

**PENGARUH PENAMBAHAN GENISTEIN DALAM
PENGECER *TRIS-AMINOMETHAN* DAN LAMA
THAWING TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

**Aisyah Nur Arifiyanti
NIM. 175050101111156**



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

2021





UNIVERSITAS
BRAWIJAYA



**PENGARUH PENAMBAHAN GENISTEIN DALAM
PENGECER *TRIS-AMINOMETHAN* DAN LAMA
THAWING TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

**Aisyah Nur Arifiyanti
NIM. 17505010111156**

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

PROGRAM STUDI PETERNAKAN

FAKULTAS PETERNAKAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021



**PENGARUH PENAMBAHAN GENISTEIN DALAM
PENGECER *TRIS-AMINOMETHAN* DAN LAMA
THAWING TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI
PERANAKAN ONGOLE**

SKRIPSI

Oleh:

Aisyah Nur Arifiyanti
NIM. 175050101111156

Telah dinyatakan lulus dalam ujian Sarjana
Pada Hari/Tanggal : Rabu/21 Juli 2021

Mengetahui:
Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya

Menyetujui:
Pembimbing Utama,

Prof.Dr.Sc.Agr.Ir. Suyadi,
MS, IPU., ASEAN Eng.
NIP.19620403.198701.1001
Tanggal.....

Prof.Dr.Sc.Agr.Ir. Suyadi,
MS, IPU., ASEAN Eng.
NIP.19620403.198701.1001
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 sebagaiberikut:

No	Nama Mahasiswa	Judul Penelitian
1	Hamida Madani Rosmiati 175050100111065	Pengaruh Penambahan Genistein Terhadap Kualitas Semen Cair Di Suhu Ruang Pada Sapi PO Di Tuban
2	Diajeng Doyu Pangestu 175050100111179	Pengaruh Kadar Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethane Terhadap Kualitas Semen Peranakan Ongole (Po) Selama Penyimpanan Suhu Dingin
3	Herjuna Aditama 175050100111184	Efek Suplementasi Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur Terhadap Mutu Semen Sapi Peranakan Ongole Post Thawing
4	Aik Awallikah 175050101111034	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Dan Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair



		Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole
5	Natalia Kristina Lubis 175050101111045	Pengaruh Penambahan Antioksidan Genistein Dalam Pengencer Dan Lama Ekuilibrasi Pada Uap Nitrogen Terhadap Kualitas Semen Sapi Po Setelah Thawing
6	Adhe Tya Purnomo 175050101111118	Pengaruh Penambahan Genistein Dalam Pengencer Tris Aminomethan Terhadap Kualitas Post Thawing Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) Pada Suhu Berbeda
7	Aisyah Nur Arifiyanti 175050101111156	Pengaruh Penambahan Genistein Dalam Pengencer Tris-Aminomethan Dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole
8	Aulia Setyo Lazuardi 175050107111065	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Dingin Dan Posisi Straw Pada Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Setelah Pengenceran Dengan Penambahan Genistein

9	Dicky Ananta Kudori 175050107111143	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole Yang Disuplementasi Dengan Genistein
10	Calista Mega Herawati 175050100111115	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Suhu Thawing Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Po
11	Kristina Delvina Gultom 175050100111186	Pengaruh Lama Ekuilibrasi Suhu Dingin Dan Lama Thawing Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Po
12	Pandu Alif Utama 175050101111136	Pengaruh Lama Waktu Dan Jarak Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Po Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer
13	Kristina Sidabalok 175050100111158	Pengaruh Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Dan Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Po Dengan



		Penambahan Genistein Pada Pengencer
14	Frando Gabriel Situmorang 175050107111108	Pengaruh Posisi Straw Pada Ekuilibrasi Uap Nitrogen Cair Dan Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapu Po Dengan Penambahan Genistein Pada Pengencer

Demikian surat pernyataan ini disampaikan, agar digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 21 Juli 2021
Mahasiswa Peneliti

(Aisyah Nur Arifiyanti)
NIM. 175050101111156



EFFECT OF SUPPLEMENTATION GENISTEIN IN THE TRIS- AMINOMETHANE DILUENT AND DURATION THAWING ON SPERM QUALITY PERANAKAN ONGOLE

Aisyah Nur Arifiyanti¹, dan Suyadi²

1) Student of Faculty of Animal Science, Universitas
Brawijaya, Malang

2) Lecturer of Faculty of Animal Science, Universitas
Brawijaya, Malang

E-mail: aisyahicha614@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the effect of supplementation genistein in the tris aminomethane diluent and duration thawing on sperm quality peranakan ongole. The materials used for this experiment were peranakan ongole bull's semen which were collected using the artificial vagina method. The design used was completely randomized design (CRD) factorial with five replications. The first factor is the supplementation genistein include: G1: Without the addition of genistein (control), G2: The addition of 10 μM genistein, G3: The addition of genistein 30 μM , and G4: The addition of genistein 50 μM thawed with different times as the second factor consisting of T1: 30 seconds of thawing time, T2: The thawing time is 60 seconds, and T3: The thawing time is 90 seconds. Data were analyzed by analysis of variance, if there is a real effect then continued with Ducan Test. The result showed that the addition of genistein significant ($P < 0.05$) on



individual motility, viability and membrane integrity. Thawing time significant ($P < 0.05$) on individual motility, viability, abnormality and membrane integrity. Meanwhile, the interaction between adding genistein and thawing time is not significant ($P > 0.05$). The best result that shown on post thawing motility is in treatment addition genistein with 30 mM thawing time 30 seconds.

Keywords: Peranakan Ongole, Genistein, Thawing, Frozen Semen

PENGARUH PENAMBAHAN GENISTEIN DALAM PENGECER *TRIS-AMINOMETHAN* DAN LAMA *THAWING* TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI PERANAKAN ONGOLE

Aisyah Nur Arifiyanti¹, dan Suyadi²

- 1) Mahasiswa Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,
Malang
- 2) Dosen Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,
Malang

E-mail: aisyahicha614@gmail.com

RINGKASAN

Sapi Peranakan Ongole merupakan salah satu bangsa sapi potong yang memiliki keunggulan daya adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan pakan dan iklim yang kurang baik, tahan terhadap penyakit, daya reproduksi yang baik dan mempunyai pertumbuhan relative cepat. Penggunaan semen beku untuk IB memiliki keuntungan dapat disimpan lebih lama, tetapi pengaruh cekaman dingin selama prosesing dapat menurunkan kualitas semen. Penambahan bahan pengencer yang tepat dapat mempertahankan kualitas semn beku. Adanya kandungan antioksidan dalam genistein diharapkan mampu mempertahankan kualitas semen beku sapi Peranakan Ongole.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dan lama thawing yang berbeda terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi bagi akademisi maupun masyarakat umum berkaitan dengan penambahan



genistein dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dan lama thawing untuk mempertahankan kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole

Materi yang digunakan yaitu semen sapi Peranakan Ongole dari UPT Tuban. Penampungan dilakukan menggunakan vagina buatan. Syarat semen segar yang digunakan untuk pengenceran yaitu memiliki nilai motilitas individu $\geq 70\%$ dengan motilitas massa minimal 2++. Pengencer yang digunakan yaitu pengencer tris aminomethan (Merck Jerman) kuning telur. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu experimental laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang diulang 5 kali. Faktor pertama adalah penambahan genistein meliputi: G1 : Tanpa penambahan genistein (kontrol), G2 : Penambahan genistein 10 μM , G3 : Penambahan genistein 30 μM , dan G4 : Penambahan genistein 50 μM yang di thawing dengan waktu yang berbeda sebagai faktor kedua yang terdiri atas T1 : Lama thawing 30 detik, T2 : Lama thawing 60 detik, dan T3 : Lama thawing 90 detik. Apabila hasil yang didapatkan ada perbedaan maka dilanjutkan dengan uji ducan. Variable yang diamati selama penelitian yaitu motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan genistein berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase motilitas individu, viabilitas dan integritas membran. Tetapi pada motilitas individu hasil yang didapatkan $< 40\%$ tidak memenuhi standart SNI untuk diinseminasikan. Lama thawing berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran. Sementara itu, interaksi penambahan genistein dan lama thawing tidak memberikan pengaruh secara nyata ($P > 0,05$). Berdasarkan hasil

penelitian disimpulkan bahwa penambahan genistein mampu mempertahankan kualitas semen sapi Peranakan Ongole dengan hasil terbaik pada perlakuan penambahan genistein 30 μM dan lama thawing terbaik adalah 30 detik.



DAFTAR ISI

Isi	Halaman
RIWAYAT HIDUP	i
KATA PENGANTAR	ii
PERNYATAAN PENELITIAN BERSAMA	iv
ABSTRACT	viii
RINGKASAN	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan penelitian	6
1.4 Manfaat penelitian	6
1.5 Kerangka konsep penelitian	6
1.6 Hipotesis	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Sapi Peranakan Ongole	10
2.2. Pengembangan Sapi Peranakan Ongole.....	11
2.3. Inseminasi Buatan	11
2.4. Penampungan Semen dan Evaluasi Kualitas Semen	





12

2.4.1 Uji Makroskopis Semen..... 13

2.4.2 Uji Mikroskopis Semen 16

2.5. Pengenceran Semen..... 20

2.6. Penyimpanan Semen 21

2.7. Thawing dan Pengaruh Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen..... 23

2.8. Reaksi Biocemist Selama Penyimpanan..... 25

2.9. Reaksi Ros dan Efeknya 27

2.10. Antioksidan..... 29

2.11. Genistein Sebagai Antioksidan 30

BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN 31

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian..... 31

3.2. Materi Penelitian 31

3.3. Metode Penelitian..... 32

3.4. Variabel Penelitian 33

3.4.1 Pemeriksaan Makroskopis Semen 33

3.4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Semen..... 34

3.5. Prosedur Penelitian..... 37

3.5.1 Pembuatan Pengencer Tris aminomethane Kuning Telur 37

3.5.2 Pelarutan Genistein 38

3.5.3 Pembuatan Pengencer Tris aminomethan

Kuning Telur dengan Penambahan Genistein...	38
3.5.4 Penampungan Semen	39
3.5.5 Pemeriksaan Kualitas Semen Segar	40
3.5.6 Pengenceran Semen	40
3.5.7 Proses Pembekuan Semen	41
3.5.8 Thawing	42
3.6 Analisis data.....	42
3.7 Kerangka Oprasional	44
3.8 Batasan Istilah.....	45
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
4.1 Evaluasi Semen Segar Sapi Peranakan Ongole.....	47
4.2 Evaluasi Semen Before Freezing Sapi Peranakan Ongole.....	51
4.3 Evaluasi Semen Post Thawing	55
4.3.1 Hasil Pengamatan Motilitas Individu Semen Beku Sapi Peranakan Ongole.....	55
4.3.2 Hasil Pengamatan Viabilitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole	59
4.3.3 Hasil Pengamatan Abnormalitas Semen Belu Sapi Peranakan Ongole.....	65
4.3.4 Hasil Pengamatan Integritas Membran Semen Beku Sapi Peranakan Ongole.....	69
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	74



5.1 Kesimpulan.....	74
5.2 Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA.....	75
LAMPIRAN.....	90



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kombinasi perlakuan	33
2. Hasil pengamatan semen segar Sapi Peranakan Ongole..	47
3. Kualitas Semen Sapi PO <i>Before Freezing</i>	52
4. Rata-rata hasil pengamatan <i>motilitas</i> individu (%)	56
5. Rata-rata hasil pengamatan <i>viabilitas</i> (%).....	61
6. rata-rata hasil pengamatan <i>abnormalitas</i> (%)	66
7. Rata-rata hasil pengamatan <i>integritas membran</i> (%).....	70



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
--------	---------

1. Kerangka Pikir Penelitian	9
2. Sapi Peranakan Ongole (Ditjen PKH, 2012).....	11
3. Skema mekanisme sel selama proses pembekuan (Yeste, 2016)	27
4. Cryodamage akibat ROS (Hezavehei, et.al, 2018).....	29
5. Prosedur pengenceran semen	41
6. Kerangka Oprasional	44
7. Grafik persentase motilitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.	59
8. Pengamatan viabilitas spermatozoa perbesaran 400 kali, (A) hidup (tidak berwarna) dan (B) mati (berwarna)	60
9. Grafik persentase viabilitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.	64
10. Pengamatan abnormalitas spermatozoa dengan perbesaran 400 kali, (A) Normal dan (B) Abnormal (ekor putus).....	65
11. Grafik persentase abnormalitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.	68
12. Integritas membrane spermatozoa perbesaran 400 kali, (A) ekor lurus dan (B) ekor melingkar	69
13. Grafik persentase integritas membran spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.	73



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Data rata-rata kualitas semen segar sapi peranakan ongole	90
2. Analisis statistik Motilitas Individu Spermatozoa Setelah Thawing (%)	91
3. Analisis statistik Viabilitas Spermatozoa Setelah Thawing (%)	95
4. Analisis statistik Abnormalitas Spermatozoa Setelah Thawing (%)	99
5. Analisis statistik Integritas Membran Spermatozoa Setelah Thawing (%)	103

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

%	= Presentase
°C	= Derajat celcius
pH	= <i>Power of hydrogen</i>
RAL	= Rancangan Acak Lengkap
SNI	= Standar Nasional Indonesia
Cm	= Centimeter
μM	= mikromolar
DO	= <i>Days Open</i>
S/C	= <i>Service per Conception</i>
CR	= <i>Conception Rate</i>
DNA	= <i>deoksiribonukleat</i>
<i>et al</i>	= <i>et al (and others)</i> atau dan kawan - kawan
dkk	= dan kawan - kawan



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan hasil pemuliaan melalui sistem persilangan *grading up* sapi Jawa dan Sumba Ongole (SO), bangsa sapi ini terbentuk sekitar tahun 1930 hingga kini sudah tersebar luas di wilayah Indonesia dan bagian terbesar dari populasi terdapat di pulau Jawa terutama di Jawa Timur. Sapi PO berkembang sebagai bangsa sapi yang unggul dengan karakteristik morfologi yang mudah dikenali (Rohayati dan Christi, 2017). Keunggulan sapi PO adalah memiliki daya adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan, pakan dan iklim yang kurang baik, tahan terhadap penyakit, daya reproduksi yang baik, mempunyai pertumbuhan relative cepat dan merupakan sapi dwiguna (penghasil daging dan ternak pekerja), sudah terbiasa dibudidayakan oleh peternak secara umum, mudah perawatannya dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Susilawati, Puspita, Kuswati, dkk., 2019). Tampilan reproduksi sapi PO S/C ($1,28 \pm 0,32$ kali), DO ($156,9 \pm 29,33$ hari), dan CR (74%) lebih tinggi dibandingkan dengan sapi Peranakan Limousin yang hanya mendapatkan nilai S/C ($1,52 \pm 0,39$ kali), DO ($172,9 \pm 19,21$ hari), dan CR (52,3%) sehingga sapi PO lebih efisien menghasilkan anak dalam jangka waktu yang pendek (Yulyanto, Susilawati dan Ihsan, 2014). Potensi tersebut menjadikan sapi PO idola bagi para petani-peternak sekaligus menjadi ancaman adanya pengurangan stok. Kondisi ini perlu diatasi dengan peningkatan jumlah populasi yang bisa dilakukan dengan mengoptimalkan program inseminasi buatan.

Inseminasi buatan (IB) telah terbukti memberikan



dampak positif pada peningkatan populasi ternak. Program Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi reproduksi yang mampu dan telah berhasil meningkatkan perbaikan mutu genetik (Susilawati, dkk., 2011). Keuntungan lain dari inseminasi buatan adalah mampu meningkatkan mutu lebih cepat karena menggunakan semen dari pejantan unggul, dapat menghemat biaya pemeliharaan pejantan dan penularan penyakit kelamin dari ternak yang diinseminasi dapat dibatasi atau dicegah (Setiawan, 2018). Pengembangan sapi Peranakan Ongole dengan inseminasi buatan sudah banyak dilakukan di berbagai daerah di Indonesia karena para peternak menilai dengan dilakukannya IB menghemat biaya pemeliharaan ternak jantan. Keberhasilan IB ditentukan oleh beberapa faktor yaitu keterampilan inseminator, kondisi ternak dan kualitas semen beku. Program inseminasi buatan sepenuhnya bisa dilaksanakan hanya dengan semen beku yang memungkinkan penyimpanan yang lebih lama dan cakupan distribusi yang tidak terbatas (Layek et al., 2016), tetapi beku juga memiliki kekurangan yaitu kualitas semen setelah pembekuan akan menurun.

Semen beku adalah semen yang diencerkan sesuai prosedur proses pengolahan sehingga menjadi semen beku dan disimpan dalam medium nitrogen cair (N₂ cair) dengan suhu -196o C. Selama proses pengolahan, kualitas semen beku akan dipengaruhi oleh proses koleksi, pengenceran, pengemasan, dan pembekuan semen (Setiono, Suharyati, dan Santoso, 2015). Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, sehingga proses kehidupan akan berlanjut setelah pembekuan dihentikan atau dicairkan kembali. Proses pembekuan dan pencairan kembali inilah yang sering

menyebabkan kerusakan yang berujung penurunan kualitas spermatozoa. Masalah utama yang sering dihadapi dalam proses pembekuan semen adalah pengaruh cold shock terhadap sel spermatozoa yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit di dalam larutan atau di dalam sel (Muzakkir, dkk., 2017). Kristal es yang dihasilkan akan meningkatkan aktivitas metabolisme yang juga menyebabkan reaksi radikal bebas. Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas diperlukan bahan pengencer yang dapat menjamin kebutuhan fisik dan kimia selama proses pendinginan, pembekuan maupun pada saat thawing sehingga kualitas semen tetap terjaga (Yusuf, dkk., 2017)

Proses pengenceran memiliki tujuan untuk memperbanyak volume semen, melindungi spermatozoa dari cold shock, menyediakan zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, menyediakan buffer untuk mempertahankan pH, tekanan osmotik, dan keseimbangan elektrolit, mencegah kemungkinan terjadinya pertumbuhan kuman. Bahan pengencer yang dapat digunakan untuk semen sapi adalah pengencer tris aminomethan kuning telur. Pengencer trisaminomethan kuning telur merupakan larutan buffer yang mengandung asam sitrat yang berperan sebagai penyangga (buffer) dan fruktosa sebagai bahan energi, untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat serta mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, sumber energi dan melindungi spermatozoa dari cold shock (Widjaya, 2011). Cold shock dapat merusak membran plasma sel yang berakibat kematian pada spermatozoa (Kurnia, Udin dan Jaswandi, 2012), hal ini diakibatkan selama proses pembekuan kemudian



thawing spermatozoa melewati berbagai perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim dan memicu produksi reactive oxygen species (ROS) (Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara, 2014). Produksi ROS yang berlebihan tidak dapat dinetralisir oleh sistem pertahanan, antioksidan yang ada pada spermatozoa perlahan akan hilang selama proses pembekuan menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Susilowati, 2008).

