dengan Penambahan Antioksidan
Genistein dan Posisi Straw pada
Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair

14 Grafik Persentase Integritas 69

Membran Spermatozoa *Post Thawing*
Sapi PO dengan Penambahan
Antioksidan *Genistein* dan Posisi
Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen
Cair



DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

%	= Persentase
°C	= Derajat celcius
ANOVA	= <i>Analysis of variance</i>
pH	= <i>Power of hydrogen</i>
RAL	= Rancangan Acak Lengkap
Cm	= Centimeter
ml	= Mililiter
<i>et al</i>	= <i>et al (and others)</i> atau dan kawan - kawan
dkk	= dan kawan - kawan
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
PO	= Peranakan Ongole
IB	= Inseminasi Buatan
PUFA	= <i>Poly Usaturated Fatty Acids</i>
s/d	= sampai dengan
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
S/C	= <i>Service per Conception</i>
DO	= <i>Days Open</i>
CR	= <i>Conception Rate</i>





BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan akan ternak sapi potong untuk memenuhi konsumsi daging sapi di Indonesia setiap tahun semakin meningkat, sejalan dengan bertambahnya jumlah penduduk, peningkatan pendapatan dan kesejahteraan masyarakat serta semakin tingginya tingkat kesadaran masyarakat akan pentingnya kebutuhan protein hewani. Pada tahun 2018 produksi daging sapi di Indonesia sebesar 496.302 ton dengan jumlah konsumsi daging sapi sebesar 708.056 ton (Badan Pusat Statistik, 2018). Sapi Peranakan Ongole merupakan salah satu komoditas ternak yang potensial dikembangkan di Indonesia untuk menghasilkan daging sebagai sumber protein hewani yang bergizi tinggi. Sapi Peranakan Ongole merupakan hasil perkawinan antara sapi Jawa dengan sapi Ongole yang telah berkembang lama di Indonesia sehingga dijadikan sebagai salah satu cikal bakal sapi lokal Indonesia. Bangsa sapi Peranakan Ongole tersebar luas di wilayah Indonesia dan bagian terbesar dari populasi terdapat di pulau Jawa (Subiharta *et al*, 2012). Salah satu usaha untuk meningkatkan populasi sapi Peranakan Ongole salah satunya yakni dengan meningkatkan kualitas pelayanan reproduksi sehingga perbaikan akan selalu terjadi.

Upaya Peningkatan sapi potong dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya adalah meningkatkan mutu genetik dan efisiensi reproduksi yakni dengan program Inseminasi Buatan (IB). IB merupakan salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam waktu pendek dapat



menghasilkan anak dengan kualitas baik dalam jumlah yang besar dengan memanfaatkan pejantan unggul sebanyak-banyaknya (Susilawati, 2013). Priyanto (2011) menambahkan bahwa untuk mendukung swasembada daging sapi, beberapa kegiatan telah direkomendasikan yaitu penyelamatan sapi betina produktif, tunda potong untuk mengoptimalkan bobot potong, memperpendek jarak beranak (*calving interval*) dan, menerapkan teknologi IB. Program IB yang berhasil dapat dicapai dengan melihat kualitas semen jantan, perlakuan terhadap semen, transportasi serta pelaksanaan dalam inseminasi, sehingga ketersediaan semen yang diperlukan setiap saat tetap dalam keadaan baik dan layak untuk dilakukan inseminasi dengan cara pengawetan semen berupa pengenceran semen.

Seleksi dan penyediaan pejantan unggul merupakan faktor terpenting untuk menghasilkan semen yang berkualitas baik agar tercapai keberhasilan IB. Pejantan unggul yang baik mempunyai produksi dan kualitas semen yang bagus dengan bobot badan yang tinggi (Khairi, 2016). Perkawinan melalui inseminasi buatan dapat meningkatkan pengelolaan pejantan unggul karena satu ejakulat sperma pejantan akan dikoleksi, diencerkan dan diawetkan sehingga dapat digunakan untuk membuahi 200 s/d 1000 ekor betina. Semen pejantan yang telah diencerkan dapat ditransportasikan dengan mudah sehingga memungkinkan bagi ternak betina yang berada pada wilayah geografis yang berbeda dapat diinseminasi secara kontinyu. Inseminasi buatan dengan menggunakan semen pejantan sangat menguntungkan dikarenakan tanpa memelihara pejantan unggul dapat memperoleh bibit (semen beku) yang unggul dan berkualitas, sehingga menghasilkan keturunan yang unggul. Dengan IB maka potensi untuk



meningkatkan seleksi terhadap pejantan dan keturunannya sangat dimungkinkan sehingga akan bermanfaat meningkatkan populasi ternak yang berkualitas (Ismaya, 2014).

Kerusakan spermatozoa merupakan salah satu kendala dalam upaya untuk mempertahankan semen pada suhu rendah. Semen sapi mudah mengalami kerusakan selama proses pembekuan. Sanoeka dan Kurpisz (2004) mengatakan bahwa salah satu kendalanya adalah rendahnya kualitas semen akibat rusaknya membran kepala spermatozoa selama penyimpanan yang salah satunya disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan stress oksidatif. Stress oksidatif pada spermatozoa merupakan penyebab utama disfungsi semen sehingga menghambat proses fosforilasi. Oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan *ROS* semen, kadar *ROS* yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA. Lipid membran plasma semen memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi menyebabkan semen sangat rentan terhadap *ROS*. Maxwell dan Watson (1996) mengatakan bahwa rusaknya membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya peroksidasi lipid, keadaan ini terjadi karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi. Hal tersebut juga didukung dengan pendapat Sikka (2004) menyatakan bahwa spermatozoa mamalia kaya akan asam lemak tidak jenuh dan sangat mudah terkena *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang dapat mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa serta meningkatkan kerusakan morfologi yang berpengaruh terhadap kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom. Peroksidasi lemak pada membran plasma merupakan mekanisme kunci dari *ROS* yang mengakibatkan kerusakan spermatozoa dan infertilitas.



Permasalahan ROS dapat diatasi yaitu dengan cara penambahan antioksidan kedalam pengencer semen. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai dampak negatif, misalnya *α-tokoferol*, *glutathione* dan *genistein*. Antioksidan yang ditambahkan dalam pengencer salah satunya adalah *genistein*. *Genistein* adalah isoflavon yang termasuk dalam fitoestrogen yang banyak ditemukan pada kedelai. Fitoestrogen adalah senyawa alami yang berasal dari tanaman yang struktural dan fungsionalnya mempunyai efek mengikat reseptor esterogen. *Genistein* memiliki efek antioksidan terhadap integritas DNA sel sperma, sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, dan senyawa anti kanker (Wocwalek *et al*, 2013).

Ekuilibrase adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer agar pada saat pembekuan kematian dan kerusakan sperma akibat *cold shock* dapat dicegah. Pada saat ekuilibrase keefisienan gliserol pada masa pembekuan sangat ditentukan, gliserol diberi kesempatan untuk memasuki sel spermatozoa sebelum pembekuan agar kerusakan mekanis pada spermatozoa dapat dihindari. Ekuilibrase dilakukan sebelum semen dibekukan pada suhu 5°C selama 2 jam. Susilawati (2013) mengatakan bahwa metode pembekuan dengan menggunakan straw selalu didinginkan lebih dulu dalam suhu 5°C, kemudian diuapkan diatas N₂ cair dengan menempatkan 8-10 cm diatas permukaan nitrogen cair sebelum dimasukan didalam N₂ cair, Hal ini karena straw mempunyai dinding yang kuat, sehingga memberikan kesempatan agar dinginnya masuk terlebih dahulu dalam waktu yang cepat. Setelah semen dimasukan dalam N₂ cair maka motilitas dan viabilitas semen



beku dapat dievaluasi sebelum 48 jam setelah pembekuan dengan dithawing dalam air suhu 37°C selama 15-30 detik.

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti ingin mencari kadar antioksidan *genistein* dalam pengencer *Tris Aminomethan* dan posisi straw pada ekuilibrisasi menggunakan uap nitrogen cair terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole. sehingga perlu dilakukan penelitian agar kualitas semen beku tetap dalam keadaan motil dan mampu secara maksimal membuahi sel telur.

1.2. Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana pengaruh penambahan antioksidan *genistein* dalam pengencer *Tris Aminomethan* terhadap kualitas semen beku sapi PO yang diekuilibrisasi pada uap nitrogen cair dengan posisi straw yang berbeda.

1.3. Tujuan

Tujuan penelitian adalah mengetahui dan mengkaji pengaruh penambahan antioksidan *genistein* dengan pengencer *Tris Aminomethan* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair yang berbeda terhadap kualitas semen beku sapi Peranakan Ongole .

1.4. Kegunaan

Hasil penelitian diharapkan memberikan informasi tentang pengaruh penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair yang berbeda terhadap kualitas semen beku sapi PO, sehingga dapat mencegah penurunan kualitas spermatozoa yang diakibatkan oleh radikal bebas serta berguna sebagai standar optimal pemberian antioksidan *genistein* dan standart ketinggian ekuilibrisasi uap



nitrogen cair pada penelitian selanjutnya guna mendukung perkembangan ilmu peternakan pada bidang bioteknologi reproduksi.

1.5. Kerangka Pikir

Manajemen reproduksi sapi PO harus dilakukan perbaikan secara terus menerus salah satunya yaitu produksi semen yang berkualitas tinggi. Menurut Wiratri, Susilawati dan Wahjuningsih (2014) menjelaskan bahwa semen beku yang sering digunakan sebagai IB mempunyai kualitas yang lebih rendah dan hanya dapat dipertahankan dengan adanya nitrogen cair (N_2 cair), sedangkan di beberapa daerah di Indonesia N_2 cair masih sulit didapatkan dan akan berdampak terhadap rendahnya tingkat keberhasilan IB.

Penyimpanan semen penting dilakukan agar kualitas semen dapat terjaga hingga proses IB pada ternak betina, oleh karena itu dibutuhkan pengencer semen (Susilawati, 2011). Muhammad dkk, (2016) menambahkan bahwa prinsip dasar pengenceran adalah menyediakan lingkungan bagi spermatozoa yang secara fisik maupun kimiawi menyerupai plasma semen, tidak mengandung zat toksik, dan tidak menurunkan fertilitas. Susilawati (2011) menjelaskan bahwa syarat penting yang harus dimiliki pengencer adalah bahan tidak bersifat toksik terhadap spermatozoa, mengandung sumber energi, bersifat isotonis, mengandung *buffer*, melindungi dari pengaruh pendinginan cepat, menghambat pertumbuhan bakteri dan meningkatkan volume sehingga bisa digunakan beberapa kali IB. Salah satu pengencer yang dapat digunakan yaitu *Tris Aminomethan* merupakan salah satu pengencer yang umum digunakan dan mampu mempertahankan kualitas semen. Nugroho, Susilawati dan

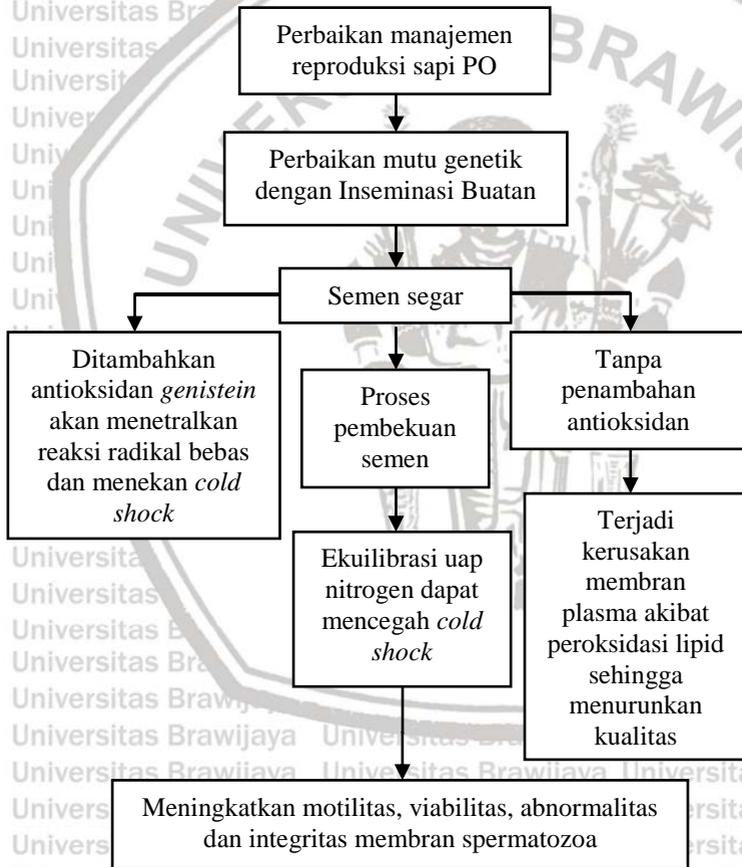
Wahjuningsih (2014) menjelaskan bahwa jenis krioprotektan ekstraseluler yang banyak digunakan dalam proses pendinginan semen adalah kuning telur yang terdapat kandungan lesitin dan lipoprotein yang mampu melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya *cold shock* selama pendinginan pada suhu 5°C.

Penambahan antioksidan *genistein* dalam pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur mampu menjaga kualitas semen sapi PO selama penyimpanan beku. Spermatozoa tanpa penambahan antioksidan rentan terhadap kerusakan sel. *Genistein* berfungsi sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, antioksidan, dan senyawa anti kanker. Antioksidan dari *genistein* dapat memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan penurunan radikal bebas oksidatif (ROS) yang signifikan dan juga dapat memberikan pengaruh pada fungsi spermatozoa dan memungkinkan untuk mendukung seluruh proses reproduksi (Prihantoko, et. al., 2020).

Menurut Kusumaningrum, Situmorang, Setioko, Sugiarto, Triwulaningsih, dan Sianturi (2012) dalam proses pembekuan sel ditambahkan krioprotektan dan yang paling umum digunakan pada mamalia adalah gliserol. Mumu (2009) menambahkan bahwa spermatozoa diadaptasikan dengan gliserol pada suhu dingin (3-5°C). Proses ini dikenal juga dengan ekuilibrisasi. Penambahan gliserol dalam pengencer melindungi spermatozoa terhadap efek-efek lethal selama proses pembekuan serta dapat memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan, sehingga mampu menghambat kerusakan mekanis membran sel spermatozoa pada waktu penurunan suhu (*cooling rate*). Menurut Susilawati (2013) metode pembekuan dengan

menggunakan straw selalu didinginkan lebih dulu dalam suhu 5°C, kemudian diupkan diatas N₂ cair dengan menempatkan 8-10 cm diatas permukaan nitrogen cair sebelum dimasukan didalam N₂ cair, Hal ini karena straw mempunyai dinding yang kuat, sehingga memberikan kesempatan agar dinginnya masuk terlebih dahulu dalam waktu yang cepat. Setelah semen dimasukan dalam N₂ cair maka motilitas dan viabilitas semen beku dapat dievaluasi sebelum 48 jam setelah pembekuan dengan dithawing dalam air suhu 37°C selama 15-30 detik.

Penelitian terkait pengenceran semen beku sapi PO menggunakan antioksidan *genistein* dalam pengencer *Tris Aminomethan* dengan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui kualitas semen sapi PO sebagai dasar penentuan kadar *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang tepat. Skema kerangka pikir penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema Kerangka Pikir Penelitian

1.6. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian yang telah dibuat maka hipotesis yang diajukan adalah :

H₀ : Diduga penambahan antioksidan *genistein* dalam pengecer Tris Aminmethan dapat mempertahankan motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa.

H₁ : Diduga posisi straw pada saat ekuilibrase uap nitrogen cair dapat mempertahankan motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa.

