

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN
BEKU SAPI PESISIR *PRE* DAN *POST THAWING*

TESIS

Oleh

CICI APRIYANTI

1021204013



PROGRAM STUDI ILMU TERNAK
PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS

PADANG

2012

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PESISIR *PRE* DAN *POST THAWING*

CICI APRIYANTI, di bawah bimbingan

Prof. Dr. Ir. Zaituni Udin, M. Sc dan Dr. Ir. H. Jaswandi, MS

Program Studi Ilmu Peternakan Program Pascasarjana

Universitas Andalas Padang, 2012

RINGKASAN

Kualitas semen beku yang digunakan untuk inseminasi buatan dipengaruhi oleh proses pembekuan. Problema pembekuan semen yaitu adanya pengaruh *cold shock* dan pembentukan kristal-kristal es. Kelemahan ini dapat diatasi dengan menggunakan zat-zat pelindung di dalam pengencer seperti gliserol. Keefisienan gliserol pada masa pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu optimum ekuilibrasi semen dalam pengencer tris-kuning telur untuk mempertahankan kualitas semen beku sapi Pesisir. Pada penelitian ini digunakan semen dari pejantan sapi Pesisir yang berumur 3 tahun. Penampungan semen sapi Pesisir ini menggunakan metode vagina buatan.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan (ekuilibrasi 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam) dan empat kali penampungan semen sebagai ulangan. Percobaan ini diawali dengan melakukan penampungan semen pada sapi Pesisir, selanjutnya semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis di laboratorium Fisiologi Reproduksi Ternak, kemudian dilakukan pengenceran semen dengan menggunakan tris-kuning telur. Selanjutnya dilakukan *filling* dan *sealing* straw kemudian diekuilibrasi selama 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam pada suhu 5⁰C, setelah itu diamati motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh. Kemudian dilakukan pembekuan di atas uap nitrogen cair selama 9 menit dan disimpan di dalam kontainer selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan *thawing*

selama 30 detik dengan air kran pada suhu 27⁰C kemudian dilakukan evaluasi kembali.

Hasil penelitian setelah ekuilibrasi (*pre thawing*) terbaik pada ekuilibrasi 4 dan 6 jam. Dimana rata-rata motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh *pre thawing* pada ekuilibrasi 4 jam yaitu $55 \pm 5.77 \%$, $65.75 \pm 5.20 \%$, $12.25 \pm 0.64 \%$ dan $62.5 \pm 4.91 \%$. Sedangkan rata-rata motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh *pre thawing* pada ekuilibrasi 6 jam yaitu $52.5 \pm 5 \%$, $60.12 \pm 5.40 \%$, $12.5 \pm 0.70 \%$ dan $57.5 \pm 4.74 \%$.

Rata-rata motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh *post thawing* pada ekuilibrasi 4 jam yaitu $25 \pm 5.77\%$, $30.5 \pm 3.85\%$, $15.62 \pm 1.10\%$ dan $36.75 \pm 1.32\%$. Sedangkan rata-rata motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh terbaik *post thawing* pada ekuilibrasi 6 jam yaitu $22.5 \pm 5 \%$, $26.37 \pm 4.09 \%$, $16.5 \pm 1.58 \%$ dan $34.25 \pm 1.19 \%$. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$) terhadap motilitas, persentase hidup dan membran plasma utuh spermatozoa sapi Pesisir, sedangkan untuk abnormalitas waktu ekuilibrasi tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P > 0.05$).

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN
BEKU SAPI PESISIR *PRE* DAN *POST THAWING*

Oleh

CICI APRIYANTI

1021204013

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Memperoleh Gelar Magister Pertanian
Pada Program Pascasarjana Universitas Andalas

PROGRAM STUDI ILMU TERNAK
PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS

PADANG

2012

Judul Penelitian : PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PESISIR *PRE* DAN
POST *THAWING*
Nama Mahasiswa : CICI APRIYANTI
No. BP : 1021204013
Program Studi : ILMU TERNAK

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan di depan sidang panitia ujian akhir
Magister Pertanian pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan
dinyatakan lulus pada tanggal 31 Mei 2012.

Menyetujui

1. Komisi Pembimbing

Ketua

Anggota

Prof. Dr. Ir. ZAITUNI UDIN, M. Sc
NIP. 195309071980032001

Dr. Ir. H. JASWANDI, MS
196310091988101001

2. Ketua Program Studi

3. Direktur Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. MIRZAH, MS
NIP. 195805151986031004

Prof. Dr. Ir. NOVIRMAN JAMARUN, M.Sc
NIP. 195511061980031001

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Nagari Sintuak Kecamatan Sintuak Toboh Gadang Kabupaten Padang Pariaman pada tanggal 11 April 1987. Anak dari Katik Ali Amran dan Junaida. Penulis adalah anak ke empat dari lima bersaudara.

Pada tahun 1999 penulis menamatkan Pendidikan Sekolah Dasar Negeri 24 Tanjung Pisang, pada tahun 2002 menamatkan Pendidikan Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama Negeri 2 Lubuk Alung dan pada tahun 2005 penulis menamatkan Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Lubuk Alung dan pada tahun 2005 penulis di terima sebagai mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Andalas melalui tes SPMB dan lulus sebagai Sarjana Peternakan pada tahun 2009. Penulis melanjutkan pendidikan pada Program Studi Ilmu Ternak Pascasarjana Universitas Andalas Padang pada tahun 2010.

Pada bulan September sampai November 2011 melakukan penelitian dengan judul **“PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PESISIR PRE DAN POST THAWING”** di laboratorium Fisiologi Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Andalas, guna memenuhi syarat untuk menyelesaikan studi pada Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Padang, Mei 2012

Cici Apriyanti

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa Tesis yang ditulis dengan judul :

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI PESISIR *PRE* DAN *POST THAWING*

Adalah hasil penelitian/karya saya sendiri dan bukan merupakan jiplakan dari hasil/karya orang lain, kecuali kutipan pustaka yang sumbernya dicantumkan. Jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Mei 2012
Yang membuat pernyataan

Cici Apriyanti
1021204013

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Tesis ini dengan judul “ **Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Pesisir *Pre dan Post Thawing***”. Kemudian salawat dan salam penulis haturkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW yang telah membawa umatnya ke alam yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang setulusnya kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Zaituni Udin, M.Sc dan Bapak Dr. Ir Jaswandi, MS selaku dosen pembimbing, Ibu Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin. BP, MS, Bapak Prof. Dr. Ir. Ferdinal Rahim dan Bapak Prof. Dr. Ir. Mirzah, MS selaku tim penguji yang telah banyak memberikan arahan, saran, kritikan dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini. Kedua orang tua yang telah ikhlas berkorban, rekan-rekan seperjuangan serta semua pihak yang telah turut membantu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, kritik dan saran maupun komentar yang ditujukan untuk perbaikan penulisan usulan penelitian ini sangat penulis harapkan. Akhir kata semoga ini dapat bermanfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan dan juga bermanfaat bagi masyarakat.