Kerusakan membran plasma semen akibat radikal bebas dapat dicegah dengan pemberian antioksidan dalam pengencer. Antioksidan berfungsi melindungi sistem biologi terhadap suatu efek yang berpotensi merusak suatu proses atau reaksi yang menyebabkan oksidasi yang meluas (Rizal dan Herdis, 2010). Beberapa waktu terakhir banyak dilakukan penelitian mengenai tanaman kedelai (*Glycine max* Merr.). Biji, daun, dan bunganya sudah sering dimanfaatkan manusia dalam bidang farmakologi dan kedokteran untuk pencegahan dan terapi penyakit. Kemudian dari pemurnian kedelai didapatkan genistein. Genistein tidak dapat larut dalam air, tetapi larut dalam etanol, metanol dan minyak jagung. Genistein merupakan salah satu senyawa fitoestrogen, karena memiliki struktur kimia yang menyerupai hormon estrogen yaitu 17β -estradiol. Senyawa tersebut mampu berikatan dengan reseptor estrogen sehingga memberikan aktifitas fisiologis sebagai hormon estrogen (Primiani, 2019). Genistein memiliki kandungan antioksidan yang berfungsi memodifikasi membran hemodialisis dan menyebabkan penurunan radikal bebas oksidatif (ROS) yang signifikan dan juga dapat memberikan pengaruh pada fungsi spermatozoa dan mendukung seluruh proses reproduksi (Prihantoko, et. al., 2020). Genistein berperan sebagai penghambat seperti angiogenesis, peroksidasi



lemak, antioksidan, dan senyawa anti kanker. Kandungan antioksidan yang dimiliki genistein diduga mampu menetralkan reaksi radikal bebas pada saat pemrosesan semen beku sapi Peranakan Ongole.

Selain saat pembekuan, rendahnya kualitas semen beku juga bisa disebabkan karena metode thawing yang tidak tepat. Thawing merupakan pencairan kembali semen yang telah dibekukan sebelum dilakukan inseminasi. Saat thawing, spermatozoa mengalami perubahan suhu yang ekstrim menyebabkan kerusakan sel, menurunkan motilitas, viabilitas, keutuhan membran plasma, dan merusak DNA spermatozoa (Ardhani, dkk., 2020). Lama thawing yang dilakukan sebelum inseminasi buatan sering tidak terpantau dengan jelas, banyak pendapat mengenai lama waktu thawing yang bisa dilakukan inseminator dilapangan sebelum melakukan inseminasi. Malinda, Santoso dan Lactuconsina (2021) menyatakan bahwa semakin singkat waktu thawing maka semakin banyak sperma yang layak hidup dan Kusumawati dkk., (2019) menyatakan semakin lama waktu thawing maka persentase motilitas dan viabilitas semen beku semakin meningkat dan abnormalitasnya semakin rendah.

Berdasarkan uraian diatas, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh dari penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan kuning telur dan metode thawing yang sesuai untuk mempertahankan kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole yang diharapkan adanya antioksidan dapat mencegah penurunan kualitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole yang diakibatkan oleh radikal bebas. Sehingga diharapkan dalam jangka panjang bisa membantu meningkatkan jumlah populasi Sapi Peranakan Ongole dengan jalan peningkatan kualitas semen beku.



1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan untuk mempertahankan kualitas semen sapi Peranakan Ongole?
2. Bagaimana pengaruh lama waktu thawing terhadap kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole?
3. Bagaimana pengaruh interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing dalam mempertahankan kualitas semen Sapi Peranakan Ongole?

1.3 Tujuan penelitian

1. Mengetahui pengaruh penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan untuk mempertahankan kualitas semen sapi Peranakan Ongole
2. Mengetahui pengaruh lama waktu thawing terhadap kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole?
3. Mengetahui pengaruh interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing dalam mempertahankan kualitas semen Sapi Peranakan Ongole?

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi bagi akademisi maupun masyarakat umum berkaitan dengan penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dan lama thawing untuk mempertahankan kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole

1.5 Kerangka konsep penelitian

Sapi Peranakan Ongole adalah sapi dwiguna (penghasil

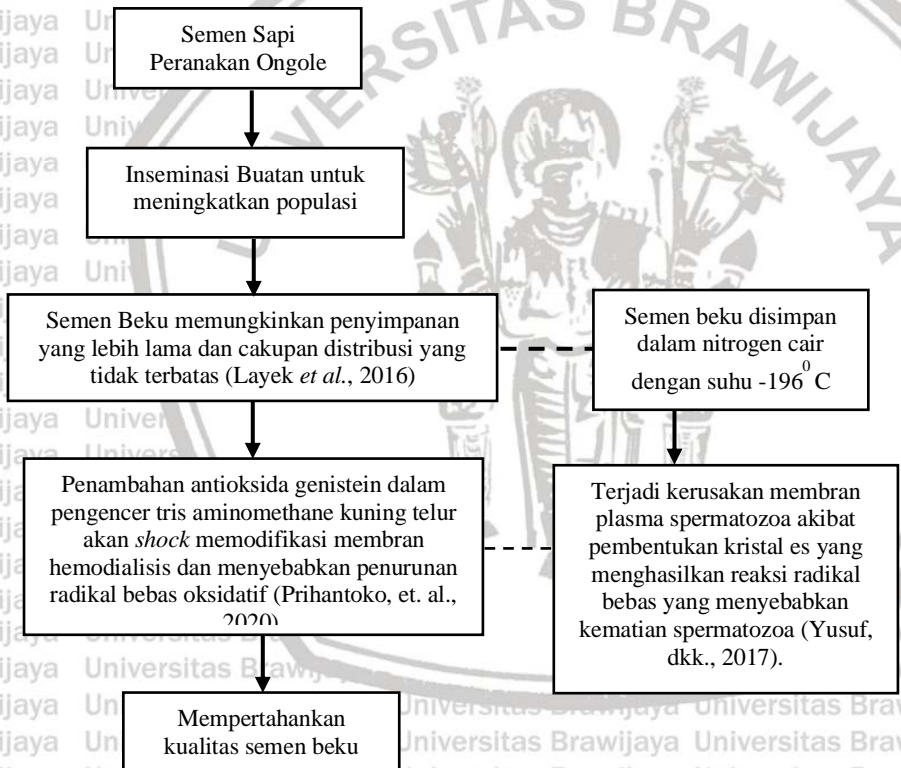
daging dan sapi pekerja) yang memiliki potensi unggul karena memiliki daya reproduksi yang baik dan memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap perbedaan iklim serta mampu mengonsumsi pakan yang berkualitas rendah. Hal ini membuat sapi PO menjadi salah satu sapi lokal yang banyak dibudidayakan. Cara yang optimal untuk membantu para peternak meningkatkan populasi sapi PO adalah inseminasi buatan (IB). Keberhasilan program IB dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain, ternak betina itu sendiri, keterampilan inseminator, ketepatan waktu IB, deteksi berahi, handling semen dan kualitas semen (Susilawati, 2011). Kualitas semen sebagai salah satu faktor penting dalam keberhasilan IB dipengaruhi oleh proses pengolahan semen mulai dari penampungan, pengenceran, ekuilibrasi dan pembekuan semen. Selain itu, metode thawing yang digunakan oleh inseminator sangat berperan dalam menentukan kualitas semen yang akan diinseminasikan. Bagian paling kritis dari proses pembekuan semen adalah saat pembekuan itu sendiri dan thawing (Rizal dan Herdis, 2010). Dalam proses tersebut semen akan mengalami peristiwa kejutan dingin (*cold shock*) dan serangan radikal bebas. Kejutan dingin (*cold shock*) dan radikal bebas dapat mengakibatkan penurunan terhadap kualitas semen (Bebas, Buyona, Budiasa, 2016).

Radikal bebas didefinisikan sebagai atom atau molekul dengan satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan bersifat tidak stabil, berumur pendek, dan sangat reaktif menarik elektron molekul lain untuk mencapai stabilitas yang menyebabkan potensi kerusakan pada biomolekul dengan merusak integritas lipid, protein, dan DNA yang mengarah pada peningkatan stres oksidatif (Arnanda dan Nurwanda, 2019). Penambahan zat antioksidan pada pengencer dapat mencegah aktivitas radikal bebas terhadap kerusakan membran



sel spermatozoa yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa, berperan sebagai sumber energi untuk mempertahankan motilitas spermatozoa (Nugroho, Susilawati dan wajuningsih, 2014). Genistein merupakan salah satu antioksidan yang dapat ditambahkan kedalam pengencer. Genistein adalah isoflavon yang ditemukan di kacang-kacangan terutama kedelai sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas. Genistein mampu mengurangi produk peroksidasi lipid yang diinduksi radikal bebas dan menstabilkan struktur membran sel (Ganai and Husain, 2017). Pengenceran bertujuan untuk meningkatkan volume semen, memberikan nutrisi bagi spermatozoa dan mempertahankan viabilitas dari spermatozoa. Pengencer tris aminomethan memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan, antara lain fruktosa, laktosa, asam amino dan vitamin dalam kuning telur (Saifudin, dkk., 2018). Tris aminomethan mampu memberi nutrisi bagi spermatozoa dan mempertahankan viabilitas spermatozoa. Penambahan kuning telur bertujuan sebagai bahan sumber energi bagi spermatozoa dan sebagai krioprotektan ekstraseluler dengan harga yang terjangkau (Wiratri, 2014).





Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian

1.6 Hipotesis

Penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan kuning telur, lama waktu thawing dan interaksi antara penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan kuning telur dan lama waktu thawing berengaruh terhadap kualitas semen beku spi peranakan ongole.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi Peranakan Ongole

Sapi Peranakan Ongole (PO) adalah sapi hasil persilangan antara sapi-sapi lokal yang berasal dari india dan termasuk golongan zebu yang dimasukkan ke Indonesia pada permulaan abad ke-20 yang di kembangkan di pulau Sumbawa (Susilawati, 2017). persilangan sapi PO berasal dari sapi jawa asli (Madura) dan Sapi Ongole secara grading up (keturunan hasil persilangan dikawinkan kembali dengan Sapi Ongole (Susilowati, dkk., 2019). Sapi Peranakan Ongole memiliki ciri-ciri badan berwarna putih sedikit keabu-abuan, mata besar cerah, telinga panjang menggantung, kaki panjang, berurat kuat, bertubuh besar dan berpunuk. Pertambahan bobot badan harian berkisar 0,4 - 0,8 kg, pejantan dewasa memiliki bobot badan hingga 600 kg. Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan salah satu jenis sapi yang paling banyak dicari di pasaran (Sutarno and Setyawan, 2016). Sapi ini terkenal sebagai tipe dwiguna, yaitu tipe sapi pedaging dan sapi pekerja, mempunyai kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap perbedaan kondisi lingkungan, memiliki tenaga yang kuat, serta aktivitas reproduksi induknya cepat kembali normal setelah beranak, serta jantannya memiliki kualitas semen yang baik (Irmaylin, Hartono dan Santosa, 2014).



Gambar 2. Sapi Peranakan Ongole (Ditjen PKH, 2012)

2.2. Pengembangan Sapi Peranakan Ongole

Pada tahun 1906, sapi ongole didatangkan langsung dari Madras di India ke Pulau Sumba. Selanjutnya, tahun 1916 sapi ongole yang sudah berkembang biak di sumba mulai menyebar ke tempat-tempat lain di Indonesia dengan sebutan Sumba Ongole (SO). Pada tahun 1930-an, pemerintah Hindia-Belanda dengan kebijakan di bidang perternakan yang disebut ongolisasi mengawinsilangkan sapi SO dengan sapi Jawa, untuk memperbaiki ukuran dan bobot badan sehingga lahirlah sapi Peranakan Ongole (PO) (Murtidjo, 2012). Saat ini sapi PO merupakan sapi lokal yang banyak dibudidayakan di Indonesia dengan populasi terbesar di pulau Jawa. Di Jawa Timur, beberapa lokasi yang banyak dijumpai sapi PO adalah Situbondo, Probolinggo, Tuban dan Bojonegoro. (Susilawati, 2017). Sedangkan di Jawa tengah, populasi sapi PO terbesar terdapat di Kebumen yaitu sebesar 90% dari populasi sapi merupakan sapi PO (Subiharta, Utomo, dan Sudrajad, 2012).

2.3. Inseminasi Buatan

Teknologi 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 (Susilawati, 2011). Teknik IB dikenal luas oleh masyarakat peternak dikarenakan prosesnya yang sangat mudah dan murah. Dengan Teknik ini peternak tidak perlu lagi memelihara ternak jantan yang dipelihara dengan tujuan dijadikan pemancek, sehingga efektivitas dan efisiensi reproduksi dapat tercapai (Isnaini dan Fazrien, 2020). Inseminasi buatan pada hewan, awalnya dikembangkan untuk megendalikan penyebaran penyakit. Hal ini guna menghindari pengangkutan hewan yang berpotensi pathogen untuk unit hewan lain pada saat kawin dengan menghindari kontak fisik antara individu (Ismaya dan Dwitarizki, 2019). Empat faktor utama yang mendukung keberhasilan Inseminasi Buatan di tingkat lapangan yaitu ketrampilan petugas, kemampuan deteksi birahi oleh peternak, ada tidaknya penyakit gangguan reproduksi dan kualitas semen beku. (Sa'adah, Mukson dan Ondho, 2019).

2.4. Penampungan Semen dan Evaluasi Kualitas Semen

Guna mendapatkan kualitas spermatozoa yang maksimal maka perlu di dilaksanakan metode dan waktu penampungan semen yang optimal sehingga kualitas semen yang diperoleh memenuhi syarat untuk di inseminasikan, dalam penelitian Herdis (2014) menyatakan bahwa gerakan massa spermatozoa terbaik diperoleh pada waktu penampungan pukul 06.00 dengan suhu sekitar 22,7oC sebesar 2,9 dibandingkan gerakan massa pada waktu penampungan pukul 12.00 yang hanya sebesar 2,1. Terdapat 3 metode penampungan semen yaitu: 1). Massage (pemijatan/pengurutan), 2). Vagina buatan

dan 3). Elektroejaculator. Metode massage biasanya digunakan pada unggas, babi dan lainnya, vagina buatan digunakan untuk penampungan semen ternak secara rutin sedangkan elektroejaculator digunakan untuk hewan langka atau ternak yang tidak dapat ditampung menggunakan vagina buatan karena kecelakaan misalnya. Sebelum dilakukan penampungan dengan vagina buatan, pejantan dilakukan fals mounting 3-5 kali yang bertujuan untuk meningkatkan libidonya. Selanjutnya vagina buatan dipersiapkan sesuai dengan suhu badan dan telah diberi vaselin di ujung karetinya, dengan menggunakan sudut kemiringan 45o dan ujungnya terdapat tabung reaksi yang telah ditutup bahan gelap agar semen yang dihasilkan tidak terkena sinar matahari langsung. Dari semen yang dihasilkan selanjutnya dilakukan uji kualitas semen, pengenceran dan pembekuan sehingga dapat digunakan untuk IB (Susilawati, 2011). Pengujian kualitas semen dilakukan sebelum dan sesudah pengolahan. Uji kualitasnya meliputi pemeriksaan makroskopis yakni volume, warna, bau, konsistensi, dan pH. Uji mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi (Nugroho, Susilawati, dan Wahjuningsih, 2014).

2.4.1 Uji Makroskopis Semen

a. Volume Semen

Volume semen adalah salah satu titik ukur yang digunakan untuk mengetahui kualitas suatu semen sapi pejantan dalam 1 kali ejakulat koleksi semen (Komariah, dkk., 2020). Cara menilai volume semen dilakukan dengan melihat langsung pada skala tabung penampung yang digunakan untuk menampung semen, sehingga dapat langsung ditentukan volume semennya (Saputra, Ihsan dan Isnaini, 2017). Garner and Hafez (2008) dalam Zamuna, dkk. (2015) menyatakan bahwa volume semen sapi berkisar



antara 5-8 ml per ejakulasi. Volume semen dipengaruhi oleh bangsa, bobot badan, umur, pakan dan frekuensi penampungan (Khairi, 2016).

b. Warna Semen

Penilaian warna semen dilakukan dengan melihat langsung semen yang ditampung. Pada umumnya semen sapi berwarna putih kekuning-kuningan atau hampir seputih susu, hal ini karena adanya riboflavin didalam semen. Warna tersebut sering dikacaukan apabila tercampur urin, oleh sebab itu bau dapat membedakannya (Susilawati, 2011). Feradis (2010) menambahkan bahwa semen sapi normal berwarna putih susu atau krem keputihan dan keruh, derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Dalam kondisi normal dikatakan bahwa semakin pekat warna semen yang terlihat, maka semakin kental konsistensi semen tersebut (Zulyazzaini, dkk., 2016).

c. Bau

Bau semen sapi yaitu khas semen yang menunjukkan bahwa semen tersebut normal dan tidak terdapat kontaminasi sehingga dapat dilakukan prosesing semen (Pratiwi, Suharyati, dan Hartono, 2014). Cara untuk membau semen yaitu tabung semen dipegang pada posisi tegak lurus. Tabung didekatkan ke bagian muka pemeriksa dan mulut tabung tersebut dilewatkan di bawah lubang hidung. Pada saat tabung melewati lubang hidung tarik nafas perlahan sampai bau semen tercium (Hardijanto, 2010).

d. Konsistensi

Kekentalan atau konsistensi atau viskositas merupakan salah satu sifat semen yang memiliki kaitan dengan kepadatan atau konsentrasi spermatozoa didalamnya. Semakin kental semen dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi spermatozoanya. Semen ayam, domba dan sapi umumnya merupakan semen yang sedang sampai kental, sedangkan kuda dan babi memiliki semen yang encer (Feradis, 2010). Susilawati (2011) menjelaskan penilaian konsistensi encer apabila (<1000.106 spermatozoa/ml semen), sedang ($1000.106-1500.106$ spermatozoa/ ml semen), dan pekat (>1500.106 spermatozoa/ ml semen). Pemeriksaan konsistensi semen dilakukan tidak dengan menggoyang tabung yang berisi semen, tetapi dengan melihat angka konsentrasi semen yang sebelumnya telah dihitung dengan menggunakan spectrophotometer (Adhyatma, Isnaini dan Nuryadi, 2013)

e. Derajat Keasaman (pH)

Kehidupan spermatozoa didalam semen sangat ditentukan oleh derajat keasaman. Semakin tinggi atau semakin rendah pH semen akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. pH semen sapi berkisar antara 6,2-6,8 (Susilawati, 2011). Keasaman semen perlu diukur untuk memastikan bahwa semen hasil penampungan memiliki karakteristik yang normal. Pemeriksaan pH semen dapat dilakukan menggunakan kertas indikator keasaman. Setiap bangsa sapi mempunyai nilai pH semen segar yang

berbeda-beda (Feradis, 2010).