H₂ : Diduga interaksi antara penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada saat ekuilibrase uap nitrogen cair dapat mempertahankan motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gambaran Umum Sapi Peranakan Ongole (PO)

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan sapi persilangan antara sapi Ongole (*Bos-Indicus*) dengan sapi lokal. Sapi ini tahan terhadap iklim tropis dengan musim kemaraunya (Yulianto dan Saparinto, 2010). Sapi Peranakan Ongole merupakan sapi hasil program ongolisasi sapi-sapi di pulau Jawa dengan sapi Ongole. Program tersebut menghasilkan sapi PO dengan postur tubuh maupun bobot badan lebih kecil dibandingkan dengan sapi Ongole, punuk dan gelambir kelihatan kecil atau tidak sama sekali. Warna bulunya sangat bervariasi, tetapi pada umumnya putih atau putih keabu-abuan (Siregar, 2008).

Sapi PO memiliki nilai rata-rata untuk S/C terkecil adalah 1,29 kali dan terbesar adalah 2,23 kali, S/C semakin mendekati angka 1 menunjukkan bahwa IB semakin bagus. Jarak beranak terpendek adalah 13,75 bulan dan terpanjang 20,30 bulan, nilai kawin setelah beranak paling cepat 97,80 hari dan paling lambat 309,00 hari (Astuti, 2003). Sapi PO memiliki karakteristik yaitu warna rambut keabu-abuan, memiliki gelambir dan punuk besar, tubuh panjang serta telinga menggantung. Kelebihan sapi lokal antara lain tahan ekto dan endoparasit, adaptif terhadap perbedaan kondisi lingkungan, tenaga kuat, serta kualitas kulit dan karkas baik. Pada kondisi kurang pakan, sapi lokal akan kurus, tetapi masih mampu birahi, berovulasi, dan bunting. Kekurangan sapi lokal adalah adaptasi terhadap pakan kurang, Pertambahan Bobot Badan Harian (PBBH) rendah, serta bobot potong kecil. Akibat kurang pakan sapi lokal akan melahirkan anak yang

berukuran kecil dan mati dikarenakan rendahnya produksi susu. Sapi PO mencapai pubertas pada umur 12 sampai 18 bulan (Partodihardjo 1987). Hasil penelitian Yanhendri (2007) terhadap 10 sapi PO memiliki nilai S/C 1,54 kali dan CI 16,97 bulan. Hasil penelitian Nuryadi dan Wahjuningsih (2011) menyatakan bahwa sapi PO di Kabupaten Malang memiliki nilai S/C 1,28 kali, DO 130,27 hari, CI 414,97 hari dan CR 75,34%.



Gambar 2. Sapi Peranakan Ongole
(Website Puslitbang Peteranakan, akses 20 Juli 2021)

2.2. Pengembangan Sapi Peranakan Ongole

Astuti (2004) menyatakan bahwa sapi PO sebagian besar telah disilangkan dengan berbagai macam bangsa sapi, terutama sapi Limousin dan Simental. Hal tersebut terjadi karena: 1) harga sapi silangan antara PO dengan sapi Limousin dan Simmental lebih mahal dibandingkan dengan harga sapi PO, dan 2) pertumbuhan sapi silangan antara PO dengan sapi Limousin dan Simental lebih cepat dibandingkan dengan sapi PO. Namun efek negatif terjadi pada sifat reproduksi individu betina sapi silangan PO dengan sapi Limousin atau Simmental

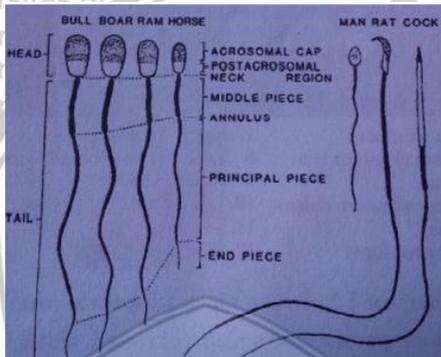
yang ditandai dengan semakin menurunnya angka konsepsi, meningkatnya jumlah inseminasi per konsepsi dan *day open* dengan semakin tingginya darah *Bos taurus*.

Pemeliharaan sapi PO sangat didukung oleh masyarakat karena cukup mendukung ekonomi masyarakat. Dalam melakukan usaha pemeliharaan sapi PO masyarakat tidak melibatkan lembaga ekonomi maupun lembaga sosial, baik formal maupun nonformal. Pengembangan potensi wilayah dan masyarakat harus diikuti dengan pemeliharaan dan pengembangan sapi PO. Wilayah memenuhi kriteria sebagai wilayah sumber bibit, kecenderungan yang terjadi adalah pengurusan ternak dengan kualitas baik sehingga mutu genetik turun. Hal tersebut ditunjang dengan pelaksanaan tatacara pemeliharaan sapi PO yang kurang baik (Supartini dan Darmawan, 2014).

2.3. Spermatozoa

Spermatozoa dibentuk dari tubuli seminiferi yang berada di dalam testis. Spermatozoa memiliki sel yang panjang, terdiri dari kepala yang tumpul didalamnya terdapat inti sel, ekor yang mengandung apparatus untuk pergerakan sel. Pada kepala terdapat akrosom yang memiliki struktur dinding rangkap terletak diantara membran plasma bagian anterior nukleus, leher menghubungkan kepala dan ekor (flagela) yang dibagi menjadi bagian tengah, pokok dan akhir. Bagian-bagian tersebut memiliki struktur yang berbeda (Susilawati, 2011).





Gambar 3. Spermatozoa Pada Beberapa Ternak
(Sumber: Garner and Hafez, 2008)

Kepala spermatozoa secara umum membentuk oval, sedikit pipih dan terdapat nukleus yang mengandung kromosom (*deoxyribonucleic acid* = DNA) (Morel, 1999). Ekor spermatozoa merupakan bagian yang terpanjang dari spermatozoa, yang terbagi atas leher, bagian tengah, bagian utama dan bagian ujung. Bagian leher spermatozoa kurang jelas bentuknya dan pada bagian ini pula akan terlihat bagaimana kepala spermatozoa mudah terlepas dari bagian badan dan ekor. Bagian tengah merupakan bagian yang paling lebar dari ekor spermatozoa dan di kelilingi oleh mitokondria. Bagian utama merupakan bagian terpanjang dari ekor spermatozoa dan mengandung banyak mesin penggerak (*propellin machinery*) serta mempunyai selubung yang berserat. Bagian ujung ekor relative pendek dan tidak mempunyai selubung (Evan dan Maxwell, 1987).

Spermatogenesis merupakan proses pembentukan spermatozoa di dalam testis, selanjutnya mengalami pematangan lebih lanjut di dalam epididimis dimana sperma



disimpan sampai ejakulasi. Spermatogenesis ini meliputi: Spermatositogenesis (Spermatocytogenesis) atau pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonia tipe A dan Spermiogenesis atau pembentukan spermatozoa dari spermatid (Feradis, 2014).

2.4. Inseminasi Buatan

Inseminasi Buatan merupakan salah satu teknologi tepat guna yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produktifitas sapi dengan memanfaatkan potensi pejantan unggul agar dapat mengawini lebih dari satu induk dan dapat meningkatkan mutu genetik dari ternak tersebut (Susilawati, 2013). Pelaksanaan IB perlu diperhatikan dalam beberapa hal yaitu: (1) Manusia (Inseminator dan peternaknya) dalam hal ketepatan waktu IB dan penempatan semen (deposisi semen), (2) Fisiologi betina, (3) Kualitas semen beku yang berasal dari Balai Inseminasi Buatan (Susilawati, 2011). Menurut penggunaan teknik IB berkaitan erat dengan kualitas spermatozoa yang dipengaruhi oleh faktor internal (umur, bangsa dan genetik) dan faktor eksternal (pakan, lingkungan dan pengencer yang digunakan seperti Andromed, tris kuning telur dan lain-lain). Saat ini program IB yang populer adalah menggunakan semen beku.

Susilawati (2013) mengatakan bahwa secara umum IB berfungsi untuk: 1) perbaikan mutu genetik 2) pencegahan penyakit menular 3) rekording lebih akurat 4) biaya lebih murah 5) mencegah kecelakaan yang disebabkan oleh pejantan. IB difasilitasi dengan menggunakan sinkronisasi estrus dan dapat dilakukan pengaturan jenis kelamin dengan pemanfaatan pemisahan spermatozoa X dan Y. Kelemahan dari IB jika tidak dikelola dengan baik adalah : 1) bila seleksi pejantan

salah maka bisa menyebabkan sifat jelek 2) membutuhkan ketrampilan yang tinggi dari Balai Inseminasi Buatan, Penyimpanan selama transport, inseminator juga peternaknya 3) bisa kehilangan sifat bangsa lokal dalam waktu cepat.

2.5. Penampungan Semen

Semen adalah zat cair yang keluar dari tubuh melalui penis sewaktu kopulasi (Partodihardjo, 1992). Sedangkan menurut (Toelihere, 1979) semen adalah sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan.

Sebelum penampungan semen lokasi tempat penampungan semen dibersihkan dengan desinfektan, ternak dimandikan dan bagian *prenulum preputium* dibersihkan, hal ini penting sebab apabila terdapat penyakit menular akan ditularkan ke banyak betina, atau bila tercemar dengan semen akan menyebabkan kerusakan semen dengan banyaknya mikroba didalam semen (Susilawati, 2011). Metode penampungan semen memakai vagina buatan sering dipakai secara meluas pada pusat-pusat inseminasi buatan (Apriyanti, 2012). Menurut Susilawati (2011) sebelum dilakukan penampungan pejantan dilakukan *fals mounting* 3-5 kali yang bertujuan meningkatkan libido. Vagina buatan yang telah dipersiapkan sesuai dengan suhu badan dan telah diberi vaselin dibagian ujung karetnya, dengan menggunakan sudut kemiringan 45° dan ujungnya terdapat tabung reaksi yang telah ditutup bahan gelap agar semen yang dihasilkan tidak terkena sinar matahari langsung, semen yang dihasilkan dilakukan uji kualitas semen, pengenceran dan pembekuan.



Gambar 4. Penampungan semen dengan menggunakan vagina buatan (Susilawati,2013)

2.6. Uji Kualitas Semen

Untuk keberhasilan perkawinan atau IB, semen harus diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang tinggi. Uji kualitas spermatozoa harus segera dilakukan setelah penampungan atau sebelum proses pengenceran yang meliputi pemeriksaan makroskopis : volume, warna, konsistensi dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi: motilitas massa, motilitas individu, persentase hidup dan mati, konsentrasi serta abnormalitas (Susilawati, 2011).

Menurut Susilawati (2013) menjelaskan bahwa volume semen sapi bervariasi setiap penampungan antara 1-5 ml atau 5-8 ml. Dengan melihat pada skala tabung yang digunakan untuk menampung semen, maka dapat ditentukan volume semen yang diejakulasikan. Keasaman semen dapat diketahui dengan menggunakan pH meter atau kertas lakmus. Diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar dengan menggunakan ose dan diletakan pada pH meter atau kertas lakmus kemudian dilihat pH-nya, pH normal semen 6,2-6,8.

Semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu. Nyuwita, Susilawati dan Isnaini (2015) melaporkan bahwa volume semen dan konsentrasi spermatozoa dapat mempengaruhi total spermatozoa yang dihasilkan, sehingga semakin tinggi volume semen dan konsentrasi spermatozoa maka total spermatozoa semakin banyak dan meningkatkan total dosis semen beku yang dihasilkan. Jika semakin tinggi total spermatozoa maka semen beku yang dihasilkan akan semakin tinggi.

Penilaian motilitas spermatozoa meliputi penilaian motilitas massa dan individu. Motilitas massa spermatozoa dapat diamati dengan cara meneteskan semen diatas gelas obyek, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Sehingga dengan cara ini dapat diamati sekelompok sel sperma yang bergerak bersama-sama satu arah dan besar kecilnya gelombang serta keaktifan dalam pergerakan. Penilaian motilitas individu dapat diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C dengan menggunakan *cover glass*, kemudian menentukan proporsi (persentase) spermatozoa yang bergerak progresif (Susilawati, 2013). Hartono (2008) menjelaskan bahwa semen beku yang dapat disimpan dan digunakan untuk IB harus mempunyai persentase motilitas yang tidak kurang dari 40% setelah pencairan kembali.

Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi dua yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer berhubungan dengan kepala dan akrosom. Sedangkan abnormalitas sekunder berhubungan dengan adanya *sitoplasmic droplet* pada *mid piece* pada ekor (Susilawati, 2011). Menurut Wiratri dkk. (2014) menjelaskan bahwa abnormalitas spermatozoa akan mengalami



peningkatan setiap jam. Hal ini dipengaruhi oleh spermatogenesis dari ternak dan perlakuan semen setelah ejakulasi, misalnya penanganan semen segar, pencampuran semen dengan pengencer dan pada saat proses pembuatan ulasan. Waktu yang terlalu lama dalam penyimpanan juga dapat mempengaruhi jumlah spermatozoa abnormal.

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat diamati melalui perubahan warna spermatozoa setelah diulas dengan pewarna *eosin negrosin*. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan warna yang tidak terserap oleh spermatozoa karena membran sel spermatozoa dalam keadaan baik, namun pada spermatozoa yang mati akan menyerap warna sehingga dapat dikatakan bahwa terjadi kerusakan pada membran sel spermatozoa (Sholikah, Isnaini, Yekti dan Susilawati, 2016)

2.7. Pengenceran Semen

Anggorodi (1979) menyatakan bahwa, pengenceran dan penyimpanan bertujuan untuk memperbesar volume, melindungi spermatozoa selama proses pendinginan dan memperpanjang masa hidup tanpa menghilangkan kesuburannya. Menurut Susilawati (2011) terdapat 2 alasan pokok semen perlu diencerkan sebelum pembekuan yaitu : 1) alasan teknis dan 2) alasan biologis. Alasan teknis adalah untuk dapat menginsinasi lebih banyak betina dari semen pejantan unggul, sedangkan alasan biologisnya agar dapat memberikan medium yang cocok sebagai sumber nutrisi, control pH serta mempertahankan tekanan osmotik spermatozoa. Syarat penting yang harus dimiliki oleh setiap pengencer adalah : (1) mempunyai daya preservasi tinggi, (2) Mengandung unsur yang sifat fisik dan kimianya hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat yang bersifat racun



bagi spermatozoa dan saluran kelamin betina, (3) Tetap dapat mempertahankan daya fertilisasi spermatozoa, tidak terlalu kental sehingga menghambat fertilisasi. Syarat pengencer adalah 1) bahan tidak bersifat toxic terhadap spermatozoa, 2) mengandung sumber energi, 3) bersifat isotonis, 4) mengandung buffer, 5) melindungi dari pengaruh pendinginan secara cepat, 6) menghambat pertumbuhan bakteri, 7) meningkatkan volume sehingga bisa digunakan beberapa kali IB, dan 8) melindungi spermatozoa dari semen beku. Beberapa tambahan lain adalah mudah membuatnya, tidak menghalangi saat uji kualitas dan harga terjangkau.

Pada berbagai ternak, pengenceran telah dilakukan dengan berbagai perbandingan volume pengencer dengan volume semen. Perbandingan volume pengencer dengan volume semen sebaiknya didasarkan pada konsentrasi sperma (Purdy, 2006). Media pengencer biasanya terdiri dari buffer, krioprotektan dan zat-zat lain yang ditambahkan ke dalam pengencer, yang melindungi spermatozoa selama pembekuan dan *thawing*. Antibiotik biasanya juga ditambahkan ke dalam media pengenceran (Sansone, *et al.*, 2000).

2.8 Integritas Membran

Keutuhan membran plasma spermatozoa merupakan salah satu faktor penting dalam metabolisme spermatozoa, reaksi akrosom, kapasitasi, dan pengikatan spermatozoa pada permukaan sel telur (Baqir, Fakhridin *and* Kouty, 2009). Urutan kerja *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST) yaitu 1 ml larutan hiposmotik 150 m osmol (yang dibuat dari 7,35 gram natrium sitrat, 2H₂O, 13,52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquades) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit,

selanjutnya diamati dengan perbesaran 400 kali perubahan yang khas yaitu adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujungnya (Susilawati, 2013).