Padang, Mei 2012

Cici Apriyanti

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sapi Pesisir	4
2.2 Organ Reproduksi Sapi Jantan	5
2.3 Penampungan Semen	6
2.4 Kualitas Semen.....	6
2.5 Komposisi Semen.....	10
2.6 Morfologi spermatozoa	10
2.7 Pengenceran Semen.....	12
2.8 Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sebelum dan Setelah Pengencer.....	14
2.9 Penambahan Gliserol dalam Pengencer	15
2.10 Ekuilibrasi dan Pembekuan Semen	16
2.11 Thawing.....	18

III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.2 Bahan dan Alat.....	20
3.3 Metode Penelitian.....	21
3.4 Peubah yang Diamati	26
3.5 Analisis Data	29

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Semen Segar Sapi Pesisir	31
4.2 Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Sapi Pesisir.....	36
4.2.1 Persentase Motilitas.....	36
4.2.2 Persentase Hidup.....	38
4.2.3 Abnormalitas.....	40
4.2.4 Persentase Membran Plasma Utuh (MPU).....	43

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	46
5.2 Saran.....	46

DAFTAR PUSTAKA.....	47
----------------------------	-----------

LAMPIRAN	51
-----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Halama
1.	Komposisi kimia semen sapi.....	10
2.	Komposisi pengencer yang digunakan.....	20
3.	Rataan nilai karakteristik semen segar sapi Pesisir.....	31
4.	Rataan persentase motilitas spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur	36
5.	Rataan persentase hidup spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur	38
6.	Rataan persentase abnormalitas spermatozoa pada berbagai waktu Ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur	41
7.	Rataan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Teks	Halaman
1.	Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%).....	51
2.	Analisis Statistik Persentase Hidup Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%).....	53
3.	Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%).....	55
4.	Analisis Statistik Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%).....	56
5.	Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i> (%).....	58
6.	Analisis Statistik Persentase Hidup Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i> (%).....	60
7.	Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i> (%).....	62
8.	Analisis Statistik Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i> (%).....	63

I. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Ternak sapi merupakan hewan ternak terpenting dari jenis hewan ternak yang dipelihara manusia sebagai sumber daging, susu dan tenaga kerja pengolahan lahan. Selain itu, sapi juga berperan sebagai sumber pendapatan, tabungan hidup, aset kultural dan religius, sumber gas bio dan pupuk kandang. Sapi Pesisir merupakan salah satu bangsa sapi lokal Indonesia yang banyak dipelihara masyarakat di Sumatera Barat, terutama di Kabupaten Pesisir Selatan. Menurut Saladin (1983), sapi pesisir termasuk bangsa sapi berukuran kecil, dengan demikian, sapi pesisir merupakan sumber daya genetik (plasma nutfah) nasional yang perlu dilestarikan dan dikembangkan.

Sapi Pesisir pada umumnya dipelihara secara bebas (berkeliaran) dan masih sangat sedikit perhatian peternak dalam pemeliharaannya. Sapi Pesisir merupakan sapi yang paling banyak digunakan sebagai hewan qurban di wilayah Sumatera Barat.

Dinas Peternakan Provinsi Sumatera Barat melaporkan bahwa populasi sapi Pesisir pada tahun 2008 jauh menurun dibandingkan tahun 2004. Populasi sapi Pesisir pada tahun 2008 tercatat 89.995 ekor, jauh menurun dibanding tahun 2004 yang mencapai 104.109 ekor. Penurunan populasi diduga berkaitan dengan sistem pemeliharaan yang bersifat ekstensif tradisional, tingginya jumlah pemotongan ternak produktif, terbatasnya pakan, menyempitnya areal penggembalaan dan kurang tersedianya pejantan sapi Pesisir untuk mengawini sapi betina, disebabkan juga dengan tingginya permintaan untuk hewan qurban .

Peningkatan populasi sapi Pesisir perlu dilakukan dengan memperbaiki manajemen pemeliharaan, pemanfaatan teknologi, dan pengendalian pengeluaran ternak. Peningkatan produktivitas ternak sapi dapat dipercepat dengan penerapan berbagai teknologi dibidang peternakan yang telah berkembang dengan pesat, mulai dari teknologi pakan hingga reproduksi. Khusus untuk teknologi reproduksi, pada saat ini telah diterapkan inseminasi buatan (IB) dengan menggunakan semen beku.

Kualitas semen beku yang digunakan untuk inseminasi buatan dipengaruhi oleh proses pembekuan. Menurut Toelihere (1993) bahwa problema pembekuan semen berkisar pada pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan pembentukan kristal-kristal es. Kelemahan ini sebagian dapat diatasi dengan menggunakan zat-zat pelindung di dalam pengencer dan penurunan suhu secara gradual. Pelindung yang bisa digunakan adalah gliserol. Keefisienan Gliserol pada masa pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrase (Umar dan Maharani, 2005).

Waktu ekuilibrase adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Toelihere, 1993). Semen harus berada dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5⁰C (Roberts dalam Toelihere, 1993).

Waktu ekuilibrase berbeda-beda pada berbagai jenis, bangsa dan individu pejantan (Toelihere, 1993). Pada pembekuan semen domba, waktu ekuilibrase pada suhu 5⁰C terbaik adalah 2 jam dan pada rusa 4 jam (Bearden dalam Afriantini dkk, 2007). Pada semen sapi FH waktu ekuilibrase selama 4 jam dengan

suhu 5⁰C. Mengetahui pentingnya waktu ekuilibrasi pada proses pembekuan semen beku maka dilakukan penelitian tentang pengaruh waktu ekuilibrasi pada pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas semen beku sapi Pesisir.

1.2.Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan masalah yang akan diteliti, yaitu : Sejauh mana pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen Sapi Pesisir *pre* dan *post thawing* meliputi : motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas spermatozoa dan membran plasma utuh spermatozoa.

1.3.Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Untuk mengetahui pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku sapi Pesisir
2. Untuk mendapatkan waktu ekuilibrasi yang terbaik pada pembekuan semen sapi Pesisir.

1.4.Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat membantu perkembangan teknologi reproduksi dengan penyimpanan semen beku sapi Pesisir dan meningkatkan kinerja reproduksi salah satunya inseminasi buatan (IB) dengan menggunakan semen beku.

1.5.Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah waktu ekuilibrasi akan mempengaruhi viabilitas spermatozoa pada waktu pembekuan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi Pesisir

Sapi Pesisir merupakan sapi asli yang berkembang di kawasan pesisir Sumatera Barat. Saladin (1983) menduga sapi Pesisir sebagai sisa sapi asli yang pada mulanya berkembang di Kabupaten Pesisir Selatan. Sapi Pesisir termasuk sapi yang berukuran kecil. Namun, sapi Pesisir dapat beradaptasi dengan baik terhadap pakan berkualitas rendah, pemeliharaan secara sederhana, dan tahan terhadap beberapa penyakit dan parasit. Sapi Pesisir memiliki potensi besar dalam penyediaan daging untuk memenuhi gizi masyarakat dan sebagai ternak kurban.