2.4.2 Uji Mikroskopis Semen

a. Motilitas Massa

Motilitas merupakan salah satu kriteria penentu kualitas semen yang dilihat dari banyaknya spermatozoa yang motil progresif dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang ada dalam satu pandang mikroskop (Woli, Kusumawati, dan Krisnaningsih, 2017). Motilitas massa adalah pergerakan dari sel-sel spermatozoa yang secara bersama-sama membentuk gelombang. Semakin tinggi skala gerakan atau motilitas massa, maka kualitas sperma semakin baik. Penilaian motilitas massa hasil penelitian sangat bagus apabila bernilai (+++). Penilaian dilakukan dengan 4 kriteria yaitu "0" dimana tidak ada pergerakan yang terjadi pada spermatozoa dan hanya membentuk gumpalan yang diam, (+) gumpalan spermatozoa mengalami pergerakan yang sangat sedikit sehingga hampir dipastikan memiliki fertilitas yang rendah, (++) pergerakan gumpalan spermatozoa bergerak seperti awan dengan pergerakan massif, dan yang terakhir yaitu (+++) dimana kumpulan spermatozoa bergerak dengan cepat membentuk seperti awan hitam dengan gerakan masif yang sangat cepat. Dalam penilaian kualitas semen maka semen dengan pergerakan massa 0 dan + tidak layak untuk dilakukan perlakuan berikutnya karena dipastikan motilitas semakin menurun seiring proses yang terjadi dan menyebabkan fertilitas semen tersebut rendah (Isnaini dan Fazrien, 2020).

b. Motilitas Individu Spermatozoa

Motilitas individu spermatozoa merupakan faktor terpenting dalam uji kualitas semen yang menentukan semen tersebut layak atau tidaknya untuk diproses ketahapan selanjutnya karena pada dasarnya spermatozoa bergerak menghampiri ovum (Sunami, Isnaini, dan Wahjuningsih, 2017). Spermatozoa yang mempunyai motilitas yang kurang progresif dimungkinkan tidak dapat sampai ke ovum. SNI (2017) menetapkan bahwa motilitas semen segar diharuskan mempunyai nilai minimum 70% untuk dapat dilakukan proses berikutnya sedangkan motilitas semen setelah di proses minimum 40%. Lemma and Shemu (2015) menyatakan bahwa adanya korelasi yang signifikan antara libido dan motilitas individu spermatozoa dimana nilai libido yang tinggi akan menunjukkan nilai motilitas individu spermatozoa yang lebih tinggi juga.

c. Konsentrasi

Konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah kematangan seksual pejantan, volume ejakulat, interval penampungan, kualitas pakan, kesehatan reproduksi, besar testis, umur, musim, dan perbedaan geografis (Widhyari, dkk., 2015). Angka konsentrasi digunakan untuk mengetahui berapa banyak pengencer yang harus ditambahkan kedalam semen, serta untuk mengetahui banyaknya straw yang nantinya dapat diproduksi. (Isnaini dan Fazrien, 2020). Menurut Ratnawati, Isnaini dan Susilawati (2017) Konsentrasi spermatozoa di atas 1000 juta/ml menunjukkan

semen telah memenuhi standar semen sapi jantan (200-1800 juta/ml) dan layak untuk diproses selanjutnya.

d. Viabilitas

Viabilitas spermatozoa adalah persentase sel spermatozoa yang hidup ditinjau dari kondisi membran sel. Evaluasi ini dilakukan dengan memberikan zat pewarna Eosin-negrosin. Spermatozoa yang masih hidup sebelum dilakukan pengulasan akan mempertahankan warna yang transparan dan tidak menyerap warna dari eosin-negrosin karena struktur membran sel masih terjaga utuh dan tidak mengalami kerusakan. Spermatozoa yang mati sebelum dilakukan ulasan akan menyerap warna eosin-negrosin dikarenakan membran sel yang telah rusak sehingga partikel warna akan masuk menembus membran sel spermatozoa yang mati (Isnaini dan Fazrien, 2020). Persentase viabilitas berhubungan erat dengan fertilitas spermatozoa, jika persentase viabilitas tinggi maka fertilitas spermatozoa juga tinggi. Penurunan viabilitas terjadi pada saat dilakukan pengenceran yang mengakibatkan adanya kerusakan membran sel sehingga terjadi kematian sel (Lestari, Ihsan dan Isnaini, 2014).

e. Abnormalitas

Spermatozoa yang memiliki morfologi normal merupakan syarat bagi terjadinya fertilisasi. Abnormalitas merupakan keadaan dimana spermatozoa mengalami kecacatan pada salah satu



atau seluruh bagian tubuh spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan (Susetyarini, dkk., 2020). Abnormalitas spermatozoa yang sering dijumpai saat pengamatan adalah abnormalitas sekunder yaitu ekor patah atau melingkar yang terjadi akibat terlalu banyak tekanan saat pembuatan preparat serta kepala tanpa ekor (Lestari, Ihsan dan Isnaini, 2014).

f. Integritas Membran

Membran plasma merupakan lapisan semipermeabel yang menyelimuti sel spermatozoa. Integritas membran plasma serta fungsinya penting untuk menjaga viabilitas sel. Bagian ini menjadi struktur penting dari sel sebagai gerbang yang menghubungkan lingkungan ekstra seluler dan intra seluler, dengan demikian keutuhan struktur dan fungsi membran plasma sangat penting untuk dievaluasi dalam pengujian kualitas spermatozoa (Artika, Dkk., 2014). Spermatozoa pada semen beku mengalami kondisi hipertonik selama pembekuan hingga pencairan (thawing) dan kondisi isotonik selama pembersihan sperma *in vitro* atau ketika berada pada saluran reproduksi betina selama inseminasi buatan (Ball and Peters 2004). Untuk mengevaluasi keutuhan membran maka perlu dilakukan pengecekan pada integritas membran menggunakan uji hypoosmotic swelling test (Hos Test) dengan cara semen dimasukkan ke dalam



larutan hipoosmotik yang mengandung natrium sitrat dan fruktosa yang dilarutkan dalam aquades (Diliyana, Susilawati dan Rahayu, 2014). Hypo-osmotic swelling (HOS) test merupakan metode yang murah dan mudah diaplikasikan dalam pengujian integritas membran plasma (Nalley dan Arifiantini 2013). Pengujian HOS didasarkan pada kemampuan spermatozoa membengkak setelah dimasukkan ke dalam larutan hipoosmotik. Spermatozoa dengan membran utuh jika ditempatkan pada media hipoosmotik akan berusaha meningkatkan volume air didalam tubuhnya agar cairan didalam dan diluar spermatozoa tetap seimbang. Upaya ini menyebabkan terjadinya penyempitan pada membran yang menutupi ekor, sehingga memaksa ekor spermatozoa melingkar. Proses menggelembung diawali pada bagian ekor, kemudian dilanjutkan bagian tengah dan kepala sehingga menyebabkan kepala menggelembung (Susilawati, 2011).

2.5. Pengenceran Semen

Pengenceran adalah proses lanjutan dalam pembuatan semen beku yaitu dengan menambahkan bahan-bahan yang menunjang hidup semen selama dibekukan. Pengenceran semen dilakukan karena volume semen sapi berkisar 4-8 ml, sedangkan inseminasi menggunakan volume 0,25 ml, sehingga semen yang dihasilkan dalam satu ejakulat dapat digunakan untuk menginseminasi sejumlah hewan betina yang sedang birahi. Pada proses pengenceran semen dibutuhkan pengencer yang dapat menjamin terjadinya proses metabolisme dan respirasi spermatozoa selama proses peninginan, pencetakan kedalam straw ataupun selama pembekuan (Susilawati, 2013).

Bahan pengencer yang memenuhi syarat adalah salah satu masalah penting dalam inseminasi buatan. Beberapa syarat pengencer yang baik adalah mampu mempertahankan pH semen, mencegah terjadinya cold shock (kejutan dingin) pada spermatozoa dalam suhu rendah serta mengandung bahan nutrisi (Toelihere,1993; Achlis, dkk, 2013). Berbagai macam bahan pengencer semen menunjukkan hasil yang tidak sama dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa (Foeh, dkk., 2019). Pengencer tris aminomethan memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan bagi spermatozoa, antara lain fruktosa, laktosa, rafinosa, asam- asam amino dan vitamin dalam kuning telur sehingga spermatozoa dapat memperoleh sumber energi dalam jumlah yang cukup (Wiratri, Susilawati, dan Wahjuningsih, 2014). Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membrane sel spermatozoa. Kuning telur mengandung asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral untuk kebutuhan hidup spermatozoa (Saifudin, Isnaini, dan Yekti, 2018).

2.6. Penyimpanan Semen

Teknik penyimpanan semen yaitu melakukan kombinasi dan manipulasi suhu serta komposisi kimiawi semen. Teknik penyimpanan semen yang sampai saat ini telah digunakan yaitu penyimpanan dalam bentuk cair dan beku (Isnaini dan Fazrien, 2020). Penyimpanan semen cair dilakukan di dalam lemari pendingin dengan cara dimasukkan ke dalam tabung yang tertutup kemudian tabung tersebut dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi air yang kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Lupitasari, dkk., 2019). Penyimpanan semen semen pada suhu 5oC dapat dilakukan dengan metode water jacket dan metode free water jacket. Water jacket yaitu metode

penambahan air pada beaker glass sebagai tempat menaruh tabung reaksi yang sudah berisi semen sesudah di encerkan. Metode free water jacket yaitu penyimpanan semen dengan refrigerator yang diletakkan secara bebas tanpa penambahan media air. Penyimpanan dengan penambahan air mampu menciptakan kondisi lingkungan mikro yang stabil sehingga semen mampu beradaptasi terhadap perubahan suhu drastis yang dapat mengakibatkan cold shock. Tahapan penyimpanan semen suhu dingin berjalan secara perlahan dan minimal selama 1 jam untuk menurunkan suhu semen dari 37oC menjadi 5oC (Susilawati dan Yekti, 2018). Penggunaan semen cair juga bisa menjadi solusi untuk mengatasi sulitnya ketersediaan nitrogen cair serta mahalnya tabung kontainer, karena syarat penyimpanan untuk semen cair tidak sesulit semen beku yaitu cukup pada suhu dingin 4-5oC (Muhammad, Susilawati dan Wahjuningsih, 2016).

Penyimpanan semen dengan pembekuan merupakan Teknik terbaru yang kini diterapkan dan telah terbukti dapat dilakukan secara efektif bagi para inseminator. Pembekuan dilakukan dengan penambahan bahan khusus sehingga dapat bertahan tidak hanya dalam suhu dingin namun hingga suhu jauh lebih rendah dibawah titik beku. Bahan yang ditambahkan dalam semen cair sebelum pembekuan yaitu gliserol yang secara umum digunakan sebagai krioprotektan intraseluler yang berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat adanya penurunan suhu yang sangat drastis sekaligus menjaga permeabilitas membran spermatozoa tetap baik. Pembekuan semen menggunakan medium nitrogen cair (N₂) dengan suhu -196oC, masa simpan semen beku mencapai 30 tahun bergantung pada kondisi straw dan ketersediaan nitrogen cair secara terus menerus (Isnaini dan Fazrien, 2020). Sebelum dilakukannya proses pembekuan terlebih dahulu semen di



ekuilibrasi. Ekuilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya pada waktu pembekuan dalam N2 cair kematian spermatozoa dapat dikurangi (Novita, Karyoto, dan Rasminah, 2019). Ekuilibrasi sebelum pembekuan dilakukan dengan meletakkan straw yang berisi sperma diatas permukaan nitrogen cair dengan ketinggian 8 cm selama 9 menit, setelah itu dilakukan freezing dengan membenamkan straw ke dalam nitrogen cair (Bintara, dkk., 2018). Kematian spermatozoa selama pembekuan berkisar antara 20-80% dengan rata-rata 50%. Untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa maka semen beku harus selalu disimpan dalam nitrogen cair yang bersuhu -196°C dan terus dipertahankan pada suhu tersebut sampai waktu dipakai. Semen beku yang sudah dicairkan kembali tidak dapat dibekukan Kembali (Hoesni, 2013).

2.7. Thawing dan Pengaruh Lama Thawing Terhadap Kualitas Semen

Thawing dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisi ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menimbulkan heat shock effect maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku (Salim, Susilawati, Wahjuningsih, 2012). Saat thawing semen mengalami tekanan yang berat akibat peningkatan suhu yang drastis. Selanjutnya, terjadi peningkatan aktivitas metabolisme, yang meningkatkan konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme (Rizal dan Herdis, 2010). Metode thawing semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan program IB karena thawing semen beku

merupakan prosedur yang paling penting dalam IB jika menggunakan metode thawing yang salah akan mempengaruhi kualitas spermatozoa yang akan berdampak pada hasil IB. Prinsip thawing adalah semakin dingin suhu thawing maka waktunya semakin lama, sebaliknya semakin tinggi maka waktunya semakin cepat (Susilawati, 2011). Kombinasi suhu dan lama thawing yang baik adalah yang mengakibatkan sedikit kerusakan sel sperma, sehingga tetap memiliki kemampuan membuahi sel telur yang tinggi (Apriliansi, Suharyati, dan Santosa, 2014).

Cara pelaksanaan thawing yang berkembang dilapangan sangat beragam. Aprilina, Suharyati dan Santosa (2014) menyatakan bahwa lama thawing yang terlalu singkat akan menghasilkan motilitas spermatozoa rendah, begitu juga sebaliknya apabila lama thawing terlalu lama akan menyebabkan motilitas spermatozoa rendah. Hal ini disebabkan pada lama thawing yang terlalu singkat menyebabkan kristal-kristal es belum mencair secara sempurna sehingga menghambat pergerakan sel spermatozoa secara aktif sedangkan waktu thawing terlalu lama menyebabkan penurunan motilitas individu karena aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal sehingga terjadi peningkatan produksi asam laktat. Sedangkan Salim, Susilawati dan Wahyuningsih (2020) menyatakan bahwa bila suhu thawing rendah dan durasi thawingnya panjang menyebabkan terjadi penurunan daya motilitas individu. Durasi thawing yang singkat belum menyebabkan terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permeabilitas membran utuh dan tidak terganggu, ini menjamin fluiditas dan keseimbangan homeostatis membran sel karena pertukaran senyawa-senyawa berlangsung secara normal dan durasi thawing yang singkat juga belum menyebabkan terjadinya



peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang berakibat menurunkan daya tahan hidup. Semakin lama durasi thawing dan perlakuan bisa menyebabkan stres untuk spermatozoa, sehingga spermatozoa tidak mampu melewati masa kritis selama thawing karena panjangnya lama waktu thawing (Novita, 2020).

2.8. Reaksi Biocemist Selama Penyimpanan

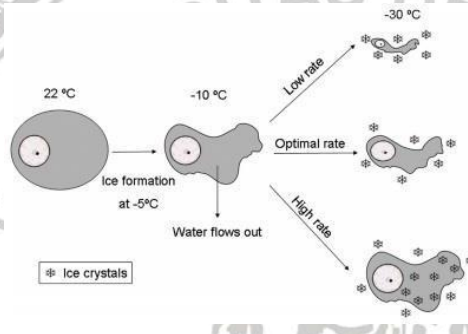
Pada saat proses pengenceran dan penyimpanan semen berlangsung akan terjadi reaksi antara spermatozoa dengan oksigen yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas yang terbentuk akan memicu terjadinya peroksidasi lemak membran sehingga akan menurunkan daya hidup dan motilitas spermatozoa. Peroksidasi lipida pada membran plasma merupakan mekanisme kunci dalam ROS yang menyebabkan terjadinya kerusakan spermatozoa dan bagian dari ketidakfertilan akibat dampak dari proses peroksidasi yang dapat merusak DNA dan protein (Siahaan, Laksmi, dan Bebas 2012). Kerusakan spermatozoa dapat terjadi karena adanya perubahan tekanan osmotik pada plasma semen yang mengakibatkan permeabilitas menurun. Kerusakan membran yang melindungi spermatozoa dari perubahan lingkungan akan menyebabkan sperma rapuh, khususnya pada bagian ekor, hal tersebut akan mengakibatkan perubahan morfologi sperma sehingga menjadi abnormal. Kerusakan membran plasma akan menyebabkan terganggunya metabolisme, motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi karena lepasnya komponen seluler dan inaktivasi protein-protein di dalam akrosom (Hidayat, 2018). Membran plasma yang utuh (MPU) merupakan hal yang mutlak harus dimiliki spermatozoa yang baik karena membran plasma memegang peranan yang central dalam mengatur seluruh



proses biokimia yang terjadi di dalam sel. Membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid yang mengandung asam lemak tak jenuh sehingga sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (Ardhani, dkk., 2020).

Proses pendinginan, pembekuan dan thawing mengakibatkan stress fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan memfertilisasi spermatozoa. Kerusakan membran spermatozoa banyak terjadi karena pembentukan kristal es khususnya selama titik kritis 0-10oC (Susilawati, 2011). Pada suhu ini es terbentuk dimedia sekitar semen tetapi intraselular sel tetap tidak beku hanya sangat dingin. Karena potensi kimia air lebih tinggi di intraselular dari pada saat keadaan beku, air mengalir keluar dari sel dan membeku secara eksternal. Saat laju pendinginan sangat cepat, air intraseluler tidak mengalir keluar sepenuhnya menyebabkan cold shock dan pembentukan kristal es. Sedangkan saat laju pendinginan lambat air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensi kimia air intra dan ekstraselular serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraselular, meningkatnya tekanan osmosis pada periode pembekuan merusak protein dan lipoprotein didalam spermatozoa dan akrosom (Yeste, 2016). Isnawati dkk. (2016) menyatakan bahwa kejutan dingin menyebabkan terjadinya perpindahan ion melewati membran dan penurunan kandungan lipid (fosfolipid dan kolesterol) yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktural membran plasma.





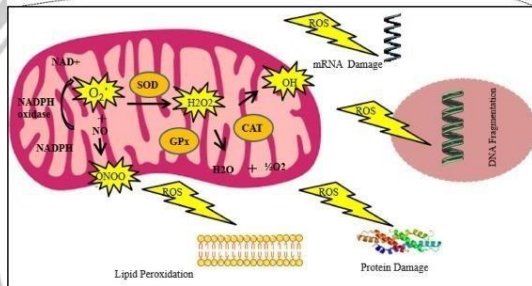
Gambar 3. Skema mekanisme sel selama proses pembekuan (Yeste, 2016)

2.9. Reaksi Ros dan Efeknya

Radikal bebas merupakan molekul yang relative tidak stabil. Untuk memperoleh kestabilannya, maka molekul yang bersifat reaktif tersebut akan mencari pasangan elektronnya, sehingga disebut juga sebagai reactive oxygen species (ROS) (Simanjuntak dan Zulham, 2019). Jika disuatu tempat mengalami reaksi oksidasi dan dari reaksi tersebut menghasilkan radikal bebas (OH) maka dengan tidak adanya antioksidan, radikal bebas ini akan menyerang dan bereaksi dengan molekul-molekul lain di sekitarnya (Pratama dan Busman, 2020). Reaksi antara radikal bebas dan lipida terutama asam lemak tak jenuh yang dominan menyusun membran plasma sel akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipida. Apabila reaksi awal ini tidak dikendalikan maka akan terjadi reaksi secara terus menerus yang pada akhirnya akan merusak sebagian besar atau seluruh membran plasma sel spermatozoa. Rusaknya membran plasma sel akan mengganggu seluruh proses biokemis di dalam sel yang pada akhirnya akan

menyebabkan kematian sel itu sendiri (Gunawan, Laksmi, dan Trilaksana, 2012). Mekanisme reaksi radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh dimulai dari satu atom hidrogen yang dilepaskan sehingga menghasilkan radikal lipid bebas. Kemudian radikal lipid bebas bereaksi dengan oksigen (O_2) membentuk lipid peroksida atau endoperoksida. Jika asam lemak tak jenuh mula-mula berupa asam lemak yang mengandung paling sedikit tiga ikatan rangkap, maka produk akhirnya adalah malondialdehid (MDA). Peroksidasi lipid yang berkepanjangan merusak struktur matrik lipid, menyebabkan instabilitas pada membrane (Feradis, 2010). Senyawa oksigen reaktif menyerang membran plasma sel sperma dan merusak strukturnya, sehingga pada tingkat stres oksidatif tinggi dimana jumlah senyawa oksigen reaktif lebih banyak daripada antioksidan yang ada maka akan meningkatkan abnormalitas sekunder sel sperma (Solihati, dkk., 2018). Radikal bebas menyebabkan kerusakan integritas DNA spermatozoa hingga kematian sel. Radikal bebas dalam jumlah berlebihan dapat menyebabkan kerusakan sel. Kerusakan sel inilah yang diduga menjadi penyebab menurun konsentrasi spermatozoa dalam semen dan penurunan kecepatan gerak sperma (Susmiarsih, Kenconoviati dan Kuslestari, 2018).