Spermatozoa dengan membran yang masih utuh dapat menahan cairan hiposmotik dalam sel, sehingga akan terlihat ekor menjadi melingkar atau bengkok. Spermatozoa dengan membran yang mengalami kerusakan menunjukkan ekor yang lurus karena tidak mampu untuk menahan air yang masuk. Keutuhan membran plasma sangat diperlukan spermatozoa karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme, motilitas serta daya hidup spermatozoa yang dihasilkan (Arsiwan, Takdir, La Ode dan Rahadi, 2014).. Persentase integritas membran spermatozoa dapat dihitung dengan membandingkan antara jumlah spermatozoa yang bereaksi (HOS positif) dibagi dengan jumlah spermatozoa total (bereaksi dan tidak bereaksi) dikalikan dengan 100% (Nurcholis, Arifiantini dan Yamin, 2016).

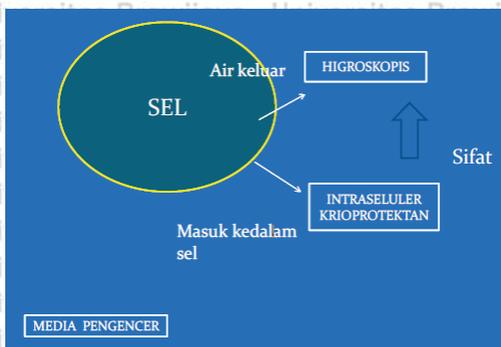
2.9 Ekuilibrisasi dan Pembekuan

Toelihere (1979) menyatakan bahwa, waktu ekuilibrisasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebih-lebihan dapat dicegah. Novianto, Sudarno dan Masithah (2014) menyatakan bahwa spermatozoa dibiarkan dalam suhu 5°C selama 2 hingga 6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan *diluter* yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai (ekuilibrisasi). Susilawati (2011) menambahkan bahwa pendinginan semen pada suhu 5°C sebelum penambahan pengencer B atau pengencer yang mengandung gliserol, dapat



meningkatkan daya hidup sel setelah proses pembekuan atau pencairan (thawing). Gliserolisasi di suhu 5°C memberikan hasil yang terbaik.

Gliserol ditambahkan sebagai bahan untuk melindungi spermatozoa dari efek pembekuan. Pada saat sel bersuhu 0°C bentukan es intraseluler akan terbentuk karena sebagian besar spermatozoa tersusun oleh air dengan penambahan intraseluler krioprotektan (misal gliserol, DMSO, *ethilen glicol*) akan menurunkan titik beku sel spermatozoa hingga -196°C. Mekanisme perubahan titik beku disebabkan oleh peristiwa masuknya krioprotektan di dalam sel yaitu intraseluler krioprotektan yang bersifat higroskopis akan menarik air yang ada dalam sel, kemudian digantikan oleh intraseluler krioprotektan. Ekstraseluler krioprotektan yang berupa fosfolipid atau glukosa sangat diperlukan. Bahan ekstraseluler krioprotektan dapat berupa lesitin (kuning telur yang mengandung lesitin) atau ekstraseluler lain seperti golongan gula adalah fruktosa, glukosa dan raffinosa (Susilawati, 2013).



Gambar 5. Mekanisme masuknya krioprotektan ke sel (Susilawati, 2013)

Pembekuan semen merupakan proses penghentian kehidupan spermatozoa secara sementara untuk mengurangi proses metabolisme hampir secara total dengan tujuan mengurangi penggunaan energi. Masalah yang ditimbulkan dari proses pembekuan semen adalah stres terhadap cekaman dingin (*cold shock*) dan terbentuknya kristal es yang diakibatkan oleh proses pengeluaran air secara intraseluler (Setiono, Suharyati dan Santosa, 2015). Menurut Insani, Rahayu, Pramana dan Soewondo (2014) menjelaskan bahwa pembekuan sel dapat menyebabkan terbentuknya kristal es dan penumpukan elektrolit serta bahan terlarut lainnya. Kristal es intraseluler dapat merusak semen secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan dapat menyebabkan pelarutan selubung lipoprotein membran sel sperma sehingga permeabilitas membran akan mengalami perubahan dan dapat menyebabkan kematian sel.

Ismaya (2014) melaporkan bahwa pembekuan semen dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa baik kerusakan fungsional (*biochemical*) maupun kerusakan fisik (*ultrastructural*). Kerusakan fisik dapat berupa kerusakan plasma dan *membrane acrosome*, *acrosome*, *mitochondrial sheath* dan *axonema*. Selama *freeze-thawing* mengakibatkan perubahan biokimia atau hilangnya bagian penting dari spermatozoa, seperti hilangnya *glutamic oxaloacetic transaminase* (GOT), hilangnya lipoprotein dan asam amino, menurunnya aktivitas *phosphatase*, menurunnya pengikatan *cholesterol protein*, meningkatnya *sodium* dan menurunnya jumlah *potassium*, tidak aktifnya enzim *hyaluronidase* dan *acrosin*, kehilangan *prostaglandin*, mengurangi sintesa *adenosinetriphosphate* (ATP) dan *adenosinediphosphate* (ADP),



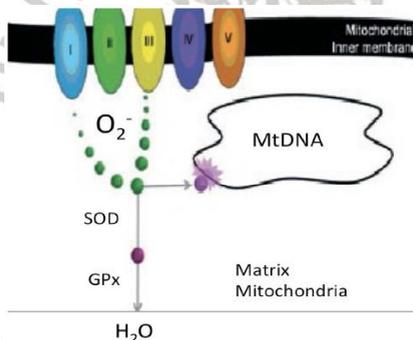
dan menurunnya aktivitas proteolitik *acrosome*. Kerusakan ini lebih banyak terjadi pada spermatozoa domba daripada sapi.

Susilawati (2011) melaporkan bahwa metode pembekuan dengan menggunakan straw selalu didinginkan lebih dulu dalam suhu 5°C, kemudian diupkan diatas N₂ cair dengan menempatkan 8-10 cm diatas permukaan nitrogen cair sebelum dimasukkan didalam N₂ cair, Hal ini karena straw mempunyai dinding yang kuat, sehingga memberikan kesempatan agar dinginnya masuk terlebih dahulu dalam waktu yang cepat. Setelah semen dimasukkan dalam N₂ cair maka motilitas dan viabilitas semen beku dapat dievaluasi sebelum 48 jam setelah pembekuan dengan dithawing dalam air suhu 37°C selama 15-30 detik.

2.10 Reaksi Biochemist Selama Penyimpanan

Radikal bebas adalah suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital terluarnya sehingga sangat reaktif. Radikal ini cenderung mengadakan reaksi berantai yang apabila terjadi didalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus menerus. Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang diakibatkan factor stress, radiasi, asap rokok dan polusi lingkungan menyebabkan system pertahanan tubuh yang ada tidak memadai, sehingga tubuh memerlukan tambahan antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas (Harmita, 2014). Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan satu buah elektron dari pasangan elektron bebasnya, atau merupakan hasil pemisahan homolitik suatu ikatan kovalen. Akibat pemecahan homolitik, suatu molekul akan terpecah menjadi radikal bebas yang mempunyai elektron tak berpasangan. Elektron memerlukan pasangan untuk

menyeimbangkan nilai spinnya, sehingga molekul radikal menjadi tidak stabil dan mudah sekali dengan molekul lain, membentuk radikal baru. Aktivitas radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 6.



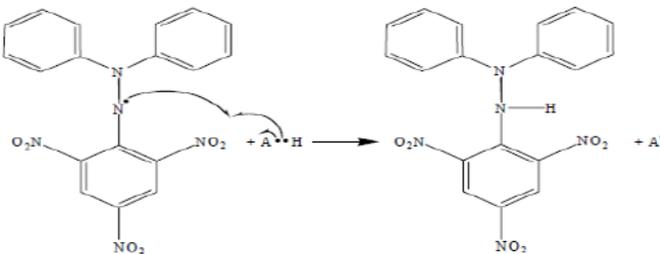
Gambar 6. Pembentukan ROS

2.11 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang bisa menghilangkan, membersihkan dan menahan pembentukan efek spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* ROS) (Wardhana *et al.*, 2012). Puspita (2005) menyatakan bahwa antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Antioksidan mempunyai kemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas. Antioksidan mampu mencegah terjadinya reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma spermatozoa selama proses pengolahan semen, sehingga membran plasma tetap dalam keadaan utuh. Dengan demikian, spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh mampu dengan baik mengatur lalu lintas keluar masuk semua substrat

dan elektrolit pada tingkat sel, sehingga proses metabolisme termasuk fruktolisis dan siklus Krebs dapat berlangsung dengan baik.

Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan yaitu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Pada reaksi antioksidan dapat dilihat pada Gambar 7



Gambar 7. Reaksi radikal bebas dengan antioksidan (Budi Tjatur, 2010)

Reaksi oksidasi bersifat merugikan karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas membrane plasma sel. Penambahan antioksidan pada bahan pengencer merupakan upaya untuk meminimalkan kerusakan membrane spermatozoa akibat peroksidasi lipid selama proses pendinginan. Reaksi oksidasi yang berlebihan sangat membahayakan kehidupan spermatozoa karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas sel.

2.12 Antioksidan *Genistein*

Genistein adalah isoflovon yang termasuk dalam fitoesterogen yang banyak ditemukan pada kedelai. Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dorman adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu *daidzin*, *genistein* dan *glisitin*. Fitoesterogen adalah senyawa alami yang berasal dari tanaman yang struktural dan fungsionalnya mempunyai efek mengikat reseptor estrogen. Antioksidan pada isoflavon sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. *Genistein* memiliki efek antioksidan terhadap integritas DNA sel sperma, sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, dan senyawa anti kanker (Wocwalek *et al*, 2013). Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. *Genistein* mengandung gugus fenolik yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu: mendonorkan ion hidrogen dan bertindak sebagai scavenger radikal bebas secara langsung. *Genistein* merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah radikal bebas, proses oksidasi lipid, lipoprotein, protein dan DNA (Astuti, 2008).





BAB III MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal pada tanggal Maret-April 2021. Lokasi penelitian di Unit Pelaksana Teknis Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak (UPT PT HMT) Karangwaru, Desa Sidorejo, Kecamatan Tuban, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Kabupaten Tuban adalah salah satu kabupaten di Jawa Timur yang berada di wilayah paling Barat dengan luas wilayah 183.994,561 Ha. Secara Geografis, Kabupaten Tuban terletak pada koordinat 111°30'-112°35' BT dan 6°40'-7°18' LS.

3.2 Materi Penelitian

Materi yang digunakan adalah semen segar dari satu ekor sapi pejantan Peranakan Ongole dengan nomor eartag 0045 yang berumur kurang lebih 7 tahun dan bobot badan kurang lebih 700 kg yang ditampung sebanyak satu kali dalam seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Semen yang akan digunakan sebagai penelitian mempunyai persyaratan motilitas individu minimal 70% dan motilitas massa minimal 2+ dengan frekuensi penampungan semen satu kali dalam seminggu. Pengencer yang digunakan adalah *Tris Aminomethan* merk *MERCK* produksi Jerman. Sistem kandang yang digunakan untuk memelihara sapi PO adalah *tail to tail* dan pemberian air minum secara *ad libitum*.

3.2.1 Peralatan dan Bahan Penampungan

- Alat-alat yang digunakan :
 - Satu set vagina buatan

o Tabung penampung semen

o Teko pemanas

o Gelas penutup

o Tube

o Gelas ukur

o Alumunium foil

o Tissue

• Bahan yang digunakan :

o Sapi Peranakan Ongle

o Sapi betina

o Alkohol 70%

o Vasellin

o Air hangat

3.2.2 Evaluasi Kualitas Semen

• Alat-alat yang digunakan :

o Mikroskop Olympus Cx 21

o Object glass

o Ose bulat

o Cover glass

o Waterbath

o Tabung reaksi

o Alumunium foil

o Rak tabung reaksi

o Mikropipet

o Haemocytometer

o pH meter

• Bahan yang digunakan :

o Semen Sapi Peranakan Ongle

o NaCl 3%

o Eosin-negrosin

3.2.3 Peralatan Pengenceran dan Penyimpanan

- Alat-alat yang digunakan :
 - Pipet tetes
 - Refrigerator
 - Ose bulat
 - Waterbath
 - Tabung reaksi
 - Alumunium foil
 - Rak tabung reaksi
 - Tube

3.2.4. Proses Pembuatan Pengencer *Tris Aminomethan* Kuning Telur

Pada penelitian ini menggunakan *Tris Aminomethan* dengan merk MERCK produksi Jerman yang sudah dicampurkan dengan bahan pengencer lainnya oleh Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

- Alat-alat yang digunakan :
 - Kertas saring
 - Erlenmeyer
 - Gelas ukur
 - Magnetic stirrer
 - Timbangan analitik
 - Alumunium foil
- Bahan yang digunakan :
 - Asam sitrat
 - Rafinosa
 - Aquabidest
 - Penicilin
 - Fruktosa

- Laktosa
- Streptomycin
- Kuning telur

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*) dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial atas 2 faktor dan 5 ulangan dan data setiap perlakuan dianalisa secara statistic menggunakan *anova*, yang dilanjut dengan uji Duncan. Faktor pertama dengan penambahan Antioksidan *Genistein* yang berbeda dalam pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur pada semen sapi Peranakan Ongole. Faktor kedua ekuilibrasasi uap nitrogen cair dengan ketinggian 5 cm, 10 cm dan 20 cm.

Perlakuan penelitian sebagai berikut :

1. Ketinggian Ekuilibrasasi 5 cm

Perlakuan :

P0= 0 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur

P1= 10 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur

P2= 30 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur

P3= 50 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur

2. Ketinggian Ekuilibrasasi 10 cm

Perlakuan :

P0= 0 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur

P1= 10 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

P2= 30 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

P3= 50 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

3. Ketinggian Ekuilibrasi 20 cm

Perlakuan :

P0= 0 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

P1= 10 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

P2= 30 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

P3= 50 μM *genistein* + pengencer *Tris Aminomethan*
kuning telur

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan dan Persiapan Pengencer

Pengencer *Tris Aminomethan* memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan baginya. Berikut komposisi kimia pengencer *Tris Aminomethan* menurut Susilawati (2011) :

Tabel 1. Komposisi *Tris Aminomethan*

Bahan Penyusun	Jumlah
Tris Amino Methan	1,363 g
<i>Citric Acid</i> /asam sitrat	0,762 g
Lactose	1,500 g
Fructose	0,500 g
Kuning Telur	20,00 ml
Raffinosa	2,700 g
Steptomycin	0,100 g
Aquadest	80,00 ml
Penicillin	0,100 g

Langkah-langkah pembuatan pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur :

1. Telur dibersihkan dengan menggunakan air, kemudian dilakukan densifikasi dengan menggunakan alkohol 70%.
2. Kuning dan putih telur dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Diusahakan kuning telur jangan sampai pecah.
3. Kuning telur ditusuk dengan jarum dan dimasukkan ke dalam gelas ukur.
4. Disiapkan aquadest yang ditambahkan dengan bahan *Tris aminomethan*, asam sitrat, laktosa, fruktosa dan raffinosa dimasukkan ke tabung Erlenmayer
5. Dipanaskan larutan hingga mendidih, kemudian didinginkan hingga suhu 37-40°C.
6. Dimasukkan larutan tersebut ke tabung yang berisi kuning telur hingga tercampur dengan memindahkan dari tabung ukur ke tabung erlenmayer yang kemudian ditutup dengan aluminium foil. Kemudian dilakukan



dihomogenkan dengan magnetik stirer selama 10-15 menit, disertai dengan penambahan penicilin dan streptomycin.