Menurut Jauzanoey (2010) karakteristik sapi Pesisir adalah sebagai berikut : Jantan dewasa umur 4-6 tahun memiliki bobot badan 186 kg dengan tinggi 99 cm. Sapi muda umur 1,5-2,5 tahun hanya bertumbuh 20 gr/ekor/hari. Induk muda umur 3-4 tahun bertumbuh sebesar 140-225 gr/ekor/ hari. Warna bulu pola tunggal terdiri atas lima warna utama, yaitu merah bata (34,35%), kuning (25,51%), coklat (19,96%), hitam (10,91%) dan putih (9,26%). Warna merah bata dominan, dan derajat heterozigositasnya tinggi. Tanduk pendek dan mengarah keluar seperti tanduk kambing. Jantan memiliki kepala pendek, leher pendek dan besar, belakang leher lebar, ponok besar, kemudi pendek dan membulat. Betina memiliki kepala agak panjang dan tipis, kemudi miring, pendek dan tipis, tanduk kecil dan mengarah keluar. Umur bunting pertama 30 bulan. Umur beranak pertama 40 bulan.

Sapi Pesisir pada umumnya dipelihara secara bebas (berkeliaran) dan masih sangat sedikit perhatian peternak dalam pemeliharaannya (Rusfidra, 2007). Sapi Pesisir memiliki bobot badan kecil sehingga tergolong sapi mini (*mini cattle*). Sapi Pesisir jantan dewasa (umur 4-6 tahun) memiliki bobot badan 186 kg. Penampilan bobot badan yang kecil tersebut merupakan salah satu penciri suatu bangsa sapi, sehingga dapat dikatakan bahwa sapi pesisir merupakan sapi khas Indonesia (terutama di Sumatera Barat). Rusfidra (2007) juga menambahkan Sapi Pesisir merupakan ternak yang populer untuk kebutuhan hewan kurban pada hari raya Idul Adha.

2.2. Organ Reproduksi Sapi Jantan

Organ reproduksi hewan jantan dapat dibagi atas tiga komponen : (a) organ kelamin primer, yaitu *gonad* jantan, dinamakan testis, (b) sekelompok kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap yaitu kelenjar vesikulares, prostate dan cowper dan saluran-saluran yang terdiri dari *epididymis* dan *vas deferens*, dan (c) alat kelamin luar atau kopulatoris yaitu *penis*. Organ kelamin primer atau testes berjumlah dua buah dan pada ternak mamalia secara normal terdapat di dalam suatu kantong luar , scrotum (Toelihere, 1979).

Bentuk testes bulat panjang, dengan sumbu memanjangnya ke arah vertical. Pada hewan dewasa panjang testes 12 sampai 15 cm dan diameter berkisar dari 6 sampai 8 cm. berat sebuah testes termasuk tunika albugenia dan epididymis berkisar antara 300 sampai 500 gram, tergantung pada umur, jenis sapi dan kondisi makanan. Testes mempunyai dua fungsi penting untuk menghasilkan spermatozoa dan horman-hormon jantan androgen (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa dihasilkan dalam testes yaitu di dalam *tubuli seminiferi* melalui

proses spermatogonia yang terdiri dari dua fase utama yaitu : (a) Fase perkembangan awal sel spermatogonia secara pembelahan mitosis dari jumlah sel menjadi dua kali (*fase spermatocytogenesis*). (b) Fase spermiogenesis yaitu spermatid mengalami *metamorphosis* dan berubah bentuknya dan menghasilkan spermatozoa sempurna (Salisbury dan Van Demark, 1985).

2.3. Penampungan Semen

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

Metode penampungan semen memakai vagina buatan sangat populer dan kini dipakai secara meluas pada pusat-pusat inseminasi buatan. Pada penampungan semen menggunakan vagina buatan libido justru diusahakan dipertinggi untuk memperoleh semen berkuantitas dan berkualitas tinggi. Untuk itu sebelum penampungan biasanya dilakukan dengan tidak menampung semen pada penampungan pertama atau kedua, disebut *false mount* (Toelihere, 1993). Hale dan Almquist pada tahun 1960 dalam Toelihere (1993) menyatakan suatu *false mount* menyebabkan dua kali lipat konsentrasi spermatozoa diperoleh tanpa pengekangan.

2.4. Kualitas Semen

Untuk keberhasilan perkawinan atau IB, semen harus diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang tinggi. Pemeriksaan dan evaluasi meliputi keadaan umum contoh semen, volume, konsentrasi dan motilitas atau daya geraknya.

Observasi ini perlu untuk penentuan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan (Toelihere,1993) Salisbury dan VanDemark (1985) menyatakan bahwa kriteria mengenai penilaian semen bertujuan untuk mendapatkan suatu cara pendugaan tidak langsung mengenai potensi semen untuk memperlihatkan fungsi fertilisasinya.

Pemeriksaan dan evaluasi semen penting dilakukan untuk menentukan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan, khususnya untuk menentukan kadar pengencer, karakteristik semen dapat digunakan sebagai indikator dari fertilitas (Toelihere, 1981). Berdasarkan gerakan individual, dilakukan penilaian sebagai berikut : 0. Spermatozoa immotil atau tidak bergerak, 1. Gerak berputar ditempat, 2. Gerak berayun atau melingkar, kurang dari 50 bergerak progresif atau tidak ada gelombang, 3. Antara 50 sampai 80% spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa, 4. Pergerakan progresif gesit dan segera membentuk gelombang dengan 90% sel spermatozoa motil, 5. Gerakan sangat progresif, gelombang sangat cepat bergerak, 100% motil aktif (Toelihere, 1993).

Sedangkan penilaian gerakan massa, kualitas semen dapat ditentukan sebagai berikut : (a) Sangat baik (+ + +), terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bagaikan gumpalan awan hitam dekat waktu hujan yang bergerak cepat berpindah-pindah tempat. (b) baik (+ +), bila terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kualitas jelas dan bergerak lamban. (c) cukup (+), jika tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan-gerakan individual aktif progresif. (d) buruk (N, necrospermia atau O), bisa hanya sedikit atau tidak ada gerakan-gerakan individual (Toelihere, 1993).

2.4.1. Motilitas Sperma

Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya geraknya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam mpenilaian semen untuk inseminasi buatan (Toelihere, 1993). Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa ada tiga motilitas spermatozoa : (a) Gerakan progresif. (b) Gerakan berputar. (c) Gerakan ditempat. Dua tipe gerakan terakhir disebabkan oleh gerak ayun-ayun ekor yang abnormal dan ditambahkan bahwa motilitas kurang dari 50 % akan menghasilkan angka konsepsi yang lebih rendah.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa sapi di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering di hubungkan dengan infertilitas. Kebanyakan pejantan fertile mempunyai 50-80% spermatozoa motil, aktif progresif. Hafez (1987) menyatakan bahwa peniliain spermatozoa yang aktif yang bergerak atau hidup dan penilaian dilakukan pada suhu 37⁰ C sampai 40⁰ C. Untuk pertesentase sperma yang aktif tidak harus lebih besar dari pada 70%. Sama dengan yang di ungkapkan oleh Toelihere (1993) bahwa untuk memperoleh hasil yang lebih tepat sebaiknya semen diperiksa pada suhu 37⁰ C sampai 40⁰ C dengan menempatkan gelas objek di atas suatu meja panas atau menggunakan mikroskop yang di panaskan secara elektrik.