Gambar 4. Cryodamage akibat ROS
(Hezavehei, et.al, 2018)

2.10. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari radikal bebas dalam oksidasi lipid. Cara kerja dari antioksidan yaitu dengan mendonorkan satu elektronnya ke senyawa yang bersifat oksidan, sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Sayuti & Yenrina, 2015). Untuk mempertahankan kualitas semen yang akan dibekukan agar tetap terjaga selama dalam penyimpanan diperlukan pengencer yang mengandung antioksidan yang dapat menjaga kualitas semen dalam proses ekuilibriasi hingga pembekuan (Wiratri, Susilawati, dan Wahjuningsih, 2014). Penambahan antioksidan dalam pengencer semen diperlukan untuk melindungi membran plasma sel sperma (Yahaq, Ondho dan Sutyono, 2019). Antioksidan dalam pengencer juga berguna untuk mempertahankan metabolisme sel serta mengatasi laju kerusakan membran sel akibat peroksidasi lemak. Spermatozoa dengan membran plasma yang masih utuh

menunjukkan persen hidup dan viabilitas sperma tinggi menandakan bahwa tudung akrosom dan organel sel didalamnya terlindungi (Tethool, Ollong dan Koibur, 2017). Tetapi dosis antioksidan yang terlalu banyak dapat berpengaruh terhadap laju oksidasi yang menyebabkan aktivitas antioksidan menghilangkan bahkan antioksidan yang berlebihan dapat menjadi prooksidan (Savitri, Suharyati, dan Siswanto, 2014).

2.11. Genistein Sebagai Antioksidan

Genistein adalah isoflavon yang ditemukan di kacang-kacangan terutama kedelai sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas dan oksigen. Genistein mampu penguragi produk peroksidasi lipid yang diinduksi radikal bebas dan menstabilkan struktur membran sel (Ganai and Husain, 2017). Genistein juga melindungi semen saat proses pembekuan tetapi konsentrasi genistein yang tinggi dapat merusak kualitas spermatozoa dan integritas fungsionalnya (Elsayed, dkk., 2019). Menurut Martinez, et. al, (2010) dalam penelitiannya menggunakan semen beku setelah di thawing, penambahan genistein ke dalam pengencer menghambat radikal bebas dan melindungi DNA pada sperma, hal ini ditunjukkan dengan kerusakan DNA yang lebih rendah pada kelompok suplementasi yang diberi genistein. Sedangkan dalam penelitian Prihantoko, et. al, (2020) penambahan genistein kedalam pengencer berpengaruh nyata terhadap motilitas tapi tidak berpengaruh nyata terhadap viabilitas spermatozoa pada sempel semen cair dan beku sapi Ongole.



BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT PT dan HMT Karangwaru, Desa Sidorejo, Kecamatan Tuban, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Pada bulan Maret sampai dengan April 2021.

3.2 Materi Penelitian

1. Semen Sapi Peranakan Ongole

Semen yang digunakan berasal dari dua ekor sapi PO yang dimiliki oleh UPT PT HMT Karangwaru Tuban dengan ear tag 0076 yang berumur 6 tahun 6 bulan dengan bobot badan 488,41 kg dan sapi ear tag 1035 yang berumur 2 tahun 11 bulan dengan bobot badan 327,61 kg. Sapi tersebut dipelihara di kandang dengan atap berbentuk gable dan diberi pakan hijauan dan konsentrat. Penampungan semen dilakukan oleh tenaga ahli dari BBIB (Balai Besar Inseminasi Buatan) Singosari, Malang menggunakan vagina buatan dan betina pemancing.

2. Bahan Kimia

Pengencer Tris aminomethane (Merck Jerman) dan larutan Hypoosmotic Swelling (HOS) test didapatkan dari Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang. Glycerol didapatkan dari CV. Makmur Sejati Malang. Genistein berasal dari Sigma-Aldrich jenis khusus untuk analisis laboratorium yang dibeli di kota Surabaya, Jawa Timur.

3. Kuning Telur



Kuning telur yang digunakan merupakan kuning telur dari ayam kampung yang dipelihara oleh mahasiswa atau didapat melalui pembelian di pasar baru tuban.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (experimental laboratory), dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial atas dua faktor. Faktor pertama merupakan penambahan genistein (G) sedangkan faktor kedua merupakan lama waktu thawing (T). Perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Faktor pertama yaitu:

G1: Tanpa penambahan kadar genistein (kontrol)

G2: Penambahan genistein 10 mM

G3: Penambahan genistein 30 mM

G4: Penambahan genistein 50 mM

Faktor kedua yaitu:

T1: Lama waktu thawing 30 detik

T2: Lama waktu thawing 60 detik

T3: Lama waktu thawing 90 detik

Sehingga didapat $4 \times 3 = 12$ kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Setiap unit percobaan terdiri dari 0,2 mL semen sapi Peranakan Ongole. Perlakuan Penelitian ini sebagai berikut:



Tabel I. Kombinasi perlakuan

PERLAKUAN	T1	T2	T3
G1	G1T1	G1T2	G1T3
G2	G2T1	G2T2	G2T3
G3	G3T1	G3T2	G3T3
G4	G4T1	G4T2	G4T3

Keterangan:

G1T1 : 0 genistein + waktu thawing 30 detik

G1T2 : 0 genistein + waktu thawing 60 detik

G1T3 : 0 genistein + waktu thawing 90 detik

G2T1 : 10 mM genistein + waktu thawing 30 detik

G2T2 : 10 mM genistein + waktu thawing 60 detik

G2T3 : 10 mM genistein + waktu thawing 90 detik

G3T1 : 30 mM genistein + waktu thawing 30 detik

G3T2 : 30 mM genistein + waktu thawing 60 detik

G3T3 : 30 mM genistein + waktu thawing 90 detik

G4T1 : 50 mM genistein + waktu thawing 30 detik

G4T2 : 50 mM genistein + waktu thawing 60 detik

G4T3 : 50 mM genistein + waktu thawing 90 detik

3.4 Variabel Penelitian

Variable yang diukur dalam penelitian ini adalah:

3.4.1 Pemeriksaan Makroskopis Semen

1. Volume: Volume semen pada satu kali penampungan dilihat langsung pada skala tabung yang digunakan pada proses penampungan.
2. Bau: Bau semen langsung diamati dengan menggunakan indra penciuman. Bau semen sapi yaitu khas semen yang menunjukkan semen tersebut



normal dan tidak terkontaminasi sehingga dapat dilakukan prosesing semen (Pratiwi, Suharyati, dan Hartono, 2014)

3. Warna: Warna semen sapi PO dilihat langsung pada tabung penampungan. semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu (Suslawati, 2013).
4. pH: Derajat keasaman (pH) semen diketahui dengan cara diambil semen menggunakan mikropipet dan ditetaskan pada kertas lakmus, setelah terjadi perubahan dibaca derajat keasaman (pH) dengan menggunakan skala kertas lakmus.
5. Konsistensi: Konsistensi semen segar dinilai dengan melihat kecepatan pergerakan semen yang dimiringkan dalam tabung dengan penilaian mulai dari encer, sedang dan pekat.

3.4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Semen

1. Motilitas massa: Uji kualitas semen segar sapi PO dengan mengamati pergerakan dari kumpulan spermatozoa. Cara yang dilakukan dengan meletakkan semen segar diatas object glass tanpa ditutup cover glass dan diamati pergerakan spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 x (Susilawati, 2011)
2. Motilitas individu: Uji kualitas semen segar sapi PO dengan mengamati persentase motilitas progresif spermatozoa. Cara yang dilakukan yaitu diambil 1 tetes semen menggunakan ose, diletakkan pada object glass dan ditutup dengan

cover glass. Gerak individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali (Muhammad, Susilawati dan Wahjuningsih, 2016)

3. Konsentrasi: Konsentrasi semen diamati menggunakan *haemocytometer* yang di mikroskop dengan perbesaran 400 kali. perhitungan dilakukan pada 5 kotak besar dalam kotak hitung haemocytometer yang terletak diagonal dari atas ke bawah. Konsentrasi terhitung: jumlah spermatozoa dalam 5 kotak besar $\times 10$ juta/ml semen (Adnyani, Sumardani dan Sarini, 2018).
4. Viabilitas: Perhitungan persentase spermatozoa yang hidup dan mati dapat dibedakan melalui reaksi terhadap warna tertentu, sel spermatozoa yang tidak motil dan dianggap mati akan menghisap warna dan sel spermatozoa yang motil dan yang hidup tidak berwarna (Susilawati, 2013). Penentuannya dengan membuat ulasan eosin-negrosin, kemudian dihitung dalam bentuk persentase antara spermatozoa yang hidup dan mati. Pemataman menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa yang hidup dan mati yang terhitung minimal 200 spermatozoa (Susilawati, 2011). Perhitungan viabilitas menggunakan rumus sebagai berikut:

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

5. Abnormalitas: Penilaian abnormalitas dilakukan dengan membuat preparat ulas menggunakan eosin negrosin dan diamati dengan mikroskop perbesaran 400 kali. Pengamatan difokuskan pada bagian kepala, leher dan ekor yang abnormal, yaitu: tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proximal dan bentuk abnormal ekor pada bagian distal droplet (Susilawati, 2011). Persentase abnormalitas sperma menggunakan rumus sebagai berikut:

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

6. Integritas Membran: Pengamatan Integritas Membran dilakukan berdasarkan uji pembengkakan atau hypoosmotik swelling test (HOS-Test) dengan cara menggabungkan semen ke dalam larutan hypoosmotik swelling osmotik test dengan takaran 1:4. Lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan di atas dengan 1 tetes eosin nigrosin, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X. dengan cara berurutan atau zig zag sampai 10 lapang pandang atau jumlah spermatozoa 100 – 200. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma yang utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti dengan ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedangkan spermatozoa



yang membran plasmanya sudah rusak ditandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dan ekor yang lurus (Lubis, Dasrul, Thasmi, dkk., 2013).

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

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Pengencer Tris aminomethane Kuning Telur

Pengencer tris aminomethan disiapkan satu hari sebelum dilakukan penampungan semen. Prosedur pembuatan pengencer tris aminomethane yaitu ditimbang tris aminomethan 1,363 g, Asam sitrat 0,762 g, laktosa 1,5 g, Raffinosa 2,7 g, dan Fruktosa 0,5 g. Masukkan kedalam erlenmeyer dan tambahkan aquadest 80 ml kemudian dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 10-15 menit. Lalu disterilisasi dengan memanaskan larutan dalam panci hingga mendidih kemudian diamkan hingga suhunya menjadi 370C. Tambahkan penicilin 0,1 g dan streptomycin 0,1 g, kemudian dihomogenkan lagi selama 10-15 menit. Masukkan kuning telur sebanyak 20 ml dan dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 15-20 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Setelah itu diambil supernatan, tutup Erlenmeyer dengan aluminium foil dan simpan kedalam refrigerator selama 24 jam. Setelah 24 jam diambil lagi supernathan dan dibuang endapannya.



3.5.2 Pelarutan Genistein

Pelarut *Genistein* 10 mg dilakukan sebagai berikut:

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

Pembuat larutan genistein dengan konsentrasi yang diinginkan sebagai berikut:

1. Dihitung kebutuhan larutan *genistein* (mM atau ml).
2. Diambil *genistein* (mM atau ml) sesuai kebutuhan menggunakan mikropipetatau spuit.
3. Diletakkan larutan *genistein* dalam microtube atau wadah yang memadai.
4. Dibekukan *genistein* dan disimpan pada *freezer* hingga saat akan digunakan.

3.5.3 Pembuatan Pengencer Tris aminomethan Kuning Telur dengan Penambahan Genistein

Laruran pengencer dibagi kedalam 4 erlenmeyer yang telah diberi tabel perlakuan P0, P1, P2, P3 dengan volume yang sama. Erlenmeyer perlakuan P0 tidak ditambah *genistein* (kontrol), P1 ditambah *genistein* 10 μ M, P2 ditambah *genistein* 30 μ M, dan P3 ditambah *genistein* 50 μ M. Pengencer

perlakuan kemudian dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer selama 10 menit, setelah dihomogenkan letakkan didalam waterbath 37oC dan siap digunakan untuk pengencer A.

Pengencer B (pengencer tris aminomethane + 13% gliserol) dipersiapkan sehari sebelum digunakan agar gliserol benar-benar terlarut dalam pengencer A. Pengencer A setiap perlakuan ditambah 13 % gliserol ditempatkan pada 4 erlenmayer yang berbeda dan diberi label B. Pengencer yang sudah ditambah gliserol dihomogenkan dengan magnetic stirrer selama 15-20 menit, kemudian setelah homogen pengencer disimpan di dalam refrigerator suhu 5 °C selama 1 hari.

3.5.4 Penampungan Semen

Semen ditampung dengan metode vagina buatan yang dilakukan oleh petugas khusus dari BBIB. Sapi jantan dilakukan penampungan dengan menggunakan pemancing sapi betina yang dimasukkan ke dalam service create. Sebelum dilakukan penampungan semen, dilakukan false mounting 3-5 kali yang bertujuan untuk meningkatkan libidonya. Setelah sapi pejantan menaiki pemancing, bagian preputium dipegang, ujung penis diarahkan ke lubang vagina buatan dengan posisi miring. Vagina buatan yang telah dipersiapkan sesuai dengan suhu badan dan telah diberi vaselin diujung karetinya dengan menggunakan sudut kemiringan 45oC dan ujungnya terdapat tabung reaksi yang telah ditutup bahan gelap agar semen yang dihasilkan tidak terkena sinar

matahari langsung (Susilawati 2013).dan ujungnya terdapat tabung reaksi yang telah ditutup bahan gelap agar semen yang dihasilkan tidak terkena sinar matahari langsung (Susilawati 2013).

3.5.5 Pemeriksaan Kualitas Semen Segar

Analisis kualitas semen segar dilakukan segera setelah penampungan atau sebelum dilakukannya pengenceran. Analisis kualitas semen segar meliputi pemeriksaan makroskopis: volume, warna, bau, konsistensi, pH dan pemeriksaan mikroskopis: motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.

3.5.6 Pengenceran Semen

Semen diencerkan berdasarkan konsentrasinya. Pengencer dibagi menjadi 3 volume yaitu VA1, VA2, dan VB. VA1 adalah volume pengencer yang dicampurkan pada suhu 37oC, sedangkan VA2 adalah volume pengencer yang ditambahkan secara bertahap hingga suhu 12-15oC dan VB adalah volume pengencer yang sudah ditambahkan 13% gliserol yang ditambahkan pada suhu 3-5oC. Adapun prosedur pengenceran semen sebagai berikut:

Semen dan pengencer VA1 dengan perbandingan 1:1 dalam dimasukkan tabung reaksi kosong yang berada dalam *beakerglass* yang berisi air suhu 37°C di *waterbath*

Dihitung V. total, VA2 dan VB

Beaker glass yang berisi tabung reaksi semen + VA1 dimasukkan kedalam cool tube

Ditambahkan pengencer VA2 secara bertahap dalam tabungreaksi yang berisi semen + VA1 hingga suhu $12-15^{\circ}\text{C}$

Dimasukkan pengencer VB dalam tabung reaksi yang berisi semen + VA pada suhu $4-5^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam (ekuilibrasi suhu dingin)

Gambar 5. Prosedur pengenceran semen

3.5.7 Proses Pembekuan Semen

a. Ekuilibrasi

Ekuilibrasi dilakukan Ketika sampel semen dan pengencer telah tercampur homogen dan telah ditambahkan dengan VB. Proses ekuilibrasi berlangsung selama 2 jam didalam *refrigerator* (cool tube) suhu 5°C .

b. Filling dan Sealing

Setelah dilakukan pengenceran, maka dilakukan *filling* dan *sealing*. *Filling* dan *sealing* adalah 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 straw ditutup dengan menggunakan pinset yang sudah dipanaskan diatas bunsen.

c. Prefreezing

Selanjutnya dilakukan tahap prefreezing yaitu straw diletakkan dirak straw pada ketinggian 10 cm selama 10 menit.

d. Freezing

Semen yang sudah diturunkan suhunya pada tahap *prefreezing*, selanjutnya akan dibekukan (*freezing*) yaitu perendaman straw yang berisi semen di dalam nitrogen cair dengan suhu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.8 Thawing

Dilakukan evaluasi semen untuk mengetahui kualitas spermatozoa Sapi Peranakan Ongole setelah thawing. Proses thawing dilakukan dengan merendam straw di dalam waterbath dengan suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan tiga metode lama waktu thawing yang berbeda yaitu 30 detik, 60 detik dan 90 detik.

3.6 Analisis data

Setelah data penelitian di peroleh maka akan dilakukan analisis data dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan rumus sebagai berikut:



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

Keterangan:

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

μ = nilai rata-rata

α_i = pengaruh faktor A pada taraf ke-i

β_j = pengaruh faktor B pada taraf ke-j

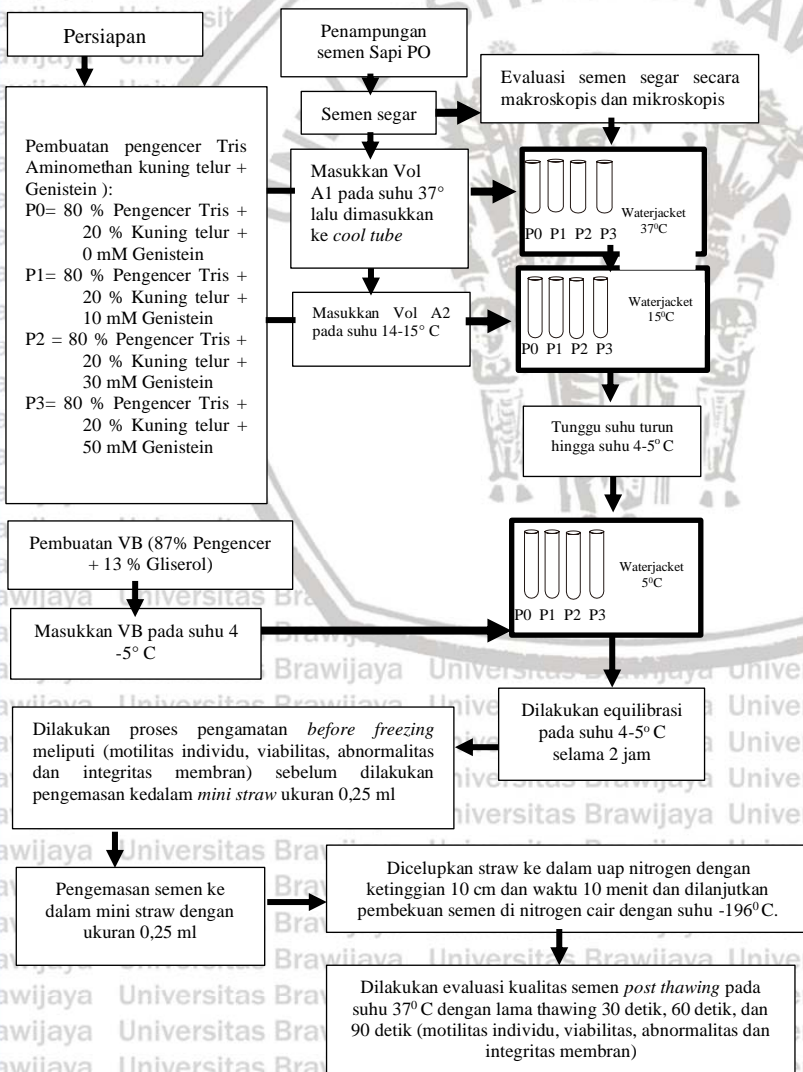
$(\alpha\beta)_{ij}$ = interaksi antara faktor A level ke-i dan faktor B level ke-j

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

Apabila hasil perlakuan pada penelitian ini berpengaruh nyata ($P < 0,05$) atau sangat nyata ($P < 0,01$), maka akan dilakukan pengujian lebih lanjut dengan Uji Jarak Duncan.