7. Disentrifugasi 1500 rpm apabila dipakai sehari sebelum pemakaian dan disentrifugasi 2 kali dengan kecepatan 1500 rpm apabila dipakai pada hari tersebut.
8. Diinkubasi di waterbath sampai suhu tubuh 37°C
9. Dimasukan ke dalam refrigator dan dipisahkan antara endapan dan supernatan serta yang digunakan hanya supernatannya sedangkan endapan dibuang.

3.4.2 Penampungan Semen

Penampungan semen segar sapi Peranakan Ongole dilakukan pada pagi hari antara pukul 08.00-09.30 WIB di UPT PT HMT Karangwaru. Semen dari pejantan sapi PO ditampung dengan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung penampung semen. Langkah-langkah penampungan semen adalah sebagai berikut :

- Vagina buatan terdiri dari selongsong karet tipis yang dimasukkan ke dalam silinder karet tebal. Lipat dan kaitkan karet tipis pada masing-masing ujung silinder karet yang tebal dengan menggunakan gelang-gelang karet yang dipasang 5 cm dari ujung silinder.
- Corong penampung dari karet tipis dipasang pada salah satu ujung vagina buatan dan dieratkan dengan karet gelang. Pada ujung corong penampung dipasang sebuah tabung pengumpul semen berskala, lalu diikat pula dengan karet gelang.
- Dimasukan air panas dengan suhu 50 sampai 70°C ke dalam ruang antara silinder dan selongsong karet yang tipis melalui lubang pada silinder dengan volume

setengah sampai dua pertiga penuh. Suhu vagina buatan dipertahankan pada waktu penampungan berkisar antara 40 sampai 52°C.

- Ditiupkan udara melalui pentil silinder yang gunanya untuk menambah tekanan pada vagina buatan. Kemudian dengan sebatang ebonite atau gelas yang steril diolesi dengan bahan pelicin sampai setengah panjang batang vagina buatan.
- Setelah vagina buatan disiapkan, pejantan sapi PO yang akan ditampung semennya dibawa ke kandang penampungan yang telah tersedia betina pemancing. Penampung berada disebelah kanan betina pemancing sambil memegang vagina buatan dengan kemiringan 45° dari tanah.
- Untuk mempertinggi libido pejantan diusahakan dengan mengadakan *false mounts* yaitu pengekanan yang dilakukan terhadap pejantan dengan tidak menampung semen pada penunggaan pertama ataupun kedua. Semen ditampung ketika ejakulasi terjadi, yang ditandai dengan adanya dorongan yang kuat dari penis yang berereksi dengan sempurna pada vagina buatan.
- Setelah itu dilakukan proses evaluasi semen

3.4.3 Evaluasi Semen

Evaluasi semen dilakukan segera setelah penampungan atau sebelum diencerkan yang meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume (ml), warna, konsistensi, bau, dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas

massa, motilitas individu, persentase hidup-mati, konsentrasi dan abnormalitas.

➤ **Pemeriksaan Makroskopis**

- a. *Volume* : volume semen yang sudah ditampug pada 1 kali penampungan diukur dengan melihat langsung pada tabung berskala.
- b. *Warna* : pemeriksaan warna semen dilakukan dengan melihat semen yang ada pada tabung penampungan secara langsung. Semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu sedangkan semen abnormal mengandung air, darah, nanah air kotor dan bau yang tidak normal.
- c. *Konsistensi* : konsistensi berkorelasi dengan konsentrasi spermatozoa. Penilaian bisa encer ($<1000 \cdot 10^6$ spermatozoa/ml semen), sedang ($1000 \cdot 10^6$ - $1500 \cdot 10^6$ spermatozoa/ml semen), dan pekat ($>1500 \cdot 10^6$ spermatozoa/ml semen). Ditentukan dengan cara menggoyang-goyangkan tabung yang berisi semen. Konsistensi kental ditandai dengan pergerakan lambat pada permukaan semen didalam tabung dan konsistensi encer ditandai dengan gerakan permukaan semen didalam tabung cepat.
- d. *pH*: diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar dengan menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter kemudian dilihat pH-nya, pH normal semen 6,2-6,8.

➤ **Pemeriksaan Mikroskopis**

- a. *Motilitas massa* : semen diambil menggunakan ose dan diletakkan satu tetes di atas objek glass, penilaian motilitas massa diamati dengan menggunakan

mikroskop tanpa *cover glass* dengan perbesaran 100 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C. Dievaluasi secara subjektif pada 5 lapang pandang. Hasil berkisar 0-100%.

b. *Motilitas individu* : semen diambil menggunakan ose dan diletakkan satu tetes di atas objek glass dan ditutup *cover glass* diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali. Dievaluasi secara subjektif pada 5 lapang pandang. Hasil berkisar 0-100%.

c. *Persentase hidup-mati (viabilitas)* : dilakukan dengan meneteskan satu tetes semen pada ujung objek glass dengan menggunakan ose kemudian diteteskan larutan eosin-negrosin didekat semen dan keduanya dicampurkan. Campuran tersebut kemudian ditutup dengan objek glass pada ujungnya membentuk sudut 45° dan ditarik ke ujung lainnya. Hasil olesan diamati pada mikroskop perbesaran 400 kali, spermatozoa yang menyerap warna berarti spermatozoa mati sedangkan yang tidak menyerap warna berarti hidup.

d. *Konsentrasi* : konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan cara kerja sebagai berikut : semen dihisap dengan pipet *eritrocyt* sampai angka 0,5 kemudian NaCl 0,3 % dihisap sampai angka 1,01. pipet *eritrocyt* digoyang-goyang membentuk angka delapan selama 2-3 menit. Kemudian semen dibuang 1-2 tetes, yang kemudian baru dibuang pada kamar hitung yang di atasnya sudah ditutupi dengan *cover glass* sebanyak satu tetes. Spermatozoa dihitung pada 5 kotak (kamar hitung)

yaitu pada sudut kanan dan kiri atas, sudut kanan dan kiri bawah, dan tengah)

- e. *Abnormalitas* : Pengamatan bentuk spermatozoa yang abnormal preparat ulas untuk viabilitas menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan dari persentase jumlah spermatozoa yang abnormal dibandingkan jumlah spermatozoa yang diamati minimal 200 spermatozoa.

3.4.4. Pengenceran Semen

- Disiapkan tabung reaksi yang telah diberi label sesuai perlakuan, setiap tabung berisi 0,1 ml pengencer *Tris Aminomethan* yang telah dicampur dengan antioksidan *genistein* dengan kadar 0 μM , 10 μM , 30 μM dan 50 μM yang diambil menggunakan mikropipet.
- Dimasukan 0,1 ml semen segar
- Dilakukan perhitungan konsentrasi terhadap semen segar untuk mengetahui kebutuhan pengencer spermatozoa.
- Diambil cairan pengencer dari tabung reaksi untuk dimasukan kedalam tabung reaksi yang berisi semen sesuai dengan hasil perhitungan dari konsentrasi spermatozoa. Kemudian dilanjutkan pada tahapan penyimpanan dan evaluasi kualitas dari spermatozoa.



Dimasukan semen dan pengencer VA1 dengan perbandingan 1:1 kedalam tabung reaksi kemudian diletakan pada *beaker glass* yang berisi air suhu 37°C pada *waterbath*



Dihitung volume total, VA2 dan VB
Dengan rumus :

$$V_{tot} = \frac{v. \text{segar} \times \text{konsentrasi spermatozoa} \times 10^7}{50 \times 10^6} \times 0,25$$
$$VA2 = \frac{v. \text{total} - (v. \text{semen} + vA1)}{2}$$
$$VB = \frac{v. \text{total}}{2}$$

Penambahan gliserol
= VB x 13%



beaker glass yang berisi tabung reaksi semen + VA1 dimasukan kedalam cool tube



Ditambahkan pengencer VA2 secara bertahap dalam tabung reaksi yang berisi semen + VA1 hingga suhu 12-15°C



Dimasukan pengencer VB dalam tabung reaksi yang berisi semen + VA pada suhu 4-5°C didiamkan selama 2 jam (ekuilibrasi suhu dingin)

Gambar 8. Prosedur pengenceran semen (Susilawati, 2013)

3.4.5. Penyimpanan Semen

- Setelah semen diencerkan dan dimasukan kedalam refrigator, kemudian apabila suhu telah



turun pada 12-15°C. Ditambahkan pengencer VA2 sesuai dengan hitungan kebutuhan kedalam tabung reaksi yang berisi semen. Kemudian dimasukkan kembali ke dalam refrigrator.

- Pada suhu 4-5°C, ditambahkan pengencer VB kedalam tabung reaksi yang berisi semen + VA, kemudia didiamkan selama 2 jam (ekuilibrasi suhu dingin)
- Setelah diekuilibrasi suhu dingin semen dievaluasi kembali untuk mengetahui apakah layak untuk di filling and sealing.
- Semen dimasukkan kedalam straw (0,25 ml) dengan menggunakan mikropipet, kemudian ujung straw dijepit dengan pinset yang telah dipanaskan terlebih dahulu menggunakan api Bunsen.
- Straw diletakkan diatas uap nitrogen cair sesuai dengan perlakuan penelitian yaitu ketinggian 5 cm, 10 cm dan 20 cm selama 10 menit.
- Kemudian straw disimpan didalam container yang berisi nitrogen dengan suhu -196°C.

3.5 Variabel Penelitian

- Persentase Motilitas Individu

Persentase motilitas individu adalah persentase spermatozoa yang bergerak ke depan dibandingkan dengan semua spermatozoa yang diamati. Penilaian motilitas individu dapat diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C dengan menggunakan *cover glass*,



kemudian menentukan persentase spermatozoa yang bergerak progresif (Susilawati, 2013).

$$\frac{\sum \text{Spermatozoa motilitas}}{\sum \text{Spermatozoa yang dihitung}} \times 100$$

- **Persentase Viabilitas**

Persentase viabilitas adalah persentase spermatozoa yang hidup dan semua spermatozoa. Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat diamati melalui perubahan warna spermatozoa setelah diulas dengan pewarna *eosin negrosin*. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan warna yang tidak terserap oleh spermatozoa karena membran sel spermatozoa dalam keadaan baik, namun pada spermatozoa yang mati akan menyerap warna sehingga dapat dikatakan bahwa terjadi kerusakan pada membran sel spermatozoa (Sholikah, Isnaini, Yekti dan Susilawati, 2016).

$$\frac{\sum \text{Spermatozoa hidup}}{\sum \text{Spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

- **Persentase Abnormalitas**

Persentase abnormalitas adalah persentase spermatozoa yang abnormal meliputi abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder dan semua spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi dua yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer berhubungan dengan kepala dan akrosom. Sedangkan abnormalitas sekunder berhubungan dengan adanya *sitoplasmic droplet* pada *mid piece* pada ekor (Susilawati, 2011).



$$\frac{\sum \text{Spermatozoa abnormal}}{\sum \text{Spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

- Persentase Integritas Membran

Perhitungan persentase Integritas membran dengan menghitung jumlah spermatozoa yang memiliki ekor melengkung dan lurus. Spermatozoa yang memiliki membrane utuh akan menahan cairan hipoosmotik di dalam sel, sehingga ekornya akan terlihat melengkung atau bengkok. Sedangkan spermatozoa yang lurus menunjukkan bahwa membran plasma telah mengalami kerusakan karena tidak mampu menahan air yang masuk, sehingga ekornya akan terlihat lurus (Arsiwan dkk., 2014).

$$\frac{\sum \text{Spermatozoa ekor melingkar}}{\sum \text{Spermatozoa ekormelengkung+ekor lurus}} \times 100$$

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dicatat dan ditabulasi menggunakan program *Microsoft Excel* dan selanjutnya data dianalisis dengan *Analysis of Variance (ANOVA)* berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Uji *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* digunakan apabila terdapat perbedaan pengaruh diantara perlakuan. Menurut model matematika Rancangan Acak Lengkap Faktorial adalah:



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

Keterangan:

Y_{ijk} = hasil pengamatan pada satuan percobaan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan taraf ke-I dari faktor α dan taraf ke-j dari faktor β

μ = nilai rata-rata

α_i = pengaruh faktor A pada taraf ke-i

β_j = pengaruh faktor B pada taraf ke-j

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

ϵ_{ijk} = pengaruh acak satuan ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan

3.7 Batasan Istilah

Semen : Hasil sekresi organ reproduksi ternak jantan yang secara normal diejakulasikan melalui penis ke dalam saluran kelamin betina sewaktu terjadi kopulasi. Kualitas semen segar sesuai dengan SNI memiliki motilitas massa minimal 2+ dan motilitas individu minimal 70%.

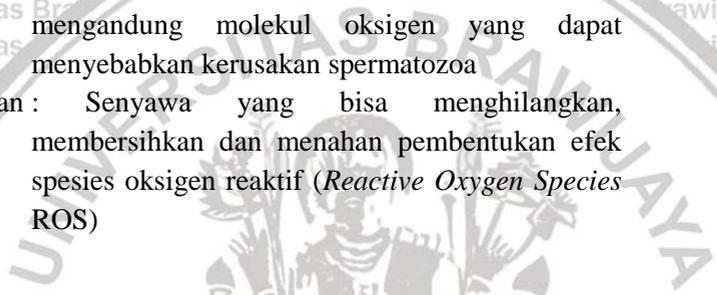
IB : Teknologi tepat guna yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produktifitas sapi dengan memanfaatkan potensi pejantan unggul agar dapat mengawini lebih dari satu induk dan dapat meningkatkan mutu genetik dari ternak tersebut

ROS : Oksigen yang sangat reaktif dan termasuk dalam kelompok radikal bebas yang



mengandung molekul oksigen yang dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa

Antioksidan : Senyawa yang bisa menghilangkan, membersihkan dan menahan pembentukan efek spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* ROS)





BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Semen Segar

Uji kualitas segar adalah penentu apakah semen layak atau tidak untuk dilakukan prosesing semen. Uji kualitas spermatozoa harus segera dilakukan setelah penampungan atau sebelum proses pengenceran yang meliputi pemeriksaan makroskopis : volume, warna, konsistensi dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi: motilitas massa, motilitas individu, persentase hidup dan mati, konsentrasi serta abnormalitas. Berikut hasil rata-rata semen segar 4 kali penampungan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Kualitas Semen Segar Sapi PO.

Pengamatan	Rataan
Makroskopis	
Volume (ml)	9±0,62
Konsistensi	Sedang
Ph	6,77±0,21
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Mikroskopis	
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	81,25±7,5
Viabilitas (%)	87,38±8,87
Abnormalitas (%)	3,12±1,57
Konsentrasi (10 ⁷ spermatozoa/ml semen)	128,5±7,32

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata volume semen segar sapi PO adalah 9±0,62 ml/ejakulasi. Berdasarkan pada data volume semen tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan beberapa laporan yang menunjukkan bahwa volume



semen sapi PO yaitu $7,65 \pm 6,00$ ml/ejakulasi (Luthfi, Affandhy dan Ratnawati, 2020). Adanya perbedaan disetiap ejakulasi disebabkan oleh pakan, umur, frekuensi penampungan dan faktor lainnya (Salmah, 2015). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa volume semen sapi PO normal. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2008) yang menyatakan bahwa volume semen sapi bervariasi setiap penampungan antara 1-15 ml atau 5-8 ml.

