

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

SKRIPSI

Oleh :

**Kristina Delvina Gultom
NIM.175050100111186**



PROGRAM STUDI PETERNAKAN

FAKULTAS PETERNAKAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021



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

SKRIPSI

Oleh :

**Kristina Delvina Gultom
NIM.175050100111186**

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

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

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

SKRIPSI

Oleh :

**Kristina Delvina Gultom
NIM. 175050100111186**

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

Mengetahui,
Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

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

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



PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA

Yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa penelitian skripsi yang saya lakukan merupakan penelitian yang dilaksanakan secara kelompok dibawah bimbingan Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., IPU., ASEAN Eng. dengan tema **“Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris-aminomethan pada penyimpanan cair dan beku semen sapi PO”** dengan perincian sebagai berikut:

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





3	Herjuna Aditama	Efek Suplementasi Genistein Dalam Pengencer Tris aminomethan Kuning Telur Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post Thawing	175050100111184
4	Aik Awallikah	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein dalam Pengencer Tris aminomethan dan Ketinggian Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole	175050101111034
5	Natalia Kristina Lubis	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Penambahan Genistein pada Pengencer Tris	175050101111045



		Aminomethane Terhadap Kualitas Semen Beku	
6	Adhe Tya Purnomo	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris aminomethan Terhadap Kualitas Post <i>Thawing</i> Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Suhu Berbeda	175050101111118
7	Aisyah Nur Arifiyanti	Pengaruh Penambahan Genistein dalam Pengencer Tris- Aminomethan dan Lama <i>Thawing</i> terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole	175050101111156
8	Aulia Setyo Lazuardi	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Dingin dan Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair Terhadap	175050107111065



		Kualitas Semen Beku Setelah Pengenceran dengan Penambahan Genistein	
9	Dicky Ananta Kudori	Pengaruh Lama ekuilibrasi suhu dingin dan Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair terhadap kualitas semen beku sapi PO yang disuplementasi dengan 30 μ M genistein	175050107111143
10	Calista Mega Herawati	Pengaruh Lama Ekuilibrasi dan Suhu <i>Thawing</i> dengan Penambahan Genistein pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO	175050100111115
11	Kristina Delvina Gultom	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Lama <i>Thawing</i> Dengan	175050100111186



		Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO	
12	Pandu Alif Utama	Pengaruh Jarak dan Lama Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengenceran	175050101111136
13	Kristina Sidabalok	Pengaruh Jarak Straw pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair dan Metode <i>Thawing</i> Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi PO dengan Penambahan Genistein pada Pengencer	175050100111158

14	Frando Gabriel Situmorang	Pengaruh jarak straw pada ekuilibersi uap nitrogen dan lama <i>thawing</i> terhadap kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer	175050107111108
----	---------------------------	--	-----------------

Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 3 Juni 2021

Mahasiswa Peneliti

(Kristina Delvina Gultom)

NIM.175050100111186



THE EFFECT OF COLD TEMPERATURE EQUILIBRATION AND THAWING TIME WITH ADDITIONAL GENISTEIN ON DILUTER ON THE QUALITY OF FROZEN CEMENT OF ONGOLE BULL (PO)

Kristina Delvina Gultom¹⁾ dan Suyadi²⁾

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

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

Email: delvi_10@student.ub.ac.id

ABSTRACT

Effect of damage due to Reactive Oxygen Species and *cold shock* during the frozen semen storage process for PO bull. Appropriate equilibration and *thawing* methods with the addition of the antioxidant genistein in the diluent are expected to maintain the quality of frozen semen of PO bull. The material used was fresh semen of Ongole bull, the diluent used was egg yolk tris-aminomethane with the addition of 30 μ M genistein, 13% glycerol. The research method is a laboratory experiment using 3 treatments, 3 groups and 5 replications. The design pattern used was a Factorial Completely Randomized Design (CRD). Equilibration treatment for 1 hour, 1.5 hours and 2 hours, as well as *thawing* time of 30 seconds, 60 seconds and 90 seconds. The variables observed were individual motility, viability, abnormalities and membrane integrity. Time of equilibration and the interaction factor of cold equilibration time with *thawing* had no significant effect ($P>0.05$) on individual motility, viability and membrane integrity of PO bull semen, while the *thawing* time factor had a significant effect

($P < 0.05$) on individual motility, viability and membrane integrity of PO bull semen. The conclusion is that the addition of $30 \mu\text{M}$ genistein in diluent with equilibration for 2 hours and *thawing* time for 30 seconds at 37°C can maintain the quality of frozen semen of PO bull.

Keyword : semen bull, antioxidant, genistein, cold shock, ROS

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

Kristina Delvina Gultom¹⁾ dan Suyadi²⁾

¹⁾Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

²⁾Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

Email: delvi_10@student.ub.ac.id

RINGKASAN

Sapi potong merupakan sumber daya genetik yang dimiliki Indonesia. Populasi sapi potong lokal Indonesia memiliki potensi yang sangat besar untuk dilestarikan. Keunggulan yang dimiliki sapi PO menjadikannya alasan tersendiri sehingga eksistensi sapi tersebut tetap terjaga. Beberapa keunggulan tersebut diantaranya memiliki tampilan bobot badan yang baik, tampilan reproduksi yang baik, tahan terhadap panas, terhadap ekto dan endoparasit, pertumbuhan relatif cepat, serta persentase karkas dan kualitas daging baik. Keunggulan yang dimiliki oleh pejantan sapi PO dapat diturunkan kepada anaknya. Tampilan ternak yang baik akan mewariskan tampilan yang baik pula terhadap keturunannya, sehingga seleksi pada pejantan berdasarkan tampilan (*performans*) ternak menjadi sangat penting.

Pemanfaatan sapi pejantan lebih banyak dijadikan sebagai sumber daya genetik untuk melakukan inseminasi buatan (IB). Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil dalam meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam kurun waktu yang singkat dapat menghasilkan keturunan dengan kualitas yang baik dengan memanfaatkan pejantan unggul. Kualitas



semen sebagai salah satu faktor penting dalam keberhasilan IB dipengaruhi oleh proses pengolahan semen mulai dari penampungan, pengenceran, ekuilibrasi, pembekuan semen dan *thawing*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama ekuilibrasi suhu dingin dan lama *thawing* yang baik untuk mempertahankan kualitas semen sapi PO dan memiliki keterampilan dalam memproses semen sapi mulai penampungan hingga *thawing*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh semen berkualitas melalui pengaruh lama ekuilibrasi pada suhu dingin, *thawing* dan penambahan genestein sebagai antioksidan pada pengencer tris aminomethan kuning telur. Kualitas semen beku Sapi PO dapat dipertahankan dengan memperhatikan proses penanganan semen. Penambahan genistein sebagai antioksidan yang diduga dapat mencegah kerusakan akibat ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan *cold shock*. Selama proses penyimpanan semen beku dibutuhkan pengencer dan antioksidan dengan syarat mengandung sumber energi, mencegah *cold shock*, mengandung *buffer*, bersifat isotonis tidak bersifat *toxic*, menghambat pertumbuhan bakteri dan mengandung unsur yang sifat fisik dan kimiawinya sama dengan semen.

Penelitian dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban. Penelitian dilaksanakan mulai dari tanggal 22 Maret – 22 April 2021. Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen segar dari 1 ekor Sapi Peranakan Ongole yang berada di UPT PT dan HMT karangwaru Tuban. Persyaratan semen segar yang digunakan yaitu semen yang memiliki motilitas individu $\geq 70\%$ dan motilitas massa 2+. Pengencer yang digunakan yaitu tris aminomethan kuning telur ayam kampung dengan penambahan 30 μM genestein. Gliserol yang digunakan sebanyak 13% sebagai krioprotektan intraseluler. Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*)



menggunakan 3 perlakuan, 3 kelompok dan 5 kali ulangan. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial). Perlakuan ekuilibrasasi suhu dingin selama 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam, serta lama *thawing* 30 detik, 60 detik dan 90 detik. Variabel yang diamati yaitu motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran yang dilakukan pada semen segar, ekuilibrasasi suhu dingin dan setelah *thawing*.

Hasil penelitian menurut uji statistika menunjukkan bahwa faktor lama ekuilibrasasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasasi suhu dingin dengan lama *thawing* tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran semen sapi PO, sedangkan faktor lama *thawing* berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran semen sapi PO. Persentase motilitas individu terendah pada perlakuan ekuilibrasasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik yaitu $27 \pm 2,74\%$ dan persentase motilitas individu tertinggi pada perlakuan lama ekuilibrasasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik yaitu $33 \pm 2,74\%$. Persentase viabilitas terendah pada perlakuan lama ekuilibrasasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik yaitu $51,00 \pm 3,24\%$, persentase viabilitas tertinggi pada lama ekuilibrasasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik yaitu $58,13 \pm 1,63\%$. Persentase integritas membran terendah pada perlakuan lama ekuilibrasasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik yaitu $48,80 \pm 3,06\%$, persentase integritas membran tertinggi pada lama ekuilibrasasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik yaitu $55,21 \pm 2,14\%$. Berdasarkan hasil analisis statistik pada menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh terhadap persentase abnormalitas spermatozoa ($P>0,05$). Abnormalitas tertinggi pada ekuilibrasasi 2 jam dengan lama *thawing* 90 detik yaitu $11,83 \pm 0,18\%$ dan abnormalitas terendah pada lama



ekuilibrasi 1 jam dengan lama *thawing* 30 detik dengan persentase $10,17 \pm 0,36\%$.

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dengan lama *thawing* tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran sedangkan faktor lama *thawing* berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur. Perlakuan terbaik pada semua variabel pengamatan yaitu lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik dengan suhu 37°C . Berdasarkan hasil penelitian disarankan menerapkan penggunaan genistein $30 \mu\text{M}$ dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik dengan suhu 37°C .

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA	iv
RIWAYAT HIDUP	x
ABSTRACT	xiv
RINGKASAN	xvi
DAFTAR ISI.....	xx
DAFTAR TABEL.....	xxiii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
BAB I PENDAHULUAN.....	26
1.1. Latar Belakang	26
1.2. Rumusan Masalah.....	29
1.3. Tujuan Penelitian	30
1.4. Manfaat Penelitian	30
1.5. Kerangka Pikir	31
1.6. Hipotesis	35
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	36
2.1. Sapi PO dan Pengembangan Sapi PO.....	36
2.2. Inseminasi Buatan.....	39
2.3. Penampungan Semen.....	40
2.4. Evaluasi Kualitas Semen	41
2.4.1. Makroskopis	41
2.4.2. Mikroskopis	42





2.5.	Pengenceran Semen	46
2.6.	Ekuilibrasi, Pembekuan dan Penyimpanan Semen	48
2.7.	Reaksi Biogemis selama Penyimpanan	50
2.7.1.	Struktur Membran Spermatozoa	50
2.7.2.	Lipid Bilayer Membran.....	52
2.7.3.	Radikal Bebas (Reactive Oxygen Species)	53
2.8.	Antioksidan.....	55
2.9.	Pengaruh Genistein sebagai Antioksidan.....	57
2.10.	<i>Thawing</i>	58
BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN		60
3.1.	Lokasi dan Waktu Penelitian	60
3.2.	Materi Penelitian.....	60
3.3.	Metode Penelitian	61
3.4.	Prosedur Penelitian	62
3.4.1.	Pelarutan Genistein	62
3.4.2.	Pembuatan Pengencer tris aminomethan kuning telur + 30 μ M Genistein	63
3.4.3.	Penampungan Semen Sapi PO.....	65
3.4.4.	Pemeriksaan kualitas semen segar	65
3.3.5.	Pengenceran Semen	70
3.3.6.	Pembekuan Semen	71
3.3.7.	<i>Thawing</i>	72
3.5.	Variabel Penelitian.....	73
3.6.	Analisis Data.....	73

3.7.	Kerangka Operasional.....	75
3.8.	Batasan Istilah.....	76
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		78
4.1.	Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi PO	78
4.2.	Persentase Motilitas Individu Spermatozoa.....	85
4.3.	Persentase Viabilitas Spermatozoa	89
4.4.	Persentase Abnormalitas Spermatozoa	92
4.5.	Persentase Integritas Membran Spermatozoa	95
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		99
DAFTAR PUSTAKA		100
LAMPIRAN.....		115



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil pengamatan semen segar Sapi PO	78
Tabel 2. Hasil pengamatan motilitas individu spermatozoa pada berbagai perlakuan	87
Tabel 3. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa pada berbagai perlakuan.....	90
Tabel 4. Hasil pengamatan Abnormalitas spermatozoa pada berbagai perlakuan.....	93
Tabel 5. Hasil pengamatan Integritas Membran Spermatozoa pada berbagai perlakuan	97



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Pikir.....	34
Gambar 2. Pejantan Sapi Peranakan Ongole.....	37
Gambar 3. Struktur Internal Spermatozoa Sapi.....	50
Gambar 4. Stuktur membran spermatozoa.....	51
Gambar 5. Lipid Bilayer.....	53
Gambar 6. Aktivitas Radikal Bebas.....	54
Gambar 7. Reaksi Antioksidan.....	56
Gambar 8. Pengencer dihomogenkan.....	64
Gambar 9. Pengencer disentrifugasi.....	64
Gambar 10. Prosedur Pengenceran Semen.....	71
Gambar 11. Kerangka Operasional.....	75
Gambar 12. Warna Semen segar sapi PO.....	79
Gambar 13. pH Semen Segar Sapi PO.....	80
Gambar 14. Konsentrasi semen segar.....	81
Gambar 15. Motilitas Individu Semen Segar.....	82
Gambar 16. Viabilitas Spermatozoa.....	83
Gambar 17. Abnormalitas Spermatozoa.....	84
Gambar 18. Integritas Membran Spermatozoa.....	85
Gambar 19. Grafik Persentase motilitas individu sesudah pembekuan.....	86
Gambar 20. Grafik Persentase Viabilitas sesudah pembekuan	89
Gambar 21. Persentase abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan (%).....	92
Gambar 22. Persentase Integritas Membran.....	95



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data semen segar sapi PO.....	115
Lampiran 2. Analisa Motilitas Individu Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin dan Lama Thawing	116
Lampiran 3. Analisa Viabilitas Lama Ekuilibrasi suhu dingin dan Lama Thawing	119
Lampiran 4. Analisa Abnormalitas Lama Ekuilibrasi suhu dingin dan Lama Thawing	122
Lampiran 5. Analisa Integritas Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin dan Lama Thawing	125
Lampiran 6. Dokumentasi.....	128



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sapi potong merupakan sumber daya genetik yang dimiliki Indonesia. Populasi sapi potong lokal Indonesia memiliki potensi yang sangat besar untuk dilestarikan. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan (2019) menyatakan bahwa populasi sapi potong lokal yang ada di Indonesia sebanyak 17.118.650 ekor. Lokasi penyebarannya paling besar berada di wilayah Jawa Timur sebanyak 4.763.182 ekor. Kemudian disusul oleh wilayah Jawa Tengah sebanyak 1.755.396 ekor dan wilayah Sulawesi Selatan sebanyak 1.362.604 ekor. Indonesia memiliki berbagai jenis bangsa sapi potong, diantaranya sapi Peranakan Ongole atau biasa yang dikenal dengan sapi PO. Sapi PO merupakan salah satu jenis bangsa sapi potong yang termasuk kedalam sapi *Bos indicus* atau sapi Zebu. Perkembangannya berawal dari negara India kemudian menyebar ke berbagai negara tropis, termasuk Indonesia. Bangsa sapi PO menjadi salah satu bangsa sapi potong yang banyak dipelihara, khususnya di wilayah Jawa Timur. Keunggulan yang dimiliki sapi PO menjadikannya alasan tersendiri sehingga eksistensi sapi tersebut tetap terjaga. Beberapa keunggulan tersebut diantaranya memiliki tampilan bobot badan yang baik, tampilan reproduksi yang baik, tahan terhadap panas, terhadap ekto dan endoparasit, pertumbuhan relatif cepat, serta persentase karkas dan kualitas daging baik. Keunggulan yang dimiliki oleh pejantan sapi PO dapat diturunkan kepada anaknya. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Susilawati (2013) bahwa tampilan ternak yang baik akan mewariskan tampilan yang baik pula terhadap keturunannya, sehingga seleksi pada pejantan berdasarkan tampilan (*performans*) ternak menjadi sangat penting. Pemanfaatan sapi



pejantan lebih banyak dijadikan sebagai sumber daya genetik untuk melakukan inseminasi buatan (IB).

Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil dalam meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam kurun waktu yang singkat dapat menghasilkan keturunan dengan kualitas yang baik dengan memanfaatkan pejantan unggul (Susilawati, 2013). Diimbangi dengan hal tersebut, tampilan reproduksi juga menjadi salah satu faktor yang dapat menentukan baik atau tidaknya seekor pejantan. Kualitas semen sebagai salah satu faktor penting dalam keberhasilan IB dipengaruhi oleh proses pengolahan semen mulai dari penampungan, pengenceran, ekuilibrasi, pembekuan semen dan *thawing*. Selain itu, metode *thawing* yang digunakan oleh inseminator sangat berperan dalam menentukan kualitas semen yang akan diinseminasikan. Guna dapat dilakukan inseminasi buatan, kualitas semen beku setelah *thawing*. Produksi yang baik dari seekor pejantan dapat tercermin dari bobot badan yang dimiliki. Rata-rata bobot badan seekor pejantan unggul kisaran dari 700-750 kg. Pemilihan calon pejantan dilakukan dengan dua uji, yaitu uji performan (*performance test*) dan uji zuriat (*progency test*). Uji performa didasarkan pada penampilan individu, seperti berat badan, panjang badan, tinggi gumba, lingkaran dada, libido, dan kualitas semen, serta kesehatan dan penyakit (Sulilawati, 2013). Pejantan yang baik dapat dilihat dari reproduksi nya yaitu kualitas semen yang baik.

Salah satu faktor yang dapat mempertahankan produksi sapi PO yaitu mutu semen sapi PO. Kualitas semen segar lebih cepat menurun dibandingkan dengan semen beku. Oleh sebab itu, mutu semen beku harus selalu terjaga fertilitasnya. Semen beku yang baik mempunyai persentase motilitas dan spermatozoa hidup yang tinggi. Menurut Amalia (2019) semen beku mempunyai keunggulan yaitu dapat digunakan untuk



waktu yang lama dan ekonomis tetapi memiliki kekurangan yaitu mengalami penurunan kualitas setelah proses pembekuan. Penurunan kualitas semen saat pembekuan mencapai 40-50%, sehingga dapat menyebabkan spermatozoa mati dalam proses pembekuan. Hal ini terjadi karena selama proses pembekuan, spermatozoa mengalami perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim dan memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Jenis oksigen reaktif ini memiliki sifat toksik yang menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa yang mampu menurunkan motilitas serta meningkatkan kerusakan morfologi spermatozoa.