3.7 Kerangka Oprasional



Gambar 6. Kerangka Oprasional

3.8 Batasan Istilah

- Semen** : Hasil ejakulasi pejantan berupa suspense cairan sel yang berisi seminal plasma dan spermatozoa.
- Antioksidan** : Senyawa yang mempunyai kemampuan menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari radikal bebas dalam oksidasi lipid.
- EkUILibrasi** : suatu tahap awal proses penurunan suhu bertingkat spermatozoa untuk mencegah *cold shock* sampai **semen** dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair.
- Reactive Oxygen Species (ROS)** : 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.
- Cold shock** : Suatu keadaan dimana spermatozoa akan kehilangannya hidupnya yang tidak dapat dipulihkan Kembali
- Peroksidasi lipid** : Proses terjadinya degradasi lipid secara oksidatif karena radikal bebas mengikat elektron-elektron lipid pada membrane sel yang berakibat langsung pada kerusakan sel.



False Mounting

: Tindakan meningkatkan libido hewan jantan dengan jalan menurunkan pejantan yang sudah menaiki tubuh hewan betina pada saat penampungan semen menggunakan metode vagina tiruan.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Evaluasi Semen Segar Sapi Peranakan Ongole

Pengamatan kualitas semen segar Sapi Peranakan Ongole dilakukan langsung setelah penampungan semen untuk mengetahui kualitas semen yang akan diproses. Pengamatan kualitas semen dilakukan secara makroskopis (volume, warna, bau, ph dan konsistensi) dan mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran). Pengamatan kualitas semen segar ini dilakukan untuk mengetahui semen yang telah ditampung layak di proses lebih lanjut atau tidak. Hasil rata-rata pengamatan uji kualitas semen segar dengan dua kali ejakulasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan semen segar Sapi Peranakan Ongole.

Parameter	Rata-rata ± SD
Makroskopis	
Volume	6,65 ± 0,21
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Ph	6,9 ± 0,14
Konsistensi	Sedang
Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	83 ± 3,54
Konsentrasi (juta/ml)	1535 ± 445,48
Viabilitas (%)	85 ± 6,36
Abnormalitas (%)	3,57 ± 0,23
Integritas Membran (%)	80,16 ± 1,87



Hasil pengamatan volume semen segar Sapi Peranakan Ongole sebesar $6,65 \pm 0,21$ ml. Jumlah volume ini masih dalam kisaran normal karena menurut Garner dan Hafez (2008) volume semen sapi setiap penampungan bervariasi dengan kisaran 1-15 ml atau 5-8 ml setiap ejakulasi. Nilai tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Sholikah, dkk. (2016) yang melaporkan bahwa sapi Peranakan Ongole menghasilkan volume semen segar dengan rata-rata $5,9 \pm 1,9$ ml. Susilawati (2011) menyatakan perbedaan volume ejakulasi semen yang dihasilkan dipengaruhi oleh umur pejantan, kondisi fisik, musim, keterampilan, kolektor dan frekuensi penampungan.

Warna semen segar sapi Peranakan Ongole hasil pengamatan adalah putih kekuningan dengan bau khas semen. Hasil pengamatan warna putih kekuningan menandakan warna semen sapi yang normal, hal ini sesuai dengan pendapat Susilawati (2013) bahwa 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. Bau khas yang terdapat pada semen juga menandakan sapi peranakan ongole dalam keadaan normal. Kusumawati, Krisnaningsih dan Lele (2017) menyatakan bahwa Semen yang normal umumnya memiliki bau amis khas disertai bau dari ternak. Bau busuk bisa terjadi apabila semen mengandung nanah yang disebabkan oleh adanya infeksi organ atau saluran reproduksi ternak jantan.

Hasil rata-rata pengamatan pH semen segar yang diperoleh pada penelitian ini adalah $6,9 \pm 0,14$. Hasil ini lebih rendah dari penelitian Sulistyowati, dkk. (2018) yang melaporkan pH semen segar sapi Peranakan Ongole 7 ± 0 , namun rataan pH semen yang yang diperoleh pada penelitian masih tergolong normal, hal ini sesuai dengan Garner dan



Hafez (2008) menyatakan bahwa pH semen sapi segar berada di kisaran angka 6,4-7,8. Sundari, Tagama dan Maldaswar (2013) menyatakan bahwa derajat keasaman semen dipengaruhi oleh adanya aktivitas spermatozoa dalam menguraikan fruktosa, sehingga pH menjadi turun, kontaminasi dengan mikroorganisme, sehingga pH naik, dan perbedaan cara mengoleksi semen.

Konsistensi semen segar sapi Peranakan Ongole yang didapatkan yaitu sedang. Konsistensi semen berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa. Iswanto, Suyadi dan Rachmawati (2013) 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. Susilawati (2013) menambahkan penilaian konsistensi dapat dikategorikan dengan encer, sedang dan pekat. Sehingga semakin kental konsistensi semen yang didapat maka konsentrasi spermatozoa dalam semen tersebut semakin tinggi. Hal ini dibuktikan dengan rataan konsentrasi semen segar yang didapatkan pada penelitian ini sebesar yaitu $1535 \pm 445,48$ juta spermatozoa/ml. Perhitungan konsentrasi spermatozoa setiap mililiter sangat penting dilakukan, karena faktor ini dipakai sebagai penentu kualitas semen dan menentukan jumlah pengencer yang dibutuhkan untuk mengencerkan semen tersebut (Susilawati, 2011).

Hasil pengamatan uji kualitas mikroskopis semen segar sapi Peranakan Ongole menunjukkan motilitas massa ++ yang diperlihatkan adanya gelombang awan hitam tipis dengan pergerakan yang lambat. Hasil ini dikategorikan normal dan bisa diproses, karena semen segar yang mempunyai motilitas massa ++ atau lebih dapat digunakan untuk IB (Shukla, 2011). Rataan motilitas individu semen segar sapi PO yang didapatkan



pada penelitian ini sebesar $83 \pm 3,54\%$, hasil ini diatas hasil penelitian Yekti, dkk. (2018) sebesar $71 \pm 2,58\%$. Rataan motilitas ini termasuk normal. Susilawati (2011) menyatakan bahwa motilitas semen segar pada sapi potong sebesar 70-90%. Susilawati (2013) menyatakan semen yang mempunyai persentase motilitas di atas 70% lebih tahan hidup dibandingkan dengan bila rendah dari 70 %. Banyak faktor yang mempengaruhi perbedaan nilai motilitas spermatozoa diantaranya umur, bangsa, kematangan spermatozoa, dan kualitas plasma spermatozoa (Komariah, Arifiantini dan Nugraha, 2013).

Persentase rataan viabilitas semen segar pada penelitian ini sebesar $85 \pm 6,36\%$ rataan ini lebih tinggi dibandingkan dengan rataan motilitasnya, hal ini dikarenakan banyaknya spermatozoa yang masih hidup tapi dalam keadaan tidak bergerak progresif ke depan. Nilai viabilitas semen segar ini masih dikategorikan dalam kisaran baik. Rosary, Kuswati dan Susilawati (2018) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa nilai rata-rata viabilitas semen segar sapi peranakan ongole berumur 2 tahun sebesar $77,46 \pm 4,74 \%$. Ducha, dkk., (2013) bahwa semen segar yang akan diproses menjadi semen beku berdasarkan SNI harus mengandung minimal 70% spermatozoa yang hidup. Hal tersebut menunjukkan bahwa persentase viabilitas semen segar sapi Peranakan Ongole yang digunakan memenuhi syarat karena menunjukkan presentase lebih dari 70%.

Rata-rata persentase abnormalitas semen segar sapi peranakan ongole yang digunakan dalam penelitian ini adalah $3,57 \pm 0,23\%$. Penelitian yang dilakukan oleh Rosary, Kuswati dan Susilawati (2018) melaporkan rataan abnormalitas semen segar yang cukup tinggi yaitu $8,24 \pm 6,16$ tetapi masih dalam kisaran normal, sesuai dengan Susilawati (2011) yang



menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak boleh melebihi 20%. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa persentase abnormalitas semen segar Sapi Peranakan Ongole yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kategori yang baik. Terdapat lima kategori spermatozoa abnormal yang harus diperhatikan dengan presentase abnormalitas yang tidak boleh lebih dari 20% antara lain tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor yang abnormal, bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proksimal, lalu abnormalitas pada ekor dengan distal droplet (Rahayu, Pramana dan Ciptadi, 2014).

Hasil rata-rata integritas membran sapi peranakan ongole yaitu sebesar $80,16 \pm 1,87\%$. Integritas membran pada semen segar sapi Limousin berumur sekitar empat tahunan pada penelitian Diliyana, Susilawati dan Rahayu (2014) sebesar $88,59 \pm 3,74$ sedangkan pada integritas membran pada kambing Boer pada penelitian Lubis dkk. (2013) sebesar $83,67 \pm 0,16\%$. Integritas membran plasma harus tetap terjaga keutuhannya untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas dan kemampuan fertilisasi. Hal ini disebabkan karena membran plasma berfungsi sebagai pembatas sel kontineus, yang melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik dan mengatur lalu lintas keluar masuknya zat-zat makanan serta ion-ion yang diperlukan dalam proses metabolisme.

4.2 Evaluasi Semen Before Freezing Sapi Peranakan Ongole

Evaluasi semen before freezing adalah pengecekan kualitas semen beku setelah pendinginan atau ekuilibrasi suhu dingin sebelum dilakukannya proses pembekuan. Pada penelitian ini terdapat empat perlakuan yaitu P0: tanpa penambahan genistein, P1: penambahan genistein 10 mM, P2:

penambahan genistein 30 mM, dan P3: penambahan genistein 50 mM. Hasil pengamatan kualitas semen before freezing dengan empat perlakuan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Kualitas Semen Sapi PO *Before Freezing*

Pengamatan	Perlakuan			
	P0	P1	P2	P3
Motilitas Individu (%)	58 ± 2,74	60 ± 3,54	63 ± 2,74	59 ± 2,24
Viabilitas (%)	67,21 ± 6,11	69,09 ± 5,71	78,76 ± 5,03	69,51 ± 4,47
Abnormalitas (%)	5,66 ± 0,31	5,76 ± 0,75	5,34 ± 0,60	5,53 ± 0,55
Integritas Membran (%)	57,47 ± 6,26	59,44 ± 5,56	68,64 ± 5,06	59,36 ± 4,61

Berdasarkan tabel 3 dapat dilihat bahwa spermatozoa mengalami penurunan jika dibandingkan dengan semen segar, hal ini karena selama pendinginan spermatozoa masih melakukan proses metabolisme sel walaupun dengan lambat, sehingga masih membutuhkan nutrisi untuk respirasi maupun metabolisme sehingga menyebabkan kualitas spermatozoanya menurun. Penurunan kualitas juga dapat disebabkan karena spermatozoa mengalami cekaman dingin yang menyebabkan permeabilitas membran terganggu. Lubis dkk., (2013) menyatakan karena saat pendinginan tetap melakukan proses metabolisme maka semakin sedikitnya spermatozoa yang memiliki cadangan energi yang cukup untuk digunakan bergerak, karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin (suhu rendah) dapat mengalami destabilisasi membran. Destabilisasi membran akan meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion-ion, termasuk ion kalsium sehingga akan berakibat terhadap meningkatnya ion kalsium dalam sitosol yang diikuti dengan meningkatnya ion kalsium dalam

mitokondria. Meningkatnya konsentrasi ion kalsium dalam mitokondria ini akan menurunkan sintesa ATP dalam mitokondria. Nilai terbaik terdapat pada perlakuan P2 dengan penambahan genistenin 30 μM sedangkan nilai terendah terdapat pada perlakuan P0 atau tanpa penambahan antioksidan genistein. Hal ini diduga pada perlakuan P0 tidak ada senyawa yang dapat menjadi krioprotektan ekstraseluler yang melindungi spermatozoa selama proses pendinginan, sehingga spermatozoa mudah mati saat terjadi cekaman dingin dan terbentuk radikal bebas.

Motilitas individu spermatozoa pada tahap before freezing pada penelitian ini memiliki nilai rata-rata 58-63%. Hal ini menunjukkan bahwa motilitas before freezing termasuk normal. Sudarmanto, dkk. (2016) menambahkan bahwa motilitas before freezing adalah motilitas individu setelah dilakukan pengenceran. Motilitas before freezing harus memiliki syarat minimal $\geq 55\%$ agar dapat diproses menjadi semen beku sesuai standart BIBD (Balai Inseminasi Buatan Daerah). Masyitoh, dkk. (2018) menyatakan Evaluasi before freezing bertujuan untuk melihat kelayakan semen yang akan dibekukan dan pengaruh bahan-bahan tambahan dalam mempertahankan spermatozoa pada proses pendinginan, semen yang layak akan dilakukan proses pembekuan. Kualitas semen beku akan mendapatkan hasil yang baik jika kualitas dari spermatozoa pada proses sebelum pembekuan berada pada standar untuk dibekukan, sehingga perlunya dilakukan pemeriksaan before freezing.

Viabilitas spermatozoa tertinggi terdapat pada perlakuan P2 dengan rata-rata 78,76 tidak terlalu jauh dari viabilitas semen segarnya sebesar 85%. Soeparna dan Arifiantini (2013) menyatakan bahwa penyimpanan pada suhu 50C akan menurunkan metabolisme spermatozoa sampai hanya



10% saja, sehingga viabilitas spermatozoa dapat dipertahankan. Rhochim dkk., (2017) menyatakan penurunan viabilitas spermatozoa saat penyimpanan suhu dingin diakibatkan karena perubahan pH yang terjadi pada pengencer. metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob menghasilkan asam laktat yang kian tertimbun dan menurunkan pH semen yang akhirnya menurunkan viabilitas spermatozoa. Sekalipun demikian perlakuan P1, P2, dan P3 yang ditambahkan genistein dalam pengencer mendapatkan hasil lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan P0 tanpa ditambahkan genistein kedalam pengencer menunjukkan penambahan genistein memberikan pengaruh bagi viabilitas.

Abnormalitas before freezing mendapatkan nilai kurang dari 10% dengan nilai P0 5,56%, P1 5,76%, P2 5,34%, dan P3 5,53% Spermatozoa yang memiliki persentase abnormalitas di bawah 20% dan tidak melebihinya, maka semen tersebut masih normal dan bisa di proses menjadi semen beku, namun begitu persentase before freezing tetap mengalami penurunan jika dibandingkan dengan persentase abnormalitas semen segar Muhammad, Susilawati dan Wahjuningsih (2016) menyatakan pendinginan menyebabkan peningkatan abnormalitas dan kerusakan sel spermatozoa namun masih dapat teratasi dengan adanya pengencer yang mengandung kuning telur, karena di dalam kuning telur terdapat lesitin dan lipoprotein yang berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa serta mencegah cekaman dingin.

Nilai integritas membran semen segar mengalami penurunan yang cukup besar pada before freezing dibandingkan dengan semen segar, Sitepu and Marisa (2019) menyatakan penurunan integritas membran spermatozoa sebelum pembekuan karena faktor enzim koagulasi kuning



telur dalam plasma semen toksin dan cekaman dingin. Penurunan Integritas Membran ini juga disebabkan oleh penurunan energi pasokan spermatozoa digunakan untuk mempertahankan hidup dan mendukung gerak sperma. Namun integritas membran dalam penelitian ini masih normal dan masih bisa diproses menjadi semen beku. Lubis dkk., (2013) menyatakan selama proses pendinginan terjadi depolarisasi atom-atom atau molekul-molekul penyusun membran yang mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran. Ada beberapa hal yang menyebabkan kematian sel spermatozoa sehubungan dengan destabilisasi membran, diantaranya adanya perubahan susunan membran terutama susunan fosfolipid penyusun membran akibat cekaman dingin.

4.3 Evaluasi Semen Post Thawing

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan uji kualitas semen sapi Peranakan Ongole menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur yang ditambah dengan genistein kemudian dibekukan dan thawing meliputi persentase motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa.

4.3.1 Hasil Pengamatan Motilitas Individu Semen Beku Sapi Peranakan Ongole

Motilitas individu merupakan salah satu parameter yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi fertilitas spermatozoa dilihat dari banyaknya spermatozoa yang bergerak progresif dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang ada dalam satu lapang pandang mikroskop. Lubis dkk., (2013) menyatakan bahwa daya gerak yang progresif pada spermatozoa mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Data



rata-rata persentase motilitas individu pada semen beku sapi peranakan ongole setelah thawing dengan penambahan genistein dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata hasil pengamatan *motilitas* individu (%)

Genistein (μM)	Waktu thawing (detik)			Rata-rata
	30	60	90	
0	32 \pm 2, 74	31 \pm 2, 24	28 \pm 2, 74	30,33 ^a
10	35 \pm 3, 54	33 \pm 2, 74	29 \pm 2, 24	32,33 ^c
30	36 \pm 2, 24	34 \pm 2, 24	31 \pm 2, 24	33,67 ^d
50	33 \pm 2, 74	31 \pm 2, 24	29 \pm 2, 24	31 ^{ab}
Rata-rata	34 ^c	32,25 ^b	29,25 ^a	

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

Berdasarkan hasil analisis ragam (lampiran 2) penambahan genistein dan lama thawing masing-masing berpengaruh nyata terhadap kualitas semen beku sapi Peranakan Ongole ($P < 0,05$). Namun interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan genistein kedalam pengencer dan lama thawing sama-sama memberikan pengaruh terhadap persentase motilitas semen beku, tetapi antara genistein dan lama thawing tidak saling mempengaruhi terhadap semen beku sapi peranakan



ongole.

Uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa rata-rata nilai motilitas spermatozoa perlakuan penambahan genistein 50 μM tidak berbeda nyata dengan dan perlakuan kontrol tetapi berbeda nyata dengan perlakuan penambahan genistein 10 μM dan 30 μM . Hal ini disebabkan perlakuan tanpa penambahan genistein dan perlakuan penambahan genistein 50 μM belum cukup menjaga kualitas semen beku. Motilitas terbaik terdapat pada penambahan genistein 30 μM tetapi tidak memenuhi standart SNI untuk diperlitisasikan karena nilainya <40%. Hal ini dikarenakan kesalahan saat proses pembekuan dan juga dapat disebabkan karena perubahan suhu pembekuan dalam nitrogen cair (-1960C). Penambahan genistein 10 μM mendapatkan rata-rata 32,33%, hasil ini lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan 30 μM yaitu 33,67%. Hal ini diduga karena genistein pada konsentrasi tersebut belum mencukupi untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Hasil yang lebih rendah juga didapatkan pada perlakuan penambahan genistein dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 50 μM dengan rata-rata 31% hal ini kemungkinan terjadi karena penambahan senyawa genistein dalam jumlah banyak akan semakin meningkatkan tekanan osmotik larutan pengencer dan kurang dapat diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa sehingga berakibat buruk terhadap berlangsungnya proses metabolisme spermatozoa. Hal ini sejalan dengan penelitian Elsayed, et. al (2019) yang menyatakan bahwa konsentrasi genistein yang tinggi merusak motilitas spermatozoa karena penambahan genistein dosis tinggi memberikan efek inhibitor tirosin kinase yang menghambat gerakan spermatozoa. Dalam penelitiannya

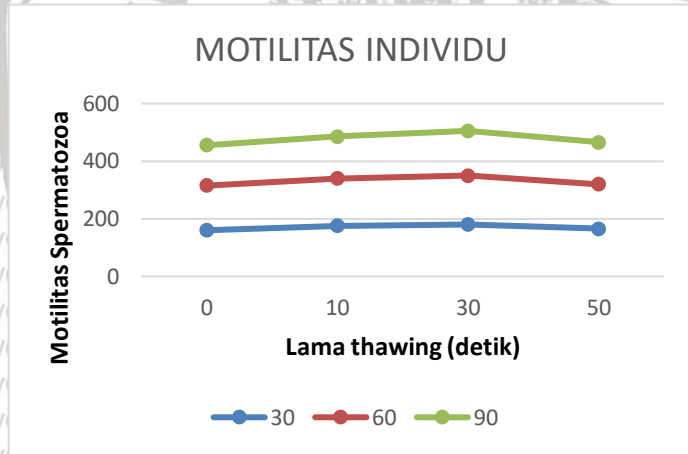


penambahan genistein 100 μM pada semen beku domba mendapatkan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan penambahan genistein 10 μM .