Berdasarkan hasil pengamatan semen yang digunakan memiliki konsistensi sedang. Hal ini dibuktikan bahwa semen yang digunakan sudah masuk dalam ideal semen segar dan konsentrasi spermatozoa tinggi. Kartasudjana (2001) mengatakan bahwa konsistensi atau kekentalan merupakan salah satu sifat semen yang memiliki hubungan dengan konsentrasi spermatozoa didalamnya. Semakin kental semen dapat diartikan semakin tinggi pula konsentrasi. Rataan pH yang didapatkan dari hasil pengamatan adalah $6,77 \pm 0,21$ dimana pH semen yang digunakan dalam kisaran normal. Susilawati (2013) menyatakan bahwa kisaran pH sapi normal adalah 6,2-6,8. Variasi pH berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa, Bearden & Fuquay (2004) menyatakan bahwa spermatozoa yang berkonsentrasi tinggi bersifat lebih asam dibandingkan semen dengan spermatozoa yang berkonsentrasi rendah. Selain itu menurut Sundari (2013) bahwa derajat keasaman semen dipengaruhi oleh adanya aktivitas spermatozoa dalam menguraikan fruktosa, sehingga pH menjadi turun, kontaminasi dengan mikroorganisme, sehingga pH naik, dan perbedaan cara mengoleksi semen. Apabila pH semen lebih cenderung bersifat alkali, maka hal ini disebabkan oleh cairan-cairan yang lebih banyak diperoleh dari kelenjar asesoris karena metode penampungan dilakukan dengan

menggunakan elektroejakulator, sedangkan pH semen yang tinggi disebabkan banyak spermatozoa yang mati.

Warna semen yang diperoleh dari hasil penelitian menunjukkan semen sapi PO berwarna putih kekuningan dengan melihat semen ditabung penampungan. Menurut Ihsan (2013) warna semen putih kekuningan disebabkan oleh sekresi pigmen riboflavin oleh kelenjar vesikularis. Garner & Hafez (2008) menyatakan bahwa ejakulat normal spermatozoa sapi berwarna krem sampai putih susu, spermatozoa dengan konsentrasi yang rendah akan terlihat bening dan tembus cahaya. Menurut Gordon (2004) warna, jumlah, volume, konsentrasi, konsistensi, gerakan massa, pH, dan motilitas spermatozoa segar dari seekor pejantan sangat bervariasi. Menurut Feradis (2010) bahwa semen yang berwarna putih susu atau krem keputihan dan keruh adalah semen sapi normal. Derajat kekeruhannya didasarkan pada konsentrasi spermatozoa tersebut.

Motilitas massa semen sapi PO yang didapat saat penelitian adalah (++) sedangkan motilitas individu $81,25 \pm 7,5$, semen tersebut dapat dikategorikan baik. Ducha, Susilawati, Aulanni'am dan Wahjuningsih (2013) menyatakan bahwa persyaratan motilitas massa dan motilitas individu yang sesuai dengan SNI (Standart Nasional Indonesia) adalah minimum ++ untuk motilitas massa dan 70% untuk motilitas individu. Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa (Setiadi, 2012). Persentase daya hidup spermatozoa atau sering disebut viabilitas hasil penelitian adalah $87,38 \pm 8,87$, hal tersebut menunjukkan bahwa semen termasuk kategori yang baik karena sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa semen yang normal

mempunyai persentase hidup minimal 50%. Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat diamati melalui perubahan warna spermatozoa setelah diulas dengan pewarna *eosin negrosin*. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan warna yang tidak terserap oleh spermatozoa karena membran sel spermatozoa dalam keadaan baik, namun pada spermatozoa yang mati akan menyerap warna sehingga dapat dikatakan bahwa terjadi kerusakan pada membran sel spermatozoa (Sholikah, Isnaini, Yekti dan Susilawati, 2016).

Rataan abnormalitas semen sapi PO yang diperoleh yaitu $3,12 \pm 1,57$, hal tersebut menunjukan semen dalam kategori baik karena sesuai dengan pendapat Pezzanite, Allen, Mike and Hutchens (2012) yang menjelaskan bahwa kriteria semen segar yang dapat digunakan sebagai dasar penentuan dalam proses kriopreservasi memiliki persentase abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 15%. Berdasarkan penelitian konsentrasi semen sapi PO ini termasuk baik yaitu $128,5 \pm 7,32$ (10^7) juta/ml. Hal tersebut sesuai dengan Toelihere (1993) konsentrasi sperma berkisar antara 300-2500 juta/ml dengan rata-rata 1000-1800 juta/ml. Standar minimum bagi kualitas semen yang dapat dipakai untuk inseminasi buatan adalah minimal mengandung 500 juta sel per ml ejakulat. Konsentrasi sejalan dengan perkembangan seksual dan kedewasaan sapi jantan, kualitas makanan, pengaruh kesehatan reproduksi, besar testis, perbedaan umur, perbedaan musim dan letak geografis.



4.2 Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair yang Berbeda

Hasil pengamatan motilitas individu semen sapi Peranakan Ongole yang diekuilibrasi dengan uap nitrogen cair pada posisi straw ketinggian 5 cm, 10 cm dan 20 cm. Dapat dilihat pada tabel 3

Tabel 3. Rata-rata motilitas individu spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan *Genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda

Ketinggian	<i>Genistein</i>				Jumlah	Rata-Rata
	0	10	30	50		
5 cm	31±2,24	32±2,74	38±2,74	31±2,24	132	33±3,11 ^c
10 cm	27±2,74	30±0,00	33±2,74	28±2,74	118	29,5±2,23 ^b
20 cm	24±2,24	31±2,24	31±2,24	26±2,24	112	28±2,11 ^a
Jumlah	82	93	102	85		
Rata-rata	27,33±3,21 ^a	31±4,13 ^c	34±5,04 ^d	28,33±3,32 ^{ab}		

Keterangan : Huruf superskrip (a-d) pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) penambahan antioksidan *genistein* terhadap motilitas individu spermatozoa sapi Peranakan Ongole, namun tidak ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada interaksi antara penambahan antioksidan *genistein* dan ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair. Berdasarkan hasil

pengamatan menunjukkan bahwa motilitas individu spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan *genistein* 30 μM memiliki rata-rata tertinggi dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sapi PO yang diekuilibrasikan pada uap nitrogen cair ketinggian 5 cm, 10 cm dan 20 cm. Penambahan antioksidan *genistein* 30 μM memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Pada ketinggian ekuilibrasikan uap nitrogen 5 cm, 10 cm dan 20 cm dapat dilihat bahwa persentase motilitas P2 dengan kadar *genistein* 30 μM sebesar $34 \pm 5,04\%$ lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan penambahan *genistein* 0 μM , 10 μM dan 50 μM yaitu secara berturut-turut penambahan *genistein* 0 μM ($27,33 \pm 3,21\%$), *genistein* 10 μM ($31 \pm 4,13\%$) dan *genistein* 50 μM ($28,33 \pm 3,32\%$).

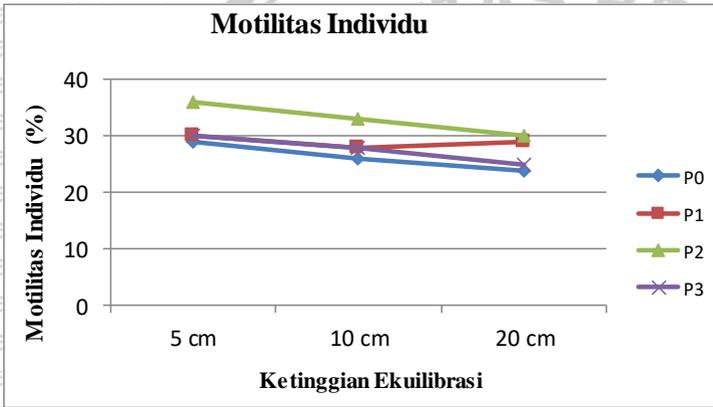
Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan antioksidan *genistein* dalam pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole. Pada penelitian ini dibuktikan dengan penambahan antioksidan *genistein* 30 μM dalam pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur dapat memperbaiki komposisi fisiologis pengencer, sebagaimana dibuktikan dengan hasil persentase motilitas spermatozoa sapi PO yang lebih tinggi daripada kontrol pada ketinggian ekuilibrasikan uap nitrogen 5 cm, 10 cm dan 20 cm. Hal tersebut dikarenakan karena tidak adanya antioksidan sehingga semen akan mengikat radikal bebas dan menyebabkan persentase motilitas berkurang. Puspita (2005) menyatakan bahwa antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Antioksidan mempunyai kemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi



radikal bebas. Antioksidan mampu mencegah terjadinya reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma spermatozoa selama proses pengolahan semen, sehingga membran plasma tetap dalam keadaan utuh. Dengan demikian, spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh mampu dengan baik mengatur lalu lintas keluar masuk semua substrat dan elektrolit pada tingkat sel, sehingga proses metabolisme termasuk fruktolisis dan siklus Krebs dapat berlangsung dengan baik.

Genistein memiliki efek antioksidan terhadap integritas DNA sel sperma, sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, dan senyawa anti kanker (Wocwalek et al, 2013). Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. *Genistein* mengandung gugus fenolik yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu: mendonorkan ion hidrogen dan bertindak sebagai scavenger radikal bebas secara langsung. *Genistein* merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah radikal bebas, proses oksidasi lipid, lipoprotein, protein dan DNA (Astuti, 2008).





Gambar 9. Grafik persentase motilitas individu spermatozoa *post thawing* sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair.

Berdasarkan Gambar 9, motilitas individu spermatozoa sapi PO mengalami penurunan dengan posisi straw ekuilibrasi uap nitrogen cair 10 cm dan 20 cm dengan empat perlakuan yang berbeda pada setiap posisi straw ekuilibrasi uap nitrogen cair dengan hasil berturut-turut sebesar $29,5 \pm 2,23\%$ dan $28 \pm 2,11\%$. Hal tersebut dikarenakan membran plasma spermatozoa mengalami kerusakan. Supriatna (1993) menjelaskan bahwa akibat proses adaptasi sel spermatozoa terhadap konsentrasi bahan pengencer dapat mengakibatkan gangguan permeabilitas membrane, menurunkan aktivitas metabolisme sel dan menurunkan motilitas individu. Aini, Suharyati dan Hartono (2012) menambahkan bahwa penurunan suhu yang lebih lambat sehingga menyebabkan proses metabolisme tetap berjalan dan energi yang digunakan akan habis dengan cepat. Keadaan ini dapat meningkatkan

asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme spermatozoa. Konsentrasi asam laktat yang semakin tinggi menjadikan bahan pengencer semakin asam dan bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa.

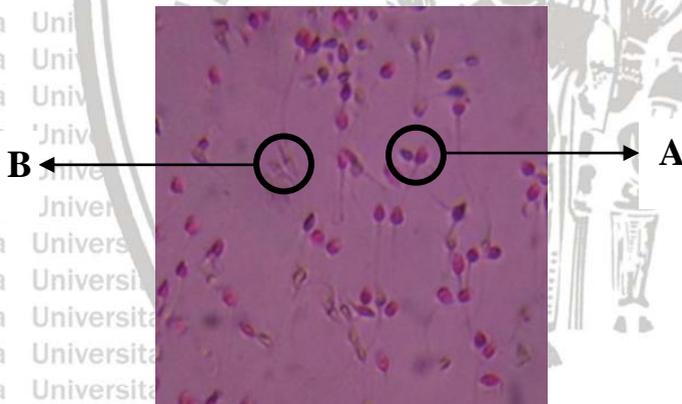
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan posisi straw ekuilibrasi uap nitrogen cair berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi PO setelah thawing. Perlakuan ketinggian 5 cm memberikan motilitas spermatozoa terbaik dibanding dengan ketinggian ekuilibrasi 10 cm dan 20 cm dengan hasil $33 \pm 3,11\%$. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa persentase motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 40,00 % diperoleh dari perlakuan jarak straw 4 cm dan 6 cm, sedangkan persentase motilitas spermatozoa terendah yaitu 5% dihasilkan oleh perlakuan jarak straw 2 cm. Jarak straw dengan nitrogen cair yang optimal adalah 6 cm yang menghasilkan motilitas spermatozoa setelah thawing adalah 34%. Hal ini disebabkan karena proses pembekuan dapat menyebabkan perubahan kualitas semen beku yang dihasilkan. Rendahnya motilitas spermatozoa setelah thawing disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kerusakan bahkan terjadi kematian akibat penurunan suhu terlalu cepat.

4.3 Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair yang Berbeda

Viabilitas adalah kemampuan menentukan spermatozoa dinyatakan hidup dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin. Nilai viabilitas juga menentukan tingkat kemampuan



fertilitas spermatozoa. Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa (Setiadi, 2002). Viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Viabilitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Keterangan A : Spermatozoa Mati (Menyerap warna eosin negrosin)

B : Spermatozoa Hidup (tidak menyerap warna eosin negrosin)

Berdasarkan hasil pengamatan viabilitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole pada ketinggian ekuilibrisasi uap nitrogen cair dengan penambahan antioksidan *genistein* pada pengencer Tris Aminomethan dengan berbagai perlakuan yang

dicobakan yaitu 0 μM , 10 μM , 30 μM dan 50 μM dapat dilihat pada tabel 4

Tabel 4. Rata-rata viabilitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan *Genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda

Ketinggian	<i>Genistein</i>				Jumlah	Rata-Rata
	0	10	30	50		
5 cm	39,37±	54,86±	59,02±	44,49±	197,	49,45±
	1,85	1,78	3,69	2,16	81	3,84 ^c
10 cm	36,09±	47,81±	55,60±	38,85±	178,	44,59±
	2,61	4,51	0,95	2,20	35	3,32 ^b
20 cm	33,42±	40±3,5	47,49±	34,2±1,	155,	38,78±
	1,44	0	4,75	73	11	2,54 ^a
Jumlah	108,88	142,67	162,11	117,54		
Rata-rata	36,29±	47,57±	54,04±	39,18±		
	2,65 ^a	3,43 ^c	5,21 ^d	3,21 ^b		

Keterangan : Huruf superskrip (a-d) pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

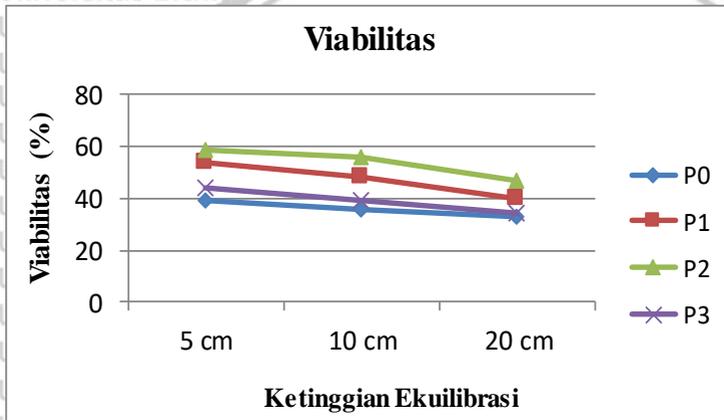
Hasil dari analisis ragam menunjukkan pada Tabel 4. Menunjukkan bahwa kadar penambahan antioksidan *genistein* 30 μM memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Pada ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair 5 cm, 10 cm dan 20 cm dapat dilihat bahwa persentase viabilitas pada P2 dengan kadar *genistein* 30 μM sebesar (54,04±5,21 %) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan penambahan kadar *genistein* 0 μM , 10 μM dan 50 μM yaitu secara berturut turut adalah (36,29±2,65 %), (47,57±3,43 %) dan (39,18±3,21 %). Hal ini dikarenakan antioksidan *genistein* mengandung gugus fenolik yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua



mekanisme, yaitu: mendonorkan ion hidrogen dan bertindak sebagai scavenger radikal bebas secara langsung. *Genistein* merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah radikal bebas, proses oksidasi lipid, lipoprotein, protein dan DNA (Astuti, 2008).