2.4.2. Abnormalitas Spermatozoa

Menurut Robert (1971), abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada kepala, badan dan ekornya, jumlah spermatozoa abnormal dihitung dari pemeriksaan sekitar seratus sampai dua ratus spermatozoa. Ditambahkan oleh Toelihere (1979), kelainan morfologi dibawah 20% masih di anggap normal. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa kesuburan sapi jantan

tergantung pada proporsi spermatozoa yang abnormal terhadap spermatozoa normal di dalam semen. Sedangkan abnormalitas spermatozoa 20% atau lebih kualitasnya dianggap jelek (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa yang abnormal kemungkinan tidak subur.

Bearden dan Fuguay (1980) mengklasifikasikan abnormalitas spermatozoa dalam abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Selanjutnya juga dinyatakan bahwa bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa terdapat di dalam testes karena kesalahan spermiogenesis, faktor keturunan, penyakit, defisiensi makanan dan pengaruh lingkungan yang jelek. Rollinson (1951) menyatakan bahwa bentuk abnormalitas primer terjadi selama perkembangan spermatozoa dalam *tubuli seminiferi* dan akibat cara penanganan seperti pemanasan yang berlebihan, pendinginan terlalu cepat, kontaminasi dengan air dan sebagainya. Toelihere (1993) menyatakan bahwa abnormalitas primer meliputi kepala kecil, kepala besar, kepala miring, kepala kembar, ekor bercabang, leher besar dan melipat. Sedangkan abnormalitas sekunder meliputi ekor terputus, kepala tanpa ekor, bagian tengah melipat, adanya butiran-butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosomal terlepas.

2.4.3. Persentase Hidup Spermatozoa

Persentase hidup atau spermatozoa dapat ditentukan dengan pewarnaan *eosin* atau *eosin-negrosin*. Zat warna *eosin* akan mewarnai spermatozoa yang mati menjadi merah atau merah mudah, sedangkan zat warna *negrosin* memberi latar biru hitam (Toelihere, 1993). Kemudian Salisbury dan VanDemark (1985) menyatakan bahwa spermatozoa yang hidup dapat di bedakan reaksinya terhadap zat warna tertentu, spermatozoa yang di anggap mati menyerap zat warna dan

spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna. Toelihere (1993) menyatakan standar minimum bagi kualitas semen yang dapat di pakai untuk inseminasi buatan adalah minimal 50% spermatozoa hidup.

2.5. Komposisi Semen

Hafez (1980) menyatakan bahwa plasma semen secara garis besar mengandung unsur-unsur organik dan anorganik. Yang termasuk unsur organik adalah seperti : Asam Sitrat, Fruktosa, Gliserol Phosporil (GPC), Sorbitol, dan Erigiotionim. Unsur anorganik terpenting dalam semen adalah : Kalsium, Natrium, Kalium, Phospor dan Chlor.

Tabel 1. Komposisi Kimia Semen Sapi

No	Bahan	Mg/100 ml
1	Fruktosa	530
2	Sorbitol	75
3	Gliserol phosporil chrom	350
4	Mositol	35
5	Asam sitrat	720
6	Plasmogen	60
7	Sodium	250
8	Potasium	140
9	Chlor	180
10	Kalsium	44
11	Magnesium	8

Sumber : Hafez (1980)

2.6. Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa merupakan suatu sel kecil, kompak dan sangat khas yang tidak tumbuh membagi diri. Secara esensial spermatozoa terdiri dari kepala yang membawa hereditas paternal dan ekor untuk bergerak. Spermatozoa secara sitologik dibagi atas kepala dan ekor. Ekor terbagi menjadi bagian tengah atau

leher, bagian utama dan bagian ujung (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa tidak memegang peranan apapun dalam bidang fisiologis hewan yang menghasilkannya tetapi hanya untuk melibatkan diri dalam pembuahan untuk membentuk individu baru sejenis dari mana spermatozoa itu berasal (Toelihere, 1979).

Unsur kimia yang terpenting dari spermatozoa adalah deoxyribonukleoprotein yang terdapat dalam inti ikatan protein mucopolysaccarida di dalam akrosom, plasmalogen di bagian tengah dan ekor. Protein yang berupa kreatin menyusun membran dan fibril-fibril serta enzim dan koenzim yang mengontrol motilitas dan aktivitas metabolisme spermatozoa (Mann, 1968). Spermatozoa sebagian besar terdiri dari : (a) Deoxyribunucleoprotein yang terdapat dalam nukleus yang merupakan kepala dari spermatozoa. (b) Mucopolysaccarida yang terikat pada molekul-molekul protein terdapat akrosom, yaitu bagian pembungkus kepala. (c) Plasmalogen atau lemak aldehydogen yang terdapat pada bagian leher, badan dan ekor dari spermatozoa, merupakan bahan yang digunakan oleh spermatozoa untuk respirasi endogen. (d) Protein yang merupakan keratin yang merupakan selubung tipis yang meliputi seluruh badan, kepala dan ekor dari spermatozoa. Protein ini banyak menggunakan ikatan dengan unsur zat tanduk yaitu S (Sulfur). Protein ini banyak terdapat pada membran pada sel-sel dan fibril-fibrilnya. (e) Enzim dan koenzim yang pada umumnya digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi (Partodihardjo, 1992).

Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa spermatozoa normal terdiri dari kepala, leher dan ekor. Di bawah mikroskop bagian dinding depan kepala tampak sekitar dua pertiga bagian tertutup oleh akrosom. Tempat sambungan dasar akrosom dan kepala disebut cincin nukleus, di antara kepala dan

badan terdapat sambungan pendek yaitu leher yang berisi sentriol proksimal, kadang dinyatakan sebagai pusat kinetik aktivitas spermatozoa. Bagian badan mulai dari leher dan berlanjut ke cincin sentriol. Bagian badan dan ekor mampu bergerak bebas, meskipun tanpa kepala. Ekor merupakan cambuk, membantu mendorong spermatozoa bergerak maju.

Salisbury dan Van Demark(1985) menyatakan bahawa sesuai dengan bentuk morfologi spermatozoa atau pola metaboliknya yang khusus dengan dasar produksi energi, spermatozoa hidup dapat mendorong dirinya sendiri maju ke depan di dalam lingkungan zat cair. Pada umumnya setiap penyimpangan morfologi dari struktur spermatozoa yang normal dipandang sebagai abnormal.

2.7. Pengenceran Semen

Anggorodi (1979) menyatakan bahwa, pengenceran dan penyimpanan bertujuan untuk memperbesar volume, melindungi spermatozoa selama proses pendinginan dan memperpanjang masa hidup tanpa menghilangkan kesuburannya. Menurut Toelihere (1993), unsur yang ditambahkan tersebut haruslah mempunyai fungsi yang baik sebagai berikut : (1) menyediakan zat makanan sebagai sumber energy bagi spermatozoa, (2) melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*, (3) menyediakan suatu penyangga untuk mencegah perubahan pH akibat paembentukan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa, (4) mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang sesuai, (5) memperbanyak volume sehingga banyak hewan betina yang dapat di inseminasi dalam satu ejakulasi.