Lama thawing 30 detik berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan lama thawing 60 detik dan 90 detik. 30 detik adalah lama thawing terbaik dengan rata-rata 34%. Sedangkan nilai terendah terdapat pada lama thawing 90 detik dengan rata-rata 29,25%. Hal ini diduga karena perendaman straw selama 30 detik merupakan waktu yang cukup untuk thawing sehingga memberikan ketahanan hidup pada spermatozoa Sapi Peranakan Ongole. Menurut Datta, dkk., (2009) spermatozoa yang terlalu lama terpapar oksigen menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang menghasilkan peroksidasi lipid, sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Peningkatan radikal bebas berupa spesies oksigen reaktif (ROS) dapat merusak struktur membran mitokondria spermatozoa sehingga menginduksi terjadinya apoptosis yaitu kematian sel secara fisiologis karena adanya perubahan morfologi maupun biokimia sel mitokondria sebagai organel spermatozoa yang berada pada bagian ekor spermatozoa. Jika membran kehilangan fungsi potensialnya, maka kemampuan untuk mensintesis ATP sebagai sumber energi menurun. ATP membentuk suatu matarantai antara reaksi-reaksi yang menghasilkan energi dan motilitas. Hasil ini mendapatkan tren yang sama dengan penelitian Darmasasmita, Mulyati dan Arimbi (2016) dalam penelitiannya terhadap motilitas semen beku Sapi Simmental dimana waktu thawing yang semakin lama mendapatkan persentase nilai yang semakin rendah. Lama thawing 15 detik, 30 detik dan 45 detik hasil terbaik terdapat pada 15 detik yaitu 50,83%, kemudian pada 30



detik dan 45 detik mengalami penurunan menjadi 45,83% dan 40,83%. Grafik motilitas spermatozoa sapi peranakan ongole dengan penambahan genistein dan lama thawing dapat dilihat pada gambar 7.

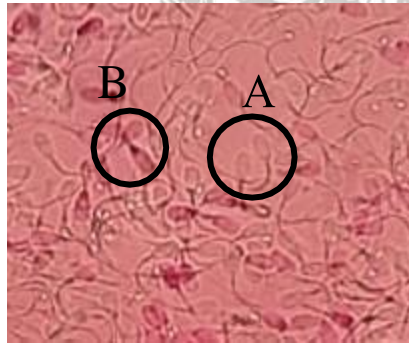


Gambar 7. Grafik persentase motilitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.

4.3.2 Hasil Pengamatan Viabilitas Semen Beku Sapi Peranakan Ongole

Penentuan nilai viabilitas spermatozoa berdasarkan perhitungan jumlah spermatozoa hidup setelah pewarnaan menggunakan eosin, spermatozoa yang hidup terlihat terang karena spermatozoa tidak menyerap eosin sedangkan spermatozoa mati akan menyerap eosin. Hal ini sesuai dengan penjelasan Susilawati (2011) persentase viabilitas spermatozoa yang hidup dan mati dapat dibedakan reaksinya terhadap warna tertentu, sel spermatozoa yang dianggap mati dapat menghisap warna dan sel spermatozoa hidup tidak menghisap warna

dikarenakan spermatozoa hidup membrannya masih baik sehingga warna tidak dapat masuk, sedangkan spermatozoa yang mati membrannya tidak berfungsi sehingga pewarna dapat masuk kedalam membran. Hasil pengamatan viabilitas semen beku sapi peranakan ongole pada waktu penelitian dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengamatan viabilitas spermatozoa perbesaran 400 kali, (A) hidup (tidak berwarna) dan (B) mati (berwarna)

Hasil pengamatan persentase viabilitas semen sapi peranakan ongole yang diberi penambahan genistein pada pengencer tris aminomethan dan di thawing dengan waktu yang berbeda dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata hasil pengamatan viabilitas (%)

Genistein (μM)	Waktu thawing (detik)			Rata-rata
	30	60	90	
0	47,41 \pm 2,6 5	46,62 \pm 3,1 5	43,67 \pm 4.2 3	45,9 ^a
10	52,53 \pm 4,6 2	50,57 \pm 3,8 0	44,69 \pm 1.3 0	49,26 ^{bc}
30	54,09 \pm 1,3 7	51,55 \pm 4,4 7	47,14 \pm 3.0 7	50,93 ^c
50	51.94 \pm 0,9 0	47,46 \pm 4,2 0	45,95 \pm 4.1 6	48,45 ^b
Rata-rata	51,49 ^c	49,05 ^b	45,37 ^a	

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

Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen, karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa. Berdasarkan hasil pengamatan nilai persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi dari nilai motilitasnya. Hal ini karena banyak spermatozoa hidup tetapi tidak motil atau tidak bergerak progresif. Kusumaningrum, dkk., (2007) menyatakan bahwa persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi dari persentase motilitas adalah normal karena spermatozoa yang hanya bergerak kurang progresif merupakan spermatozoa yang masih hidup. Berdasarkan hasil dari analisis ragam (lampiran 3) penambahan genistein dan lama thawing masing-masing berpengaruh nyata terhadap kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole. Namun tidak ada perbedaan yang nyata pada interaksi antara



penambahan genistein dan lama thawing. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan genistein dan lama thawing sama-sama memberikan pengaruh terhadap persentase spermatozoa hidup, tetapi antara genistein dan lama thawing tidak saling memengaruhi terhadap kualitas semen beku Sapi Peranakan Ongole.

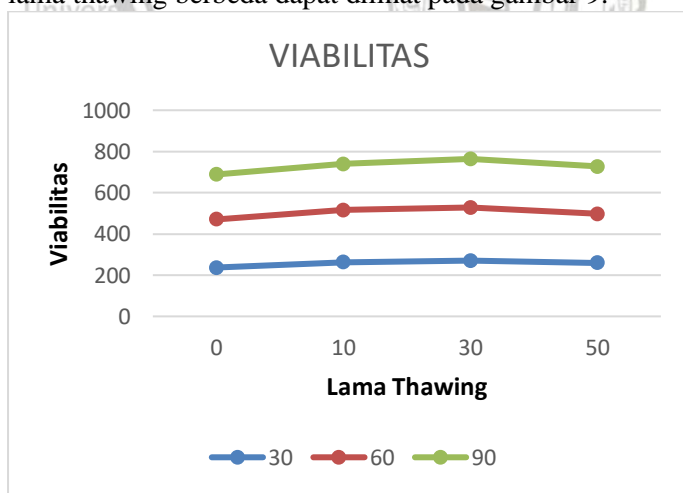
Uji lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa lama thawing 30 detik, 60 detik dan 90 detik masing-masing menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Persentase rata-rata viabilitas tertinggi terdapat pada lama thawing 30 detik yaitu 51,49% dan persentase rata-rata lama thawing terendah terdapat pada lama thawing 90 detik yaitu 45,37%. Semakin lama waktu thawing maka akan menghasilkan viabilitas semen yang lebih rendah. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu thawing akan menyebabkan peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang akan merusak dinding membran spermatozoa. Lama thawing 30 detik merupakan durasi thawing yang baik bagi semen Sapi Peranakan Ongole beku, pada durasi ini dinding membran spermatozoa masih berfungsi dengan baik, tidak terganggu oleh aktivitas metabolisme spermatozoa yang dapat meningkatkan produksi asam laktat sehingga zat pewarna tidak dapat masuk ke dalam dinding membran spermatozoa, maka spermatozoa akan tampak transparan dan diperoleh persentase spermatozoa hidup paling tinggi. Hasil ini mendapatkan tren yang sama dengan penelitian Novita (2020) dalam penelitiannya terhadap viabilitas semen beku Sapi Simmental dimana waktu thawing yang semakin lama mendapatkan persentase nilai yang semakin rendah. Pada penelitian ini menunjukkan persentase viabilitas terbaik yaitu pada perlakuan dengan lama waktu

thawing 40 detik sebesar 70,63 %, hal ini disebabkan pada lama thawing tersebut belum menyebabkan terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permeabilitas membran utuh dan tidak terganggu, ini menjamin fluiditas dan keseimbangan homeostatis membran sel karena pertukaran senyawa-senyawa berlangsung secara normal. Sedangkan pada lama thawing 50 detik menurun menjadi 65,63% Lama yang tidak sesuai mengakibatkan membran spermatozoa mengalami kerusakan sebagai akibat cekaman panas dan kontak dengan oksigen. Membran spermatozoa yang tersusun dari fosfolipid mengalami reduksi karena timbulnya asam lemak dari proses peroksidasi sel. Hilangnya viabilitas sperma tidak bisa dihindari karena selama pengolahan semen, sperma mengalami perubahan kondisi lingkungan yang sangat ekstrim.

Persentase rata-rata viabilitas dalam uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa penambahan genistein 10 μM berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan kontrol tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan penambahan genistein 30 μM dan 50 μM , tetapi penambahan genistein 10 μM lebih baik jika dibandingkan dengan penambahan 50 μM . Persentase perlakuan kontrol mendapatkan hasil yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan pengencer yang ditambah genistein. Hal ini karena pada perlakuan kontrol tidak ada antioksidan yang dapat mengikat radikal bebas selama proses pengolahan semen. Dalam proses pengolahannya, semen banyak berkontak dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen sehingga akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas. Hal ini mempercepat metabolisme dan menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang dapat menyebabkan



kerusakan pada membran plasma sel spermatozoa. Hal ini sesuai laporan Mittal et al. (2010) dimana kematian sel spermatozoa dapat terjadi apabila tidak ada perlindungan antioksidan. Menurut Hartono (2008) prinsip kerja dari antioksidan dalam menghambat oksidasi pada asam lemak tak jenuh dapat dilihat sebagai berikut: oksigen bebas diudara akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan beraksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif yang menyebabkan instabilitas pada membran. Grafik viabilitas spermatozoa sapi peranakan ongole dengan penambahan genistein dan lama thawing berbeda dapat dilihat pada gambar 9.

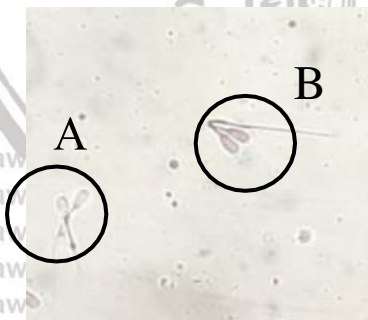


Gambar 9. Grafik persentase viabilitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.



4.3.3 Hasil Pengamatan Abnormalitas Semen Belu Sapi Peranakan Ongole

Pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan membuat ulasan menggunakan pewarna eosin, lalu dihitung persentase antara spermatozoa normal dan abnormal. Abnormalitas spermatozoa adalah keadaan normal atau tidaknya spermatozoa yang dibagi menjadi abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Keadaan abnormal pada spermatozoa berhubungan dengan fertilitas ternak. Gambar hasil pengamatan abnormalitas pada semen beku sapi peranakan ongole dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Pengamatan abnormalitas spermatozoa dengan perbesaran 400 kali, (A) Normal dan (B) Abnormal (ekor putus)

Hasil pengamatan persentase abnormalitas semen sapi peranakan ongole yang di tambahkan dengan genistein pada pengencer tris aminomethan kemudian di bekukan dan di thawing dengan lama thawing berbeda dapat dilihat pada tabel 6.



Tabel 6. rata-rata hasil pengamatan abnormalitas (%)

Genistein (μM)	Waktu thawing (detik)			Rata-rata
	30	60	90	
0	11,73 \pm 0,59	12,53 \pm 0,55	12,64 \pm 0,33	12,30
10	11,50 \pm 0,28	11,89 \pm 1,05	12,45 \pm 0,20	11,94
30	11,04 \pm 0,55	11,82 \pm 0,81	12,32 \pm 1,35	11,73
50	11,50 \pm 0,40	11,71 \pm 0,40	12,58 \pm 0,75	11,93
Rata-rata	11,44 ^a	11,99 ^b	12,50 ^c	

Keterangan: Notasi yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0.05$)

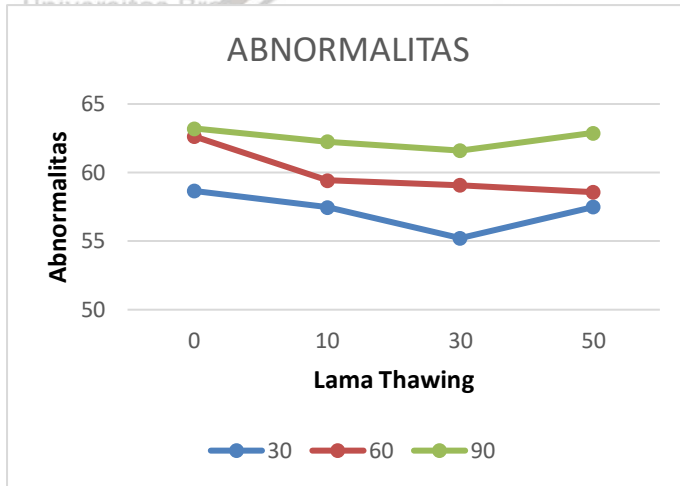
Berdasarkan analisis ragam (lampiran 4) menunjukkan bahwa lama thawing memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$). Namun penambahan genistein tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0,05$). Kondisi tersebut karena abnormalitas pada spermatozoa disebabkan oleh perkembangan spermatozoa secara morfologik serta akibat penanganan semen pada proses penampungan. Interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing juga tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase abnormalitas setelah di thawing.

Lama thawing 30 detik, 60 detik dan 90 detik masing-masing berbeda nyata ($P < 0,05$). Lama thawing 30 detik memiliki nilai rata-rata yang lebih rendah dibandingkan dengan lama thawing 60 detik dan 90 detik



hal ini menunjukkan bahwa lama thawing 30 detik adalah waktu yang optimal untuk mempertahankan kualitas semen beku. Lama thawing 60 detik dan 90 detik termasuk dalam kategori waktu thawing cukup lama sehingga akan menyebabkan tekanan yang ekstrim secara mekanis sehingga menjadi abnormal. Novita (2020) menyatakan bahwan semakin lama durasi thawing bisa menyebabkan stres untuk spermatozoa, sehingga spermatozoa tidak mampu melewati masa kritis selama thawing karena panjangnya lama waktu thawing. Hasil ini sesuai dengan penelitian Adnyani, Sumardani dan Sarini (2018) terhadap semen beku Sapi Bali bahwa semakin lama waktu thawing maka persentase abnormalitasnya semakin tinggi. Lama thawing 15 detik mendapatkan hasil terendah 7,59% dibandingkan dengan lama thawing 30 detik 7,99%, 45 detik 7,79% dan 60 detik 8,48%. Persentase abnormalitas dalam penelitian ini masih termasuk normal dan dapat dipergunakan untuk keperluan inseminasi buatan. Hal ini sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) yang mensyaratkan semen sapi harus memiliki morfologi abnormalitas baik primer maupun sekunder $< 20\%$ (BSN, 2005). Grafik abnormalitas spermatozoa sapi peranakan ongole dengan penambahan genistein dan lama thawing berbeda dapat dilihat pada gambar 11.





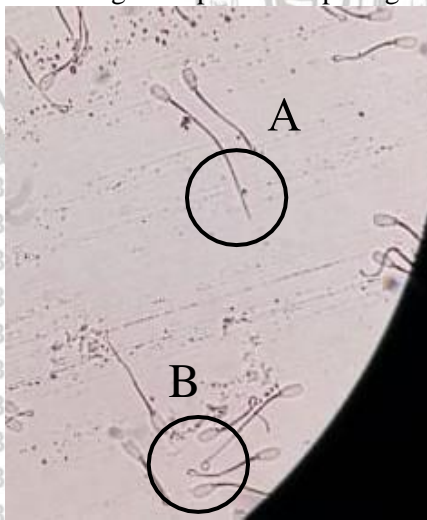
Gambar 11. Grafik persentase abnormalitas spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.

Dari hasil penelitian ini lebih banyak didapatkan abnormalitas sekunder yaitu kepala putus dan ekor putus yang kemungkinan disebabkan karena proses pembekuan, proses thawing serta pada saat proses preparasi seperti pembuatan preparat ulas. Hal ini di nyatakan oleh Yulnawati, dkk. (2009) bahwa abnormalitas tersier dapat terjadi disebabkan karena kurang hati-hati dalam pembuatan preparat ulas yang menyebabkan kepala atau ekor spermatozoa terputus. Solihati, dkk. (2018) menambahkan jika peningkatan abnormalitas sekunder post thawing juga dapat disebabkan karena stress oksidatif dimana senyawa oksigen reaktif menyerang membran plasma sel sperma dan merusak strukturnya, sehingga pada tingkat stres oksidatif tinggi dimana jumlah senyawa oksigen reaktif lebih banyak daripada antioksidan yang ada maka akan meningkatkan abnormalitas sekunder sel sperma. Hal ini karena sperma tidak dapat

mempertahankan diri oleh serangan tersebut dan kehilangan integritas selnya.

4.3.4 Hasil Pengamatan Integritas Membran Semen Beku Sapi Peranakan Ongole

Pengamatan integritas membran dilakukan untuk mengetahui kondisi dari membran plasma spermatozoa dengan menggunakan Hypoosmotic Swelling Test (HOS). Membran plasma yang utuh ditandai dengan ujung ekor yang melingkar, sedangkan membran plasma yang rusak atau tidak utuh ditandai dengan ekor yang lurus. Gambar hasil pengamatan integritas membran pada semen beku sapi peranakan ongole dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Integritas membrane spermatozoa perbesaran 400 kali, (A) ekor lurus dan (B) ekor melingkar

Gambar diatas menunjukkan ekor spermatozoa yang melingkar menandakan bahwa integritas membran spermatozoa tersebut masih dalam keadaan baik,

sedangkan ekor yang lurus memiliki integritas membran yang buruk atau rusak. Zubair, et al., (2013) menyatakan membran spermatozoa yang masih utuh akan melingkar jika ditempatkan pada kondisi hiposmotik karena spermatozoa berusaha meningkatkan volume air didalam tubuhnya untuk mencapai keseimbangan volume air di dalam dan diluar tubuhnya. Hasil rata-rata persentase integritas membran semen beku sapi peranakan ongole dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Rata-rata hasil pengamatan integritas membran (%)

Genistein (μM)	Waktu thawing (detik)			Rata-rata
	30	60	90	
0	34,56 \pm 0,96	34,66 \pm 2,25	33,17 \pm 2,2	34,13 ^a
10	37,28 \pm 3,19	36,71 \pm 4,34	34,21 \pm 1,64	36,07 ^c
30	38,34 \pm 2,64	36,22 \pm 1,26	34 \pm 2,64	36,19 ^c
50	35,85 \pm 0,9	33,88 \pm 3,8	32,7 \pm 1,6	34,14 ^b
Rata-rata	36,51 ^c	35,37 ^b	33,52 ^a	

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

Hasil analisis ragam (lampiran 5) menunjukkan bahwa penambahan genistein dan lama thawing masing-masing memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase integritas membran spermatozoa.