Genistein adalah isoflavon yang termasuk dalam fitoestrogen yang banyak ditemukan pada kedelai. Isoflavon yang terdapat dalam biji kedelai dorman adalah dalam bentuk isoflavon glikosida yaitu *daidzin*, *genistein* dan *glisitin*. Fitoestrogen adalah senyawa alami yang berasal dari tanaman yang struktural dan fungsionalnya mempunyai efek mengikat reseptor estrogen. Antioksidan pada isoflavon sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. *Genistein* memiliki efek antioksidan terhadap integritas DNA sel sperma, sebagai penghambat angiogenesis, peroksidasi lemak, dan senyawa anti kanker. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif karena kehilangan satu atau lebih elektron yang bermuatan listrik, dan untuk mengembalikan keseimbangannya maka radikal bebas berusaha mendapatkan elektron dari molekul lain atau melepas elektron yang tidak berpasangan tersebut. Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak (Wocwalek *et al*, 2013).





Gambar 11. Grafik persentase viabilitas spermatozoa *post thawing* sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair.

Berdasarkan Gambar 11. Dapat dilihat bahwa persentase viabilitas spermatozoa sapi PO dengan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair mengalami penurunan seiring dengan jarak straw dengan uap nitrogen cair. Hasil analisis ragam menyatakan bahwa ketinggian ekuilibrisasi uap nitrogen cair memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa sapi PO dengan hasil terbaik adalah pada ketinggian 5 cm dengan hasil rata-ran viabilitas sebesar $49,45 \pm 3,84\%$, disusul dengan ketinggian 10 cm kemudian 20 cm dengan rata-ran masing-masing $44,59 \pm 3,32\%$ dan $38,78 \pm 2,54\%$.

Ketinggian straw dengan uap nitrogen cair yang optimal adalah 5 cm yang menghasilkan spermatozoa hidup (viabilitas) setelah thawing $49,45 \pm 3,84\%$. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Aini, Suharyanti dan Hartono (2012) yang menyatakan bahwa persentase spermatozoa hidup tertinggi yaitu 50,00% pada perlakuan jarak straw 4 cm dan terendah

diperoleh pada perlakuan jarak 2 cm. Hal tersebut dikarenakan jarak straw 2 cm terlalu dekat dari nitrogen cair menyebabkan penurunan suhu terlalu cepat sehingga spermatozoa mengalami kerusakan. Terjadinya cold shock menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya peroksidasi lipid yang semakin banyak. Lipid merupakan komponen penting dalam membran sel mengandung asam laktat tak jenuh yang sangat rentan terhadap oksidasi sehingga menyebabkan terjadinya radikal bebas, terutama radikal bebas hidroksil. Radikal bebas hidroksil ini dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid ini akan mengubah struktur spermatozoa terutama pada bagian membran, sehingga spermatozoa akan kehilangan fungsi permeabilitas, meningkatkan kerusakan spermatozoa yang mengakibatkan kematian spermatozoa lebih banyak.

Spermatozoa hidup setelah thawing mengalami penurunan pada ketinggian 10 cm dan 20 cm. Hal ini terjadi dikarenakan penurunan suhu yang lebih lambat sehingga proses metabolisme tetap berjalan yang menyebabkan asam laktat meningkat. Pada proses metabolisme sumber energi dalam bahan pengencer akan berkurang sehingga terjadi penurunan daya gerak spermatozoa hingga terjadi kematian. Menurut Datta et al (2009) menyatakan bahwa apabila terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permeabilitas fosfolipid rusak menyebabkan fluiditas membrane terganggu sehingga terjadi kematian pada spermatozoa. Persentase spermatozoa hidup tergantung pada ketuahan membran spermatozoa, kerusakan membran spermatozoa akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme intraseluler sehingga spermatozoa akan melemah dan bahkan mengalami kematian. Susilawati (2011)

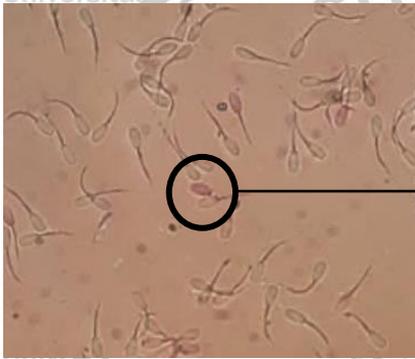


menambahkan bahwa fungsi membran adalah sebagai pelindung sel, kerusakan membran mengakibatkan terganggunya metabolisme intraseluler, sehingga spermatozoa akan lemah dan bahkan mengakibatkan kematian.

4.4 Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibrase Uap Nitrogen Cair yang Berbeda

Pemeriksaan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan cara membuat preparat semen menggunakan pewarna eosin-negrosin dengan cara meneteskan semen secukupnya lalu diteteskan pada ujung object glass dengan ose. Larutan eosin-negrosin diteteskan satu tetes di dekat semen segar kemudian keduanya dicampur dan ditutup dengan object glass lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik kearah ujung yang lain kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa mati akan menyerap warna. Spermatozoa yang abnormal ditandai dengan bentuk sperma tanpa kepala, kepala tanpa ekor, ekor melingkar, kepala ganda. Abnormalitas pada spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 12.





A

Gambar 12. Abnormalitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole (kepala putus) diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Berdasarkan hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa sapi-PO pada ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair dengan berbagai perlakuan penambahan antioksidan *genistein* pada pengencer *Tris Aminomethan* kuning telur dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata abnormalitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan *Genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasasi uap nitrogen cair yang berbeda

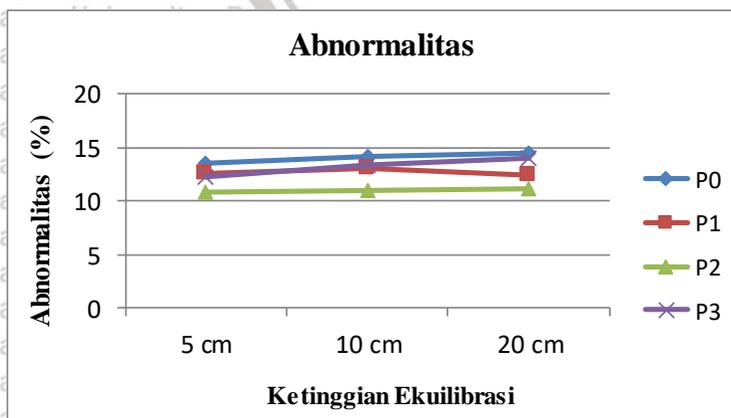
Ketinggian	<i>Genistein</i>				Jumlah	Rata-Rata
	0	10	30	50		
5 cm	13,6±0,68	12,59±0,50	10,88±0,55	12,35±1,39	49,42	12,36±2,14 ^b
	14,13±0,37	13,03±0,47	10,94±0,67	13,32±0,84	51,42	12,86±1,32 ^b
10 cm	14,44±0,54	12,38±0,94	11,09±0,87	14,1±0,59	52,01	13±1,54 ^a
	42,17	38	32,91	39,77		
Jumlah	42,17	38	32,91	39,77		
Rata-rata	14,06±1,75	12,67±1,43	10,97±2,21	13,26±1,23		

Keterangan : Huruf superskrip (a-d) pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasasi uap nitrogen cair memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa. Penambahan antioksidan *genistein* 30 μM memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan 0 μM , 10 μM dan 50 μM . Pada ketinggian ekuilibrasasi uap nitrogen cair 5 cm, 10 cm dan 20 cm dapat dilihat bahwa persentase abnormalitas pada P2 dengan kadar antioksidan *genistein* 30 μM sebesar (10,97±2,21%). Lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan penambahan antioksidan *genistein* 0 μM , 10 μM dan 50 μM yaitu berturut-turut adalah *genistein* 0 μM (14,06±1,75%), *genistein* 10 μM (12,67±1,43%) dan *genistein* 50 μM (13,26±1,23%). Wiratri dkk (2014) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa akan mengalami peningkatan yang



disebabkan oleh spermatogenesis dari ternak tersebut dan perlakuan setelah penampungan semen seperti penanganan semen segar, pencampuran semen dengan pengencer dan pada saat pembuatan ulasan. Kerusakan spermatozoa atau abnormalitas spermatozoa saat pembuatan ulasan pada object glass dapat ditandai dengan patahnya ekor spermatozoa dan yang tidak memiliki ekor. Spermatozoa yang dapat dipakai untuk IB memiliki abnormalitas tidak boleh lebih dari 15%. Suyadi, Susilorini dan Amalta (2015) menambahkan bahwa peningkatan abnormalitas dapat disebabkan oleh adanya proses peroksidase lipid, perubahan tekanan osmotik akibat radikal bebas dan asam laktat hasil dari proses metabolik, sehingga dapat merusak membran plasma dan menyebabkan peningkatan abnormalitas spermatozoa. Grafik persentase Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO dapat dilihat pada Gambar.



Gambar 13. Grafik persentase abnormalitas spermatozoa *post thawing* sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair.



Gambar 13. Menunjukkan bahwa abnormalitas spermatozoa sapi PO mengalami kenaikan pada seiring dengan ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair. Ketinggian ekuilibrasi 5 cm dengan penambahan antioksidan *genistein* 30 μM memberikan abnormalitas paling rendah terhadap spermatozoa sapi PO. Yulianti (2006) menyatakan bahwa peningkatan jumlah spermatozoa yang mengalami abnormalitas diakibatkan oleh pengaruh fisik pada saat perlakuan fisik pada saat perlakuan dimana spermatozoa saling bergesekan satu sama lain sehingga menyebabkan abnormalitas sekaligus kematian. Hasil dari analisis ragam menunjukan bahwa ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa sapi PO. Ketinggian ekuilibrasi 5 cm memberikan hasil abnormalitas spermatozoa terbaik yaitu sebesar $12,36 \pm 2,14\%$, lebih rendah dibandingkan ketinggian 10 cm dan 20 cm yang masing-masing yaitu $12,86 \pm 1,32\%$ dan $13 \pm 1,54\%$. Hal ini disebabkan karena proses pembekuan dapat menyebabkan perubahan kualitas semen beku yang dihasilkan. Tingginya abnormalitas spermatozoa setelah thawing disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kerusakan bahkan terjadi kematian akibat penurunan suhu terlalu lambat. Hasil penelitian ketinggian 10 cm dan 20 cm memiliki nilai abnormalitas spermatozoa lebih tinggi. Hal ini diduga karena terjadi penurunan suhu yang lebih lambat sehingga menyebabkan proses metabolisme tetap berjalan dan energi yang digunakan akan habis dengan cepat. Keadaan ini dapat meningkatkan asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme spermatozoa. Konsentrasi asam laktat yang semakin tinggi menjadikan bahan pengencer semakin asam dan bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya

menyebabkan abnormalitas dan kematian spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Maxwell dan Watson (1996) yang menyatakan bahwa suhu yang rendah akan mengakibatkan struktur fosfolipid membran plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel sehingga akan menyebabkan motilitas yang rendah. Posisi straw 5 cm dari permukaan nitrogen cair merupakan posisi yang terbaik terhadap abnormalitas spermatozoa setelah thawing. Hal ini diduga posisi straw 5 cm tidak mengalami penurunan suhu secara drastis sehingga spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat cold shock.

4.5 Persentase Integritas Membran Sapi Peranakan Ongole dengan Penambahan Antioksidan *Genistein* dan Posisi Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair yang Berbeda

Persentase integritas membran merupakan keutuhan dari membran plasma spermatozoa yang diamati dengan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS) tes. Menurut Achlis dkk. (2013) bahwa membran plasma yang utuh ditandai dengan adanya ekor yang melengkung, karena membran plasma dari spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Sebaliknya, spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak atau permeabilitasnya meningkat, larutan *hypoosmotic* akan keluar masuk membrane spermatozoa secara bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus.

Membran plasma spermatozoa rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh tekanan osmotik atau peroksidasi lipid. Tekanan osmotik ini dapat menyebabkan kerusakan membran, kecuali tidak melewati batas-batas dari

integritas membran maka membran plasma akan merespon baik dan sebagai osmometer yang ideal. Pemeriksaan integritas membran spermatozoa (HOST) didasarkan pada prinsip tersebut. Sehingga ketika sampel ditempatkan pada larutan HOST maka akan terjadi reaksi pembengkakan dan ekor yang terlihat melingkar (Nalley *and* Arifiantini., 2013). Arsiwan dkk (2014) menyatakan bahwa spermatozoa dengan membran yang masih utuh dapat menahan cairan hiposmotik dalam sel, sehingga akan terlihat ekor menjadi melingkar atau bengkok. Spermatozoa dengan membran yang mengalami kerusakan menunjukkan ekor yang lurus, karena tidak mampu untuk menahan air yang masuk. Keutuhan membran plasma sangat diperlukan spermatozoa karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme, motilitas serta daya hidup spermatozoa yang dihasilkan. Hasil pengamatan integritas membrane plasma utuh semen Sapi PO post thawing disajikan pada Tabel 6.



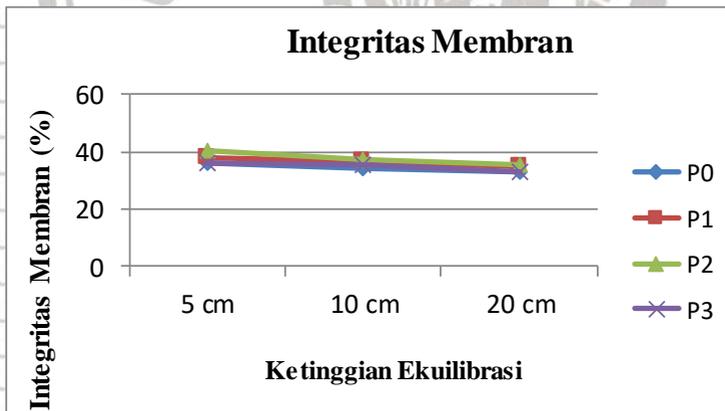
Tabel 6. Rata-rata integritas membran spermatozoa sapi Peranakan Ongole dengan penambahan antioksidan *Genistein* dan posisi straw pada ekuilibrase uap nitrogen cair yang berbeda.

Ketinggian	<i>Genistein</i>				Jumlah	Rata-Rata
	0	10	30	50		
5 cm	35,84±2,08	38,12±2,83	40,31±1,51	35,88±0,96	150,15	37,54±2,34 ^c
	34,57±2,13	36,61±4,21	37,58±1,56	35,54±2,75	144,3	36,07±1,67 ^b
20 cm	32,78±2,03	34,99±0,54	35,56±1,73	32,84±1,39	136,17	34,02±2,23 ^a
	Jumlah	103,19	109,72	113,45	104,26	
Rata-rata	34,4±2,43 ^a	36,57±3,54 ^c	37,82±2,67 ^c	34,75±1,45 ^{ab}		

Keterangan : Huruf superskrip (a-d) pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan antioksidan *genistein* memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase integritas membrane spermatozoa sapi PO. Penambahan *genistein* 30 μM memberikan hasil terbaik yaitu sebesar 37,82±2,67% namun tidak berbeda nyata dengan penambahan antioksidan *genistein* 10 μM yaitu sebesar 36,57±3,54%. Sedangkan penambahan antioksidan *genistein* 50 μM mampu mempertahankan integritas membran berkisar 34,75±1,45% dan tidak berbeda nyata dengan penambahan antioksidan *genistein* 0 μM yaitu 34,4±2,43%. Menurut Prasetyo dan Kusumawati (2019) melaporkan bahwa rata-rata persentase integritas membrane spermatozoa pada sapi PO sebesar 27,96±1,63%. Menurut Arsiwan dkk. (2014) bahwa keutuhan membran plasma sangat

dibutuhkan oleh spermatozoa karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses dari metabolisme dan akan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup dari spermatozoa yang dihasilkan. Grafik persentase Integritas Membran Spermatozoa Sapi PO dapat dilihat pada Gambar. 14.



Gambar 14. Grafik persentase integritas membran spermatozoa *post thawing* sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair.