Ditambahkan oleh Salisbury dan VanDemark (1985) menyatakan bahwa pengencer yang baik haruslah mempunyai syarat-syarat sebagai berikut: (a)

mempunyai tekanan isotonik yang isotonis dengan darah yang dapat mempertahankan tekanan isotonis itu selama penyimpanan, (b) memberikan imbang unsur mineral yang di butuhkan, (c) menyediakan bahan makanan bagi sel mani untuk proses metabolis aerob dan anaerob, (d) memiliki lipoprotein atau lecithin untuk melindungi sel mani terhadap kejut dingin, (e) menyediakan penyangga terhadap sel mani, (f) merupakan sumber bahan reduksi untuk melindungi enzim seluler yang mengandung sulfahidril, (g) bebas dari substansi produk kuman-kuman atau organisme penyakit seluler yang dapat membahayakan sel mani, alat-alat reproduksi betina, proses fertilisasi, implantasi dan pengembangan ovum yang di fertilisasi. Begitu juga Toelihere (1993) bahwa bahan pengencer yang di tambahkan harus murah dan praktis di buat tetapi mempunyai daya fertilisasi yang tinggi.

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

Penggunaan buffer yang sesuai dalam media pengenceran merupakan salah satu faktor penting terhadap kelangsungan hidup spermatozoa (Rasul *et al.*, 2000). Buffer yang digunakan adalah Tris Natrium Sitrat, Tris Asam Sitrat, Tris-Tes dan Tris-Hepes. Didapatkan bahwa Tris Natrium Sitrat menghasilkan kualitas yang lebih baik pada spermatozoa kerbau post-*thawing*. Kemudian Siddique *et al*

(2006) mengemukakan bahwa kombinasi Tris dan Natrium sitrat Dihidrat dapat digunakan sebagai buffer untuk pembekuan spermatozoa kerbau. Namun jika hanya satu buffer yang digunakan, penggunaan Tris lebih baik dibandingkan dengan Natrium Sitrat Dihidrat. Kuning telur dipakai dalam media pengencer sebagai krioprotektan non-permeabel yang umum dipakai untuk sebagian besar spesies ternak (Sansone *et al.*, 2000). Kuning telur berfungsi melindungi spermatozoa terhadap *cold shock* dan sebagai sumber energi. Sekitar 30 % dari berat telur adalah bagian dari kuning telur, kuning telur memiliki komposisi gizi yang lebih lengkap dibanding putih telur. Komposisi kuning telur terdiri dari air, protein, lemak, karbohidrat, mineral dan vitamin.

2.8. Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sebelum dan Setelah Pengenceran

Spermatozoa adalah sel yang halus yang mudah sekali mati, untuk itu semen harus dihindarkan dari panas yang berlebihan, penyimpanan yang terlalu lama pada suhu ruang, air atau bahan kimia, hubungan yang terlalu lama dengan udara luar terutama sinar matahari langsung (Partodihardjo, 1992). Toelihere (1993) menyatakan bahwa segera sesudah penampungan, semen harus diperlakukan hati-hati untuk mencegah *cold shock* atau pemanasan tinggi, kontaminasi dengan air, *urine* dan bahan-bahan kimia, pengocokan atau guncangan yang berlebih-lebihan atau *exposure* ke udara atau sinar matahari yang langsung. Toelihere (1979) menyatakan bahwa semen yang baru ditampung sebaiknya segera ditempatkan dalam tabung berisi air hangat pada suhu tubuh (37°C).

Toelihere (1993), mengemukakan lagi hal spermatozoa dalam semen cair dapat tahan hidup 7 sampai 14 hari, tetapi sebaiknya dipakai semen yang

disimpan kurang dari 14 hari. Semen cair sebelum di inseminasikan perlu diencerkan untuk memperbesar volumenya, dan dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa baik motilitas maupun fertilitasnya. Untuk itu bahan pengencer harus bersifat melindungi spermatozoa terhadap kemungkinan pengaruh yang bisa merusak akibat perlakuan pada saat pengenceran, bahan pengencer yang digunakan sebaiknya mengandung bahan-bahan yang dibutuhkan semen.

Andry (1982) menyatakan bahwa semen sapi apabila diberi sitrat kuning telur sekitar 20% memberikan daya hidup spermatozoa sapi FH selama 14,71 hari. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa selama semen disimpan, spermatozoa menggunakan fruktosa yang ada dalam pengencer untuk metabolisme glukosa serta karbohidrat lainnya bisa berubah menjadi fruktosa kemudian digunakan untuk metabolisme. Hasil akhir metabolisme fruktosa ini adalah asam laktat yang dapat menurunkan pH pengencer.

2.9. Penambahan Gliserol dalam Pengencer

Gliserol merupakan substansi yang langsung berdifusi ke dalam spermatozoa dan mungkin dioksidir oleh spermatozoa untuk proses energinya dan membentuk fructose (Salisbury dan VanDemark, 1985). Penambahan gliserol kedalam pengencer adalah essensial untuk pembekuan semen. Toelihere (1993) menyataka bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer dapat meninggikan daya tahan hidup spermatozoa. Selanjutnya gliserol juga dapat mempertahankan lama hidup spermatozoa bila gliserol ditambahkan dalam pengencer semen yang disimpan pada suhu 5°C.

Konsentrasi gliserol yang digunakan berbeda tergantung jenis semen serta pengencer yang digunakan. Penambahan 0,55M gliserol ke dalam pengencer susu skim-kuning telur mampu menghasilkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih tinggi (61%) dibandingkan jika ditambahkan *dimetilformamide* (DMF) (38%) pada konsentrasi yang sama. Namun, jika konsentrasi gliserol ditingkatkan (0,6M atau 0,9M) justru akan menurunkan motilitasnya menjadi hanya 52% (Squires *et al.* Dalam Azizah dan Arifiantini, 2009). Konsentrasi gliserol yang optimum pada semen beku kambing menggunakan pengencer susu skim adalah 14% (Ritar *et al.*, 1990). Pada semen beku sapi, dengan pengencer Tris konsentrasi gliserol yang digunakan adalah 6,4% (Arifiantini dan Yusuf, 2006).

Disampaikan oleh Azizah dan Arifiantini (2009) yaitu gliserol bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi, sebaliknya jika konsentrasi yang digunakan terlalu rendah maka daya protektifnya akan berkurang.

2.10. Ekuilibrasi dan Pembekuan Semen

Toelihere (1979) menyatakan bahwa, waktu ekuilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebih-lebihan dapat dicegah. Ekuilibrasi secara tradisional dianggap sebagai waktu total selama spermatozoa tetap berhubungan dengan gliserol sebelum pembekuan. Pada tahap ini, gliserol menembus ke dalam sel spermatozoa untuk membentuk konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler yang seimbang. Tidak boleh diabaikan bahwa pada ekuilibrasi tidak hanya terjadi keseimbangan konsentrasi gliserol, tetapi juga komponen ekstender osmotis aktif lainnya (Salamon dan Maxwell 2000).

Waktu ekuilibrasi berbeda-beda pada berbagai jenis, bangsa dan individu pejantan. Menurut Robert dalam Toelihere (1979), bahwa semen harus berada di dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5° C. Menurut Kacker dan Panwar tahun 1996 dalam Afriantini dkk (2007), ekuilibrasi bertujuan melindungi spermatozoa dari kematian yang disebabkan oleh penurunan tekanan osmotik yang mengganggu keutuhan membran spermatozoa akibat pembekuan.