Tetapi interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P>0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan genistein kedalam pengencer dan lama thawing sama-sama memberikan pengaruh terhadap keutuhan membran plasma, tetapi antara genistein dan lama thawing tidak saling mempengaruhi terhadap semen beku Sapi Peranakan Ongole.

Hasil uji lanjutan yang menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan tanpa penambahan genistein dan perlakuan penambahan genistein 50 μM berbeda nyata ($P<0,05$) dengan perlakuan penambahan genistein 10 μM dan 30 μM . perlakuan penambahan genistein 10 μM dan 30 μM tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Persentase rata-rata tertinggi didapatkan pada penambahan genistein 30 μM yaitu 38,34% sedangkan nilai terendah didapatkan pada rata-rata perlakuan kontrol yaitu 34,56%. Hal ini sesuai dengan penelitian Prihantoko et. al, (2020) yang melaporkan bahwa integritas membran Sapi Peranakan Ongole pada perlakuan penambahan genistein 1 mmol dan 2 mmol mendapatkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol tanpa penambahan genistein. Kim et. al, (2014) melaporkan penambahan genistein juga berpengaruh signifikan terhadap integritas membran babi dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Hal ini dikarenakan penambahan genistein mampu mempertahankan keutuhan membran plasma sel akibat radikal bebas. Genistein sebagai antioksidan akan menjadi sasaran serangan radikal bebas, sehingga senyawa ini dapat memutus atau mencegah kerja radikal bebas dan dapat mencegah reaksi peroksidasi lipid yang dapat merusak membran plasma sel. Peroksidasi

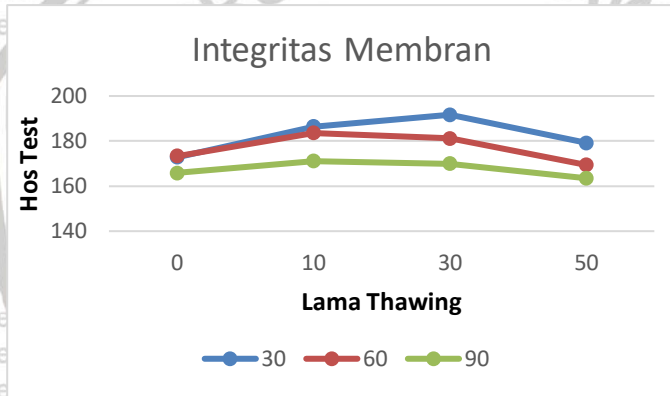


lipid yang berlebihan menyebabkan produksi ROS yang tidak terkontrol dan tidak adanya jumlah yang seimbang dan memadai.

Hasil uji lanjutan Duncan untuk lama thawing menunjukkan bahwa lama thawing 30 detik, 60 detik dan 90 detik masing-masing berbeda nyata ($P < 0,05$). Durasi thawing yang terlalu lama akan menyebabkan terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permeabilitas membran utuh dan terganggu, ini menyebabkan keseimbangan homeostatis membran sel dan pertukaran senyawa-senyawa berlangsung secara tidak normal. Kerusakan membran mengakibatkan ketidakstabilan penyerapan cairan saat spermatozoa diletakkan pada medium dengan tekanan osmotis rendah. HOS Test yang memiliki tekanan osmosis rendah dengan mudah masuk ke dalam tubuh spermatozoa yang memiliki tekanan osmosis lebih tinggi. Bila kondisi membran spermatozoa baik, cairan ke dalam sel tidak dapat keluar kembali sehingga ekor spermatozoa bengkak dan melingkar. Datta et al., (2009) menambahkan kerusakan membran spermatozoa disebabkan karena selama proses thawing terbentuk radikal bebas yang bersifat toxic pada tingkatan yang rendah di dalam sel spermatozoa bersamaan dengan suplai oksigen yang terbatas. Radikal bebas ini dapat menimbulkan reaksi berantai yang dikenal peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid ini akan mengubah struktur spermatozoa terutama pada bagian membran sehingga akan kehilangan fungsi permeabilitas, dan akan meningkatkan kerusakan spermatozoa yang mengakibatkan peningkatan kematian spermatozoa (Diliyana, Susilawati dan Rahayu, 2014). Grafik abnormalitas spermatozoa sapi peranakan ongole



dengan penambahan genistein dan lama thawing berbeda dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Grafik persentase integritas membran spermatozoa akibat pengaruh penambahan genistein dan lama thawing.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa penambahan genistein dalam pengencer tris aminomethan dan lama thawing memberikan pengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan keutuhan integritas membran spermatozoa sapi Peranakan Ongole, tetapi tidak terdapat interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing. Penambahan genistein 30 μM dan lama thawing 30 detik memberikan pengaruh yang terbaik terhadap kualitas semen beku sapi peranakan ongole tetapi tidak memenuhi standar SNI semen beku untuk di inseminasikan karena persentasenya < 40%.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk lebih memperhatikan kestabilan suhu ketika proses pengenceran supaya tidak terjadi stress oksidatif yang menyebabkan spermatozoa mati sehingga bisa didapatkan persentase semen beku yang sesuai dengan standar SNI.



DAFTAR PUSTAKA

- Adhyatma, M., N. Isnaini, dan Nuryadi. 2013. Pengaruh Bobot Badan Terhadap Kualitas dan Kuantitas Semen Sapi Simmental. *Journal of Tropical Animal Production*, 14(2):53-62.
- Adnyani, N. L. A., N. L. 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.
- Achlis, R., H. Anwar, S. Hidanah, dkk. 2013. Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawa Dalam Berbagai Macam Pengencer. *Veterinaria Medika*, 6(1):69-74.
- Aprilina, N., S. Suharyati dan P. E. Santosa. 2014. Pengaruh Suhu Dan Lama Thawing Di Dataran Rendah Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(3):96-102.
- Ardhani, F., H. Mufidah, R. Samsuriati, dkk. 2020. Efek Lama Penyimpanan Semen Beku Sapi Bali Pada Pos Inseminasi Buatan Terhadap Membran Plasma, Tudung Akrosom Utuh, Dan Dna Spermatozoa. *Jurnal Ilmu Peternakan Terapan*, 3(2):58-66.
- Arnanda, Q. P., dan R. F. Nuwarda. 2019. Review Article: Penggunaan Radiofarmaka Teknesium- 99m Dari Senyawa Glutation Dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Farmaka*, 17(2):236-243.
- Ball PJH and Peters AR. 2004. *Reproduction in Cattle*. Ed ke-

3. Oxford: Blackwell Publishing.

Bebas, W., G. L. Buyona, dan M. K. Budiasa. 2016. Penambahan Vitamin E Pada Pengencer BTS Terhadap Daya Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace Pada Penyimpanan 15°C. Buletin Veteriner Udayana, 8(1):1-7.

Bintara, S., A. Astuti, Panjono, dkk. 2018. Kualitas Sperma Domba Ekor Gemuk Pasca Pembekuan Sperma Dengan Bantuan Micro Controller. Prosiding Simposium Nasional Penelitian dan Pengembangan Peternakan Tropik Tahun 2018 Dalam Rangka Dies Natalis ke-49 Fakultas Peternakan UGM :173-176.

Darmasasmita, D. E., S. Mulyati, dan Arimbi. 2016. Pengaruh Lama Thawing Terhadap Motilitas Dan Nekrosis Spermatozoa Semen Beku Sapi Simmental. Ovozoo,5(1): 13-20.

Datta, U., Sekar, M. C., Hembram, M. L., Dasgupta, R., 2009. Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10oC. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 26(8):467-473.

Diliyana, Y. F., T. Susilawati, dan S. Rahayu. 2014. Keutuhan Membran Spermatozoa Disekuensing Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Berpengencer Andromed dan CEP-2 yang Ditambahkan Kuning Telur. Jurnal Veteriner, 15(1):23-30.

Ducha, N., T. Susilawati, Aulanni'am, dkk. 2013. Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Pada Refrigerator Dalam Pengencer Cep-2 Dengan Suplementasi Kuning Telur. Jurnal



Kedokteran Hewan, 7(1):5-8.

Elsayed, D. H., A. A. El-Shamy, H. M. A. Abdelrazek, et al. 2019. Effect Of Genistein On Semen Quality, Antioxidant Capacity, Caspase-3 Expression And DNA Integrity In Cryopreserved Ram Spermatozoa. Small Ruminant Reseach, 177:50-55.

Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Bandung: Alfabeta.

Foeh, NDFK., C. D. Gaina, A. P. Titong, dkk. Daya Tahan Spermatozoa Dalam Semen Cair Babi Landrace Pada Metode Penyimpanan Berbeda. Jurnal Kajian Veteriner, 7(1):47-52.

Ganai, A. A., and M. Husain. 2017. Genistein Alleviates Neuroinflammation and Restores Cognitive Function in Rat Model of Hepatic Encephalopathy: Underlying Mechanisms. Molecular Neurobiology, 55(2):1762-1772.

Gunawan, I., D. N. D. I. Laksmi, dan I G. N. B. Trilaksana. 2012. Efektivitas Penambahan B- Karoten dan Glutathion pada Bahan Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa pada Semen Beku Sapi. Indonesia Medicus Veterinus, 1(3):385 – 393.

Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito dan T.W. Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya: Airlangga University Press.

Hartono M. 2008. Optimalisasi Penambahan Vitamin E Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Untuk Mempertahankan Kualitas Semen Kambing Boer. J Indon Trop Anim



Agric, 33(1):11-19.

Herdis. 2014. Pengaruh Waktu Penampungan Semen Terhadap Gerakan Massa Spermatozoa Dan Tingkah Laku Kopulasi Pejantan Domba Garut. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 14(1):38-43.

Hezavehei, M., M. Shafari, H. M. Kouchesfahani, et al. 2018. Sperm Cryopreservation: A Review On Current Molecular Cryobiology And Advanced Approaches. *RBMO*, 37(3):327- 339.

Hidayat, N., Dasrul, Hamdan, dkk. 2018. Integritas Membran Plasma Spermatozoa Sapi Aceh Pasca Pembekuan Dalam Media Sitrat Kuning Telur Dengan Waktu Ekuilibrasi Yang Berbeda. *Jimvet*, 2(1):110-116.

Hoesni, F. 2013. Pengaruh Motilitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Perah Berpengencer Susu Skim Dengan Metode Thawing Yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*, 14(4):80-86.

Ismaya dan N. D. Dwitarizki. 2019. *Bioteknologi Inseminasi Buatan Pada Domba dan Kambing*.

Yogyakarta: Gadjah Mada Universit Press.

Isnaini, N., dan W. A. Fazrien. 2020. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Kerbau*.

Malang: UB Press.

Iswanto, N., Suyadi, dan A. Rachmawati. 2013. Effect of different A-tocopherol concentrations in egg yolk diluent tris aminomethane on boer goat semen quality storage at 5°C. *Jurnal Ilmu- ilmu Peternakan*, 22 (3): 1-



8.

Khairi, F. 2016. Evaluasi Produksi Dan Kualitas Semen Sapi Simmental Terhadap Tingkat Bobot Badan Berbeda. *Jurnal Peternakan*, 13(2):54-58.

Kim, T. H., Yuh, I. S., Park, I. C., et al. 2014. Effects of Quercetin and Genistein on Boar Sperm Characteristics and Porcine IVF Embryo Developments. *Journal of Embryo Transfer*, 29 (2): 141-148.

Komariah, I. Arifiantini dan F.W. Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesland holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan*, 37(3): 143- 147.

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

Kurnia, D., Z. Udin, dan Jaswandi. 2012. Pengaruh Level Gliserol Pada Pengencer Tris-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Pesisir. *Jurnal Green Swarnadwipa*, 2(2).

Kusumaningrum, D. A., P. Situmorang, E. Triwulaningsih dan R. G. Sianturi. 2007. Penambahan Plasma Semen Sapi dan Antioksidan untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (Bubalus Bubalis). *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 2007. Bogor. 188-194

Kusumawati, E. D., A. T. N. Krisnaningsih, Y. U. Lele. 2017. Motilitas dan viabilitas spermatozoa semen sexing menggunakan metode sedimentasi putih telur dengan

pengencer yang berbeda. Seminar Nasional Hasil Penelitian Universitas Kanjuruhan Malang.

Kusumawati, E. D., S. Rahadi, dan S. Santoso, dkk. 2019. Pengaruh Lama Thawing yang Berbeda pada Suhu 25oC Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Ongole. Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Topis, 6(1):119-123.

Layek, S.S., T.K. Mohanty, A. Kumaresan , J. E. Parks. 2016. Cryopreservation of Bull Semen: Evolution from Egg Yolk Based to Soybean Based Extenders. Anim. Reprod. Sci. 172 : 1–9.

Lemma, A and T. Shemsu. 2015. Effect Of Age And Brees On Semen Quality And Breeding Soundness Evaluation Of Pre-Service Young Bulls. Journal On Reproduction And Infertility, 6(2):35-40

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.

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

Lupitasari, F. B. I., R. I. Anwar, D. A. Mahari, dkk. 2020. Pengaruh Penambahan Maltosa pada Pengencer Berbasis Lesitin dalam Mempertahankan Kualitas Semen Cair Kambing. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, 20(20):375-385.



Malinda, D., H. Santoso, dan H. Latuconsina. 2021. Analisis Viabilitas Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (*Bos taurus*) Post Thawing Semen Beku Dengan Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Thawing Berbeda. *Biosaintropis*, 4(2):46-51.

Martinez-Soto, J. D. D. Hourcade, A. Gutierrez-Adan, et al. 2010. Effect Of Genistein Supplementation Of Thawing Medium On Characteristics Of Frozen Human Spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 12(3):431-441.

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

Mittal, P., Gupta V, Kaur G, dkk. 2010. Phytocimistry and pharmacological activities of *Psidium guajava*. A Review. *IJPSR*, 1(9): 9-19.

Muhammad, D., T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2016. Pengaruh Penggunaan Cep-2 Dengan Supplementasi Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Fh (Friesian Holstein) Kualitas Rendah Selama Penyimpanan Suhu 4-50c. *Jurnal Ternak Tropika*, 17(1):66-76.

Murtidjo, B., 2012. *Beternak Sapi Potong*. Yogyakarta: Kanisius, Cetakan ke-20.

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



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

Novita, R. 2020. Pengaruh Lama Waktu Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Secara Mikroskopis. *Tropical Animal Science*, 2(2):66-73.

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

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, R. I., S. Suharyati dan M. Hartono. 2014. Analisis Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Menggunakan Pengencer Andromed® Dengan Variasi Waktu Pre Freezing. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(3):8-15.

Prihantoko, K. D., F. Yuliasuti, H. Haniarti, et. al. 2020. The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade Bull Semen Based on Skim Milk – Soy Lecithin Extender. *International Conference: Improving Tropical Animal Production for Food Security*, 465:1-10.

Primiani, C., N. 2019. *Genistein dan Spermatogenesis*. Madiun : Institut Press.



Ratnawati, D., N. Isnaini dan T. Susilawato. 2017. Pemanfaatan CASA dalam Observasi Motilitas Spermatozoa Semen Cair Sapi Madura dalam Pengencer Berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 27(1):80-95.

Rahayu, W., A. Pramana W. M., dan G. Ciptadi. 2014. Kualitas Semen Segar Kambing Boer Pada Temperatur Penyimpanan 4 Oc Dengan Menggunakan Pengencer Sitrat Dan Suplementasi Susu Kedelai Bubuk. *Jurnal Biotropika*, 2(1):55-60.

Rizal dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku.

Wartazoa, 20(3):139-145.

Rohayati, T., dan R. F. Christi. 2017. Penampilan Reproduksi Sapi Peranakan Ongole Dara. *Jurnal Ilmu Peternakan*, 1(2):7-14.

Rhochim, A., M. A. Salim, N. Isnaini, dkk. 2017. Pengaruh Penghilangan Rafinosa Dalam Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Selama Simpan Dingin. *Jurnal Ternak Tropika*, 18(1):27-35.

Rosary, R. A., Kuswati, T. Susilawati. 2018. Kualitas semen cair sapi peranakan ongole menggunakan pengencer cep-3 kuning telur pada media simpan yang berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*, 19(2):87-94.

Sa'adah, I., Mukson, dan Y. S. Ondho. 2019. Pengukuran Tingkat Kepuasan Peternak Dalam Pelayanan Inseminasi Buatan Menggunakan Analisis Customer Satisfaction Index (Csi) Dan Importance Performance Analysis (IPA). *Jurnal Ekonomi Pertanian dan*



Agribisnis, 3(3):557-567.

Saifudin, M., N. Isnaini, A. P. A. Yekti, dkk. 2018. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair Menggunakan Media Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur pada Sapi Persilangan Ongole. *Jurnal Ternak Tropika*, 19(1):60-65.

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

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

Savitri, F. K., S. Suharyati, dan Siswanto. 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali Dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C Pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(3):30-36.

Sayuti, K. dan R. Yenrina. 2015. Antioksidan, alami dan sintetik. Padang: Andalas University Press Setiawan, D. 2018. Artificial Insemination of Beef Cattle UPSUS SIWAB Program Based on the

Calculation of Non-Return Rate, Service Per Conception and Calving Rate In The North

Kayong Regency. *Int. J. Trop. Vet. Biomed. Res*, 30 (1):7-11.

Setiono, N. S. Suharyati, dan P. E. Santosa. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman Dengan Dosis Krioprotektan Gliserol Yang Berbeda Dalam Bahan



Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 3(2): 61-69.

Sholikah, N., N. Isnaini, A. P. A. Yekti, dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan putih telur pada pengencer CEP-2 terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole pada suhu penyimpanan 3-5oC. *Jurnal Ilmu Peternakan*, 26 (1):7-15.

Shukla, M. . (2011). *Applied veterinary andrology and frozen semen technology*. India: New India Publishing Agency.

Siahaan, E. A., D. N. D. I. Laksmi, dan W. Bebas. 2012. Efektivitas Penambahan berbagai Konsentrasi B-Karoten terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Sapi Bali Post Thawing. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(2):239-251.

Simanjuntak, E., dan Zulham. 2019. Superoksida Dismutase (SOD) dan Radikal Bebas. *Jurnal Keperawatan dan Fisioterapi*, 2(2):124-129.

Sitepu, S. A., and J. Marisa. 2019. Combined Effect Of Streptomycin And Sweet Orange Essential Oil To Membrane And Acroso. *Journal of community Service and Research*, 3(2): 89-92

Soeparna dan Arifiantini, R. I. 2013. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Kuda*. Bogor: IPB Press.

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



Sudarmanto, T. Susilawati, dan N. Isnaini. 2016. Pengaruh lama gliserolisasi terhadap keberhasilan produksi semen beku Sapi Simmental. *Jurnal ilmu-ilmu Peternakan*, 25(2): 43-48.