Selama proses penyimpanan semen beku membutuhkan pengencer dan antioksidan dengan syarat mengandung sumber energi, mencegah *cold shock*, mengandung *buffer*, bersifat isotonis tidak bersifat *toxic*, menghambat pertumbuhan bakteri dan mengandung unsur yang sifat fisik dan kimiawinya sama dengan semen. Pemberian antioksidan dapat mencegah dan mengurangi reaksi peroksidasi lipid akibat aktivitas radikal bebas pada membran plasma spermatozoa, dimana pada bagian tersebut mengandung asam lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap reaksi peroksidasi lipid (Bebas, Geovany dan Made, 2016). Genistein memiliki sifat antioksidan pada spermatozoa beku. Hal ini mengakibatkan penurunan produksi ROS yang menunjukkan sedikit perbaikan pada motilitas sperma, dan penurunan kelainan lipid membran serta kerusakan DNA akibat kriopreservasi atau pembekuan (Soto, Hourcade, Adán, Landeras, and Gadea. 2010). Genistein memiliki efek antioksidan pelindung pada integritas DNA sperma, setelah kerusakan yang dimediasi oleh hidrogen peroksida. Genistein mampu memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan pengurangan oksigen reaktif (Jalili, Ahmadi, Roshankhah, and Salahshoor, 2016). Tris aminomethan dan kuning telur merupakan pengencer krioprotektan ekstraseluler



mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya *cold shock* selama pendinginan (Ervandi, Susilawati dan Wahjuningsih, 2013). Selain kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler, juga dibutuhkan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler untuk melindungi sel dari dalam. Proses ekuilibrisasi dan *thawing* yang digunakan pada semen beku sangat mempengaruhi kualitas semen. Ekuilibrisasi pada processing semen diperlukan untuk beradaptasi dengan pengencer, sehingga kematian yang berlebihan dapat dihindari dalam proses pembekuan (Eriani, Sari, Ihdina dan Rosnizar, 2017). Teknik dan metode *thawing* yang benar dapat mempengaruhi kualitas semen post *thawing*. Proses *thawing* atau mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dalam durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Proses ini harus dilakukan dengan tepat sebab dapat menyebabkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku (Muhammad Salim, Susilawati dan Wahyuningsih, 2012).

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan genistein sebagai antioksidan dan lama ekuilibrisasi suhu dingin pada pengencer tris aminomethan kuning telur, dengan demikian penambahan antioksidan pada proses ekuilibrisasi suhu dingin dan *thawing* diharapkan dapat mempertahankan kualitas semen sapi PO serta diaplikasikan pada Inseminasi Buatan.

1.2. Rumusan Masalah

Kualitas semen beku Sapi PO dapat dipertahankan dengan memperhatikan proses penanganan semen. Penambahan genistein sebagai antioksidan yang diduga dapat mencegah



kerusakan akibat ROS dan ekuilibrasi suhu dingin serta *thawing* yang benar maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pengaruh lama *thawing* terhadap kualitas semen beku Sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur?
2. Bagaimana pengaruh lama ekuilibrasi suhu dingin terhadap kualitas semen beku Sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur?
3. Bagaimana pengaruh interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dan lama *thawing* dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh lama *thawing* terhadap kualitas semen beku Sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur
2. Untuk mengetahui pengaruh lama ekuilibrasi suhu dingin terhadap kualitas semen beku Sapi PO dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur
3. Untuk mengetahui pengaruh interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dan lama *thawing* dengan penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh semen berkualitas melalui pengaruh lama ekuilibrasi suhu dingin, *thawing* dan penambahan genestein sebagai antioksidan pada pengencer tris aminomethan kuning telur. Menjadi kajian ilmiah bagi semua pihak dalam mencari tahu kualitas semen beku pejantan sapi PO yang diamati dengan penambahan genistein. Penelitian ini juga dapat digunakan sebagai informasi



bagi penelitian selanjutnya dan memperkaya informasi mengenai teknologi reproduksi semen beku sapi PO.

1.5. Kerangka Pikir

Upaya dalam meningkatkan populasi sapi potong dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya adalah meningkatkan mutu genetik dan efisiensi reproduksi yakni melalui program IB. Program IB dengan semen pejantan unggul merupakan suatu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak, sehingga dalam waktu yang singkat dapat menghasilkan anak dengan kualitas baik dalam jumlah yang besar dengan memanfaatkan pejantan unggul (Susilawati, 2011). IB dapat mencegah terjadinya *inbreeding* dan juga memberikan keuntungan dalam efisiensi penggunaan pejantan unggul dengan penyebaran bibit-bibit pada lokasi yang tidak terbatas (Rachmawati, 2010). Keberhasilan IB ditentukan oleh kualitas semen beku dari pejantan yang dipengaruhi oleh karakteristik semen segarnya yang dapat dilakukan melalui evaluasi, baik secara makroskopis maupun mikroskopis (Prasetyo, Tagama dan Saleh, 2013). Tingkat keberhasilan IB yang tinggi diharapkan akan dapat meningkatkan efisiensi produktivitas, ditandai dengan meningkatnya populasi ternak sapi di Indonesia sehingga dapat memenuhi permintaan kebutuhan daging sebagai sumber protein hewani (Komariah, Arifiantini dan Nugraha, 2013).

Kualitas semen pada penyimpanan suhu dingin menyebabkan proses metabolisme yang berlangsung. Penyimpanan suhu dingin menyebabkan proses tetap berjalan dan energi yang digunakan lama kelamaan akan habis. Susilawati (2011) menjelaskan bahwa proses pendinginan, ekuilibrasi, pembekuan dan *thawing* menyebabkan stres fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan

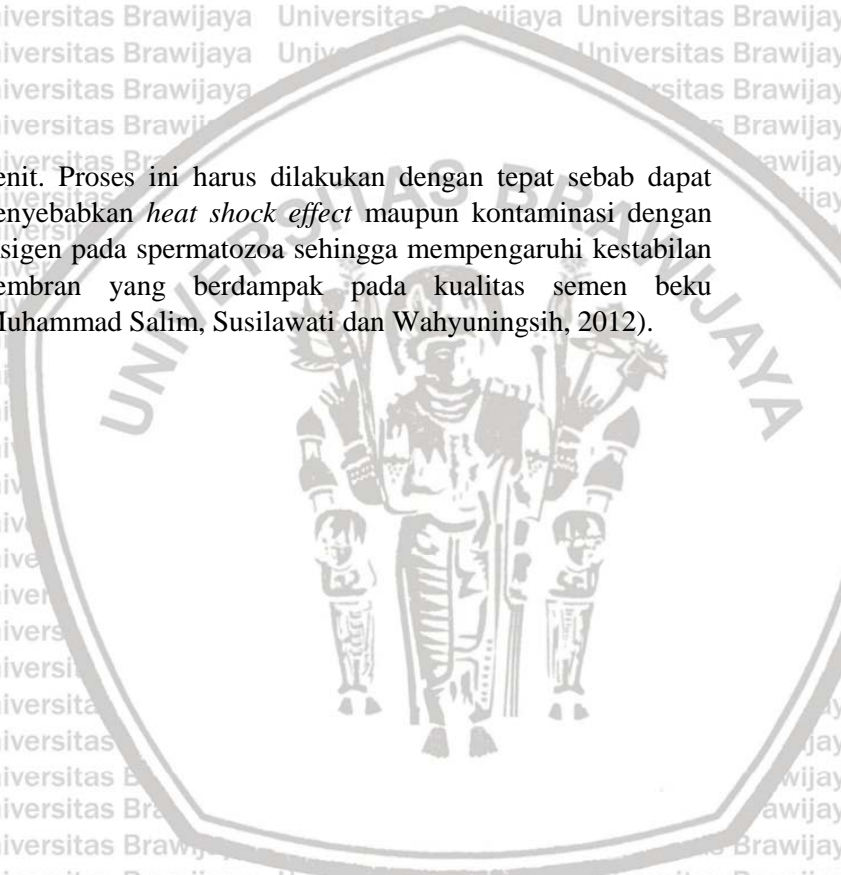


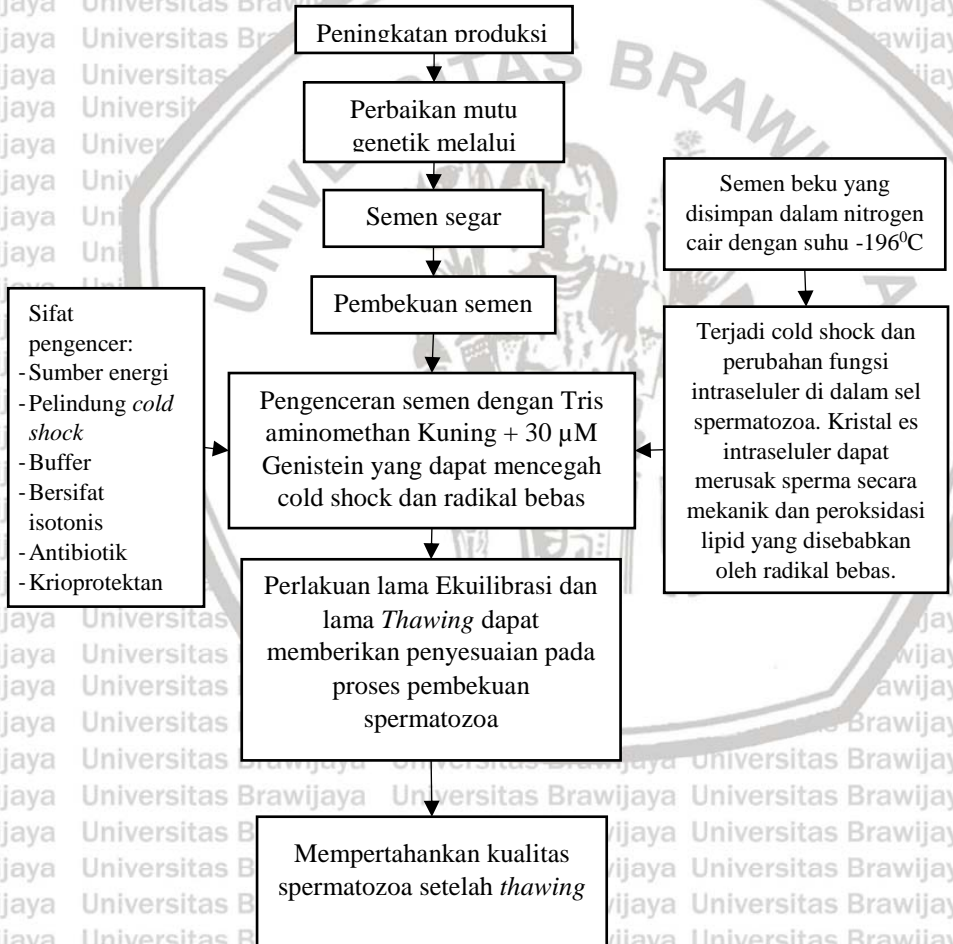
viabilitas dan kemampuan memfertilisasi spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami *cold shock* diakibatkan adanya stres oksidatif oleh *Reaction Oxygen Soecies* (ROS). Pembentukan ROS dapat diminimalkan dengan menambahkan antioksidan pada pengencer semen (Pratiwi, Yusuf, Arifiantin dan Sumantri, 2019). Antioksidan yang digunakan pada penelitian ini adalah genistein. Genistein memiliki beberapa fungsi sebagai inhibitor, angiogenesis, peroksidasi lemak, antioksidan, dan senyawa anti kanker. Sifat antioksidan dan anti-inflamasi genistein dapat memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan penurunan spesies oksigen reaktif (ROS) yang signifikan.

Penambahan pengencer dalam semen berfungsi sebagai penunjang kehidupan spermatozoa selama penyimpanan suhu dingin serta penambah agar bisa digunakan menginseminasi banyak betina. Salah satu pengencer yang digunakan yaitu tris aminomethan kuning telur. Tris aminomethan dan kuning telur merupakan pengencer krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya *cold shock* selama pendinginan. Selain kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler, juga dibutuhkan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler untuk melindungi sel dari dalam. Proses ekuilibrasasi dan *thawing* yang digunakan pada semen beku sangat mempengaruhi kualitas semen. Ekuilibrasasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh semen untuk beradaptasi dengan pengencer, sehingga kematian yang berlebihan dapat dihindari dalam proses pembekuan. Pada penelitian ini akan dilakukan lama ekuilibrasasi suhu dingin selama 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam. *Thawing* merupakan proses mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dalam durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Pada penelitian ini lama *thawing* yang diamati adalah 0,5 menit, 1 menit dan 1,5



menit. Proses ini harus dilakukan dengan tepat sebab dapat menyebabkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku (Muhammad Salim, Susilawati dan Wahyuningsih, 2012).





Gambar 1. Kerangka Pikir



1.6. Hipotesis

- Lama ekuilibrasi suhu dingin berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.
- Lama *Thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.
- Lama Ekuilibrasi suhu dingin dan *Thawing* berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi PO dan Pengembangan Sapi PO

Sapi potong memiliki banyak manfaat sehingga banyak dijadikan hewan ternak. Sapi PO adalah salah satu sapi potong terbanyak yang ditenakkan dan dikonsumsi di Indonesia. Saat ini kebutuhan sapi potong lebih tinggi daripada ternak yang dihasilkan. Oleh karena itu diperlukan adanya pengembangan peternakan sapi potong. Sapi PO terkenal sebagai sapi pedaging dan sapi pekerja, memiliki tenaga yang kuat dan aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak (Widjaja, Akhdiat dan Purwasih, 2017). Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan sapi hasil pemuliaan melalui sistem persilangan dengan *grading up* sapi Jawa dan Sumba Ongole (SO) dari setengah abad yang lalu (Astuti, 2004). Sapi PO ini termasuk kedalam sapi *Bos Indicus* atau sapi Zebu. Menurut Ridho (2017) sapi jenis *Bos Indicus* atau sapi Zebu merupakan sapi yang berpuncuk, dimana awal sejarahnya berkembang di India. Kemudian menyebar diberbagai negara, termasuk negara tropis seperti Indonesia. Sejak awal pembentukannya hingga saat ini, bangsa sapi PO sudah diyakini menjadi salah satu bangsa sapi yang baik untuk dikembangkan dan dilestarikan.

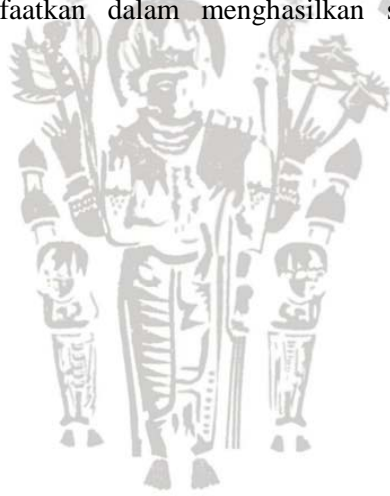


Gambar 2. Pejantan Sapi Peranakan Ongole (SNI, 2015)

Ciri sapi PO adalah warna kulit putih kelabu diseluruh tubuh dan bagian kepala, leher, serta lutut berwarna gelap sampai hitam (Gambar 2). Ukuran tubuh sapi PO yang besar dengan kepala relatif pendek, dahi cembung, bertanduk pendek, berpuncuk besar, bergelambir dan mempunyai lipatan-lipatan dikulit bawah perut serta leher (Astuti, 2002). Keunggulan Sapi Peranakan Ongole yaitu mampu beradaptasi terhadap berbagai kondisi lingkungan, cepat bereproduksi, tempramen bagus, tahan terhadap ekto dan endoparasit, pertumbuhan relatif cepat, presentase karkas dan kualitas daging baik, aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak, jantannya memiliki kualitas semen yang baik. Sapi PO memiliki performa bobot badan dikisaran 450-600 kg per ekor (BPTU-HPT Sembawa, 2015).

Pengembangan sapi PO memiliki posisi strategis dalam pembangunan ketahanan pangan nasional. Karena ternak sapi PO merupakan salah satu kontributor terbesar produksi daging nasional, mengingat 98% penyediaan sapi potong dan daging sapi dalam negeri selama ini berbasis peternakan rakyat (Tulung, Pendong, dan B. Tulung, 2020). Dalam upaya

meningkatkan produktivitas sapi PO maka pejantan sapi PO dikembangkan dengan cara meningkatkan mutu genetik sapi PO melalui Inseminasi Buatan (IB). Pengembangan ini berpotensi untuk dimanfaatkan dalam menghasilkan sapi potong yang unggul.



2.2. Inseminasi Buatan

Inseminasi Buatan (IB) adalah salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil untuk 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. Inseminasi Buatan ini sangat kontras dengan keberhasilan transfer embrio didalam perbaikan mutu genetik. Perbaikan mutu genetik menggunakan IB pada sapi potong dapat digunakan sebagai progeneri tes untuk menghasilkan pejantan unggul yang dapat dimanfaatkan menghasilkan spermatozoa (Kusumawati, 2017).

Secara umum teknik IB terdiri dari dua metode yakni metode inseminasi *transervikal* dan metode *rectovaginal*. Inseminasi buatan terbukti dapat mencegah atau menurunkan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh perkawinan alam, dapat melindungi dari penyebaran penyakit yang disebabkan oleh kontak fisik (perkawinan) tetapi juga penyebaran patogen meliputi berbagai mikroorganisme protozoa, virus dan bakteri yang berifat parasit dan patogen. Kelemahan dari IB jika tidak dikelola dengan baik adalah bila seleksi pejantan salah maka bisa menyebarkan sifat jelek dan membutuhkan keterampilan yang tinggi dari Balai Inseminasi Buatan, penyimpanan selama transport serta dapat menghilangkan sifat bangsa lokal dalam waktu yang cepat (Susilawati, 2013). Keberhasilan program IB dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain: ternak betina itu sendiri, keterampilan Inseminator dalam mendeposisikan semen, ketepatan waktu IB, deteksi berahi, handling semen dan kualitas semen terutama motilitas pasca *thawing* atau *post thawing motility* (Susilawati, Isnaini, Yekti, Nurjanah, Errico dan Da costa, 2016).



2.3. Penampungan Semen

Seekor sapi pejantan memiliki peranan sangat penting dalam keberhasilan terjadinya kebuntingan pada sapi betina. Pejantan harus dapat menghasilkan spermatozoa dengan tingkat kesuburan dan libido yang tinggi serta stamina fisik yang baik sehingga dapat mengawini induk sapi hingga terjadi kebuntingan (Luthfi, Susilawati, Isnaini, 2015). Kualitas semen setiap kali penampungan berbeda beda hal ini disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor yang mempengaruhi produksi semen antara lain genetik, suhu, musim dan frekuensi ejakulasi (Amalia, 2019).

Penampungan semen dapat dilakukan dengan menggunakan 3 metode yaitu: 1. Massage (pemijatan/pengurutan) 2. Vagina Buatan 3. Elektroejaculator. Metode massage digunakan pada unggas, babi dan yang lainnya, sedangkan vagina buatan digunakan untuk penampungan semen ternak secara rutin dan elektroejaculator digunakan untuk hewan langka dan ternak yang tidak dapat ditampung menggunakan vagina buatan misalkan karena kecelakaan (Susilawati, 2011). Vagina buatan merupakan alat yang sering digunakan untuk menampung semen. Alat ini terdiri dari silinder karet kuat dengan lapisan karet bagian dalam, rongga diantara silinder dan lapisan dalam, rongga tersebut diisi air dengan suhu yang dapat diatur (40-45° C) dengan tekanan seperti keadaan alami dengan menggunakan alat bantu kandang jepit sebagai tempat pengikat betina perangsang dan tali tambang sebagai alat bantu dalam *handling* pejantan (Dewi, Ondho dan Kurnianto, 2012).