Berdasarkan penelitian Umar dan Maharani (2005) diketahui bahwa pada waktu ekuilibrasi 6 jam didapatkan kualitas semen yaitu motilitas spermatozoa 47,17 % dan persentase hidup spermatozoa 82,17 % dengan angka kebuntingan 66,7 %. Singh et al. (1990) dan Dhami dan Sahni (1994) menyarankan penggunaan durasi waktu ekuilibrasi yang pendek (2-4 jam), Vale (2010) menggunakan waktu ekuilibrasi 4 jam, sementara Shiddique *et al.* (2006) menganjurkan waktu ekuilibrasi panjang (6 jam).

Toelihere (1979) menyatakan bahwa problema pembekuan semen berkisar pada fenomena pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan-pembentukan kristal es.

Pembekuan adalah suatu fenomena pengeringan fisik. Pada pembekuan semen, dimana terbentuk kristal-kristal es, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel-sel. Spermatozoa sapi banyak mengalami kerusakan pada suhu-suhu kritik antara -1.5° C dan -30° C, rata-rata pada suhu -17° C.

Untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa maka semen beku harus selalu disimpan dalam bejana vakum atau container berisi nitrogen cair yang bersuhu -196°C dan terus dipertahankan pada suhu tersebut sampai waktu dipakai. Sesudah pencairan kembali (*thawing*) semen beku merupakan barang rapuh dan tidak dapat tahan lama seperti semen cair. Semen beku yang sudah dicairkan kembali tidak dapat dibekukan kembali.

2.11. Thawing

Thawing sama pentingnya dengan fase pembekuan bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Spermatozoa yang telah bertahan selama pendinginan dalam suhu -196°C harus dilakukan pencairan kembali (Marshall, 1984). Pengaruh pencairan tergantung pada apakah tingkat pendingin telah cukup tinggi untuk menginduksi pembekuan intraselular, atau cukup rendah untuk menghasilkan dehidrasi sel. Dalam kasus yang pertama, pencairan cepat diperlukan untuk mencegah rekristalisasi dari setiap es intraseluler dalam spermatozoa. Thawing dengan waktu yang cepat menyebabkan keseimbangan intraselular dan ekstraselular lebih cepat daripada pencairan lambat (Salamon dan Maxwell, 2000). Thawing pada temperatur tinggi untuk waktu yang terlalu lama dapat mengakibatkan fluktuasi pH dan kemudian denaturasi protein dan kematian sel. Thawing praktis untuk spermatozoa ternak sapi, yang direkomendasikan oleh kebanyakan peneliti, adalah menggunakan air kran 35°C selama minimal 30 detik (Marshall, 1984).

Menurut Gomes (1977) thawing semen beku straw dapat dilakukan pada suhu 5°C (suhu air es), 37°C (suhu tubuh atau suhu vagina alat kelamin betina berahi) dan dalam air panas 65°C .

III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Andalas dari tanggal 26 September sampai tanggal 26 November 2011.

3.2. Bahan dan Alat

Materi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah spermatozoa sapi Pesisir yang ditampung dengan vagina buatan yang terdapat pada Unit Pelaksanaan Teknis Farm Experience Fakultas Peternakan Universitas Andalas.

Bahan-bahan yang digunakan : gliserol ($C_3H_5(OH)_3$), tris (*hydroxymethyl*) aminomethan ($C_4H_{12}ClNO_3$), kuning telur ayam, glukosa ($C_6H_{12}O_6$), fruktosa, natrium sitrat, penisilin, streptomisin, NaCl 3%, pewarna eosin, nitrogen cair, alkohol, vaselin, air hangat dan aquadestilata.

Alat-alat yang akan digunakan : vagina buatan dan perangkatnya, kandang jepit, termometer, kontainer, gelas ukur, stopwatch, kertas saring, straw, tissue, pingset, inkubator, mikroskop, gunting, objek glass, cover glass, pipet tetes, gelas ukur, pembakar bunsen, tabung erlenmeyer, gelang karet dan aluminium foil.

Tabel 2. Komposisi pengencer yang digunakan

Bahan Pengencer	Dosis
Tris aminomethan (gr)	3.634
Glukosa (gr)	1
Kuning telur (ml)	20
Penisilin (IU)	1x10
Sterptomisin (mg/ml)	1
Gliserol (%)	7
Akuadestilata (ml)	100

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan (ekuilibrase 2 jam, 4 jam, 6 jam, 8 jam) dengan 4 ulangan (jumlah penampungan semen).

Prosedur kerja :

1. Penampungan semen

Penampungan semen sapi Pesisir jantan dilakukan dengan metode vagina buatan. Persiapan vagina buatan adalah sebagai berikut : Vagina buatan terdiri dari selongsong karet tipis yang dimasukkan ke dalam silinder karet tebal. Lipat dan kaitkan karet tipis pada masing-masing ujung silinder karet yang tebal dengan menggunakan gelang-gelang karet yang dipasang 5 cm dari ujung silinder. Sebuah corong penampung dari karet tipis dipasang pada salah satu ujung vagina buatan dan dieratkan dengan karet gelang. Pada ujung corong penampung dipasang sebuah tabung pengumpul semen berskala, lalu diikat pula dengan karet gelang. Air panas dengan suhu 50 sampai 70⁰C dimasukkan ke dalam ruang antara silinder dan selongsong karet yang tipis melalui lubang pada silinder dengan volume setengah sampai dua pertiga penuh. Suhu vagina buatan dipertahankan pada waktu penampungan berkisar antara 40 sampai 52⁰C. Udara ditiupkan melalui pentil silinder yang gunanya untuk menambah tekanan pada vagina buatan. Kemudian dengan sebatang ebonite atau gelas yang steril oleskan bahan pelicin sampai setengah panjang batang vagina buatan.

Setelah vagina buatan disiapkan, pejantan sapi Pesisir yang akan ditampung semennya dibawa ke kandang penampungan yang telah tersedia betina pemancing. Penampung berada disebelah kanan betina pemancing sambil memegang vagina buatan dengan kemiringan 45° dari tanah. Untuk mempertinggi libido pejantan diusahakan dengan mengadakan *false mounts* yaitu pengekanan yang dilakukan terhadap pejantan dengan tidak menampung semen pada penunggangan pertama ataupun kedua. Semen ditampung ketika ejakulasi terjadi, yang ditandai dengan adanya dorongan yang kuat dari penis yang berereksi dengan sempurna pada vagina buatan.

2. Semen hasil penampungan di analisis secara makroskopis dan mikroskopis. Dimana penilaiannya meliputi :
 - a. Makroskopis
 - Volume : semen yang ditampung dapat langsung dilihat volumenya pada skala tabung penampung.
 - Bau : semen yang sudah ditampung didekatkan ke hidung untuk mengetahui baunya, umumnya semen sapi yang normal berbau amis khas.
 - Warna : semen sapi yang normal memiliki warna abu-abu keputihan sampai krem keputihan atau agak kekuningan.
 - pH : ditentukan dengan kertas pH universal, perubahan warna pH dicocokkan dengan warna standar.
 - Konsistensi atau derajat kekentalan dapat langsung di ketahui dengan menggoyangkan tabung penampung semen secara perlahan-lahan. Konsistensi semen biasanya berhubungan dengan warna, misalnya semen

warna krem biasanya konsistensinya pekat atau kental, sedangkan yang warna jernih atau terang biasanya konsistensinya encer.

b. Mikroskopis

- Gerakan Massa

Diamati dengan cara meneteskan satu tetes semen diatas objek glass dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 dan cahaya yang dikurangi. Kemudian dilihat gelombang-gelombang yang ditimbulkan oleh gerakan spermatozoa. Kualitas spermatozoa yang baik dapat ditentukan dengan memberi tanda sebagai berikut :

+++ (sangat baik) : gelombang yang terbentuk besar-besar, seperti awan, banyak dan gelap serta aktif.