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

Sulistiyowati, D., M. A. Faris, A. P. A. Yekti, S. Wahjuningsih dan T. Susilawati. 2018. Kualitas semen cair sapi peranakan ongole pada pengencer tris aminomethan kuning telur tanpa raffinosa yang disimpan pada media yang berbeda suhu. *Jurnal Ternak Tropika*, 19(1):38-45.

Sunami, S., N. Isnaini, dan S. Wahjuningsih. 2017. Kualitas Semen Segar Dan Recovery Rate (Rr) Sapi Limousin Pada Musim Yang Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*, 18(1):36-50.

Sundari TW, Tagama TR, Maidaswar. 2013. Korelasi kadar pH semen segar dengan kualitas semen sapi Limousin di Balai Inseminasi Buatan. *Jurnal Ilmu Peternakan*, 1:1043-1049

Susetyarini, E., R. Latifa, S. Zaenab, dkk. 2020. Embriologi dan Reproduksi Hewan. Malang: UMM Press.

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

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

, T. 2017. Sapi Lokal Indonesia (Jawa Timur dan Bali).



Malang: UB Press.

, T. (ed). 2019. Klaster Sapi Potong. Malang: UB Press.

, T dan A. P. A. Yekti. 2018. Teknologi Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair (Liquid Semen). Malang: UB Press.

Susmiarsih, T. P., Kenconoviyati, dan Kuslestari. 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Teh Hijau Terhadap Konsentrasi dan Kecepatan Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Setelah Paparan Asap Rokok. Bioeksperimen, 4(2):46-51.

Sutarno and A. D. Setyawan. 2016. The Diversity of Local Cattle in Indonesia and the Efforts to Develop superior Indigenous Cattle Breeds. Biodiversitas, 17(1):275-295.

Tethool, A. N., A. R. Ollong dan J. F. Koibur. 2017. Kualitas Mikroskopik Spermatozoa Ayam Kampung (*Gallus Gallus*) Setelah Pemberian Sari Buah Merah (*Pandanus Conoideus* Lam). Prosiding Seminar Nasional Peternakan Optimalisasi Sumberdaya Lokal Peternakan Rakyat dalam Mendukung Program Peternakan Berkelanjutan. 18 September 2017: 77-84

Widhyari, S. D., A. Esfandiari, A. Wijaya., dkk. 2015. Tinjauan Penambahan Mineral Zn dalam Pakan Terhadap Kualitas Spermatozoa pada Sapi Frisian holstein Jantan. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia, 20(1):72-77.

Widjaya, Nilawati. 2011. Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi pada Suhu Penyimpanan 5o C. Sains Peternakan, 9(2): 72-76.



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

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

Yahaq, M. A., Y. S. Ondho dan Sutiyono. 2019. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Semen Sapi Limousin yang Dibekukan Terhadap Kualitas Post Thawing. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, 14(4):380-386.

Yekti, A. P. A., W. S. Tatulus, D. Ratnawati, dkk. 2018. Kualitas dan kapasitas spermatozoa sapi bali, madura, dan peranakan ongole. *JITRO*, 5(2):34-41.

Yeste, M. 2016. Sperm Cryopreservation Update: Cryodamage, Markers, And Factors Affecting The Sperm Freezability In Pigs. *Theriogenology*, 85:47-64.

Yulyanto, C. A., T. Susilawati, dan M. N. Ihsan. 2014. Penampilan reproduksi sapi Peranakan Ongole (PO) dan sapi Peranakan Limousin di Kecamatan Sawoo Kabupaten Ponorogodan Kecamatan Tugu Kabupaten Trenggalek. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 24(2):49-57.

Yulnawati, H., H. Maheswari, A. Boediono dan M. Rizal. 2009. Potensi reproduksi dan upaya pengembangbiakan kerbau Belang Tana Toraja. *Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau*, 152-158.



Universitas Brawijaya

Yusuf, T. L., R. I. Arifiantini, R. R. Dapawole, dan W. M. M. Nalley. 2017. Kualitas Semen Beku Babi dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi dengan Trehalosa. *Jurnal Veteriner*, 18(1): 69-75.

Zubair, M., L. A. Lodhi, E. Ahmad, et al. 2013. Hypo Osmotic Swelling Test As Screening For Evaluation Of Semen Of Bull. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1(6): 124-128.

Zamuna, Abd Al K. K. M., T. Susilawati, G. Ciptadi, dkk. 2015. Perbedaan Kualitas Semen Dan Produksi Semen Beku Pada Berbagai Bangsa Sapi Potong. *Jurnal Ternak Tropika*, 16(2):1- 6.

Zulyazaini, Dasrul, S. Wahyuni, dkk. 2016. Karakteristik Semen dan Komposisi Kimia Plasma Seminalis Sapi Aceh yang Dipelihara Di BIBD Saree Aceh Besar. *Agripet*, 16(2):121- 130

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data rata-rata kualitas semen segar sapi peranakan ongole

Karakteristik	Penampungan			SD
	1	5	Rataan	
Makroskopis				
Volume	6,8	6,5	6,65	0,21
Warna	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	Putih Kekuningan	
Bau	Khas	Khas	Khas	
pH	7	6,8	6,9	0,14
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	
Mikroskopis				
Motilitas Massa	2+	2+	2+	
motilitas Individu (%)	80	85	83	3,54
Konsentrasi (juta/ml)	1850	1220	1535	445,48
Viabilitas (%)	80,5	89,5	85,00	6,36
Abnormalitas (%)	3,73	3,41	3,57	0,23
Integritas Membran (%)	78,84	81,48	80,16	1,87



Lampiran 2. Analisis statistik Motilitas Individu Spermatozoa Setelah Thawing (%)

PERLAKUAN		ULANGAN					Total	Rataan	SD
Genistein	Lama Thawing	U1	U2	U3	U4	U5			
0 μ M	30 dtk	35	35	30	30	30	160	32,00	2,74
	60 dtk	30	35	30	30	30	155	31,00	2,24
	90 dtk	25	30	30	25	30	140	28,00	2,74
10 μ M	30 dtk	35	35	30	40	35	175	35,00	3,54
	60 dtk	30	35	30	35	35	165	33,00	2,74
	90 dtk	30	30	25	30	30	145	29,00	2,24
30 μ M	30 dtk	40	35	35	35	35	180	36,00	2,24
	60 dtk	35	35	30	35	35	170	34,00	2,24
	90 dtk	30	30	30	35	30	155	31,00	2,24
50 μ M	30 dtk	30	35	35	35	30	165	33,00	2,74
	60 dtk	30	30	35	30	30	155	31,00	2,24
	90 dtk	25	30	30	30	30	145	29,00	2,24
TOTAL		375	395	370	390	380	1910		



$$FK = \frac{(1910)^2}{3 \times 4 \times 5} = 60801,67$$

$$JK_{\text{total}} = ((35)^2 + \dots + (30)^2) - FK$$

$$= 648,33$$

$$JK_{\text{genistein}} = \frac{(455^2 + 485^2 + 505^2 + 465^2)}{3 \times 5} - FK$$

$$= 98,33$$

$$JK_{\text{lama thawing}} = \frac{(680^2 + 645^2 + 585^2)}{4 \times 5} - FK$$

$$= 230,83$$

$$JK_{\text{interaksi}} = \frac{(160^2 + 155^2 + \dots + 145^2)}{5} - FK - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}}$$

$$= 9,17$$

$$JK_{\text{galat}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}} - JK_{\text{interaksi}}$$

$$= 310$$

SK	DB	JK	KT	F HITUNG	F 0.05	F 0.01
GENISTEIN	3	98,33	32,78	5,08	2,82	2,21
WAKTU	2	230,83	115,42	17,87	3,21	2,43
GW	6	9,17	1,53	0,25	2,31	1,91
GALAT	44	310	6,46			
TOTAL	59					

Kesimpulan: $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka perlakuan penambahan genistein dan lama thawing masing-masing memberikan pengaruh yang nyata terhadap motilitas spermatozoa sapi peranakan ongole ($P < 0,05$). Namun pada interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing hasil $F_{hitung} < F_{tabel}$ menandakan tidak ada pengaruh nyata terhadap spermatozoa sapi peranakan ongole ($P > 0,05$).

Uji jarak berganda ducan

1. Genistein

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{6.46}}{15}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT

1%

2	3	4
2,8505	2,998	3,095

DMRT hitung

1,23	1,29	1,33
------	------	------

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	simbol
P0	30.33	a
P3	31	ab
P1	32.33	c
P2	33.67	c

2. Waktu thawing

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{6.46}}{20}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT 1%

2 3

2,8505	2,998
--------	-------

DMRT hitung

0,92	0,97
------	------

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	simbol
T3	29,25	a
T2	32,25	b
T1	34	c



Lampiran 3. Analisis statistik Viabilitas Spermatozoa Setelah Thawing (%)

PERLAKUAN		ULANGAN					total	rataan	sd
Genistein	waktu thawing	U1	U2	U3	U4	U5			
0 μ M	30 dtk	50,27	50,33	45,45	45,86	45,12	237,03	47,41	2,65
	60 dtk	45,83	49,46	50,22	44,86	42,74	233,11	46,62	3,15
	90 dtk	40,18	46,04	49,98	41,67	40,5	218,37	43,67	4,23
10 μ M	30 dtk	51,83	51,28	47,41	60,07	52,06	262,65	52,53	4,62
	60 dtk	46,76	51,58	47,06	51,46	55,97	252,83	50,57	3,80
	90 dtk	45,03	42,51	44,8	45,11	46,01	223,46	44,69	1,30
30 μ M	30 dtk	56,24	53,09	52,73	54,14	54,27	270,47	54,09	1,37
	60 dtk	56,62	52,73	44,69	53,51	50,21	257,76	51,55	4,47
	90 dtk	50,75	45,38	44,28	50,19	45,12	235,72	47,14	3,07
50 μ M	30 dtk	53,11	52,44	52,04	50,98	51,13	259,7	51,94	0,90
	60 dtk	46,21	51,52	51,67	41,68	46,24	237,32	47,46	4,20
	90 dtk	40,41	50,08	50,14	44,3	44,84	229,77	45,95	4,16
total		583,24	596,44	580,47	583,83	574,21	2918,19		



$$FK = \frac{(2918.19)^2}{3 \times 4 \times 5} = 141930,55$$

$$JK_{\text{total}} = ((50.27)^2 + \dots + (44.84)^2) - FK$$

$$= 1180,91$$

$$JK_{\text{genistein}} = \frac{(688.51^2 + 738.94^2 + 763.95^2 + 726.79^2)}{3 \times 5} - FK$$

$$= 197,56$$

$$JK_{\text{lama thawing}} = \frac{(1029.85^2 + 981.02^2 + 907.32^2)}{4 \times 5} - FK$$

$$= 380,49$$

$$JK_{\text{interaksi}} = \frac{(237.03^2 + 233.11^2 + \dots + 229.77^2)}{5} - FK - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}}$$

$$= 45,12$$

$$JK_{\text{galat}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}} - JK_{\text{interaksi}}$$

$$= 557,73$$



SK	DB	JK	KT	F HITUNG	F 0.05	F 0.01
GENISTEIN	3	197,56	65,85	5,67	2,82	2,21
WAKTU	2	380,49	190,25	16,37	3,21	2,43
GW	6	45,12	7,52	0,65	2,31	1,91
GALAT	48	557,73	11,62			
TOTAL	59					

Kesimpulan: $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka perlakuan penambahan genistein dan lama thawing masing-masing memberikan pengaruh yang nyata terhadap viabilitas spermatozoa sapi peranakan ongole ($P < 0,01$). Namun pada interaksi keduanya hasil $F_{hitung} < F_{tabel}$ menandakan tidak ada pengaruh nyata terhadap spermatozoa sapi peranakan ongole ($P > 0,05$).

Uji jarak berganda ducan

1. Genistein

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{11.62}}{15}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT

1%

DMRT hitung

2.21

2.8505

2.998

3.095

2.32

2.40

2.40

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	simbol
P0	45,90	a
P3	48,45	b
P1	49,26	bc
P2	50,93	c

2. Waktu thawing

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{11.62}}{20}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT 1%

2

3

2.8505

2.998

DMRT hitung

1.66

1.74

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	Symbol
T3	45,37	a
T2	49,05	b
T1	51,49	c



Lampiran 4. Analisis statistik Abnormalitas Spermatozoa Setelah Thawing (%)

PERLAKUAN		ULANGAN					total	rataaan	sd
genistein	waktu thawing	U1	U2	U3	U4	U5			
0 μ M	30 dtk	11,23	11,58	11,34	12,71	11,8	58,66	11,73	0,59
	60 dtk	12,04	12,56	12,2	12,39	13,45	62,64	12,53	0,55
	90 dtk	12,52	12,14	12,96	12,73	12,87	63,22	12,64	0,33
10 μ M	30 dtk	11,43	11,3	11,76	11,17	11,82	57,48	11,50	0,28
	60 dtk	11,59	12,17	12,81	12,65	10,22	59,44	11,89	1,05
	90 dtk	12,13	12,5	12,44	12,5	12,68	62,25	12,45	0,20
30 μ M	30 dtk	11,74	10,34	10,68	11,11	11,35	55,22	11,04	0,55
	60 dtk	11,55	10,69	11,89	12,94	12,02	59,09	11,82	0,81
	90 dtk	12,46	10,08	12,62	13,76	12,68	61,6	12,32	1,35
50 μ M	30 dtk	11,27	11,21	11,32	11,52	12,18	57,5	11,50	0,40
	60 dtk	11,31	11,92	11,51	11,57	12,26	58,57	11,71	0,38
	90 dtk	12,24	12,11	12,02	13,83	12,69	62,89	12,58	0,75
total		141,51	138,6	143,55	148,88	146,02	718,56		

$$FK = \frac{(718,56)^2}{3 \times 4 \times 5} = 8605,47$$

$$JK_{\text{total}} = ((11,23)^2 + \dots + (12,69)^2) - FK$$

$$= 37,23$$

$$JK_{\text{genistein}} = \frac{(184,52^2 + 179,17^2 + 175,91^2 + 17,96^2)}{3 \times 5} - FK$$

$$= 2,56$$

$$JK_{\text{lama thawing}} = \frac{(228,86^2 + 239,74^2 + 249,96^2)}{4 \times 5} - FK$$

$$= 11,13$$

$$JK_{\text{interaksi}} = \frac{(58,66^2 + 62,64^2 + \dots + 62,89^2)}{5} - FK - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}}$$

$$= 1,02$$

$$JK_{\text{galat}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}} - JK_{\text{interaksi}}$$

$$= 22,51$$

SK	DB	JK	KT	F HITUNG	F 0.05	F 0.01
GENISTEIN	3	2.45	0.85	1.82	2.82	2.21
WAKTU	2	11.13	5.57	11.87	3.21	2.43
GW	6	1.02	0.17	0.36	2.31	1.91
GALAT	48	22.51	0.47			
TOTAL	59					

Kesimpulan: F hitung > F tabel maka perlakuan lama thawing memberikan pengaruh yang nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi peranakan ongole ($P < 0,01$). Namun pada perlakuan penambahan genistein dan interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing hasil F hitung < F tabel menandakan tidak ada pengaruh nyata terhadap spermatozoa sapi peranakan ongole ($P > 0,05$).

Uji jarak berganda ducan

1. Waktu thawing

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{0.47}}{20}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT 1%	2	3
	2.8505	2.998
DMRT hitung	0.07	0.07

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	Symbol
T1	11,44	a
T2	11,99	b
T3	12,50	c

Lampiran 5. Analisis statistik Integritas Membran Spermatozoa Setelah Thawing (%)

Perlakuan		Ulangan					Total	Rataan	Sd
Genistein	Waktu Thawing	U1	U2	U3	U4	U5			
0 μ M	30 dtk	35,68	35,38	34,37	33,4	33,96	172,79	34,56	0,96
	60 dtk	36,92	37,22	32,33	33,45	33,39	173,31	34,66	2,25
	90 dtk	34,33	35,17	34,67	30,19	31,48	165,84	33,17	2,20
10 μ M	30 dtk	35,61	35,11	34,29	41,38	40,03	186,42	37,28	3,19
	60 dtk	41,07	36,38	40,32	35,53	30,25	183,55	36,71	4,34
	90 dtk	31,45	35,16	34,78	35,59	34,09	171,07	34,21	1,64
30 μ M	30 dtk	41,78	37,87	40,25	36,25	35,53	191,68	38,34	2,64
	60 dtk	35,17	36,07	36,03	35,47	38,38	181,12	36,22	1,26
	90 dtk	34,1	33,01	31,21	33,35	38,33	170	34,00	2,64
50 μ M	30 dtk	34,67	36,62	35,41	36,87	35,67	179,24	35,85	0,90
	60 dtk	40,44	31,55	31,55	33,96	31,91	169,41	33,88	3,80
	90 dtk	34,19	31,21	31,58	31,86	34,66	163,5	32,70	1,60
Total		435,41	420,75	416,79	417,3	417,68	2107,93		

$$FK = \frac{(2107.93)^2}{3 \times 4 \times 5} = 74056,15$$

$$JK_{\text{total}} = ((35.68)^2 + \dots + (34.66)^2) - FK$$

$$= 469,09$$

$$JK_{\text{genistein}} = \frac{(511.94^2 + 541.04^2 + 542.8^2 + 512.15^2)}{3 \times 5} - FK$$

$$= 59,61$$

$$JK_{\text{lama thawing}} = \frac{(730.13^2 + 707.39^2 + 670.41^2)}{4 \times 5} - FK$$

$$= 190,85$$

$$JK_{\text{interaksi}} = \frac{(172.79^2 + 173.31^2 + \dots + 163.5^2)}{5} - FK - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}}$$

$$= 15,05$$

$$JK_{\text{galat}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{genistein}} - JK_{\text{lama thawing}} - JK_{\text{interaksi}}$$

$$= 285,32$$



SK	DB	JK	KT	F HITUNG	F 0.05	F 0.01
GENISTEIN	3	59,61	19,87	3,14	2,82	2,21
WAKTU	2	90,85	45,43	7,18	3,21	2,43
GW	6	15,05	2,51	0,40	2,31	1,91
GALAT	48	303,59	6,32			
TOTAL	59					

Kesimpulan: F hitung > F tabel maka perlakuan penambahan genistein dan lama thawing masing-masing memberikan pengaruh yang nyata terhadap integritas membran spermatozoa sapi peranakan ongole ($P < 0,05$). Namun pada interaksi antara penambahan genistein dan lama thawing hasil F hitung < F tabel menandakan tidak ada pengaruh nyata terhadap spermatozoa sapi peranakan ongole ($P > 0,05$).

Uji jarak berganda ducan

1. Genestein

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{6.32}}{15}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT
1%

	2	3	4
DMRT hitung	1,20	1,26	1,31

Hasil notasi

Perlakuan	rata-rata	simbol
P0	34,13	a
P3	34,14	b
P2	36,07	c
P1	36,19	c

2. Waktu thawing

$$SE = \frac{\sqrt{KT Galat}}{br} = \frac{\sqrt{6.32}}{20}$$

Tabel ducan

Tabel DMRT 1%

	2	3
DMRT hitung	0,90	0,95

Hasil notasi

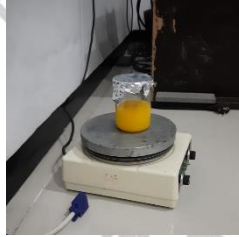
Perlakuan	rata-rata	Symbol
T3	33,52	a
T2	35,37	b
T1	36,51	c



Dokumentasi



Pengencer tris
aminomethan



Menghomogenkan
pengencer dengan
magnetic stirrer



Evaluasi semen
segar



Uji Mikroskopis



Pencampuran tris
aminomethan dan
kuning telur