Semakin tinggi frekuensi ejakulasi maka semakin rendah volume semen yang dihasilkan akan tetapi motilitas cenderung meningkat, penurunan motilitas disebabkan oleh pH yang bersifat basa. Pemakaian pejantan seharusnya dibatasi agar kualitas semen tetap terjaga dengan baik. Penampungan semen

dilakukan dua kali seminggu, pejection yang sering ditampung dengan frekuensi yang tinggi dapat menyebabkan penurunan pada libido, volume dan konsentrasi spermatozoa (Adhitama, 2018).

2.4. Evaluasi Kualitas Semen

Semen segar yang dihasilkan pejection-pejection diamati dan diuji kualitasnya baik secara makroskopis dan mikroskopis. Pengujian makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi dan pH dan secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa (Muada, Papatungan, Hendrik dan Turangan, 2017)

2.4.1. Makroskopis

Uji kualitas semen secara makroskopis dilakukan segera setelah semen ditampung agar kualitas semen tidak menurun drastis. Pemeriksaan makroskopis merupakan pemeriksaan yang meliputi warna, PH dan konsistensi dan volume. Pada umumnya semen sapi berwarna putih kekuning-kuningan atau hampir seputih susu, hal ini karena adanya riboflavin di dalam semen. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Semakin keruh biasanya jumlah spermatozoa permililiter semen semakin banyak. PH semen sapi berkisar antara 6,4-6,8 (Susilawati, 2013).

Teknik pemeriksaan makroskopis meliputi: 1) Volume semen, semen yang sudah ditampung pada 1 kali penampungan diukur dengan melihat langsung pada tabung berskala. 2) pH, diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar dengan menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter kemudian dilihat PH-nya pH semen diuji dengan menggunakan pH BTB paper. 3) Warna, dilihat pada tabung penampung (abnormal = mengandung air, darah, rambut



preputium, nanah air kotor dan bau tidak normal). Semen normal berwarna putih kekuningan atauputih susu. 4) Konsistensi, konsistensi berkorelasi dengan konsentrasi spermatozoa. Penilaian nya 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) (Widhyari, Esfandiari., Wijaya, Wulansari, Widodo, dan Maylina, 2015).

2.4.2. Mikroskopis

Uji mikroskopis adalah uji kualitas semen yang menggunakan mikroskop. Parameter motilitas uji mikroskopis yaitu persentase spermatozoa yang motil dalam keadaan normal adalah 70-90 motil, persentase spermatozoa yang bergerak progresif, kecepatan spermatozoa (*velocity*) dengan dasar skala 1-2 (cepat), umur spermatozoa (*longevity*) semen segar dengan suhu ruang ($20-25^{\circ}\text{C}$) sedangkan semen yang diencerkandapat menggunakan suhu ruang atau *refrigerator* $4-6^{\circ}\text{C}$ (Susilawati, 2013).

Motilitas massa spermatozoa dilakukan setelah semen diencerkan atau setelah *freezing* dan *thawing*. Motilitas massa diamati dengan menggunakan mikroskop tanpa cover glass dengan perbesaran 400 kali atau 100 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C . Penilaian gerak massa spermatozoa dikategorikan menjadi beberapa macam antara lain: sangat baik (+++), baik (++), kurang baik (+) dan buruk (0). Motilitas individu spermatozoa dikatakan sangat baik apabila terlihat gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif seperti gumpalan awan hitam pekat waktu hujan yang bergerak cepat, berpindah-pindah tempat. Baik apabila terdapat gelombang-gelombang tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban. Kurang baik apabila tidak terlihat gelombang melainkan gesekan-gesekan individual aktif progresif. Buruk apabila



hanya sedikit ada gesekan-gesekan individual (Susilawati, 2011). Semen yang berkualitas baik memiliki standart gerakan massa 2+ keatas dan motilitas individu $\geq 70\%$ (Lestari, Tagama dan Saleh, 2013).

Konsentrasi spermatozoa merupakan jumlah spermatozoa yang terkandung dalam satu ml ejakulat. Pentingnya penilaian konsentrasi semen ini karena digunakan dalam menentukan jumlah pengenceran. Tinggi rendahnya konsentrasi semen yang dihasilkan pejantan dipengaruhi oleh intensitas curah hujan. Semakin tinggi curah hujan maka konsentrasi yang dihasilkan semakin rendah, sebaliknya semakin rendah curah hujan konsentrasi yang diperoleh semakin tinggi (Aisah, Isnaini dan Wahjuningsih, 2017). Perhitungan konsentrasi spermatozoa dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan spectrophotometer yang telah di standardisasi (Zamuna, Susilawati, Ciptadi dan Marjuki, 2015). Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer dengan cara sampel yang telah diencerkan dengan pipet haemocytometer diisikan ke dalam kamar hitung Neubauer yang telah ditutup menggunakan gelas penutup. Perhitungan dilakukan pada 5 kotak besar, konsentrasi yang didapatkan yaitu $Y \times 5 \times 10^6$. Y = jumlah spermatozoa pada 1 kotak besar (Melita, Dasrul dan Adam, 2014).

Abnormalitas terdiri dari 2 jenis yaitu abnormalitas primer meliputi: kepala besar (*macrocephalic*), kepala kecil (*microcephalic*), kepala dua (*double cephalic*), kepala tak berkembang (*undeveloped cephalic*), kepala bulat (*round cephalic*), kepala pipih (*narrow cephalic*), leher bercabang dua (*double midpiece*), leher patah (*broken midpiece*), leher zigzag (*kink midpiece*), ekor bengkok (*bent tail*) dan ekor melingkar (*coil tail*). Abnormalitas sekunder meliputi ekor terputus, kepala saja dan *cytoplasmic droplet* (Husin, Suteky dan Kususiayah, 2007). Abnormalitas merupakan keadaan

spermatozoa yang mengalami suatu kecacatan pada salah satu atau sebagian dari anggota tubuhnya. Abnormalitas primer dapat terjadi sewaktu proses spermatogenesis maupun dikarenakan adanya gangguan testikuler. Abnormalitas sekunder terjadi setelah spermatozoa meninggalkan tubuli seminiferi menuju saluran reproduksi jantan (Lestari, Ihsan dan Isnaini, 2014).

Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa (Lestari, Ihsan dan Isnaini, 2014). Viabilitas spermatozoa adalah faktor yang menentukan keberhasilan inseminasi buatan, dikarenakan hanya spermatozoa yang mampu bertahanlah yang akan sampai pada organ reproduksi betina dalam proses fertilisasi. Tingginya persentase viabilitas spermatozoa diharapkan lebih mampu bertahan untuk memfertilisasi ovum (Lukman, Busono, Wahjuningsih and Suyadi, 2014). Viabilitas spermatozoa diamati dengan larutan pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa diklasifikasikan berdasarkan tidak berwarna (hidup) dan merah (mati). Spermatozoa yang mati akan berwarna merah karna menyerap warna eosin, membran sel spermatozoa tidak permeabel terhadap pewarna eosin, sedangkan negrosin memberi latar berwarna biru sampai hitam. Persentase normal spermatozoa dihitung sampai dengan jumlah total 200 spermatozoa per slide.

2.4.3. *Hypo Osmotic Swelling Test (HOS Test)*

Integritas membran Spermatozoa dievaluasi dengan *Hypo-osmotic Swelling Test (HOST)*. Spermatozoa yang melingkar menunjukkan respon spermatozoa yang normal. Dua ratus spermatozoa dihitung per slide dari 4 bidang pandang mikroskop yang berbeda dan dinyatakan dalam persentase (Kaka, Haron, Yusoff, Yimer, Khumran, Memon, Sarsaifi dan Ebrahim, 2017). Prinsip HOS tes adalah melihat status



membran, karena integritas membran berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa (Susilawati, 2013). Integritas Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa dengan metode *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOST) yaitu evaluasi respon spermatozoa (*swelling* dan *non swelling*) pada kondisi hiposmotik. Spermatozoa yang mempunyai membran rusak atau membran yang tidak aktif tidak dapat menyesuaikan tekanan osmosisnya sehingga tidak menggelembung, sedangkan membran yang masih berfungsi terjadi pembengkakan, pengembangan atau pembengkakan ekor spermatozoa (Rodiah, Yuliani, Dradjat dan Arman, 2015).

Membran sel merupakan bagian terluar yang membatasi bagian dalam dengan lingkungan luar sel dan berperan sebagai filter pada pertukaran zat-zat intraseluler dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2000 dalam Ba'a La Ode, 2010). Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup spermatozoa yang dihasilkan. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Membran plasma utuh dapat dilihat dengan menggunakan larutan hiposmotik. Prinsip dari *hypoosmotic swelling test* (HOST-Test) adalah memaparkan larutan hiposmotik kedalam semen sampai tercapai equilibrium antara sitoplasma dengan lingkungan ekstraseluler. Membran plasma yang utuh akan ditandai dengan melengkungnya ekor spermatozoa sedangkan spermatozoa dengan membran plasma yang rusak tidak terlihat pembengkakan ekor karena membran plasma tidak dapat mempertahankan larutan hiposmotik.



Evaluasi untuk melihat MPU dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali, dengan menghitung minimal 200 sel spermatozoa. MPU diamati dengan memasukkan sampel semen ke dalam larutan *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOS tes) (Ferlianthi, 2016). Pengamatan membran plasma utuh dilakukan melalui pengamatan preparat campuran semen dengan lautan hipoosmotik yang ditutup dengan gelas penutup di bawah mikroskop *phase* kontras. Spermatozoa dengan membran yang masih utuh akan menahan cairan hipoosmotik di dalam sel, sehingga ekornya terlihat melingkar atau bengkok, sedangkan spermatozoa dengan ekor yang lurus menunjukkan membran plasma telah mengalami kerusakan (Setiadi, Utama, Situmorang dan Mulyawan, 2000).

2.5. Pengenceran Semen

Semen yang telah ditampung harus segera mendapatkan penanganan jika tidak akan menyebabkan kematian yang lebih cepat. Pengenceran semen dapat meningkatkan efisiensi semen pejantan unggul karena dapat digunakan untuk IB beberapa ekor ternak betina. Semen yang telah mengalami proses pengenceran dapat disimpan dalam lemari es suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ dan dibekukan pada suhu -196°C (Amalia, 2019). Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk menyediakan sumber energi dan menjamin kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan (preservasi) atau pembekuan (kriopreservasi). Syarat penting bahan pengencer sperma adalah mampu menyiapkan zat-zat makanan sebagai sumber energi, mencegah terjadinya *cold shock* sewaktu preservasi maupun kriopreservasi, menjaga pH dan tekanan osmotik yang sama dengan sperma, bersifat isotonis, mengandung buffer, sumber energi, menghambat pertumbuhan bakteri (Wulandari, 2017).

Beberapa contoh pengencer yang sering digunakan yaitu tris aminomethan, kuning telur, air kelapa atau susu skim



disamping itu juga perlu ditambahkan gliserol ataupun etilen glikol. Pengenceran juga dapat memberi perlindungan terhadap *cold shock* yang terjadi saat pembekuan dan sebagai penyanggah untuk menjaga kestabilan pH (Mumu, 2009). Syarat penting pengencer adalah memiliki kemampuan preservasi yang tinggi, mengandung unsur dan sifat kimiawi yang hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat yang bersifat racun bagi spermatozoa dan saluran kelamin betina, tetap dapat mempertahankan daya fertilitas spermatozoa, tidak terlalu kental sehingga tidak menghambat fertilisasi (Susilawati, 2013). Bahan pengencer yang baik yaitu mampu mencegah penurunan spermatozoa sehingga mampu memperpanjang masa simpan. Semen yang disimpan dalam suhu 5°C (disimpan dalam *refrigerator*) maupun pada suhu -196°C (nitrogen cair) membutuhkan pengencer yang mampu mempertahankan kualitas semen selama proses penyimpanan (Susilawati, 2013).

Bahan yang dapat digunakan sebagai media pengencer antara lain Tris aminomethan kuning telur. Pengencer ini memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan baginya, antara lain yaitu seperti fruktosa, laktosa, rafinosa, asam-asam amino dan vitamin dalam kuning telur sehingga spermatozoa dapat memperoleh sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk motilitasnya (Susilawati, 2011). Pengencer Tris aminomethan kuning telur terdiri dari tris aminomethan, asam sitrat, laktosa/levulosa, fruktosa, raffinosa, penicillin dan streptomycin. Fungsi dari masing masing bahan tersebut yaitu:

- 1) Tris aminomethan kuning telur sebagai buffer untuk mencegah perubahan pH akibat metabolisme spermatozoa berupa asam laktat dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit.
- 2) Asam sitrat, sebagai buffer pengikat butir-butir lemak kuning telur dan mempertahankan tekanan



osmotik dan keseimbangan elektrolit. 3) Laktosa/levulosa, sebagai sumber energi spermatozoa. 4) Kuning telur, sebagai pelindung spermatozoa terhadap *cold shock* dan sumber energi spermatozoa. 5) Raffinosa, sebagai sumber energi dan mencegah efek *lethal* pembekuan. 6) Penicillin streptomycin, mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan meningkatkan daya tahan spermatozoa (Susilawati, 2000).

Kuning telur mengandung lipoprotein dan *lechitin* yang bekerja melindungi spermatozoa. Kuning telur mengandung glukosa yang lebih efektif digunakan oleh spermatozoa, protein, dan memiliki viskositas yang menguntungkan bagi spermatozoa. Kuning telur digunakan sebagai ekstraseluler krioprotektan yang terdapat pada telur ayam ras atau ayam buras dan itik pada umur kurang dari 3 hari agar kualitas nya masih baik (Susilawati, 2013). Fosfolipid, kolesterol dan *low density* lipoprotein yang terkandung didalam kuning telur berperan melindungi spermatozoa terhadap *cold shock* selama proses pendinginan (Metahine, Burhanuddin dan Marawali, 2014).

2.6. Ekuilibrasi, Pembekuan dan Penyimpanan Semen

Pembekuan adalah proses pendinginan semen setelah diencerkan. Semen beku yaitu semen yang telah mengalami proses pengenceran kemudian dibekukan di bawah suhu 0°C atau titik beku air. Pembekuan semen yaitu salah satu usaha untuk memperlama daya hidup spermatozoa, melalui proses pengawetan dan penyimpanan semen sehingga dapat digunakan untuk jangka panjang dengan cara direndam di nitrogen cair - 196°C pada kontainer (Arifiantini, Yusuf dan Yanti, 2005). Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel sehingga sel dapat disimpan dalam waktu yang lama. Pembekuan meliputi 2 tahap yaitu *pre freezing* dan *freezing* (Fahlevi, 2019)



Pembekuan adalah proses pengeringan fisik di bawah titik beku air. Pembekuan terdiri dari 2 metode yaitu pendinginan dengan suhu 5°C dilakukan pada saat di *cool top* dan proses pembekuan dengan nitrogen cair -196°C (Susilawati, 2013). Pembekuan dengan menggunakan nitrogen cair lebih sering digunakan karena suhunya yang sangat rendah dan dapat menyimpan semen dalam jangka waktu yang lama (Fahlevi, 2019). Suatu larutan jika dibekukan maka zat pelarutnya berupa air akan membeku dan dapat terbentuk kristal-kristal es. Kristal-kristal yang terdapat pada sel spermatozoa selama pembekuan dapat merusak secara mekanik, sedangkan adanya jumlah elektrolit yang berlebihan dapat melarutkan selubung lipoprotein pada dinding sel spermatozoa, sehingga pada saat *thawing*, permeabilitas sel akan berubah dan mengakibatkan kerusakan spermatozoa (Mumu, 2009).

Penambahan gliserol dalam pengencer dapat melindungi sperma terhadap efek-efek mematikan (efek-efek *lethal*) selama proses pembekuan. Selain itu, gliserol juga dapat berdifusi ke dalam sel-sel sperma dan dapat di metabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktosa. Gliserol dapat memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan sehingga mampu menghambat kerusakan membran sel secara mekanis pada waktu penurunan suhu (*cooling rate*). Penambahan gliserol dilakukan 1-2 jam sebelum di ekulibrasi hal ini dilakukan agar terjadi penyesuaian suhu saat gliserolisasi. Ekuilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh semen untuk beradaptasi dengan pengencer, sehingga kematian yang berlebihan dapat dihindari dalam proses pembekuan (Eriani, Sari, Ihdina dan Rosnizar, 2017). Penyimpanan (*storage*) dilakukan dengan cepat saat dipindahkan ke kontainer penyimpanan straw. Straw disimpan dalam nitrogen cair dapat bertahan hingga 20 tahun lebih

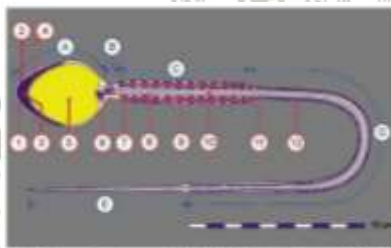


dengan setiap 6 bulan sekali ditambahkan nitrogen cair secara kontinyu (Susilawati, 2013).

2.7. Reaksi Biogemis selama Penyimpanan

2.7.1. Struktur Membran Spermatozoa

Membran plasma merupakan bagian spermatozoa yang sangat berperan dalam proses fertilisasi. Rusaknya membran plasma utuh biasanya disertai rusaknya tudung akrosom, sehingga menyebabkan keluarnya enzim-enzim yang diperlukan selama proses fertilisasi. Kerusakan membran selama pembekuan spermatozoa berhubungan erat dengan komposisi asam lemak membran yang bersangkutan (Herdis, 2015).



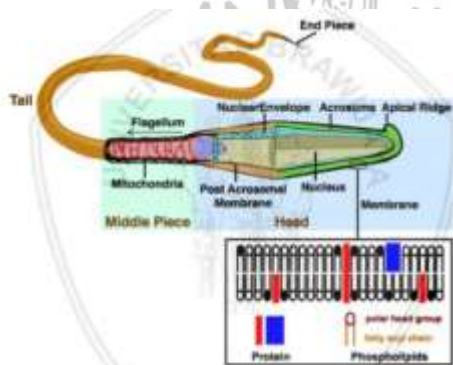
- | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| 1. Plasma membrane | 7. Tail of the distal centriole | A. Kepala |
| 2. Membran inti | 8. Tail outer longitudinal fin | B. Lelene |
| 3. Mitochondria | 9. Mitochondria | C. Mid piece |
| 4. organelan akrosom di dalam | 10. Akrosom | D. Penutup penutup |
| 5. Nukleus | 11. Akilis | E. Euploid |
| 6. sentriol posterior | 12. Basal fin | |

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

Struktur dari bagian kepalanya sampai ekor dilapisi oleh membran dengan struktur yang sangat kompleks dalam susunan yang teratur dan memiliki peran yang spesifik pada permukaannya (Gambar 3). Membran plasma spermatozoa diperkirakan terdiri dari 300 protein yang berbeda dan sekitar 92% protein membran ekstraseluler pada semua sel eukariotik berupa glikokonjugat (Mumu, 2009).



Spermatozoa harus normal secara morfologi dan memiliki motilitas yang tinggi untuk dapat membuahi ovum (Gambar 4). Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian lain yang dapat memberikan indikator adanya kerusakan pada bagian kepala spermatozoa, diantaranya dengan melihat viabilitas dan melihat keutuhan membran plasma spermatozoa. Evaluasi viabilitas spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin digunakan untuk mengevaluasi kerusakan membran plasma dan membentuk warna merah muda keunguan, sedangkan nigrosin akan mewarnai latar bidang yang dievaluasi. Pada saat pencampuran spermatozoa dengan eosin negrosin, sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menyerap warna karena permeabilitas dinding sel meningkat (Aida, 2019).