++ (baik) : gelombang yang terbentuk kecil, tipis dan kurang banyak serta gerakannya lambat.

+ (cukup) : tidak terlihat gelombang melainkan gerak individual yang progresif.

0 (buruk) : bila hanya sedikit gerakan atau bahkan tidak ada gerakan individual.

- Konsentrasi spermatozoa

Metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi spermatozoa adalah penghitungan dengan haemocytometer. Pipet erythrocyte diisi dengan semen yang belum diencerkan sampai tanda 0.5. Larutan NaCl 3 % dihisap sampai tanda 101 pada pipet, larutan tersebut mengencerkan sekaligus membunuh spermatozoa. Campuran ini dikocok hati-hati seperti

angka delapan selama dua sampai tiga menit, beberapa tetes dibuang dan dikocok lagi. Beberapa tetes lagi dibuang. Kemudian satu tetes diletakkan dibawah gelas penutup pada kamar hitung sel darah merah. Dihitung dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Setiap kamar mempunyai 16 ruangan kecil dan didalam 5 kamar terdapat 80 ruangan kecil. Seluruh gelas haemocytometer memiliki 400 ruangan kecil dengan volume 0.1 mm³ dan pengenceran 200 kali. Di dalam ruangan kecil terdapat x spermatozoa, maka konsentrasi spermatozoa adalah :

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{400}{80} \times 10 \times 200 = 10000 \\
 &= X \text{ 0.01 juta sperma/mm}^3 \\
 &= X \times 10^7 \text{ sperma/ml}
 \end{aligned}$$

- **Motilitas Spermatozoa**
Adalah daya gerak spermatozoa yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan.
 - **Persentase Hidup Spermatozoa (Mortalitas)**
Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan cara pewarnaan differensial (Toelihere, 1993)
 - **Abnormalitas Spermatozoa**
Adalah penyimpangan morfologi dari bentuk spermatozoa normal.
 - **Membran Plasma Utuh (MPU)**
Dihitung spermatozoa yang memiliki membran plasma yang masih utuh.
3. Berdasarkan konsentrasi dan persentase hidup mati spermatozoa maka diencerkan dengan media tris-kuning telur dengan penambahan gliserol 7 %.

Cara mempersiapkan bahan pengencer tris kuning telur :

- Telur dihapushamakan dengan alkohol
- Kuning dan putih telur dipisahkan dengan menggunakan kertas saring dan kuning telur jangan sampai pecah
- Kuning telur ditusuk dengan jarum, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur
- Dibuat larutan tris dengan mengencerkan 3,634 gram tris ke dalam 100 ml aquadest
- 20 % larutan tris dikeluarkan, kemudian diisi kekosongan 20 % tersebut dengan kuning telur. Sehingga perbandingan antara tris dengan kuning telur adalah 4 : 1
- Bahan pengencer tersebut diaduk sampai menyatu

4. Gliserolisasi

- Sebanyak 7 % dikeluarkan dari bahan pengencer kemudian tambahkan kekosongan dengan gliserol sebanyak 7 % ke dalam pengencer tersebut.
- Bahan pengencer dicampur dengan semen

5. Filling dan Sealing Straw

Semen dimasukkan ke dalam straw (0.25 ml) dengan menggunakan spuit, kemudian ujung straw dijepit dengan pinset yang telah dipanaskan terlebih dahulu.

6. Ekuilibrasi

- Straw kemudian disimpan pada suhu 5⁰ C selama 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam.

- Kemudian di evaluasi motilitas, persentase hidup, abnormalitas spermatozoa dan membran plasma utuh (MPU).

7. Pembekuan Semen

- Straw dibekukan di atas uap N₂ cair selama 9 menit
- Setelah itu straw disimpan di dalam kontainer yang berisi Nitrogen cair dengan suhu -196⁰ C selama 30 menit

8. Thawing

- Straw di *thawing* dengan air kran dengan suhu 27⁰ C selama 30 detik
- Kemudian diamati motilitas, abnormalitas, persentase hidup spermatozoa dan membran plasma utuh.

3.4. Peubah Yang Diamati

1. Motilitas spermatozoa meliputi :

- ✓ Sebelum diencerkan
- ✓ Setelah ekuilibrasi (*pre thawing*)
- ✓ *Post thawing*

Motilitas adalah daya gerak yang di jadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk Inseminasi Buatan. Satu tetes semen diteteskan pada glass objek yang di tutup dengan glass penutup untuk menipiskan dan mencegah penguapan, selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 kemudian dengan pembesaran 40 x 10. Penilaian persentase motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan pergerakan dibandingkan dengan yang tidak bergerak dengan menggunakan rumus :

$$\text{Motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa bergerak maju}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100 \%$$

2. Persentase hidup spermatozoa meliputi :

- ✓ Sebelum diencerkan
- ✓ Setelah ekuilibrasi (*pre thawing*)
- ✓ *Post thawing*

Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan meneteskan zat warna eosin pada glass objek yang bersih, kemudian diambil sedikit semen lalu diaduk dengan batang pengaduk. Buat preparat ulas yang tipis dan segera dikeringkan diatas nyala bunsen. Kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Kepala spermatozoa yang telah mati akan menyerap zat warna, sedangkan yang masih hidup akan tetap bening. Hitung sekurang-kurangnya 200 spermatozoa yang hidup dan mati dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase Hidup} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yanghidup}}{\text{jumlah spermatozoa dihitung}} \times 100 \%$$

3. Abnormalitas spermatozoa meliputi :

- ✓ Sebelum diencerkan
- ✓ Setelah ekuilibrasi (*pre thawing*)
- ✓ *Post thawing*

Pengamatan dilakukan dengan meneteskan zat warna eosin pada ujung sebuah glass objek yang bersih, kemudian ambil sedikit semen lalu diaduk dengan batang pengaduk supaya bercampur dengan zat warna eosin sampai homogen. Kemudian dibuat preparat ulas yang tipis dan segera keringkan preparat ulas tersebut. Kemudian diamati dibawah mikroskop

dengan pembesaran 10 x 45. Spermatozoa yang berubah morfologinya akan terlihat seperti ekor menggulung, ekor terputus dan bagian tengahnya terlipat. Kemudian dihitung sel spermatozoa normal dan abnormal dengan menggunakan rumus :

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

4. Membran Plasma Utuh (MPU)

- ✓ Sebelum diencerkan
- ✓ Setelah ekuilibrasi (*pre thawing*)
- ✓ *Post thawing*

Persentase MPU dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas : 0,9 gram fruktosa + 0,49 gram natrium sitrat yang dilarutkan dengan aquadestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 45 menit. Pengamatan dilakukan dengan pemberian satu tetes larutan spermatozoa di atas glass objek dan dicampur dengan satu tetes zat warna eosin. Buat preparat ulas tipis pada gelas objek kemudian diamati di bawah mikroskop pembesaran 45 x 10 terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus. Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang membran plasmanya utuh.

$$\% \text{ MPU} = \frac{\text{Jumlah MPU}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100 \%$$

3.5. Analisis Data

Data motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan MPU diolah secara statistik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Steel and Torrie (1995) dengan 4 perlakuan media tris-kuning telur dan penambahan gliserol 7 % dengan waktu ekuilibrase 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam dengan 4 kali ulangan.