Berdasarkan Gambar 13. Dapat dilihat bahwa persentase integritas membran spermatozoa sapi PO dengan penambahan antioksidan *genistein* mengalami penurunan seiring dengan ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen cair. Ketinggian ekuilibrasi uap nitrogen 5 cm memberikan perlindungan terbaik dengan penambahan antioksidan *genistein* 30 μM yaitu sebesar $40,31 \pm 1,51\%$. Untuk

melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan dibutuhkan ketinggian ekuilibraasi yang tepat agar terjadi perlindungan yang optimal. Hasil analisis ragam didapatkan persentase rata-rata integritas membran pada ketinggian 5 cm, 10 cm dan 20 cm dengan hasil tertinggi pada ketinggian 5 cm yaitu sebesar $37,54 \pm 2,34\%$. Lebih tinggi dibandingkan dengan ketinggian 10 cm dan 20 cm yaitu berturut-turut adalah $36,07 \pm 1,67\%$ dan $34,02 \pm 2,23\%$. Integritas membrane setelah thawing mengalami penurunan pada ketinggian 10 cm dan 20 cm. Hal ini terjadi dikarenakan penurunan suhu yang lebih lambat sehingga proses metabolisme tetap berjalan yang menyebabkan asam laktat meningkat. Pada proses metabolisme sumber energi dalam bahan pengencer akan berkurang sehingga terjadi penurunan daya gerak spermatozoa hingga terjadi kematian.





BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Penambahan Antioksidan *Genistein* dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair memberikan pengaruh terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa. Namun interaksi antara keduanya tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa. Penambahan antioksidan *genistein* 30 μM dan posisi straw 5 cm pada ekuilibrasi uap nitrogen memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu motilitas ($38 \pm 2,74\%$), viabilitas ($59,02 \pm 3,69\%$), abnormalitas ($10,88 \pm 0,55\%$), dan integritas membran ($40,31 \pm 1,51\%$)

5.2 Saran

Sebaiknya untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi PO dilakukan penambahan 30 μM Antioksidan *Genistein* kedalam pengencer *Tris Aminomethan* dengan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair 5 cm.



DAFTAR PUSTAKA

Aini, K., S., Suharyati dan M., Hartono. 2012. Pengaruh Jarak Straw dengan Nitrogen Cair Pada Proses Fre Freezing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. 62-70

Anggorodi, 1979. *Ilmu Makanan Ternak Umum*. Jakarta: Gramedia

Apriyanti, C. 2012. Pengaruh waktu equilibrasi terhadap kualitas semen beku sapi Pesisir pra dan post *thawing*. Tesis. Program Studi Ilmu Ternak. Program Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang.

Arsiwan, T., Saili, L. O. Baa dan S. Rahadi. 2014. Membran Plasma Utuh Spermatozoa Epididimis Kambing Peranakan Ettawa Dalam Natrium Klorida dengan Konsentrasi Berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 1(1): 79-87.

Astuti M. 2003. Potensi dan keragaman sumberdaya genetik sapi Peranakan *Ongole* (PO). *Wartazoa*. 14 (4):30-39.

Astuti, M. 2004. Potensi dan Keragaman Sumberdaya Genetik Sapi Peranakan Ongole (PO). *Jurnal Ilmu Ternak*. Vol. 14(4): 30-39.

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

Badan Pusat Statistik. 2018. *Proyeksi Penduduk Indonesia 2015-2045*. BPS. Jakarta. Indonesia



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): 5-9.

Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction in Farm Animals* 7th edition. Edited by E.S.E Hafez and B. Hafez. 2008. Lippincott & Williams. Baltimore, Marryland. USA: 96-109.

Hartono, M. 2008. Optimalisasi Penambahan Vitamin E Dalam Pengencer Sitrak Kuning Telur Untuk Mempertahankan Kualitas Semen Kambing Boer. *Journal Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 3(1): 11-19.

Hodgson E, Levi P E, (2000). *A Textbook of Modern Toxicology*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. 207-10.

Insani, K., S. Rahayu, A. Pramana dan A. Soewondo. 2014. Kadar MDA Spermatozoa Setelah Proses Pembekuan. *Jurnal Biotropika*. 2(3): 142-147

Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Jedrzejowska RW., J.K. Wolski and J.S. Hilczer. 2013. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Fertility. *Cent European J Urol*. 66 (1) : 60-67

Khairi, F. 2016. Evaluasi reproduksi dan kualitas semen sapi semental terhadap tingkat bobot badan berbeda.



Universitas Syiah Kuala. Banda Aceh. Jurnal
Peternakan 13(2): 54-58.

Kusumaningrum, D.A., P. Situmorang., A.R. Setioko., E.
Triwulanningsih dan R.G. Sianturi. 2012. Pengaruh
Jenis dan Aras Krioprotektan Terhadap Daya Hidup
Spermatozoa Entog. Jurnal Ilmu Ternak Veteriner.
7(4) : 244-250.

Mandal. S., S. Yadav and R. Nema. 2009. Antioxidant : A
Review. Journal of Chemical and Pharmaceutical
Research. 1(5): 102-104

Maxwell, W. M. C. and P. F. Watson. 1996. Recent progress
in the preservation of ram semen. J. Anim. Reprod.
Sci. 42: 55 – 65.

Muhammad, D., T. Susilawati, S. Wahjuningsih. 2016.
Pengaruh penggunaan CEP-2 dengan suplementasi
kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi FH
(Frisian Holstein) kualitas rendah selama
penyimpanan suhu 4-5oC. *Jurnal Ternak Tropika*,
17(1), 66-76.

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

Nikki E., Y. Yoshida and Y.N.N. Saito. 2005. Lipid
Peroxidation : Mechanisms Inhibition and Biological
Effects. PubMed. 338(1) : 76-668

Novianto, B.R., Sudarno, dan E.D. Masithah. 2014. Pengaruh
Perbedaan Konsentrasi Gliserol dalam Susu Skim

Kuning Telur untuk Proses Penyimpanan Sperma Beku terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*). Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 6 (1): 1-6.

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*). Jurnal Ternak Tropika. 15(1): 31-42.

Nuryadi dan S. Wahjuningsih. 2011. Penampilan Reproduksi Sapi Peranakan Ongole Dan Peranakan Limousin Di Kabupaten Malang. J. Ternak Tropika. 12(1):76-81.

Nyuwita, A., T. Susilawati dan N. Isnaini. 2015. Kualitas Semen Segar dan Produksi Semen Beku Sapi Simmental Pada Umur Yang Berbeda. Jurnal Ternak Tropika. 16(1): 61-68.

Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta : Penerbit Mutiara

Partodiharjo, S. 1987. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta : Mutiara Sumber Widya.

Pezzanite, L., A. Bridges, M. Neary and T. Hutchens. 2012. Breeding Soundness Examinations of Rams and Bucks.

Prasetyo, H. (2019). Kualitas makroskopis semen segar pejantan sapi Peranakan Ongole Kebumen pada umur yang berbeda. Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro



Prihantoko, K.D., F. Yuliasuti., H. Haniarti., A. Kusumawati., D.T. Widayati and A. Budiyanto. 2020. The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade Bull Semen Based in Skim Milk-Soy Lecithin Extender. Improving Tropical Animal Production for Food Security : 1-10

Priyanto, D. 2011. Strategi pengembangan usaha ternak sapi potong dalam mendukung program swasembada daging sapi dan kerbau tahun 2014. Jurnal Litbang Pertanian, 30 (3) : 108-116.

Purdy, P.H 2006. *A Review On Goat Sperm Cryopreservation*. Small ruminant research 63:215-225.

Puspita. S. 2005. Ekstraksi dan Stabilitas Antosianin dari Buah Duwet (*Syzygium cumini*). Jurnal Ekstraksi. 16(2) : 2-10

Sanoeka, D and Kurpisz, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(12): 1 – 7.

Sansone, G, M.J.F. Nastri and A. Fabbrocini. 2000. Storage of Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod.Sci.62:55-76.

Setiono, N., S. Suharyati dan P.E. Santosa. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu, 3(2): 61-69



Sholikhah, 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 3-5oC. *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.

Siregar, S.B. 2008. *Penggemukan Sapi*. Penebar Swadaya, Jakarta.

Subiharta, B., Utomo, dan P. Sudrajad. 2012. Potensi sapi Peranakan Ongole (PO) Kebumen sebagai sumber bibit sapi lokal di Indonesia berdasarkan ukuran tubuhnya (studi pendahuluan). *Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Agribisnis Peternakan Menuju Swasembada Protein Hewani*. Fakultas Peternakan Jenderal Soedirman dan ISPI, Purwokerto.

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*. UB Press. Malang.

Susilawati, T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Universitas Brawijaya Press. Malang.

Suyadi, T. E. Susilorini dan L. Amalta. 2015. Kualitas Semen Kambing Peranakan Etawah (PE) Dalam Pengencer Dengan Penambahan Ekstrak Bawang Merah (*Allium*



cepa L.) Selama Penyimpanan Suhu Dingin. Fakultas
Peternakan Universitas Brawijaya. 1-11.

Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak.
Bandung. Penerbit Angkasa

Toelihere, M.R. 1979. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak.
Bandung. Penerbit Angkasa

Wardhana. A.W., A.P.P. Amijaya dan S. Murwani. 2012. Efek
Ekstrak Air Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap
Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan
Gambaran Histopatologi Sel Endotel Arteri Coronaria
pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diberi Diet
Aterogenik. Jurnal Kedokteran Hewan Brawijaya. 3(1)
: 1-12

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

Woclawek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D,
Kowalczyk- Zieba I, Wasniewski T, Skarzynski DJ.
2013. Diverse effects of phytoestrogens on the
reproductive performance: cow as a model. *Int J
Endocrinol*.

Yanhendri. 2007. Penampilan Reproduksi Sapi Persilangan F1
Dan F2 Simental Serta Hubungannya dengan Kadar
Hormon Estrogen dan Progesteron pada Dataran
Tinggi Sumatera Barat. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana
Institut Pertanian Bogor.



Yulianto, P dan C. Saparinto. 2010. Pembesaran Sapi Potong Secara Intensif. Penebar Swadaya. Jakarta.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Kualitas Semen Segar

Parameter	Penampungan				Rataan+Sd
	1	2	3	4	
Volume	9	10	8	9	9±0,62
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang
Ph	7	6,5	6,8	6,8	6,77±0,21
Warna	PK	PK	PK	PK	PK
Bau	Khas	Khas	Khas	Khas	Khas
Motilitas individu (%)	70	85	85	85	81,25±7,5
Motilitas Massa	2+	2+	2+	2+	2+
Abnormalitas(%)	5,26	3,29	1,69	2,24	3,12±1,57
Viabilitas(%)	74,44	93,62	88,85	92,62	87,38±8,87
Konsentrasi	119	136	127	132	128,5±7,32

Keterangan: PK (Putih Kekuningan)

Lampiran 2. Motilitas

Perlakuan	Ketinggian	Ulangan					Jumlah	Rataan	Stdev
		1	2	3	4	5			
P0	5 cm	35	30	30	30	30	155	31	2,24
	10 cm	25	25	30	25	30	135	27	2,74
	20 cm	25	25	25	20	25	120	24	2,24
P1	5 cm	35	30	30	35	30	160	32	2,74
	10 cm	30	30	30	30	30	150	30	0,00
	20 cm	35	30	30	30	30	155	31	2,24
P2	5 cm	40	35	35	40	40	190	38	2,74
	10 cm	35	30	30	35	35	165	33	2,74
	20 cm	35	30	30	30	30	155	31	2,24
P3	5 cm	35	30	30	30	30	155	31	2,24
	10 cm	25	30	30	25	30	140	28	2,74
	20 cm	25	30	25	25	25	130	26	2,24
Jumlah		380	355	355	355	365	1810	362	27,1



$$\begin{aligned} \text{FK} &= \frac{(\sum Y_{ij})}{a \times b \times r} \\ &= \frac{(1810)^2}{4 \times 3 \times 5} \\ &= 54601,67 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_{\text{Tot}} &= \sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1 Y_{ij} \\ &= (35^2 + 30^2 + \dots + 25^2) - 54601,67 \\ &= 998,33 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_P &= \frac{\sum_i^2 = 1 (\sum_j^2 = 1 Y_{ij})^2}{t \times r} - \text{FK} \\ &= \frac{(380^2 + 355^2 + 355^2 + 365^2)}{12} - 54601,67 \\ &= 40,00 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_g &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \times a} - \text{FK} \\ &= \frac{(410^2 + 465^2 + 510^2 + 425^2)}{15} - 54601,67 \\ &= 401,67 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_t &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \times b} - \text{FK} \\ &= \frac{(660^2 + 590^2 + 560^2)}{20} - 54601,67 \\ &= 263,33 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK}_{g \times t} &= \frac{\sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1 (\sum_j^2 = 1 Y_{ij})^2}{r} - \text{FK} - \text{JK}_g - \text{JK}_t \\ &= \frac{(155^2 + 135^2 + 120^2 + \dots + 130^2)}{5} - 54601,67 - 401,67 - 263,33 \\ &= 63,33 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 \text{JKG} &= \text{JK}_{\text{tot}} - \text{JKP} - \text{JKg} - \text{JKt} - \text{JKg} < \text{t} \\
 &= 998,33 - 40,00 - 401,67 - 263,33 - 63,33 \\
 &= 230
 \end{aligned}$$



Tabel Dua Arah.

	P0	P1	P2	P3	Jumlah	Rataan
5 cm	155	160	190	155	660	33
10 cm	135	150	165	140	590	29,5
20 cm	120	155	155	130	560	28
Jumlah	410	465	510	425	1810	
Rataan	2,733,333	31	34	2,833,333		

Tabel Anova.