Gambar 4. Struktur membran spermatozoa (Aida, 2019)

Spermatozoa dari spesies yang mempunyai rasio asam lemak tak jenuh : asam lemak jenuh yang tinggi pada fosfolipid membran cenderung lebih sensitif terhadap cekaman dingin. Kerentanan terhadap cekaman dingin juga berhubungan dengan rasio kolesterol : fosfolipid, semakin rendah rasionya, maka semakin rentan terhadap cekaman dingin. Diketahui bahwa



molekul-molekul lipid pada membran sel tersusun dari tiga jenis yakni fosfolipid, kolesterol dan glikolipid (Herdis, 2015).

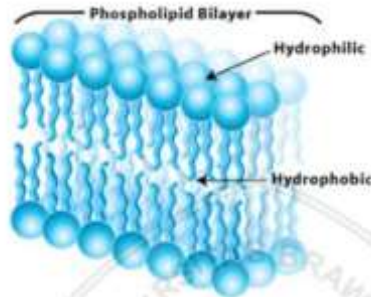
2.7.2. Lipid Bilayer Membran

Membran sel dikenal dengan nama membran biologis, meliputi membran plasma atau plasma lemma dan membran sejumlah organel yang terdapat di dalam sel. Hingga saat ini dikenal dengan sejumlah model membran, model membran yang dianut saat ini adalah model membran menurut Singer dan Nicolson atau model membran mosaik cair. Membran plasma membatasi isi sel dari lingkungan luarnya. Secara umum membran sel terdiri dari senyawa-senyawa lipida, protein dan karbohidrat (Kusumawati and Leondro, 2015).

Membran sel terdiri atas lipida, protein dan karbohidrat. Rasio antara lipida, protein dan karbohidrat tergantung pada tipe sel dan spesiesnya. Umumnya lipida kurang lebih 40%, protein 40%, karbohidrat 1-10% dan air $\pm 20\%$. Lipida membran terdiri atas dua lapisan terorientasi ke arah luar dan lapisan yang lain terorientasi ke arah sitoplasma. Protein pada membran sel merupakan protein globuler. Protein-protein tersebut terdistribusi secara tidak merata pada membran sel. Sebagian protein membran terletak pada bagian perifer dan sebagian yang lainnya tertanam pada setengah lapisan lipida atau tertanam menembus kedua lapisan lipida. Bagian karbohidrat membran biasanya terikat pada lipida dan sebagian yang lainnya terikat pada protein (Vaya, 2001). Lipida pada membran sel terdiri atas dua lapisan. Setiap molekul lipida bersifat amfifatik. Lipida amfifatik mengandung komponen yang bersifat hidrofobik (non polar/tidak suka air) dan komponen yang bersifat hidrofilik (polar/suka air). Lipida membran terdiri dari 4 kelas utama yaitu fosfolipida, sfingolipida, glikolipida dan sterol. Keempat kelas lipida tersebut bersifat amfifatik (Fitriyati, 2019).



Lipid bilayer adalah hidrofobik efek, yaitu ketidakmampuan menjadi ikatan hidrogen dengan air (Gambar 5). Struktur semua lipid memiliki karakteristik yang khas, yakni lipid tersebut gliserol dengan 3 atom karbon sebagai tulang punggung. Pada 2 dan 3 atom tersebut akan teresterifikasi asam lemak dengan 16 atau 18 atom karbon. Semua asam lemak bersifat hidrofobik (takut air), sedangkan gliserol dengan atom oksigennya lebih bersifat hidrofilik (suka air), karena oksigen dapat membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air. Pada atom karbon gliserol yang tidak mengikat asam lemak akan berasosiasi dengan molekul lain yang bersifat hidrofilik karena molekul tersebut bermuatan listrik atau mengandung banyak atom oksigen. Molekul yang mengandung bagian hidrofilik dan hidrofobik yang jelas ini disebut molekul-molekul amfipatik.



Gambar 5. Lipid Bilayer (Fitriyati, 2019)

2.7.3. Radikal Bebas (Reactive Oxygen Species)

Pembekuan sel dapat menyebabkan terbentuknya kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit serta bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal es intraseluler dapat merusak sperma secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein membran sel sperma sehingga permeabilitas membran sel sperma akan



mengalami perubahan dan menyebabkan kematian sel (O'Connell, McClure and Lewis, 2002). Produksi ROS pada sperma adalah sebagai hasil proses fisiologi normal untuk reaksi akrosom dan kapasitas sperma. Namun produksi ROS berlebih pada sperma akan menjadi bahaya diakibatkan oleh efek merugikan pada jumlah sperma fungsional (Isnani, Rahayu, Pramana, dan Soewondo, 2014).

Membran spermatozoa mamalia rentan teroksidasi oleh keberadaan ROS dikarenakan kaya akan asam lemak tak jenuh. Reaksi rantai peroksidasi lipid ini berlangsung terus menerus (autokatalitik) karena setiap reaksi menghasilkan radikal bebas (Gambar 6) baru yang mengakibatkan reaksi peroksidasi lipida baru hingga akhirnya merusak seluruh membran plasma sel spermatozoa. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan terjadinya perubahan fungsi membran yang berakibat terhadap penurunan metabolisme sperma, morfologi sperma, motilitas sperma dan fertilitas hairatul (Isnani dkk, 2014). Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang diakibatkan faktor stress, radiasi, polusi lingkungan dan suhu yang menyebabkan sistem pertahanan tubuh tidak memadai, sehingga tubuh memerlukan tambahan antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas (Harmita, 2014).



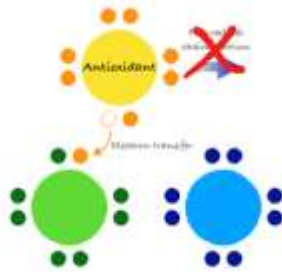
Gambar 6. Aktivitas Radikal Bebas (Adcock, 2019)

Radikal bebas berpartisipasi aktif dalam proses yang berbeda-beda, tidak hanya sebagai agen yang merusak, tetapi juga sebagai berperan dalam berbagai fungsi normal organisme hidup. Merupakan hasil berbagai proses metabolik dan fisiologik, dimana produksi yang berlebihan menyebabkan stress oksidatif (Tafari, Ciani, Luigi Iorio, Esposito and Cocchia, 2015). Kepekaan spermatozoa terhadap kerusakan oksidatif dikaitkan dengan konsentrasi tinggi asam lemak tak jenuh dalam membran fosfolipid, dan terbatasnya kapasitas antioksidan spermatozoa sama dengan kemampuan spermatozoa membentuk ROS (Aitken, 1999). Salah satu faktor penting akibat oksidatif stress adalah perubahan membran spermatozoa dan DNA (Aiken dan Krausz, 2001).

2.8. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan berkerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarti, 2010). Antioksidan yaitu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Antioksidan dapat bekerja sebagai anti karsiogenik dengan cara menurunkan tingkat stress oksidatif. Stress oksidatif yaitu dimana keadaan dimana radikal bebas oksigen dibentuk dalam jumlah banyak sehingga tubuh tidak mampu meniadakan efeknya dan akhirnya menimbulkan kerusakan jaringan (Ratnani, 2017).





Gambar 7. Reaksi Antioksidan (Adcock, 2018)

Reaksi Oksidasi (Gambar 7) bersifat merugikan karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas membran plasma sel. Pratama dan Busman (2020) menyatakan bahwa reaksi oksidasi akan menghasilkan radikal bebas (OH). Radikal bebas ini akan menyerang dan bereaksi dengan molekul-molekul lain di sekitarnya sehingga menimbulkan reaksi berantai yang membahayakan. Apabila ditambahkan dengan antioksidan, radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan membentuk ikatan stabil dan menghasilkan molekul yang tidak berbahaya.

Reaksi tanpa adanya antioksidan:

Reaktan \rightarrow Produk + OH

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

Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya.

Reaksi dengan adanya antioksidan:

Reaktan \rightarrow Produk + OH

OH + antioksidan \rightarrow Produk yang stabil

Penambahan antioksidan pada bahan pengencer merupakan upaya untuk meminimalkan kerusakan membran spermatozoa akibat peroksidasi lipid selama proses pendinginan. Reaksi oksidasi yang berlebihan sangat



membahayakan kehidupan spermatozoa karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas sel.

2.9. Pengaruh Genistein sebagai Antioksidan

Proses pengenceran dan pembekuan semen menghasilkan pembentukan reaksi oksidatif berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menurunkan kualitas semen. Pembentukan ROS dapat diminimalkan dengan menambahkan antioksidan pada pengencer semen (Pratiwi, Yusuf, Arifiantin dan Sumantri, 2019). Antioksidan memiliki sifat mudah teroksidasi sehingga mampu berikatan dengan cepat dengan ROS sebelum ROS berikatan dengan lipid bilayer. Antioksidan atau senyawa penangkap radikal bebas merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas atau suatu bahan yang berfungsi mencegah sistem biologi tubuh dari efek yang merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi yang menyebabkan oksidasi yang berlebihan (Prakash, 2001).

Prihantoko, Yuliasuti, Haniarti, Kusumawati, Widayati, Budiyanto (2020) menyatakan bahwa kedelai merupakan salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen cukup banyak dibandingkan dengan tanaman lain. Di dalam minyak kedelai terkandung enam asam lemak dan isoflavon berupa genistein dan daidzein yang termasuk ke dalam jenis fitoestrogen. Senyawa isoflavon yang memiliki aktifitas estrogenik atau dapat bekerja dengan reseptor estrogen, sedangkan genistein dapat menghambat pembelahan sel. Berkaitan dengan kondisi tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mencari senyawa yang dapat digunakan sebagai agen antioksidan untuk mengatasi efek ROS pada kriopreservasi spermatozoa.

Genistein memiliki beberapa fungsi sebagai inhibitor, angiogenesis, peroksidasi lemak, antioksidan, dan senyawa anti kanker. Sifat antioksidan dan anti-inflamasi genistein dapat memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan



penurunan spesies oksigen reaktif (ROS) yang signifikan. Dengan demikian, memiliki pengaruh langsung terhadap fungsi sel spermatozoa dewasa. Pengaruh genistein dapat mendukung seluruh proses reproduksi. Kemampuan Genistein untuk menghambat, angiogenesis, peroksidasi lipid, serta sifat antioksidan genistein, mendukung kemungkinan tersebut bahwa Genistein mungkin memiliki efek antikanker. Antioksidan dan sifat anti-inflamasi genistein dan menunjukkan bahwa genistein dimodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan pengurangan oksigen reaktif (ROS) yang signifikan (Jalili, Ahmadi, Roshankhah and Salahshoor, 2016).

2.10. Thawing

Thawing adalah melelehkan atau mencairkan kembali semen yang telah dibekukan. *Thawing* dilakukan untuk mengetahui kualitas spermatozoa setelah dibekukan. *Thawing* dilakukan pada suhu 37-38°C selama 7 detik (Zenichiro, Herliantien dan Sarastina, 2002). *Thawing* juga dapat dilakukan pada suhu 37°C selama 45 detik (Ax, Dally, Didion, Lenz, Love, Varner, Hafez and Bellin, 2008). Sedangkan menurut Hopkins and Evans (2003) menyatakan bahwa *thawing* dapat dilakukan menggunakan air suhu 35°C selama 30-60 detik. Berdasarkan berbagai pendapat tersebut maka perlu diketahui pengaruh lama *thawing* yang berbeda antara 7, 15, dan 30 detik pada suhu 37°C berpengaruh terhadap kualitas semen beku.

Teknik *thawing* semen beku sangat penting untuk diperhatikan karena merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas semen, apabila teknik *thawing* yang digunakan tidak tepat dapat menyebabkan kerusakan pada sel spermatozoa sehingga akan menurunkan kualitas semen beku (Adnyani, Sumardhani dan Sarini, 2018). Evaluasi motilitas spermatozoa *post thawing* adalah salah satu parameter yang



banyak digunakan untuk menentukan kualitas semen sapi yang akan digunakan untuk inseminasi buatan. Syarat minimal motilitas individu semen *post thawing* agar semen dapat dipergunakan dalam inseminasi buatan adalah 40% (Garner dan Hafez, 1993). Proses fertilisasi membutuhkan spermatozoa motil sekitar sepuluh juta spermatozoa, maka syarat spermatozoa sebagai standar inseminasi adalah $2,5 \times 10^7$ spermatozoa per straw dengan motilitas 40%. Apabila secara fisik spermatozoa spermatozoa dipisahkan antara populasi motil dan non-motil, prosentasi tinggi spermatozoa motil adalah viabel (hidup), dan populasi *non-motil* adalah *non-viabel* (Susilawati, Srianto dan Hermanto, 2003).



BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru, Tuban. Penelitian dilaksanakan mulai 22 Maret – 22 April 2021.

3.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen segar dari 2 ekor Sapi Peranakan Ongole (*ear tag* sapi 858 dan 0048) yang berada di UPT PT dan HMT karangwaru Tuban. Sapi tersebut berumur 6 – 7 tahun dengan estimasi bobot badan 350 – 400 kg. Sapi tersebut diberi pakan hijauan dan konsentrat sebanyak 10% dari bobot badan. Sapi dipelihara di kandang berbentuk *gable*. Penampungan semen dilakukan oleh tenaga ahli dari BBIB Singosari, Malang. Penampungan dilaksanakan pada hari Senin, 12 April 2021 (dilakukan sekali selama satu minggu) pada pukul 08.00 menggunakan teknik vagina buatan dan betina pemancing. Persyaratan semen segar yang digunakan yaitu semen yang memiliki motilitas individu $\geq 70\%$ dan motilitas massa 2+.

Pengencer Tris-Aminomethan (merk MERCK dari Jerman) didapatkan dari Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang. Kuning telur yang digunakan merupakan kuning telur dari ayam kampung yang diperoleh dari Pasar Besar Malang. Larutan *Hypoosmotic Swelling (HOS) Test* didapatkan dari Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan. Genistein berasal dari *Sigma-Aldrich* dengan nomor *bacth* yang dibeli di Kota Surabaya, Jawa Timur. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikroskop binokular Olympus (CX21), timbangan analitik, tabung reaksi, gelas ukur, *magnetic*

stirer, sentrifuge, spatula, termometer, spuit, mikro pipet, erlenmeyer, gunting, haemocytometer, bunsen, kawat ose, beaker glass, object glass, cover glass, refrigerator, timer, indikator pH, bluetip, pinset, vagina buatan dan tube collection.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium (*experimental laboratory*) menggunakan 3 perlakuan, 3 kelompok dan 5 kali ulangan. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL Faktorial) pola perlakuannya sebagai berikut :

• P1

- ✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (1 jam) + Lama *Thawing* (30 detik) suhu 37°C.
- ✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (1 jam) + Lama *Thawing* (60 detik) suhu 37°C.
- ✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (1 jam) + Lama *Thawing* (90 detik) suhu 37°C.

• P2

- ✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (1,5 jam) + Lama *Thawing* (30 detik) suhu 37°C.
- ✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu



Dingin (1,5 jam) + Lama *Thawing* (60 detik) suhu 37°C.

✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (1,5 jam) + Lama *Thawing* (90 detik) suhu 37°C.

• P3

✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (2 jam) + Lama *Thawing* (30 detik) suhu 37°C.

✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (2 jam) + Lama *Thawing* (60 detik) suhu 37°C.

✓ Pengencer Tris aminomethan kuning telur (30 μM Genistein) + Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin (2 jam) + Lama *Thawing* (90 detik) suhu 37°C.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pelarutan Genistein

Pelarutan 10 mg dilakukan sebagai berikut :

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



Pembuatan larutan genistein dengan dengan konsentrasi yang diinginkan dilakukan sebagai berikut :

- Dihitung kebutuhan larutan genistein (μl atau ml)
- Diambil genistein (μl atau ml) sesuai kebutuhan menggunakan mikropipet atau *sprit* :
- Diletakkan larutan genistein dalam mikrotube atau wadah yang memadai
- Dibekukan genistein dan disimpan pada *freezer* hingga saat akan digunakan

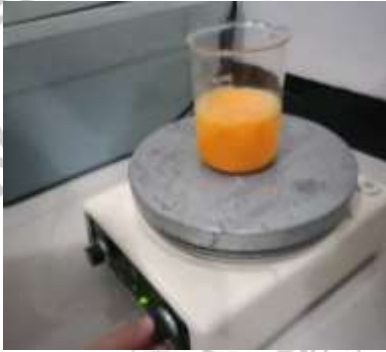
3.4.2. Pembuatan Pengencer tris aminomethan kuning telur + 30 μM Genistein

Pembuatan pengencer dipersiapkan satu hari sebelum dilakukan penampungan semen. Alat yang digunakan pada pembuatan tris aminomethan ini adalah *erlenmeyer* ukuran 250 ml, pipet ukur, timbangan analitik, *beaker glass*, *magnetic stirrer*, *aluminium foil*, panci pemanas, spatula, *refrigerator*, termometer, kompor dan *sprit*. Bahan yang digunakan adalah 80% Tris aminomethan dan 20% kuning telur.

Prosedur pembuatan :

1. Disiapkan alat dan bahan,
2. Dimasukkan 80% tris aminomethan dan 20% kuning telur serta 30 μM genistein ke dalam erlenmeyer
3. Dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*

(Gambar 8) selama 10 – 15 menit



Gambar 8. Pengencer dihomogenkan

4. Disentrifugasi (Gambar 9) dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit



Gambar 9. Pengencer disentrifugasi

5. Diambil supernatan
6. Ditutup *aluminium foil* dan disimpan ke dalam refrigerator selama 24 jam

7. Setelah 24 jam diambil supernatan dan dibuang endapannya

3.4.3. Penampungan Semen Sapi PO

Penampungan semen sapi PO dilakukan sebanyak 1 kali dalam seminggu. Semen ditampung menggunakan metode vagina buatan yang dilakukan oleh petugas khusus dari BBIB Singosari, Malang. Penampungan semen sapi PO menggunakan pemancing dari bangsa yang sama. Sebelum dilakukan penampungan, pejantan dilakukan *false mounting* sebanyak 3-5 kali untuk meningkatkan libido. Setelah sapi pejantan menaiki pemancing, bagian *preputium* dipegang, ujung penis diarahkan ke lubang vagina buatan dengan posisi miring. Vagina buatan dilengkapi dengan *collection tube* berskala yang diselimuti dengan kain hitam. Bagian dalam vagina buatan diisi menggunakan air dengan suhu 45°C, dan bagian luar diolesi vaselin agar tidak terjadi lecet pada penis (Susilawati, 2013).

3.4.4. Pemeriksaan kualitas semen segar

A. Uji Makroskopis

a. Volume

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

b. Warna

Warna semen dilihat langsung dari tabung semen.

Semen segar dapat berwarna putih susu, krem atau kekuningan.

c. Bau

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

d. Konsistensi

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

e. PH

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

B. Uji Mikroskopis

a. Motilitas Massa

Prosedur pemeriksaan motilitas massa spermatozoa (Susilawati, 2013):

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

Kriteria penilaian gerak massa spermatozoa yaitu:

- a. Sangat baik (+++), terlihat adanya kumpulan awan gelap yang bergerak aktif dan sangat cepat seperti awan gelap ketika akan turun hujan.
- b. Baik (++), bila terdapat gelombang-gelombang



kecil, kelihatan seperti awan gelap tetapi gerakannya tidak terlalu cepat.

- c. Kurang baik (+), jika yang terlihat hanya pergerakan individu saja dan tidak ada kumpulan spermatozoa.
- d. Buruk (0), apabila tidak terjadi pergerakan pada spermatozoa.

b. Motilitas Individu

Prosedur pemeriksaan motilitas individu spermatozoa (Susilawati, 2011):

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

c. Viabilitas

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

1. Diambil semen satu tetes menggunakan ose.
2. Diletakkan pada ujung *object glass*.
3. Ditetaskan satu tetes larutan *eosin-negrosin* didekat semen dan dicapur dengan menggunakan kawat ose.
4. Diletakkan *object glass* lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik ke arah ujung lain sehingga akan menghasilkan preparat ulas yang merata pada seruh permukaan *object glass*.

5. Preparat tersebut dikeringkan dengan diangin-anginkan.
6. Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

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

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

d. Abnormalitas

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

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

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

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

e. Konsentrasi

Penghitungan konsentrasi ini bertujuan untuk mengetahui jumlah spermatozoa per ml semen. Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang ada dengan menggunakan *haemocytometer* yaitu dengan cara semen segar dihisap dengan pipet eritrosit sampai pada skala 0,5 kemudian larutan NaCl 3% dihisap sampai pada skala 101, larutan tersebut mengencerkan sekaligus meng-*immobilise* (membunuh) spermatozoa. Campuran ini dikocok hati-hati tetapi cukup cepat membentuk angka delapan selama 2 – 3 menit. Beberapa tetes dibuang dan satu tetes ditempatkan pada kamar hitung *neubauer* lalu ditutup dengan cover glass (Mumu, 2009). Evaluasi konsentrasi spermatozoa digunakan alat haemositometer dengan ruang hitung Neubauer dimana konsentrasi diperoleh dengan menghitung jumlah



spermatozoa yang terdapat dalam kotak kecil sebanyak 5 buah lalu dikalikan 107 (Pamungkas dkk, 2008).

C. *Hypo Osmotic Swelling Test*

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

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

3.3.5. Pengenceran Semen

Semen diencerkan berdasarkan konsentrasinya. Pengencer dibagi menjadi 3 volume yaitu VA1, VA2 dan VB. VA1 adalah volume pengencer yang dicampurkan pada suhu 37 °C, sedangkan VA2 volume pengencer yang dicampurkan pada suhu 4-5 °C dan VB adalah volume pengencer yang sudah ditambahkan 13% gliserol. Prosedur persiapan pengenceran semen dapat dilihat pada Gambar 10.

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

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

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

Disimpan selama 18-24 jam pada suhu 4-5 °C.
(Pembekuan dilakukan keesokan harinya)

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

Diekuilibrasikan 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam dan diamati kualitas *before freezing* dan *post thawing*

Gambar 10. Prosedur Pengenceran Semen

3.3.6. Pembekuan Semen

a. Ekuilibrasasi

Ekuilibrasasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh semen untuk beradaptasi dengan pengencer, sehingga kematian yang berlebihan dapat dihindari dalam proses pembekuan (Eriani dkk, 2017). *Glycerol Equilibration Time* yaitu proses penyesuaian dari suhu -5°C menuju prefreezing -140°C dan freezing -196°C. Ekuilibrasasi suhu dingin 5°C dilakukan ketika semen dan pengencer telah homogen. Proses ekuilibrasasi suhu dingin yang berlangsung sesuai perlakuan selama 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam dalam refrigerator suhu 5°C. Setelah itu

dilakukan uji kualitas semen dan HOST untuk melihat integritas membran spermatozoa.

b. *Filling and sealing*

Filling dan *sealing* merupakan proses pengisian semen yang telah diencerkan ke dalam straw dengan cara diambil menggunakan pipet mikroliter yang ujung knop atasnya berwarna biru sampai straw terisi penuh 0,25 ml, setelah itu ujung-ujung straw dengan menggunakan pinset yang sudah dipanaskan diatas bunsen. Setelah itu dilakukan pengecekan hasil *filling* dan *sealing*. Proses ini dilakukan di dalam *cool tube* suhu 4 - 5°C.

c. *Prefreezing*

Setelah proses *filling* dan *sealing* dilakukan *prefreezing*. Straw diupkan diatas nitrogen cair (diletakkan di rak straw) dengan ketinggian 10 cm selama 10 menit dan pada suhu 37°C. *Prefreezing* merupakan awal dari proses pembekuan dengan perlakuan ini diharapkan spermatozoa tidak mengalami *cold shock* karena perubahan suhu secara mendadak.

d. *Freezing*

Proses pembekuan (*freezing*) dilakukan dengan mencelupkan straw kedalam nitrogen cair dengan suhu -196°C.

3.3.7. *Thawing*

Thawing merupakan proses mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dalam durasi tertentu. Proses *thawing* dilakukan dengan merendam straw di dalam *waterbath*



dengan suhu 37°C dengan 3 perlakuan dan lama waktu *thawing* yang berbeda yaitu 30 detik, 60 detik dan 90 detik.

3.5. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada semen segar dan semen yang dibekukan meliputi volume, warna, bau, konsistensi, pH, motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas dan abnormalitas. Integritas membran spermatozoa diamati pada saat semen segar, semen setelah diekuilibrasi dan setelah *thawing*.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan analisis ragam (*Analysis Of Variance / ANOVA*) dengan metode Rancangan Acak Lengkap. Apabila hasil yang diperoleh dari analisis RAL menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) atau sangat nyata ($P < 0,01$) maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*). Model matematis untuk RAL :

- Analisis Varian/Ragam (ANOVA)

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

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

Y_{ijk}

= Pengamatan dari faktor A level ke i, faktor B level ke j dan pada ulangan ke k

μ = Nilai tengah

α_i = Pengaruh faktor A pada level ke i

β_j = Pengaruh Faktor B pada level ke j

$(\alpha\beta)_{ij}$

= Interaksi antara faktor A level ke i dan faktor B level ke j

ε_{ijk} = Galat Percobaan untuk level ke i (faktor A) Level ke j



(faktor B) ulangan ke k

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

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

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

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

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

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

- *Duncan Multiple Range Test (DMRT)*

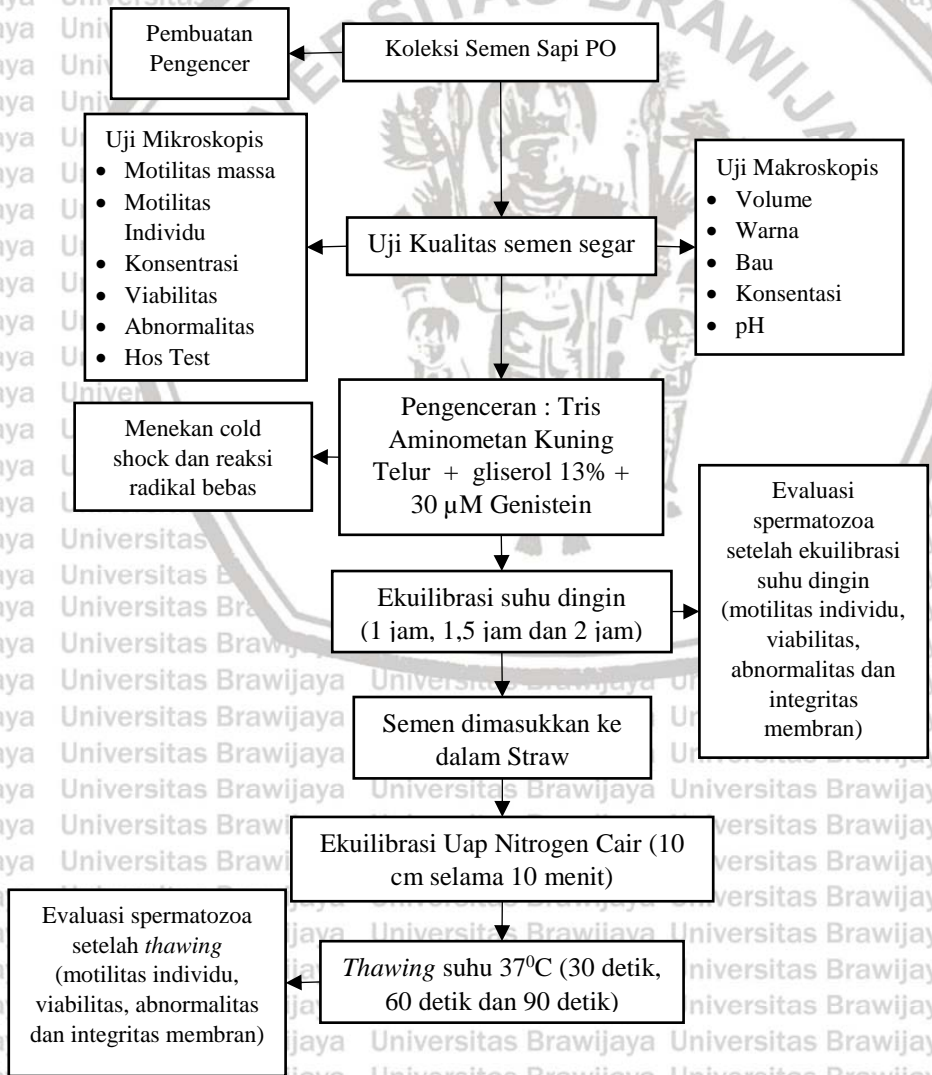
Apabila terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan Uji DMRT

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

Alat bantu analisis berupa IBM SPSS Statistics 24.0



3.7. Kerangka Operasional



Gambar 11. Kerangka Operasional

3.8. Batasan Istilah

- a. Flavonoid : Flavonoid adalah golongan senyawa polifenol yang diketahui memiliki sifat sebagai penangkap radikal bebas, penghambat enzim hidrolisis dan oksidatif.
- b. Ekuilibrasi : Ekuilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh semen untuk beradaptasi dengan pengencer, sehingga kematian yang berlebihan dapat dihindari dalam proses pembekuan.
- c. *Cold shock* : Cekaman dingin yang terjadi akibat penurunan suhu.
- d. Krioprotektan : Zat kimia non elektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematkan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan.
- e. Integritas Membran : Tingkat kemampuan sel dalam mempertahankan keutuhan membrannya.
- f. Peroksida Lipid : Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS).
- g. ROS : *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah radikal bebas yang berupa oksigen dan

turunannya yang sangat reaktif. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap molekul protein, DNA, lemak membran sel dan komponen sel.

h. Antioksidan : Senyawa nukleofilik atau yang mempunyaikemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas..

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi PO

Semen segar (Gambar 12) yang diperoleh dari hasil penampungan vagina buatan, kemudian dilakukan uji kualitas semen segar meliputi uji mikroskopis dan makroskopis. Uji makroskopis yang dilakukan diantaranya uji pH, volume, bau dan warna, sedangkan untuk uji mikroskopis yang dilakukan meliputi motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran. Hasil uji kualitas semen segar disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengamatan semen segar Sapi PO

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

Hasil penelitian yang dilakukan pada uji kualitas semen didapatkan rata-rata volume semen sapi PO sebesar $6 \pm 2,83$ ml, hal ini termasuk dalam kategori normal. Prasetyo, Tagama dan



Saleh (2013), menyatakan bahwa volume semen sapi pejantan berkisar 5-8 ml. Volume semen sapi setiap ejakulasi berbeda menurut bangsa, umur, bobot badan, pakan dan waktu penampungan. Volume semen akan menurun seiring dengan frekuensi ejakulasi atau penampungan semen. Volume rendah tidak mengakibatkan kerugian apabila diikuti dengan konsentrasi dan motilitas yang tinggi. Volume semen sapi jantan yang diejakulasikan tidak sama antara sapi jantan satu dengan yang lainnya (Tripriliawan, Saleh dan Suparman, 2014). Hasil umur sapi PO yang dilakukan penampungan adalah 6 – 7 tahun, volume yang didapatkan saat penampungan dipengaruhi oleh umur pejantan. Umur >5 - <7 tahun yang lebih tua menghasilkan volume lebih banyak dibandingkan umur 3-4 tahun, hal ini terjadi karena struktur histologi tubulus tumbuh secara cepat dengan bertambahnya umur (Wahyuningsih, Saleh dan Sugyanto, 2013).

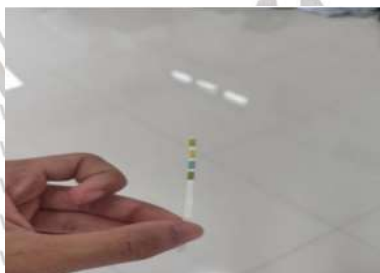


Gambar 12. Warna Semen segar sapi PO

Warna semen sapi PO yang digunakan pada penelitian mempunyai warna putih kekuningan sehingga bisa dikategorikan berkualitas baik. Semen yang berwarna putih kekuningan biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi

karena semen berwarna putih kekuningan memiliki lebih banyak sel spermatozoa. Susilawati (2013) menyatakan warna semen sapi yang normal adalah putih susu atau putih kekuningan disebabkan karena terdapat riboflavin, sedangkan semen yang abnormal berwarna kuning kemerahan karena adanya air, nanah dan darah. Semua semen segar yang diperoleh pada penelitian mempunyai bau khas sapi.

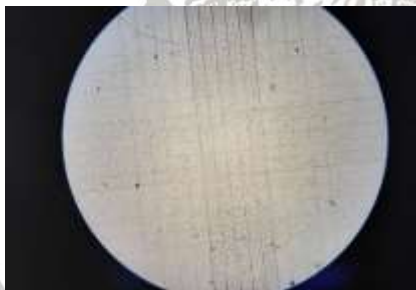
Derajat keasaman atau pH perlu diketahui untuk memastikan bahwa cairan semen hasil penampungan memiliki karakter normal. PH semen hasil penelitian diperoleh rata-rata $6,8 \pm 0,00$. Susilawati (2011) menyatakan bahwa rata-rata pH (Gambar 13) semen berkisar 6,2-6,8, sedangkan kisaran pH semen sapi pejantan menurut Garner and Hafez (2008) sebesar 6,4-7,8.



Gambar 13. pH Semen Segar Sapi PO

Konsistensi semen hasil penelitian termasuk kategori sedang dan berwarna putih kekuningan. Suyadi, A. Rachmawati dan N. Iswanto (2012), menjelaskan bahwa warna, konsistensi dan konsentrasi spermatozoa mempunyai hubungan yang sangat erat satu dengan yang lain, artinya jika semen semakin encer maka konsentrasi spermatozoa semakin rendah dan warnanya semakin pucat. Ismaya (2014) menjelaskan bahwa

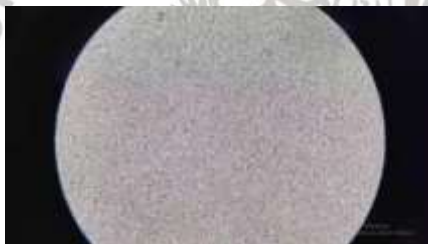
konsistensi spermatozoa juga berkaitan dengan warna spermatozoa yang dapat digunakan untuk memprediksi konsentrasi spermatozoa. Ketika konsistensinya sedang hingga kental atau warna krem maka konsentrasi spermatozoa berkisar 1.000-2.000 juta spermatozoa/ml dan hal ini terbukti konsentrasi semen segar dalam penelitian ini sebanyak $1240 \pm 11,31$ (10^6 sperm/ml semen).



Gambar 14. Konsentrasi semen segar

Motilitas massa semen segar sapi PO pada saat penelitian sebesar 2+ (Gambar 15). Penilaian semen berdasarkan penilaian motilitas massa dapat ditentukan sebagai berikut: (1) Sangat baik (+++), jika terlihat adanya gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bergerak cepat berpindah-pindah tempat. (2) Baik (++), bila terlihat gelombang-gelombang kecil tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban. (3) Lumayan (+), jika tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan-gerakan individu aktif progresif, dan (4) Buruk (0), bila hanya sedikit atau ada gerakan-gerakan individual. Berdasarkan literatur hasil penilaian motilitas massa sapi PO tergolong baik (Yusuf, 2015). Motilitas individu diamati dibawah mikroskop menggunakan perbesaran 400x, semen segar yang digunakan dalam penelitian ini memiliki rata-rata $82,50\% \pm 3,54$, motilitas

individu tersebut dapat diproses lebih lanjut dan masih tergolong normal. Beberapa faktor yang mempengaruhi nilai motilitas spermatozoa meliputi umur, bangsa, kematangan spermatozoa dan kualitas membran pada sel spermatozoa (Arifiantini dan Yusuf, 2012).



Gambar 15. Motilitas Individu Semen Segar

Viabilitas merupakan daya hidup spermatozoa yang dapat diketahui dengan cara pewarnaan sel menggunakan eosin. Rataan persentase viabilitas semen pada penelitian ini yaitu $86,00 \pm 6,60$ (Gambar 16) termasuk kategori sangat baik karena persentase viabilitas $>70\%$ atau persentase viabilitas harus di atas persentase motilitas. Lopes (2002) menjelaskan bahwa viabilitas semen masih dianggap baik jika memiliki kisaran nilai antara 50-69%. Nugroho, Y., T. Susilawati, dan S. Wahjuningsih (2015) menjelaskan bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa pada semen segar adalah 83,09%. Spermatozoa yang hidup dan mati dapat dibedakan reaksinya terhadap warna bahan pewarna eosin negrosin (Susilawati, 2011).



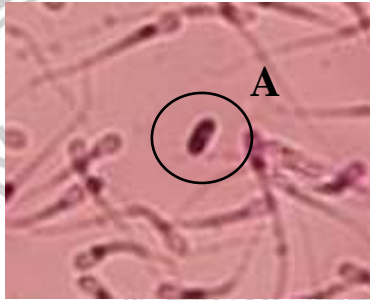
Gambar 16. Viabilitas Spermatozoa

Keterangan :

A = Spermatozoa mati (Kepala sperma berwarna merah/menyerap warna)

B = Spermatozoa hidup (Kepala sperma transparan/tidak menyerap warna)

Sel spermatozoa yang tidak motil dan dianggap mati menghisap warna dan sel spermatozoa yang motil dan yang hidup tidak berwarna. Abnormalitas untuk semen segar pada penelitian ini memiliki rata-ran $2,15 \pm 1,16$, abnormalitas tersebut tergolong sangat baik. Menurut Toelihere (1993) kualitas semen segar sangat baik bila memiliki abnormalitas kurang dari 15%.

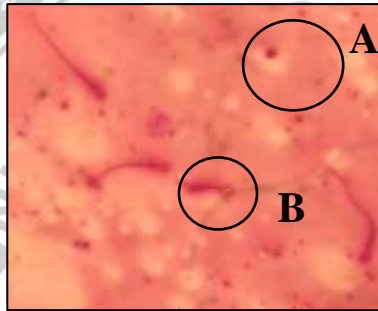


Gambar 17. Abnormalitas Spermatozoa

Keterangan :

A = Spermatozoa ekor putus/tanpa ekor

Persentase rata-rata integritas membran spermatozoa semen sapi PO pada penelitian ini yaitu $81,68 \pm 3,32$ (Gambar 17). Rataan persentase integritas membran tersebut dikategorikan dalam kisaran rata-rata baik. Spermatozoa dengan membran yang utuh akan menahan cairan hiposmotik di dalam sel, sehingga ekornya terlihat melingkar atau bengkok, sedangkan spermatozoa dengan ekor yang lurus menunjukkan membran plasma telah mengalami kerusakan. Membran plasma sel yang masih utuh akan mempengaruhi organel-organel di dalam sel. Hal ini menyebabkan spermatozoa dapat bergerak progresif dan tetap hidup (*viable*) sehingga mampu melakukan fertilisasi (Setiadi dkk, 2000).