SK	Db	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	21,96	5,49	1,17	2,58	2,08
Genistein	3	115,59	38,53	4,69	2,82	2,21
Tinggi	2	122,84	61,42	13,08	3,21	2,43
Genistein><Tinggi	6	9,49	1,58	0,34	2,31	1,91
Galat	44	206,58	4,69			

F hitung > F tabel (0,05), artinya penambahan Antioksidan *Genistein* ke dalam pengencer Tris Aminomethan dan posisi straw pada ekuilibrasi uap nitrogen cair yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap motilitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

Uji Duncan *Genistein*

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{4,69}{15}} = 0,559459$$

Duncan 0,05

	2	3	4
JND	28,505	2,998	3,095
JNT	1,594,738	1,677,258	1,731,526

Perlakuan <i>Genistein</i>	Rata-rata	Notasi	
0 μM	3,439,533	a	
50 μM	3,475,533	ab	
10 μM	3,657,533	c	
30 μM	3,781,733	c	

Uji Duncan Ketinggian Ekuilibrasi

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{4,69}{20}} = 0,484506$$

Duncan 0,05

	2	3
JND	28,505	2,998
JNT	1,381,084	1,452,548

Ketinggian	Rata-rata	Notasi	
20 cm	340,465	a	
10 cm	36,075	b	
5 cm	37,536	c	



Lampiran 3. Abnormalitas

Perlakuan	Ketinggian	Ulangan					Jumlah	Rataan	Stdev
		1	2	3	4	5			
P0	5 cm	14,4	12,96	12,88	13,67	14,11	68,02	13,604	0,68
	10 cm	14,43	14,1	13,54	14,12	14,45	70,64	14,128	0,37
	20 cm	14,76	14,65	13,65	14,15	14,98	72,19	14,438	0,54
P1	5 cm	12,65	11,9	12,33	13,18	12,89	62,95	12,59	0,50
	10 cm	13,23	12,18	13,19	13,24	13,29	65,13	13,026	0,47
	20 cm	13,48	12,11	13,09	11,08	12,16	61,92	12,384	0,94
P2	5 cm	10,74	11,68	10,76	11,04	10,17	54,39	10,878	0,55
	10 cm	11,74	11,58	10,38	10,37	10,65	54,72	10,944	0,67
	20 cm	12,2	11,87	10,38	10,37	10,65	55,47	11,094	0,87
P3	5 cm	13,43	13,04	10,27	11,58	13,44	61,76	12,352	1,39
	10 cm	13,87	11,94	13,19	13,56	14,05	66,61	13,322	0,84
	20 cm	14,23	13,45	13,7	14,12	15	70,5	14,1	0,59
	Jumlah	159,16	151,46	147,36	150,48	155,84	764,3	152,86	8,4



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

$$= \frac{(764,3)^2}{4 \times 3 \times 5}$$

$$= 9735,91$$

$$JK_{Tot} = \sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1 Y_{ij}$$

$$= (14,4^2 + 12,96^2 + \dots + 14,1^2) - 9735,91$$

$$= 114,58$$

$$JKP = \frac{\sum_i^2 = 1(\sum_j^2 = 1 Y_{ij})^2}{t \times r} - FK$$

$$= \frac{(159,16^2 + 151,46^2 + 147,36^2 + 150,48^2 + 155,84^2)}{12} - 9735,91$$

$$= 7,20$$

$$JKg = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \times a} - FK$$

$$= \frac{(210,85^2 + 190^2 + 164,58^2 + 198,87^2)}{15} - 9735,91$$

$$= 77,00$$

$$JK_t = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \times b} - FK$$

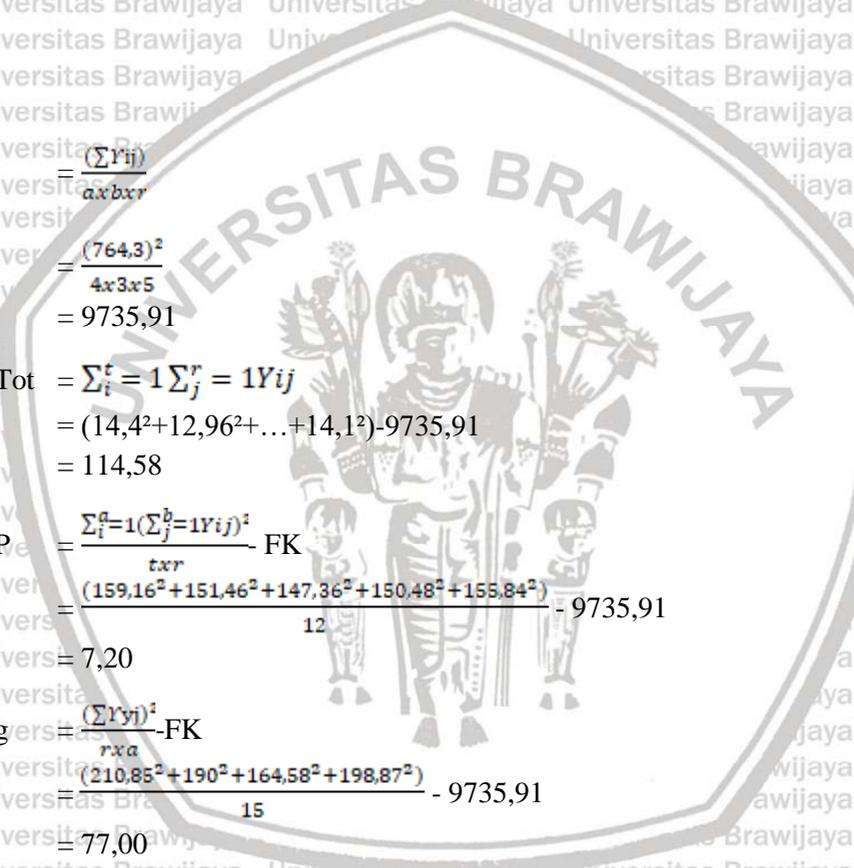
$$= \frac{(247,12^2 + 257,1^2 + 260,08^2)}{20} - 9735,91$$

$$= 4,61$$

$$JK_{g \times t} = \frac{\sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1(\sum_k^2 = 1 Y_{ijk})^2}{r} - FK - JKg - JK_t$$

$$= \frac{(68,02^2 + 70,64^2 + 72,19^2 + \dots + 70,5^2)}{5} - 9735,91 - 77,00 - 4,61$$

$$= 6,04$$



$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKtot} - \text{JKP} - \text{JKg} - \text{JKt} - \text{JKg} < \text{t} \\ &= 114,58 - 7,20 - 77,00 - 4,61 - 6,04 \\ &= 19,73 \end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Tabel Dua Arah.

	P0	P1	P2	P3	Jumlah	Rataan
5 cm	68,02	62,95	54,39	61,76	247,12	12,36
10 cm	70,64	65,13	54,72	66,61	257,1	12,85
20 cm	72,19	61,92	55,47	70,5	260,08	13,00
Jumlah	210,85	190	164,58	198,87	764,3	
Rataan	14,06	12,67	10,97	13,26		

Tabel Anova.

	SK	Db	JK	KT	F hit	F Tabel 0,05	0,01
Perlakuan		4	1,14	0,28	0,10	2,58	2,08
Genistein		3	62,58	20,86	2,84	2,82	2,21
Tinggi		2	19,89	9,95	3,51	3,21	2,43
Genistein×Tinggi		6	17,59	2,93	1,03	2,31	1,91
Galat		44	124,80	2,84			

F hitung > F tabel (0,05), artinya penambahan Antioksidan *Genistein* ke dalam pengencer *Tris Aminomethan* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap abnormalitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole



Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

Uji Duncan *Genistein*

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{2,84}{15}} = 0,4347$$

Duncan 0,05

	2	3	4
JND	28,505	2,998	3,095
JNT	1,594,738	1,677,258	1,731,526

Perlakuan <i>Genistein</i>	Rata-rata	Notasi	
30 μM	10,972	a	
10 μM	126,667		b
50 μM	13,258		
0 μM	140,567		c

Uji Duncan Ketinggian Ekuilibrasi

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{2,84}{20}} = 0,3768$$

Duncan 0,05

	2	3
JND	28,505	2,998
JNT	1,381,084	1,452,548

Ketinggian	Rata-rata	Notasi	
5 cm	12,356	a	
10 cm	12,855		b
20 cm	13,004		b



Lampiran 4. Viabilitas

Perlakuan	Ketinggian	Ulangan				Jumlah	Rataan	Stdev	
		1	2	3	4				
P0	5 cm	42,1	38,78	37,08	38,9	39,98	196,84	39	1,85
	10 cm	40,34	36,34	34,48	35,76	33,54	180,46	36	2,61
	20 cm	34,98	34,56	32,98	33,23	31,34	167,09	33	1,44
P1	5 cm	53,56	52,67	53,76	52,43	56,87	269,29	54	1,78
	10 cm	51,42	43,76	45,87	44,23	53,76	239,04	48	4,51
	20 cm	40,24	41,72	34,13	40,56	43,34	199,99	40	3,50
P2	5 cm	59,65	56,32	62,69	54,22	62,21	295,09	59	3,69
	10 cm	55,32	55,77	56,54	56,24	54,12	277,99	56	0,95
	20 cm	52,76	51,97	43,87	42,11	46,75	237,46	47	4,75
P3	5 cm	42,87	45,93	47,34	44,23	42,1	222,47	44	2,16
	10 cm	42,34	37,87	37,43	39,65	36,97	194,26	39	2,20
	20 cm	34,76	36,34	31,67	34,69	33,54	171	34	1,73
	Jumlah	550,34	532,03	517,84	516,25	534,52	2650,98	530,20	31,16



$$FK = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{n \cdot x \cdot b}$$

$$= \frac{(2650,98)^2}{4 \times 3 \times 5}$$

$$= 117128,25$$

$$JK_{Tot} = \sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1Y_{ij}$$

$$= (42,1^2 + 38,78^2 + \dots + 33,54^2) - 117128,25$$

$$= 4482,04$$

$$JK_P = \frac{\sum_i^2 - 1(\sum_j^2 = 1Y_{ij})^2}{t \cdot x \cdot r} - FK$$

$$= \frac{(550,34^2 + 532,03^2 + 517,84^2 + 516,25^2 + 534,52^2)}{12} - 117128,25$$

$$= 64,58$$

$$JK_g = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \cdot x \cdot a} - FK$$

$$= \frac{(554,39^2 + 708,32^2 + 810,54^2 + 587,73)}{15} - 117128,25$$

$$= 2903,71$$

$$JK_t = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \cdot x \cdot b} - FK$$

$$= \frac{(983,69^2 + 891,75^2 + 775,54^2)}{20} - 117128,25$$

$$= 1088,07$$

$$JK_{g \times t} = \frac{\sum_i^2 - 1 \sum_j^2 = 1(\sum_j^2 = 1Y_{ij})^2}{5} - FK - JK_g - JK_t$$

$$= \frac{196,84 + 180,46^2 + 167,09^2 \dots + 171^2}{5} - 117128,25 - 2903,71 - 1088,07$$

$$= 99,72$$



$$\begin{aligned}
 \text{JKG} &= \text{JK}_{\text{tot}} - \text{JKP} - \text{JKg} - \text{JKt} - \text{JKg} < \text{t} \\
 &= 4482,04 - 64,58 - 2903,71 - 1088,07 - 99,72 \\
 &= 325,96
 \end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Tabel Dua Arah.

	P0	P1	P2	P3	Jumlah	Rataan
5 cm	196,84	269,29	295,09	222,47	983,69	491,845
10 cm	180,46	239,04	277,99	194,26	891,75	445,875
20 cm	167,09	199,99	237,46	171	775,54	38,777
Jumlah	544,39	708,32	810,54	587,73	2650,98	
Rataan	3,629,267	4,722,133	54,036	39,182		

Tabel Anova.

SK	Db	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	64,58	16,15	2,18	2,58	2,08
Genistein	3	2903,71	967,90	7,41	2,82	2,21
Tinggi	2	1088,07	544,03	73,44	3,21	2,43
Genistein><Tinggi	6	99,72	16,62	2,24	2,31	1,91
Galat	44	325,96	7,41			

F hitung > F tabel (0,05), artinya penambahan Antioksidan *Genistein* ke dalam pengencer *Tris Aminomethan* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap viabilitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

Uji Duncan *Genistein*

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{7,41}{15}} = 0,7028$$

Duncan 0,05

	2	3	4
JND	28,505	2,998	3,095
JNT	1,594,738	1,677,258	1,731,526

Perlakuan <i>Genistein</i>	Rata-rata	Notasi	
0 μM	3,629,267	a	
50 μM	39,182		b
10 μM	4,722,133		c
30 μM	54,036		d

Uji Duncan Ketinggian Ekuilibrasi

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{7,41}{20}} = 0,6087$$

Duncan 0,05

	2	3
JND	28,505	2,998
JNT	1,381,084	1,452,548

Ketinggian	Rata-rata	Notasi	
20 cm	38,777	a	
10 cm	445,875		b
5 cm	491,845		c



Lampiran 5. Integritas Membran

Perlakuan	Ketinggian	Ulangan					Jumlah	Rataan	Stdev
		1	2	3	4	5			
P0	5 cm	36,56	38,37	36,87	33,49	33,89	179,18	35,836	2,08
	10 cm	36,24	37,45	32,78	32,98	33,39	172,84	34,568	2,13
	20 cm	34,34	35,17	32,67	30,19	31,54	163,91	32,782	2,03
P1	5 cm	36,61	38,11	34,29	41,38	40,21	190,6	38,12	2,83
	10 cm	40,56	36,38	40,32	35,53	30,25	183,04	36,608	4,21
	20 cm	35,54	35,45	34,56	35,11	34,33	174,99	34,998	0,54
P2	5 cm	41,65	37,97	40,16	41,65	40,11	201,54	40,308	1,51
	10 cm	36,87	36,91	39,87	35,88	38,38	187,91	37,582	1,56
	20 cm	34,1	35,79	35,47	34,12	38,33	177,81	35,562	1,73
P3	5 cm	34,56	36,76	35,54	36,87	35,67	179,4	35,88	0,96
	10 cm	40,44	34,54	34,11	33,96	34,66	177,71	35,542	2,75
	20 cm	34,87	31,43	33,58	31,89	32,45	164,22	32,844	1,39
	Jumlah	442,34	434,33	430,22	423,05	423,21	2153,15	430,63	23,71



$$FK = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{n \cdot x \cdot b \cdot r}$$

$$= \frac{(2153,15)^2}{4 \times 3 \times 5}$$

$$= 77267,58$$

$$JK_{Tot} = \sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1Y_{ij}$$

$$= (36,56^2 + 38,37^2 + \dots + 32,45^2) - 77267,58$$

$$= 476,45$$

$$JKP = \frac{\sum_i^2 = 1(\sum_j^2 = 1Y_{ij})^2}{n \cdot x \cdot r} - FK$$

$$= \frac{(442,34^2 + 434,33^2 + 430,22^2 + 423,05^2 + 423,21^2)}{12} - 77267,58$$

$$= 21,96$$

$$JK_g = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \cdot x \cdot a} - FK$$

$$= \frac{(513,93^2 + 548,63^2 + 567,26^2 + 521,33)}{15} - 77267,58$$

$$= 115,59$$

$$JK_t = \frac{(\sum Y_{ij})^2}{r \cdot x \cdot b} - FK$$

$$= \frac{(750,72 + 721,5^2 + 680,93^2)}{20} - 77267,58$$

$$= 122,84$$

$$JK_{>t} = \frac{\sum_i^2 = 1 \sum_j^2 = 1(\sum_j^2 = 1Y_{ij})^2}{5} - FK - JK_g - JK_t$$

$$= \frac{179,18 + 172,84^2 + 163,91^2 \dots + 164,22^2}{5} - 77267,58 - 115,59 - 122,84$$

$$= 9,49$$



$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKtot} - \text{JKP} - \text{JKg} - \text{JKt} - \text{JKg} < t \\ &= 476,45 - 21,96 - 115,59 - 122,84 - 9,49 \\ &= 206,57 \end{aligned}$$



Tabel Dua Arah.

	P0	P1	P2	P3	Jumlah	Rataan
5 cm	179,18	190,6	201,54	179,4	750,72	37,536
10 cm	172,84	183,04	187,91	177,71	721,5	36,075
20 cm	163,91	174,99	177,81	164,22	680,93	340,46 5
Jumlah	515,93	548,63	567,26	521,33	2153,15	
Rataan	3,439,533	3,657,533	3,781,733	3,475,533		

Tabel Anova.

	SK	Db	JK	KT	F hit	F Tabel	
						0,05	0,01
Perlakuan		4	21,96	5,49	1,17	2,58	2,08
Genistein		3	115,59	38,53	4,69	2,82	2,21
Tinggi		2	122,84	61,42	13,08	3,21	2,43
Genistein > Tinggi		6	9,49	1,58	0,34	2,31	1,91
Galat		44	206,58	4,69			

F hitung > F tabel (0,05), artinya penambahan Antioksidan *Genistein* ke dalam pengencer *Tris Aminomethan* dan posisi straw pada ekuilibrisasi uap nitrogen cair yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap integritas membran spermatozoa Sapi Peranakan Ongole

Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD)

Uji Duncan *Genistein*

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{4,69}{15}} = 0,5592$$

Duncan 0,05

	2	3	4
JND	28,505	2,998	3,095
JNT	1,594,738	1,677,258	1,731,526

Perlakuan <i>Genistein</i>	Rata-rata	Notasi
0 μM	3,439,533	a
50 μM	3,475,533	ab
10 μM	3,657,533	c
30 μM	3,781,733	c

Uji Duncan Ketinggian Ekuilibrasi

$$SE = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}} = \sqrt{\frac{4,69}{20}} = 0,4842$$

Duncan 0,05

	2	3
JND	28,505	2,998
JNT	1,381,084	1,452,548

Ketinggian	Rata-rata	Notasi
20 cm	340,465	a
10 cm	36,075	b
5 cm	37,536	c



Lampiran 6. Dokumentasi