Gambar 18. Integritas Membran Spermatozoa

Keterangan :

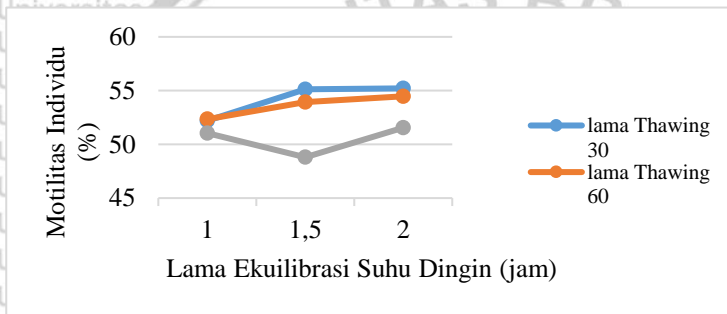
A = Spermatozoa mati (ekor lurus)

B = Spermatozoa hidup (ekor melingkar)

4.2. Persentase Motilitas Individu Spermatozoa

Setelah pengenceran, evaluasi yang pertama kali dilakukan adalah persentase motilitas. Motilitas individu spermatozoa diamati berdasarkan pergerakan individu spermatozoa progresif dan dinyatakan dalam persentase. Pengamatan motilitas spermatozoa diamati dengan perbesaran 400x. Prosesing semen beku pada penelitian ini perlu dilakukan evaluasi uji kualitas spermatozoa pada *before freezing* pada suhu 3-5°C dan setelah pembekuan (*post thawing motility*). Perlakuan terhadap lama ekuilibrasi dan lama *thawing* dengan penambahan antioksidan genistein diharapkan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Pada penelitian ini perlakuan yang berbeda yaitu lama ekuilibrasi suhu dingin 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik, 60 detik dan 90 detik. Hasil pengamatan motilitas individu spermatozoa pada semen beku sapi PO selama penyimpanan suhu dingin dapat dilihat pada Gambar 18.





Gambar 19. Grafik Persentase motilitas individu sesudah pembekuan

Berdasarkan grafik diatas bahwa motilitas individu spermatozoa sapi PO mengalami penurunan yang cukup drastis dari *before freezing* sampai setelah *thawing*. Motilitas atau pergerakan spermatozoa digunakan sebagai indikator spermatozoa dapat membuahi sel telur. Proses penurunan spermatozoa terjadi akibat proses penyesuaian antara spermatozoa dengan antioksidan dan pengencer. Pada proses ekuilibrasi suhu dingin selama 1,5 jam pada lama *thawing* 90 detik terjadi penurunan yang cukup signifikan karena pada saat semen dibekukan terjadi penurunan kualitas yang disebabkan oleh kerusakan membran plasma sel sehingga energi tidak mampu mencukupi dengan sempurna untuk melindungi spermatozoa (Danang, Isnaini dan Trisunuwati, 2012). Sedangkan pada proses ekuilibrasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 30 detik merupakan motilitas individu tertinggi setelah *thawing*. Gerakan melingkar dan gerakan mundur merupakan salah satu tanda bahwa spermatozoa mengalami *cold shock*. Apabila banyak spermatozoa banyak yang tidak bergerak maka spermatozoa tersebut dapat dikategorikan mati

(Feradis, 2010). Rataan persentase motilitas spermatozoa sapi PO pada pengamatan sebelum pembekuan dan setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan motilitas individu spermatozoa pada berbagai perlakuan (%)

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan (%)	Lama <i>Thawing</i> (s)			Rataan (%)
		30	60	90	
1 jam	55 ± 3,54	32 ± 2,74 ^b	29 ± 4,18 ^{ab}	28 ± 2,74 ^{ab}	29,67 ± 3,52 ^a
		32 ± 2,74 ^b	31 ± 2,24 ^b	27 ± 2,74 ^a	30,00 ± 3,27 ^a
1,5 jam	57 ± 2,74	33 ± 2,74 ^b	32 ± 2,74 ^b	28 ± 2,74 ^{ab}	31,00 ± 3,38 ^a
		32 ± 2,74 ^b	30 ± 2,74 ^b	27 ± 2,74 ^a	30,00 ± 3,27 ^a
2 jam	58 ± 2,74	32 ± 2,74 ^b	30 ± 3,00 ^b	27 ± 2,74 ^a	30,00 ± 3,27 ^a
		32 ± 2,74 ^b	30 ± 3,00 ^b	27 ± 2,74 ^a	30,00 ± 3,27 ^a
Rataan (%)		32,33 ± 2,58 ^b	30,67 ± 3,20 ^b	27,67 ± 2,58 ^a	

Hasil dari analisis ragam pengamatan motilitas individu sebelum pembekuan pada perlakuan ekuilibrasi suhu dingin selama 1 jam, 1,5 jam dan 2 jam secara berurutan yaitu 55 ± 3,54%, 57 ± 2,74% dan 58 ± 2,74%. Motilitas semen beku pada ekuilibrasi suhu dingin selama 1,5 dan 2 jam memiliki respon yang paling baik dengan adanya pengaruh penambahan genistein yaitu 57 ± 2,74 dan 58 ± 2,74%. Genistein dapat mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. Menurut Isnindar, Wahyuono, dan Setyowati (2011) bahwa antioksidan dapat menghambat radikal bebas sehingga mampu mencegah penurunan persentase motilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan.



Berdasarkan hasil dari analisis ragam motilitas individu semen pada perlakuan faktor lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dimana F hitung yang lebih kecil dari F tabel 0,05 dapat disimpulkan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) sedangkan F hitung lama *thawing* pada faktor lama *thawing* memiliki F hitung yang lebih besar dari F tabel 0,05 sehingga dapat disimpulkan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kualitas semen beku sapi PO yang disuplementasi dengan 30 μ M genistein. Hasil dari uji lanjutan yaitu uji Duncan bahwa motilitas individu setelah *thawing* selama 30 detik dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan rata-rata $33 \pm 2,74\%$, hasil ini berpengaruh nyata dibandingkan dengan motilitas individu semen setelah *thawing* 60 dan 90 detik dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 1 dan 1,5 jam tidak berpengaruh nyata. Kondisi ini disebabkan karena pada lama *thawing* 30 detik dengan suhu *thawing* 37°C sesuai dengan temperatur ideal bagi aktivitas motilitas spermatozoa. Selain itu terjadi proses percepatan difusi gliserol intraseluler sekaligus mencegah terjadinya tekanan osmotik. Saat pembekuan dan *thawing* semen, terjadi peristiwa tekanan osmotik pada spermatozoa sehingga menyebabkan konfigurasi lipid protein membran spermatozoa menjadi tidak seimbang, kemudian mempengaruhi keseimbangan osmotik.

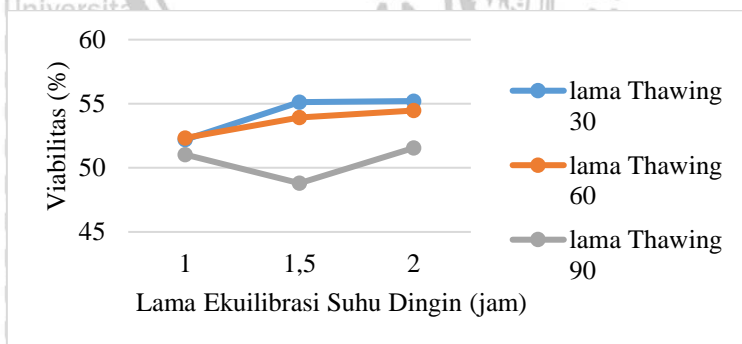
Selanjutnya terlihat persentase motilitas individu cenderung mengalami penurunan pada lama *thawing* 60 dan 90 detik dengan suhu 37°C ini menunjukkan bahwa bila suhu *thawing* semakin rendah dan durasi *thawing* yang panjang menyebabkan terjadi penurunan daya motilitas individu. Chairasat, Benjakul, Chartchue, Joemplang and Punyapornwithaya (2006), melaporkan terjadi penurunan spermatozoa motil progresif seiring berkurangnya suhu *thawing*. Selain itu durasi *thawing* yang terlalu lama menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal, terjadi peningkatan



produksi asam laktat sehingga konsentrasi asam laktat yang bersifat toxic meningkat berakibat pada rendahnya daya gerak spermatozoa sampai terjadi kematian.

4.3. Persentase Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas (daya hidup) spermatozoa dapat diketahui melalui banyaknya spermatozoa melalui banyaknya spermatozoa hidup dan spermatozoa mati dengan teknik pewarnaan *eosin negrosin*. Spermatozoa yang hidup ditunjukkan dengan indikator spermatozoa yang tidak berwarna (transparan), sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah menyerap warna. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan dan setelah *thawing* dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 20. Grafik Persentase viabilitas sesudah pembekuan

Berdasarkan grafik diatas viabilitas spermatozoa pada pengamatan mengalami penurunan persentase selama masa pembekuan. Hal ini diduga karena ternyata *cold shock* selama terjadinya pembekuan. Rataan persentase viabilitas spermatozoa sapi PO dapat dilihat pada Tabel 3.



Tabel 3. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa pada berbagai perlakuan (%)

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan	Lama <i>Thawing</i> (s)			Rataan (%)
		30	60	90	
1 jam	78.48 ± 0.85	56,79 ± 3,07 ^b	54,67 ± 4,57 ^b	53,17 ± 2,94 ^{ab}	54,88 ± 3,68 ^a
	1,5 jam	79.79 ± 2.49	56,55 ± 1,91 ^b	56,06 ± 1,86 ^b	51,00 ± 3,24 ^a
2 jam		81.04 ± 2.38	58,13 ± 1,63 ^b	57,39 ± 2,11 ^b	53,48 ± 2,81 ^{ab}
	Rataan (%)		57,16 ± 2,24 ^b	56,04 ± 3,09 ^b	52,55 ± 3,01 ^a

Nilai rataan pengamatan viabilitas tersaji pada Tabel 3 yaitu lama *thawing* pada 30 detik memiliki rataan tertinggi 57,16 ± 2,24%. Hasil analisis varians menunjukkan bahwa lama *thawing* berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa semen beku sapi Peranakan Ongole, sedangkan lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dan lama *thawing* tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap rataan persentase viabilitas spermatozoa. Uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa perlakuan memperlihatkan persentase viabilitas yang lebih tinggi (57,16 ± 2,24%) dibandingkan dengan perlakuan 60 dan 90 detik berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) yaitu 56,04 ± 3,09% dan 52,55 ± 3,01%. Penurunan angka persentase viabilitas sesuai dengan lama *thawing* yang dilakukan pada semen beku. Hal ini sebagaimana Salim dkk (2012), melaporkan bahwa persentase

viabilitas spermatozoa pada semen beku Peranakan Ongole mengalami penurunan setelah *thawing* yang durasinya semakin panjang. Berdasarkan hasil uji nilai viabilitas terbaik yaitu pada perlakuan 30 detik dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan suhu 5°C pada semen beku sapi Peranakan Ongole sedangkan lama *thawing* 60 dan 90 detik masih lebih rendah. Hal ini disebabkan lama *thawing* 30 detik belum menyebabkan adanya tekanan osmotik ekstrim pada membran spermatozoa yang dapat merusak dan mengganggu permeabilitas membran tersebut. Oyeyemi, Akusu dan Oladavis (2000) menyatakan permeabilitas fosfolipid hidrofilik akan rusak dan terganggu fluiditasnya apabila terjadi perubahan suhu ekstrim secara ekstraseluler yang menyebabkan spermatozoa mati. Viabilitas spermatozoa semen beku lebih sedikit dibandingkan dengan semen segar. Hal ini disebabkan suhu yang sangat rendah pada saat pembekuan menyebabkan substansi vital sperma mengalami kebocoran dan menyebabkan berkurangnya enzim intraseluler lipoprotein, ATP serta kalium intraseluler membran plasma rusak dan menurunkan nilai viabilitas (Mahesa, 2016).

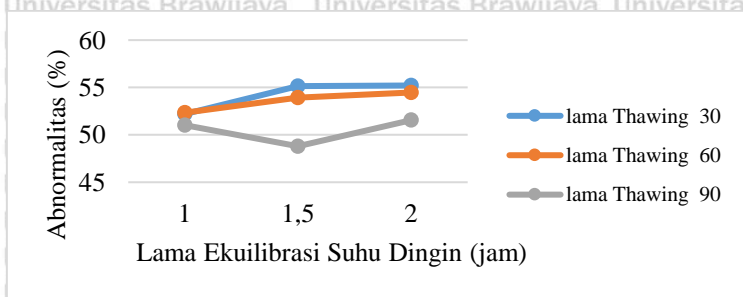
Penurunan viabilitas pada pengamatan masih tergolong normal karena kualitas sperma sesudah pembekuan sekitar 50% sperma mati dan sperma yang hidup memiliki fertilitas yang rendah. Spermatozoa hidup memiliki persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa mati maka dianggap masih normal (Bearden dan Fuaquay, 2004). Persentase viabilitas yang menurun juga kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal antara lain *cold shock* karena perubahan suhu secara drastis. Sayoko, Hartono dan Silatonga, (2007) menyatakan bahwa selama *thawing* apabila perubahan suhu terjadi cepat akan mengurangi tekanan pada spermatozoa, sehingga membantu untuk melewati fase kritis dengan cepat dan mempertahankan spermatozoa hidup dan normal lebih banyak. Proses pewarnaan dengan eosin pada dasarnya adalah



spermatozoa hidup tidak atau sedikit menyerap zat warna dan spermatozoa mati akan menyerap zat warna akibat membrannya tidak permeabel terhadap zat warna sehingga spermatozoa yang berwarna mati. Pareira, Siqueira, Ferreira, Severo, Oliveira dan Goncalves (2010) menyatakan spermatozoa mati akan menyerap warna, sedangkan spermatozoa hidup tidak menyerap warna.

4.4. Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Hal yang diamati dalam evaluasi abnormalitas sperma ini meliputi abnormalitas kepala (terlalu kecil, terlalu besar, kepala dua pada satu ekor dan kepala terputus) dan abnormalitas ekor (Alhuur, Soeparna dan Darodjah, 2020). Abnormalitas spermatozoa terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam *tubuli seminiferi* maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran organ kelamin jantan (Muzakkir, Dasrul, Wahyuni, Akmal dan Sabri, 2017). Evaluasi diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali (Herdis, 2015). Pengamatan abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 21. Persentase abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan (%)



Berdasarkan grafik (Gambar 10) hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* dan ekuilibrasi suhu dingin terjadi penurunan pada lama ekuilibrasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik sebesar $11,37 \pm 0,66\%$. Abnormalitas tertinggi yaitu pada ekuilibrasi suhu dingin selama 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik dapat disimpulkan bahwa persentase abnormalitas terbaik yaitu pada lama ekuilibrasi suhu dingin 1 dan 2 jam dengan lama *thawing* 30 dan 90 detik. Berikut hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengamatan Abnormalitas spermatozoa pada berbagai perlakuan (%)

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan	Lama <i>Thawing</i> (s)			Rataan (%)
		30	60	90	
1 jam	$7 \pm 0,43$	$10,17 \pm 0,36^a$	$11,41 \pm 0,72^b$	$10,97 \pm 0,69^{ab}$	$10,85 \pm 0,78^a$
1,5 jam	$7,44 \pm 0,30$	$10,92 \pm 0,92^{ab}$	$10,59 \pm 0,79^{ab}$	$11,30 \pm 0,74^b$	$10,94 \pm 0,82^a$
2 jam	$7,18 \pm 0,41$	$10,66 \pm 0,42^{ab}$	$10,54 \pm 0,60^{ab}$	$11,83 \pm 0,18^b$	$11,01 \pm 0,72^a$
	Rataan (%)	$10,58 \pm 0,66^a$	$10,85 \pm 0,77^a$	$11,37 \pm 0,66^b$	

Hasil analisis statistik pada Tabel 4 menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh terhadap persentase abnormalitas spermatozoa ($P>0,05$). Hasil pengamatan menunjukkan abnormalitas dari perlakuan diperoleh angka persentase abnormalitas spermatozoa semen beku rata-rata



dibawah 12% atau persentase spermatozoa normal masih di atas 80 % pada setiap perlakuan. Hasil ini sudah sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) dan SNI Semen Beku Nasional (2005) yang merekomendasikan abnormalitas di bawah 20%, masih layak dipakai untuk IB. Abnormalitas tertinggi pada perlakuan lama *thawing* 90 detik dengan rata-rata $11,83 \pm 0,66\%$ dan abnormalitas terendah pada perlakuan lama *thawing* 30 detik dengan persentase $10,58 \pm 0,66\%$ dan $10,85 \pm 0,77\%$. Hal ini mengindikasikan bahwa suhu dan lama *thawing* pada semua perlakuan belum banyak menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal. Penyebabnya karena pada suhu dan durasi *thawing* pada semua perlakuan belum memberikan tekanan yang ekstrim secara mekanis sehingga spermatozoa menjadi abnormal seperti halnya ciri khas suatu spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier.

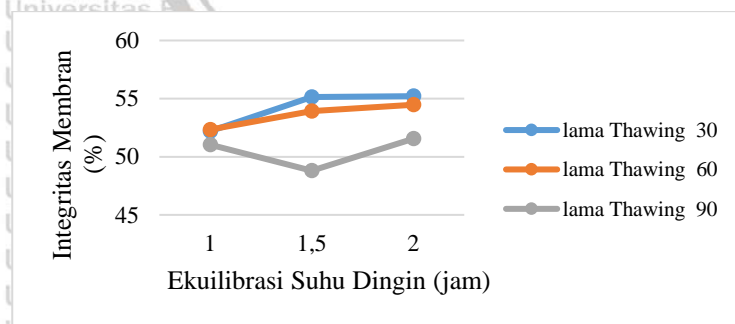
Salah satu ciri spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier yaitu ekor atau kepalanya yang terputus. Sesuai hasil pengamatan kebanyakan abnormalitas yang terjadi yaitu spermatozoa yang ekor atau kepalanya terputus atau patah. Namun kondisi ini bukan disebabkan karena *thawing*, melainkan diduga karena proses preparasi seperti pembuatan preparat ulas. Yulnawati, Herdis, Maheswari, Boediono, dan Rizal (2009) melaporkan abnormalitas tersier terjadi kemungkinan karena pembuatan preparat ulas yang menyebabkan kepala atau ekor spermatozoa putus. Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa bangsa sapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa. Hasil ini menunjukkan bahwa spermatozoa bangsa sapi tidak terpengaruh dengan adanya perlakuan *thawing*, tetapi abnormalitas yang terjadi diduga disebabkan karena adanya kesalahan dalam preparasi ataupun ejakulasi. Arifiantini dkk., (2005) menjelaskan bahwa abnormalitas sekunder kemungkinan disebabkan karena kesalahan dalam preparasi



atau ejakulasi, sedangkan Barth and Oko (1989), menjelaskan bahwa abnormalitas pada ekor disebabkan karena ejakulasi yang tidak sempurna dan shock terhadap suhu.

4.5. Persentase Integritas Membran Spermatozoa

Integritas membran spermatozoa diamati untuk mengetahui kualitas spermatozoa semen beku sapi PO. Menurut Setiadi, dkk (2000) menyatakan 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 yang rusak atau permeabilitasnya, larutan *hypoosmotic* akan keluar masuk membran spermatozoa secara bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus. Hasil pengamatan integritas membran dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 22. Persentase Integritas Membran Spermatozoa (%)

Berdasarkan grafik (Gambar 11) terjadi penurunan pada lama ekuilibrasi suhu dingin 1,5 jam dengan lama *thawing* 90 detik. Penurunan persentase integritas membran ini diduga karena terjadinya *cold shock* dan mengalami masa kritis selama pembekuan yang mengakibatkan rusaknya membran

spermatozoa. Hal ini sependapat dengan Ratnani, Ihsan, Ciptadi dan Suyadi (2017), pembekuan secara cepat pada semen selama pendinginan dan proses pembekuan menyebabkan kerusakan pada membran plasma, akrosom, mitokondria dan kromatin spermatozoa. Laporan Tuhi, Ondho dan Samsudewa (2013), penurunan kualitas spermatozoa yang drastis dari sebelum dan setelah pembekuan jika dibandingkan *before freezing*, yang disebabkan spermatozoa mengalami cekaman dingin. Semakin tinggi cekaman dingin yang diperoleh maka semakin tinggi pula aktivitas metabolisme sel spermatozoa yang dihasilkan asam laktat sehingga mempengaruhi tekanan osmotik larutan. Peningkatan tekanan osmotik pada plasma semen menurunkan permeabilitas membran spermatozoa dan meningkatkan kerusakan membran. Selain itu menurut Cooter, Goolsby dan Prien (2005), pembekuan merupakan pemicu stress sperma karena akan merubah konfigurasi dari fosfolipid membran plasma dan mengganggu fungsi dan permeabilitas membran sel. Membran merupakan bagian luar dari spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa, sehingga apabila fungsi dan struktur membran nya rusak maka spermatozoa akan mati dan hanya membran yang utuh yang mampu melakukan fertilisasi. Nilai rata-rata persentase integritas membran spermatozoa hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.



Tabel 5. Hasil pengamatan Integritas Membran Spermatozoa pada berbagai perlakuan (%)

Lama Ekuilibrasi	Sebelum Pembekuan	Lama <i>Thawing</i> (s)			Rataan (%)
		30	60	90	
1 jam	73.16 ± 1.40	52,20 ± 5,05 ^{ab}	52,34 ± 4,66 ^{ab}	51,03 ± 3,14 ^{ab}	51,86 ± 4,09 ^a
	1,5 jam	74.87 ± 2.22	55,13 ± 2,32 ^b	53,92 ± 2,52 ^b	48,80 ± 3,06 ^a
2 jam		75.87 ± 2.32	55,21 ± 2,14 ^b	54,47 ± 2,72 ^b	51,55 ± 2,56 ^{ab}
		Rataan (%)	54,18 ± 3,50 ^b	53,58 ± 3,32 ^b	50,46 ± 2,98 ^a

Berdasarkan hasil dari analisis ragam integritas membran semen pada perlakuan faktor lama ekuilibrasi suhu dingin dan faktor interaksi lama ekuilibrasi suhu dingin dimana F hitung yang lebih kecil dari F tabel 0,05 dapat disimpulkan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) sedangkan F hitung lama *thawing* pada faktor lama *thawing* memiliki F hitung yang lebih besar dari F tabel 0,05 sehingga dapat disimpulkan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kualitas semen beku sapi PO yang disuplementasi dengan 30 μ M genistein. Hasil dari uji lanjutan yaitu uji Duncan dapat dilihat bahwa integritas membran setelah *thawing* selama 30 detik dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 2 jam dengan rata-rata 54,18 ± 3,50%, hasil ini berpengaruh nyata dibandingkan dengan integritas membran semen setelah *thawing* 60 dan 90 detik dengan lama ekuilibrasi suhu dingin 1 dan 1,5 jam tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$).

Penambahan genistein diperoleh persentase integritas spermatozoa yang tinggi. Ha tersebut diduga karena adanya korelasi antara viabilitas dan integritas membran, hasil yang didapat tidak berbeda untuk perlakuan terbaik yaitu lama *thawing* dengan ekuilibrase suhu dingin 2 jam.

Menurut Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara (2014), integritas membran adalah suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap *transport ion*, sehingga cairan diluar sel tidak dapat memasuki sel. Apabila membran plasma rusak maka proses metabolisme akan terganggu, sintesa ATP tidak berjalan dengan normal dan berakibat fatal bagi spermatozoa yaitu menurunnya motilitas apapun daya tahan hidup spermatozoa itu sendiri. Menurut Ratnani dkk, (2017), membran plasma sel yang masih utuh akan mempengaruhi organel-organel di dalam sel. Hal ini meyebabkan spermatozoa dapat bergerak progresif dan tetap hidup (*viable*) sehingga mampu melakukan fertilisasi. Permatasari, Setiatin dan Samsudewa (2013), menambahkan bahwa penambahan kuning telur pada pengencer tris aminomethan dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga memiliki integritas membran yang baik yang melindungi keutuhan ultrastruktur spermatozoa. Penambahan genistein yang mengandung antioksidan dapat mempertahankan integritas membran spermatozoa saat *post thawing*.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pada penambahan genistein dalam pengencer dapat disimpulkan bahwa :

- Faktor lama *thawing* berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas dan integritas membran tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas semen beku sapi PO yang ditambah genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur.
- Faktor lama ekuilibrasasi suhu dingin tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas semen beku sapi PO.
- Faktor interaksi lama ekuilibrasasi suhu dingin dengan lama *thawing* tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.
- Perlakuan terbaik pada semua variabel pengamatan yaitu lama ekuilibrasasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik dengan suhu 37°C.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan menerapkan penggunaan genistein 30 µM dengan lama ekuilibrasasi suhu dingin 2 jam dengan lama *thawing* 30 detik dengan suhu 37°C.

DAFTAR PUSTAKA

- Adcock, J. 2018. What are Antioxidants ? and are They Truly Good For Us ?. Research Fellow in Analytical Chemistry, Deakin University. Diakses 20 Februari 2021. <<https://theconversation.com/what-are-antioxidants-and-are-they-truly-good-for-us-86062>>.
- Adnyani, N. L. A., N. L. G. Sumardani dan N. P. Sarini. 2018. Pengaruh Lama *Thawing* pada Uji Kualitas Semen Beku Sapi Bali Produksi UPT BIBD Baturiti Sebelum Didistribusikan. *Journal of Tropical Animal Science*. 6(3): 626 – 636.
- Aisah, S., N. Isnaini dan S. Wahjuningsih. 2017. Kualitas Semen Segar dan Recovery Rate Sapi Bali Pada Musim Yang Berbeda. *Jurnal-Jurnal Ilmu Peternakan*. 27 (1): 63-79.
- Aitken, R.J. 1999. The Human Spermatozoon-A Cell In Crisis. *Journal Report Fertil*. 11(5): 1 – 7.
- Aitken, R.J. and C. Krausz. 2001. Oxidative Stress, DNA Damage and The Y Chromosome. *Reproduction*. 122: 497 – 506.
- Adhitama, E. 2018. *Perbedaan Produksi Semen Segar, Recovery Rate, Semen Beku Sapi Simmental Dan Sapi Peranakan Ongole Di Balai Inseminasi Buatan Ungaran*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya : Malang.

Alhuur, K.R.G., Soeparna., Darodjah, R.S. 2020. Efek Interaksi Masa Ekuilibrase Dan Laju Penurunan Suhu Terhadap Peningkatan Ketuhan Membran Plasma Sperma Domba Priangan Pasca Thawing. *JITP*. 8 (2): 73 – 78.

Amalia. 2019. *Pengaruh Penggunaan Pengencer Susu Skim Kuning Telur Dengan Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga (Hylocereus polyrhizus) Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya : Malang.

Anonimous. 2018. *Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan: Pedataan Sapi Potong, Sapi Perah, dan Kerbau*. Kementerian Sumberdaya Genetik Ternak. Deptan, Jakarta

Anonimous. 2015. *Badan Standarisasi Nasional. Bibit Sapi Potong – Bagian 5: Peranakan Ongole (SNI 7651.5:2015)*. BSN, Jakarta.

Anonimous. 2015. *Balai Pembibitan Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak Sembawa ; Sapi Peranakan Ongole*. BPTU-HPT, Palembang.

Arifiantini., T.L. Yusuf dan D. Yanti. 2005. Kaji Banding Kualitas Semen Beku Sapi Friesian Holstein Menggunakan Pengencer dari Berbagai Balai InseminasiBuatan di Indonesia. *Animal Production*. 7(3): 168 – 176.

Arifiantini, R.I dan T.L. Yusuf. 2012. Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer dalam Dua Jenis Kemasan pada Proses Pembekuan Semen Sapi



Frisien Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*. 9(3) : 1 – 11.

Astuti, Maria. 2004. Potensi dan Keragaman Sumberdaya Genetik Sapi Peranakan Ongole (PO). *Lokakarya Nasional Sapi Potong*. Wartazoa. Vol. 14(4)

Ax, R.L., M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez and M.E. Bellin. 2008. Artificial insemination. In: *Reproduction In Farm Animals*. E.S.E Hafez and B. Hafez. (Edit). 7th ed. *Blackwell Publishing, Australia*: 365-375.

Ba'a La Ode, Rahim Aka dan Nuraeni. 2010. Pengaruh Pemberian D-Fruktosa Dan Kuning Telur Yang Berbeda Terhadap Kualitas Membran Spermatozoa Kambing Setelah Pembekuan Semen. *WARTA-WIPTEK*, Volume 18 Nomor : 01 Januari 2010, ISSN 0854-0667.

Bearden, J.H., J.w. Fuquay, dan S.T. Willard. 2004. *Applied Animal Reproduction, 6th Edition*. Prentice Hall. New Jersey.

Bebas W., L.B. Geovany dan K.B. Made. 2016. Penambahan Vitamin E pada Pengencer BTS Terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace pada Penyimpanan 15⁰C. *Buletin Veteriner Udayana*. 8(1) : 1 – 7.

Chaiprasat, S., Benjakul, W., Chartchue, A., Joemplang, P and Punyapornwithaya, V., 2006. Effect Of Bull Semen *Thawing Methods On Sperm Progressive*



Motility. *Chiang Mai Veterinary Journal* 4 (1) : 25 – 29.

Cooter, P.Z., H.A. Goolsby and S.D. Prien. 2005. Preliminary Evaluation Of a Unique Freezig Tecnology for Bovine Sperm Cryopreservation. *Reprod Dom Animal*. 40 (2) : 95 – 98.

Danang, D.R., N. Isnaini dan P. Trisunuwati. 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung dalam Pengencer Ringers Pada Suhu 4⁰C. *Jurnal Ternak Tropika*. 13(1) : 47 – 57.

Dewi, A. S., Y. S. Ondho dan E. Kurnianto. 2012. Kualitas Semen Berdasarkan Umur pada Sapi Jantan Jawa. *Animal Agriculture Journal*. 1 (2): 126-133.

Eriani, K., N. Sari., M. Ihdina., dan Rosnizar. 2017. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Pembekuan Semen Kerbau Rawa Lokal (*Bubalus bubalis*) dengan Kombinasi Extender Laktosa Dan Gliserol. *Nusantara Bioscience*. 9(1) : 77 – 82.

Ervandi, M., T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2013. Pengaruh Pengencer yang Berbeda Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Hasil Sexing Dengan Gradien Albumin (Putih Telur). *JITV*. 18(3) : 177 – 184.

Fahlevi, R. 2019. *Penambahan Ekstrak Semanggi Air (Marsilea crenata) Dalam Pengencer Tris aminomethan Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Boer*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya: Malang.



Ferlianthi, R. 2016. Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Proporsi Sperma Pembawa Kromosom X-Y dan Kualitas Semen Kambing Peranakan Etawah. *Students E-Journal*. 6(1): 1 – 16.

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

Fitriyati, A. 2019. *Pengaruh Ekstrak Daun Kemangi (Ocimum sanctum L.) Menggunakan Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur Dalam Pelarut Aseton 70% Tanpa Inaktivasi Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Selama Penyimpanan Suhu Ruang*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

Garner, D.L., and Hafez E.S.E. 1993. Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction in Farm Animals. *6th ed., Hafez, B and E.S.E., Lea and Febriger (Eds)*. Philadelphia: 165 – 187.

Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. *In B. Hafez dan E.S.E. Hafez. Reproduction in Farm Animal 7th ED*. Lippincot Williams and Wilkins Baltimore, Marryland, USA.

Harmita. 2014. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya Majalah Ilmu Kefarmasian. *Jurnal Farmasi*. 1(3): 117 – 135.

Herdis. 2015. Daya Motil Dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Domba Garut (*Ovis aries*) Pada Penambahan Kolesterol Dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur. *JSTI*. 17(1): 16 – 24.

Hopkins, S.M. & L.E. Evans. 2003. Artificial Insemination. *In Veterinary Endo-Crinology And Reproduction*.



Fifth Edition. Blackwell Publishing Australia. pp 341-370.

Husin, N., T. Suteky dan Kususiyah. 2007. Uji Kualitas Semen Kambing Nubian dan Peranakannya (Kambing Nubian X PE) serta Kambing Boer Berdasarkan Lama Penyimpanan. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*. 2 (2): 57-65.

Insani, K., S. Rahayu, A. Pramana dan A. Soewondo. 2014. Kadar Mda Spermatozoa Setelah Proses Pembekuan. *Jurnal Biotropika*. 2(3): 142 – 148.

Isnidar, W., Wahyuono dan E.P. Setyowati. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun Kesemek (Diospyros Kaki Thunb.) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1Pikrilhidrazil). *Jurnal Kesehatan*. 16 (3) : 157 – 164.

Jalili, C., S Ahmadi., S. Roshankhah., and M.R. Salahshoor. 2016. Effect Of Genistein On Reproductive Parameter And Serum Nitric Oxide Levels In Morphine-Treated Mice. *International Journal Of Reproductive Medicine*. 14(2) : 95 – 102.

Kaka, A., W. Haron, R. Yusoff, N. Yimer, A.M. Khumran, A.A. Memon, K. Sarsaifi and M. Ebrahimi. 2017. Frozen-Thawed Quality of Bull Semen after Combined Supplementation of Docosahexaenoic Acid and Alpha Linolenic Acid Into Tris based Semen Extender. *Pakistan Journal Zool*. 49(6): 2051 – 2055.

Komariah., L. Arifiantini, dan F. W. Nugraha. 2013. Kaji Banding Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental,



Limousine, dan Friesian Holstein terhadap Proses Pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37 (3): 143-147.

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

Kusumawati, A.D. and H. Leondro. 2015. The Quality of Fresh Semen of Bulls at 5°C and 24°C With or Without Diluent. In *Proceeding Interntional 51 JITRO. 2017 Seminar Improving Tropical Animal Production For Food Security*. 1(1): 122 – 126.

Lakitan, B. 1993. *Dasar dasar Fisiologi Tumbuhan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Lestari, S. D., T. R. Tagama dan D. M. Saleh. 2013. Profil Produksi Semen Segar Sapi Simmental Pada Tingkat Umur yang Berbeda Di Balai Inseminasi Buatan Lembang Jawa Barat. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1 (3): 897 – 906.

Lopes, F.P. 2002. Semen collection and evaluation in ram. *ANS 33161*. University of Florida.

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

Lukman, H.Y., W. Busono, S. Wahjuningsih and S. Suyadi. 2004. Sperm Motility and Viability After α -Tocopherol Dilution in Tris Aminomethan-Base Extender During Cold Storage in Bali Bull. *Intenational Journal of Chemtech Research*. 6(1): 5726 – 5732.



Luthfi, M., T. Susilawati dan N. Isnaini. 2015. Perbedaan Kecepatan Pubertas Calon Pejantan Sapi Po Yang Dipelihara Pada Kelompok Sex Yang Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 16(2): 7 – 15.

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

Melita, D., Dasrul dan Adam. 2014. Pengaruh Umur Pejantan dan Frekuensi Ejakulasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh. *Jurnal Medika Veterinaria*. 8 (1): 15 – 19.

Metahine, T., Burhanuddin., dan A. Marawali. 2014. Efektivitas Air Buah Lontar dalam Mempertahankan Motilitas, Viabilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. 15(2): 263 – 273.

Muada, B., U. Papatungan., M. J. Hendrik dan S. H. Turangan. 2017. Karakteristik Semen Segar, Sapi Bangsa Limousine dan Simental di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Zootek ("Zootek Journal")*. 37 (2): 360 – 369.

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

Muzakkir., Dasrul, Sri Wahyuni, Akmal.M, dan Sabri. M. 2017. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 5 (2) : 112 – 128.



Nugroho, Y., T. Susilawati, dan S. Wahjuningsih. 2015. 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.

O'Connell, M., N. McClure and S.E. Lewis. 2002. The Effects of Cryopreservation on Sperm Morphology, Motility and Mitochondrial Function. *Hum.Reprod.* 17(3): 704-709.

Oyeyemi, M., M.O. Akusu dan O.E Oladavis. 2000. Effect of successsive ejaculation on the spermiogram of west African Dwart Goats (*Capra hircus* L). *Jurnal Veterinarski*. 70(4): 215 – 221.

Pareira. G.R., E.G. Becker, L.C. Siqueira, R. Ferreira, C.K. Severo V.S. Truzzi. J.F.C. Oliveira dan P.B.D. Goncalves. 2010. Assessment Of Bovine Spermatozoa Viability Using Different Cooling Protocols Prior To Cryopreservation. *Journal of Animal Science*. 9(1): 403 – 407.

Partodihardjo S. 1992. Ilmu Reprod Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories : Analytical Progres. 19(2): 1 – 4.

Permatasari, W.D., E.T Setiatin dan D. Samsudewa. 2013. Studi Tentang Pengencer Kuning Telur dan Pengaruhnya Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Brebes. *Animal Agricultural Journal*. 2(1) : 144.

Prasetyo, A. A., T. R. Tagama dan D. M. Saleh. 2013. Kualitas Semen Segar Sapi Simmental yang dikoleksi dengan



Interfal yang berbeda di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1 (3): 907-913.

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

Pratiwi, N., T.L. Yusuf, I. Arifiantini, C. Sumantri. 2019. Kualitas Spermatozoa dalam Modifikasi Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur dengan Tambahan Astaxanthin dan Glutathione pada Tiga Jenis Ayam Lokal. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 7(1): 46 – 54.

Prihantoko, K.D., F. Yuliasuti, H. Haniarti, A. Kusumawati, D.T. Widayati, A. Budiyanto. 2020. The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade Bull Semen Based on Skim Milk – Soy Lecithin Extender. *International Conference: Improving Tropical Animal Production for Food Security*. 1(2): 1 – 11.

Rachmawati, A. 2010. Motilitas dan Viabilitas Semen Rusa Timor Menggunakan Pengencer yang Berbeda pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 20 (2): 1-7.

Ratnani, H., M.N. Ihsan, G. Ciptadi dan S. Suyadi. 2017. Effect of α – Tocopherol Supplementation in The Extender on The Sperm Quality of Maduran Bull Before and After Quick Freezing. *International Journal Adv Res*. 5 (1): 1378 – 1389.



Ridho, Salamun. 2017. *Karakteristik Performa Kualitatif dan Kuantitatif Sapi PO dan Sapi Limpo Jantan di Kecamatan Terbanggi Besar Kabupaten Lampung Tengah*. Skripsi. Unila. Bandar Lampung.

Rizal, M, dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa*. 20 (3) : 139 – 146.

Rodiah., E, Yuliani, A.S. Dradjat dan C. Arman. 2015. Efektifitas Kinerja Pentksilin Terhadap Kualitas dan Integritas Membran Plasma utuh pada Sperma Sapi bali Hasil Pemisahan dengan menggunakan Albumin. *Jurnal Ilmu Teknologi Peternakan Indonesia*. 1(1): 60 – 65.

Salim, M.A., T. Susilawati., dan S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh Metode *Thawing* terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet*. 12(2): 14 – 21.

Sayoko, Y., M. Hartono, dan Silatonga. 2007. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Proline Carnitine Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Yang Disimpan Pada Suhu 50°C (*Chilling Semen*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 6(1): 131 – 137.

Setiadi, B., I.K. Utama, P. Situmorang, Supriyati, U. Adiati, I.G.M. Budiarsana, T. Kostaman, Maulana dan Mulyawan. 2000. Evaluasi Karakteristik Semen Kambing Calon Bibit. *Rekayasa Teknologi Peternakan*. 2(1): 74 – 87.

Soto, J.C.M., J.D Hourcade., A.G. Adán, J.L. Landeras., and J. Gadea. 2010. Effect Of Genistein Supplementation



Of Thawing Medium On Characteristics Of Frozen Human Spermatozoa. *Asian Journal Of Andrologi*. 12(3) : 431 – 441.

Susulwati, T. 2000. *Analisis Membran Sapi Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin*. Desertasi pasca sarjana Unair Surabaya.

Susilawati, T., Srianto dan Hermanto. 2003. Artificial Insemination of Cows Using Semen Sexing with Egg White Concentration of Gradient Centrifugation. *Journal of Animal Husbandry and Fihery Sciences. Faculty of Livestock UnMuh Malang "PROTEIN" no.20*. ISSN: 1410 – 3281, July- Desember 2003.18.18 (Indonesian Version).

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

Susilawati, T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Universitas Brawijaya Press (UB Press). Malang.

Susilawati, T., N. Isnaini, A. P. A. Yekti, I. Nurjanah, Errico dan N. Da Costa. 2016. Keberhasilan Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku Dan Semen Cair pada sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 26 (3): 14 – 19.

Suyadi, A. Rachmawati dan N. Iswanto. 2012. Pengaruh α -tocopherol yang berbeda dalam pengencer dasar tris aminomethane-kuning telur terhadap kualitas semen Kambing Boer yang disimpan pada suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 22 (3): 1-8.



Tafari, S., F. Ciani, E. Luigi Iorio, L. Esposito and N. Cocchia. 2015. Reactive Oxygen Species and Male Fertility. *INTECH*. 2(1): 19 – 40.

Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Cetakan 3. Penerbit Angkasa. Bandung.

Tripriliawan, D., D.M. Saleh, dan P. Suparman. 2014. Perbedaan Volume Semen, Konsentrasi dan Motilitas Spermatozoa Pejantan Sapi FH di BBIB Lembang dengan Interval penampungan 72 jam dan 96 jam. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 2(1) : 227 – 232.

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

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

Vaya, J and M. Aviram. 2001. Nutritional Antioxidant : Mechanism Of Action, Analyses of Activities and Medical Applications, Curr. Med. Chemlmm, Endoc & Metabolism Agent. *Animal Sciences*. 2(1): 12 – 24.

Wahyuningsih, A., D.M. Saleh dan Sugiyatno. 2013. Pengaruh Umur Pejantan dan Frekuensi Penampungan Terhadap Volume dan Motilitas Semen Sapi



Simmental di Balai Inseminasi Buatan Lembang.
Jurnal Ilmiah Peternakan. 1(3) : 945 – 953.

Widhyari, S.D., A. Esfandiari., A. Wijaya, R. Wulansari, S. Widodo, dan L. Maylina. 2015. Tinjauan Penambahan Mineral Zn Dalam Pakan Terhadap Kualitas Spermatozoa Pada Sapi Frisian Holstein Jantan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 20(1) : 72 – 77.

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

Winarti, Sri. 2010. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta : PT. Gramedia Indonesia.

Wulandari, S.N.L.I. 2017. *Kualitas Semen Sapi Friesian Holstein (FH) Selama Penyimpanan Suhu Dingin Menggunakan Pengencer Andromed Dengan Penambahan Filtrat Daun Katuk (Sauropus androgynus (L) Merr)*. Skripsi. Universitas Brawijaya : Malang.

Yulnawati, Herdis, H. Maheswari, A. Boediono, dan M. Rizal. 2009. Potensireproduksi Dan Upaya Pengembangbiakan Kerbau Belang Tana Toraja. *Prosiding Seminar Dan Lokakarya Nasional Kerbau*. 11 Januari.

Yusuf, T.L. 2015. *Pengembangan Mutu Ternak melalui Perbaikan Manajemen Teknologi Inseminasi Buatan*. Bogor.



Zamuna, A. A. K. K. M., T. Susilawati., G. Ciptadi dan Marjuki.
2015. Perbedaan Kualitas Semen dan Produksi
Semen Beku pada Berbagai Bangsa Sapi Potong.
Jurnal Ternak Tropika. 16 (2): 01-06.

Zenichiro, K., Herliantien, & Sarastina. 2002. *Teknologi
Prosesing Semen Beku pada Sapi*. JICA-Balai
Inseminasi Buatan Singosari. Malang.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data semen segar sapi PO (nomor ear tag 0048 dan 858)

Kualitas	Ulangan		Rataan	SD
	1	2		
Volume (ml)	4	8	6	2,83
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	
pH	6,8	6,8	6,8	0
Bau	Khas	Khas	Khas	
Warna	PK	PK	PK	
Motilitas massa	2+	2+	2+	
Motilitas individu (%)	80	85	82,5	3,54
Viabilitas (%)	81,33	90,66	86	6,60
Abnormalitas (%)	2,97	1,33	2,15	1,16
Konsentrasi (10 ⁷ /ml)	116	132	124	11,31

Keterangan : PK = Putih Kekuningan



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

Faktor A (jam)	Ulangan	Faktor B (s)			Total
		30	60	90	
1	1	35	25	25	85
	2	30	30	25	85
	3	30	30	30	90
	4	35	35	30	100
	5	30	25	30	85
Sub Total		160	145	140	445
1,5	1	30	30	25	85
	2	30	30	25	85
	3	35	30	30	95
	4	35	35	30	100
	5	30	30	25	85
Sub Total		160	155	135	450
2	1	30	30	25	85
	2	35	30	30	95
	3	35	35	30	100
	4	35	35	30	100
	5	30	30	25	85
Sub Total		165	160	140	465
Total		485	460	415	1360

Keterangan : Faktor A = Lama ekuilibrasi suhu dingin
Faktor B = Lama *thawing*



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

$$= \frac{(1360)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 41102,2$$

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

$$= (35^2 + 30^2 + 30^2 + \dots + 25^2) - 41102,2$$

$$= 498$$

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

$$= \frac{(160^2 + 145^2 + 140^2 + \dots + 140^2)}{5} - 41102,2$$

$$= 197,78$$

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

$$= \frac{(445^2 + 450^2 + 465^2)}{5 \times 3} - 41102,2$$

$$= 14,44$$

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

$$= \frac{(485^2 + 460^2 + 415^2)}{5 \times 3} - 41102,2$$

$$= 167,78$$

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

$$= 197,78 - 14,44 - 167,78$$

$$= 15,56$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$= 498 - 197,78$$

$$= 300,00$$

$$KTP = JKP / dbP$$

$$= 197,78 / 8$$

$$= 24,72$$

$$KTA = JKA / dbA$$

$$= 14,44 / 2$$



$$= 7,22$$

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

$$= 167,78 / 2$$

$$= 83,89$$

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

$$= 15,56 / 4$$

$$= 3,89$$

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

$$= 300,00 / 36$$

$$= 8,33$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 24,72 / 8,33 = 2,97$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 7,22 / 8,33 = 0,87$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 83,89 / 8,33 = 10,07$$

$$\text{F-hit A} * \text{B} = \text{KTA} * \text{B} / \text{KTG} = 3,89 / 8,33 = 0,47$$

Tabel Analisis Ragam (Anova) Motilitas Individu

SK	db	JK	KT	F hitung	F	F
P	8	197,78	24,72	2,97	0,05	0,01
A	2	14,44	7,22	0,87*	3,26	5,25
B	2	167,78	83,89	10,07**	3,26	5,25
AB	4	15,56	3,89	0,47*	2,63	3,89
Galat	36	300,00	8,33			
Total	44	498	11,31			

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

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



Lampiran 3. Analisa Viabilitas Lama Ekuilibrasi suhu dingin dan Lama Thawing

Faktor A (jam)	Ulangan	Faktor B (s)			Total
		30	60	90	
1	1	58,30	49,79	49,51	157,60
	2	54,91	56,54	50,71	162,16
	3	54,24	55,63	55,13	165,00
	4	61,51	60,85	56,41	178,77
	5	55,00	50,52	54,09	159,61
Sub Total		283,96	273,33	265,85	823,14
1,5	1	55,19	55,26	49,41	159,86
	2	55,26	54,23	48,31	157,80
	3	59,01	56,00	54,49	169,50
	4	58,22	59,18	54,55	171,95
	5	55,05	55,63	48,26	158,94
Sub Total		282,73	280,3	255,02	818,05
2	1	56,72	55,76	51,84	164,32
	2	60,24	56,71	54,32	171,27
	3	58,01	60,40	56,36	174,77
	4	59,25	58,68	55,42	173,35
	5	56,42	55,39	49,45	161,26
Sub Total		290,64	286,94	267,39	844,97
Total		857,33	840,57	788,26	2486,16

Keterangan : Faktor A = Lama ekuilibrasi suhu dingin
Faktor B = Lama thawing

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

$$= \frac{(2486,16)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 137355,37$$



$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (58,30^2 + 54,91^2 + 54,24^2 + \dots + 49,45^2) - 137355,37 \\ &= 504 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(283,96^2 + 273,33^2 + 265,85^2 + \dots + 267,19^2)}{5} - 137355,37 \\ &= 217,02 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK} \\ &= \frac{(823,14^2 + 818,05^2 + 844,97^2)}{5 \times 3} - 137355,37 \\ &= 27,27 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKB} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{ra} - \text{FK} \\ &= \frac{(857,33^2 + 840,57^2 + 788,26^2)}{5 \times 3} - 137255,37 \\ &= 173,06 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 217,02 - 27,27 - 173,06 \\ &= 16,68 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 504 - 217,02 \\ &= 286,82 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\ &= 217,02 / 8 \\ &= 27,13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dbA} \\ &= 27,27 / 2 \\ &= 13,63 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTB} &= \text{JKB} / \text{dbB} \\ &= 243,63 / 2 \\ &= 121,81 \end{aligned}$$



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

$$= 16,68 / 4$$

$$= 4,17$$

$$KTG = JKG / dbg$$

$$= 286,82 / 36$$

$$= 7,97$$

$$F\text{-hit P} = KTP / KTG = 27,13 / 7,97 = 3,40$$

$$F\text{-hit A} = KTA / KTG = 13,63 / 7,97 = 1,71$$

$$F\text{-hit B} = KTB / KTG = 86,53 / 7,97 = 10,86$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA * B / KTG = 4,17 / 7,97 = 0,52$$

Tabel Analisis Ragam (Anova) Viabilitas

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
P	8	217,02	27,13	3,40	2,21	3,05
A	2	27,27	13,63	1,71*	3,26	5,25
B	2	173,06	86,53	10,86**	3,26	5,25
AB	4	16,68	4,17	0,52*	2,63	3,89
Galat	36	286,82	7,97			
Total	44	504	11,45			

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

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



Lampiran 4. Analisa Abnormalitas Lama Ekuilibrasi suhu dingin dan Lama Thawing

Faktor A (jam)	Ulangan	Faktor B (s)			Total
		30	60	90	
1	1	10,64	12,24	10,75	33,63
	2	9,83	10,67	11,35	31,85
	3	10,45	11,88	10,56	32,89
	4	10,04	11,63	11,97	33,64
	5	9,89	10,65	10,23	30,77
Sub Total		50,85	57,07	54,86	162,78
1,5	1	10,00	10,10	10,59	30,69
	2	11,84	10,67	12,36	34,87
	3	10,60	9,86	11,02	31,48
	4	10,20	10,44	11,76	32,4
	5	11,97	11,88	10,76	34,61
Sub Total		54,61	52,95	56,49	164,05
2	1	10,12	10,58	12,04	32,74
	2	10,40	10,18	11,68	32,26
	3	10,68	11,55	11,98	34,21
	4	10,96	10,07	11,79	32,82
	5	11,15	10,31	11,64	33,1
Sub Total		53,31	52,69	59,13	165,13
Total		158,77	162,71	170,48	491,96

Keterangan : Faktor A = Lama Ekuilibrasi suhu dingin
Faktor B = Lama thawing

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{(\sum Y_{ij})^2}{a.b.c} \\
 &= \frac{(491,96)^2}{3 \times 3 \times 5} \\
 &= 5378,33
 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 \text{JKT} &= \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\
 &= (10,64^2 + 9,83^2 + 10,45^2 + \dots + 11,64^2) - 5378,33 \\
 &= 25
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKP} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\
 &= \frac{(50,85^2 + 57,07^2 + 54,86^2 + \dots + 59,13^2)}{5} - 5378,33 \\
 &= 10,46
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKA} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK} \\
 &= \frac{(162,78^2 + 164,05^2 + 165,13^2)}{5 \times 3} - 5378,33 \\
 &= 0,18
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKB} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{ra} - \text{FK} \\
 &= \frac{(158,77^2 + 162,71^2 + 170,48^2)}{5 \times 3} - 5378,33 \\
 &= 4,73
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\
 &= 10,46 - 0,18 - 4,73 \\
 &= 5,55
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\
 &= 25 - 10,46 \\
 &= 14,83
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbP} \\
 &= 5,30 / 8 \\
 &= 0,66
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dbA} \\
 &= 0,18 / 2 \\
 &= 0,09
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{KTB} &= \text{JKB} / \text{dbB} \\
 &= 4,73 / 2 \\
 &= 2,37
 \end{aligned}$$



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

$$= 5,55 / 4$$

$$= 1,39$$

$$KTG = JKG / dbg$$

$$= 14,83 / 36$$

$$= 0,41$$

$$F\text{-hit P} = KTP / KTG = 1,31 / 0,41 = 3,17$$

$$F\text{-hit A} = KTA / KTG = 0,09 / 0,41 = 0,22$$

$$F\text{-hit B} = KTB / KTG = 2,37 / 0,41 = 5,74$$

$$F\text{-hit A*B} = KTA * B / KTG = 1,39 / 0,41 = 3,36$$

Tabel Analisis Ragam (Anova) Abnormalitas

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
P	8	10,46	1,31	3,17	2,21	3,05
A	2	0,18	0,09	0,22*	3,26	5,25
B	2	4,73	2,37	5,74**	3,26	5,25
AB	4	5,55	1,39	3,36*	2,63	3,89
Galat	36	14,83	0,41			
Total	44	25	0,57			

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

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



Lampiran 5. Analisa Integritas Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin dan Lama Thawing

Faktor A (jam)	Ulangan	Faktor B (s)			Total
		30	60	90	
1	1	55,32	47,36	46,53	149,21
	2	48,84	52,46	49,64	150,94
	3	53,33	54,35	52,87	160,55
	4	58,06	58,97	54,72	171,75
	5	45,45	48,57	51,39	145,41
Sub Total		288,15	261	261,71	255,15
1,5	1	53,16	52,27	46,98	152,41
	2	53,33	54,1	47,21	154,64
	3	57,53	53,09	51,09	161,71
	4	57,78	58,18	52,94	168,9
	5	53,85	51,96	45,78	151,59
Sub Total		280,73	275,65	269,6	244
2	1	53,45	51,00	49,81	154,26
	2	58,33	54,35	51,72	164,4
	3	56,36	58,62	53,09	168,07
	4	54,67	54,55	54,79	164,01
	5	53,25	53,85	48,35	155,45
Sub Total		281	276,06	272,37	257,76
Total		849,88	812,71	803,68	756,91

Keterangan : Faktor A = Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin
Faktor B = Lama *thawing*

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

$$= \frac{(756,91)^2}{3 \times 3 \times 5}$$

$$= 125167,87$$



$$\begin{aligned} \text{JKT} &= \sum(Y_{ijk})^2 - \text{FK} \\ &= (55,32^2 + 48,84^2 + 53,33^2 + \dots + 48,35^2) - 125167,87 \\ &= 570 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{(261,2^2 + 261,71^2 + 255,15^2 + \dots + 257,76^2)}{5} - 125167,87 \\ &= 182,66 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} &= \frac{\sum(\sum y_i)^2}{rb} - \text{FK} \\ &= \frac{(777,86^2 + 789,25^2 + 806,19^2)}{5 \times 3} - 125167,87 \\ &= 27,10 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKB} &= \frac{\sum(\sum y_j)^2}{ra} - \text{FK} \\ &= \frac{(812,71^2 + 803,68^2 + 756,91^2)}{5 \times 3} - 125167,87 \\ &= 119,61 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKA} * \text{B} &= \text{JKP} - \text{JKA} - \text{JKB} \\ &= 182,66 - 27,10 - 119,61 \\ &= 35,95 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JKG} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 570 - 182,66 \\ &= 386,98 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTP} &= \text{JKP} / \text{dbp} \\ &= 182,66 / 8 \\ &= 22,83 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTA} &= \text{JKA} / \text{dba} \\ &= 27,10 / 2 \\ &= 13,55 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KTB} &= \text{JKB} / \text{dbb} \\ &= 119,61 / 2 \\ &= 59,81 \end{aligned}$$

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



$$= 35,95 / 4$$

$$= 8,99$$

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

$$= 386,98 / 36$$

$$= 10,75$$

$$\text{F-hit P} = \text{KTP} / \text{KTG} = 22,83 / 10,75 = 2,12$$

$$\text{F-hit A} = \text{KTA} / \text{KTG} = 13,55 / 10,75 = 1,26$$

$$\text{F-hit B} = \text{KTB} / \text{KTG} = 59,81 / 10,75 = 5,56$$

$$\text{F-hit A*B} = \text{KTA*B} / \text{KTG} = 8,99 / 10,75 = 0,84$$

Tabel Analisis Ragam (Anova) Integritas Membran

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
P	8	182,66	22,83	2,12	2,21	3,05
A	2	27,10	13,55	1,26*	3,26	5,25
B	2	119,61	59,81	5,56**	3,26	5,25
AB	4	35,95	8,99	0,84*	2,63	3,89
Galat	36	386,98	10,75			
Total	44	570	12,95			

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

*) tidak berpengaruh nyata ($P < 0,05$)



Lampiran 6. Dokumentasi



Penampungan semen



Vagina Buatan (Panjang ± 30 cm, diameter 10 cm)



Pengencer dihomogenkan dengan *magnetig stirer*



Pengencer Tris aminomethan



Mikroskop binokular Olympus (CX21)



pH meter



Pengamatan menggunakan Mikroskop



Nitrogen Cair



Ulasan preparat



Refrigerator



Haemocytometer



Waterbath