Hasil penelitian diuji sesuai dengan rancangan penelitian. Model matematis Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Steel and Torrie (1995) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = nilai pengamatan dari spermatozoa yang mendapat perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum/perlakuan

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i (A = ekuilibrase 2 jam, B = ekuilibrase 4 jam, C = ekuilibrase 6 jam dan D = ekuilibrase 8 jam)

ϵ_{ij} = pengaruh sisa terhadap spermatozoa akibat mendapat perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

i = banyaknya perlakuan (1,2,3 dan 4)

j = banyaknya ulangan (1,2,3 dan 4)

Keterangan perlakuan :

A = waktu ekuilibrase 2 jam

B = waktu ekuilibrasi 4 jam

C = waktu ekuilibrasi 6 jam

D = waktu ekuilibrasi 8 jam

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Karakteristik Semen Segar Sapi Pesisir

Dari hasil penampungan semen pada seekor sapi Pesisir yang dilakukan dari bulan September hingga bulan November 2011 sebanyak 4 kali penampungan, didapatkan hasil rata-rata semen segar yang cukup baik (Tabel 3).

Tabel 3. Rataan nilai karakteristik Semen segar sapi Pesisir

Karakteristik semen	Nilai rata-rata
Makroskopis :	
Volume (ml)	2.975 ± 1.25
Warna	Krem keputih-putihan
Bau	Normal
Konsistensi	1x encer, 2x sedang dan 1x kental
pH	7
Mikroskopis :	
Gerakan Massa	++ dan +++
Konsentrasi (10^7 sperma/ml)	188.75 ± 69.22
Motilitas (%)	77.5 ± 5
Persentase Hidup (%)	84.125 ± 3.90
Abnormalitas (%)	10.375 ± 0.85
MPU (%)	84.75 ± 3.28
Keterangan :	
+++	: Sangat Baik
++	: Baik

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa rata-rata volume semen yang diperoleh selama penelitian adalah 2.975 ± 1.25 ml dengan kisaran antara 1.8 sampai 4.2 ml. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yaitu volume semen sapi bervariasi antara 1.0 sampai 15.0 ml. Sedangkan menurut Partodihardjo (1987) volume semen per ejakulasi pada sapi rata-rata 4-5 ml. Tetapi catatan literatur menunjukkan volume yang beragam antara terendah dan terbanyak 0.5 ml sampai 23 ml. Sedangkan menurut Salisbury dan Van Demark (1985) sapi jantan yang

telah dewasa dan potensial dan memiliki berat badan 907.2 kg atau lebih dapat menghasilkan semen tiap ejakulasi 10-15 ml. Volume semen sapi yang diejakulasikan tidak sama antara sapi jantan yang satu dengan yang lain atau pada tiap-tiap jantan itu sendiri. Pada umumnya volume semen akan bertambah banyak sesuai dengan umur, besar tubuh, perubahan keadaan kesehatan reproduksinya, daya kekutan dan frekuensi penggunaannya. Ditambahkan Partodihardjo (1987) bahwa semen yang dipancarkan oleh pejantan dapat berbeda-beda menurut umur pejantan, ras hewan, besar dan beratnya hewan, frekuensi penampungan semen dan beberapa faktor lain. Pada umumnya hewan-hewan muda dan berukuran kecil dalam satu spesies menghasilkan volume semen yang rendah. Volume rendah tidak merugikan, tetapi bila disertai dengan konsentrasi spermatozoa yang rendah akan membatasi jumlah spermatozoa yang tersedia. Peningkatan atau penurunan volume semen yang diejakulasikan umumnya tidak berhubungan dengan fertilitas atau sterilitas pejantan kecuali kalau tidak terjadi ejakulasi (Toelihere, 1993).

Warna semen yang didapatkan selama penelitian dari 4 kali penampungan dari seekor pejantan sapi Pesisir adalah krem keputih-putihan. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) bahwa semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dann keruh. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi sperma. Kebanyakan semen sapi jantan berwarna dengan variasi putih seperti susu sampai warna krem (Salisbury dan Van Demark, 1985). Semakin keruh warna semen biasanya jumlah sperma per ml semen itu semakin banyak (Partodihardjo, 1987).

Bau semen yang diperoleh selama penelitian adalah normal, berbau amis khas. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) bahwa bau semen normal adalah berbau khas atau merangsang.

Konsistensi semen yang didapatkan selama penelitian ini adalah satu kali penampungan encer, dua kali penampungan sedang dan satu kali penampungan kental. Pada sapi, semen dengan konsistensi krem mempunyai konsentrasi 1000 juta sampai 2000 juta atau lebih sel per ml (Toelihere, 1993). Semen yang baik derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu (Partodihardjo, 1987). Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) kekentalan dan sifat-sifat semen tergantung pada konsentrasi spermatozoa.

pH (derajat keasaman) semen pada empat kali penampungan semen adalah 7, pH yang demikian merupakan kondisi normal dari semen sapi. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yaitu pH semen sapi berkisar antara 6,2 – 7,5 dengan rata-rata 6,8.

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian pada seekor pejantan dari empat kali penampungan diperoleh satu kali penampungan semen mempunyai gerakan massa baik (++) dan tiga kali penampungan mempunyai gerakan massa sangat baik (+++). Pada spermatozoa yang gerakan massanya +++ (sangat baik) terlihat gelombang-gelombang yang besar, gelap, banyak, tebal dan aktif. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Toelihere (1993) spermatozoa dalam satu kelompok mempunyai kecendrungan untuk bergerak bersama-sama ke satu arah merupakan gelombang-gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat tergantung dari konsentrasi sperma hidup didalamnya.

Penilaian konsentrasi semen sangat penting karena faktor inilah menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen. Konsentrasi spermatozoa yang didapatkan pada penelitian ini termasuk baik yaitu rata-rata $188.75 \pm 69.22 \times 10^7$ sel/ml. Sedangkan menurut Toelihere (1993) konsentrasi sperma berkisar antara 300-2500 juta/ml dengan rata-rata 1000-1800 juta/ml. Standar minimum bagi kualitas semen yang dapat dipakai untuk inseminasi buatan adalah minimal mengandung 500 juta sel per ml ejakulat. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan konsentrasi sejalan dengan perkembangan seksual dan kedewasaan sapi jantan, kualitas makanan, pengaruh kesehatan reproduksi, besar testis, perbedaan umur, perbedaan musim dan letak geografis.

Motilitas spermatozoa dinilai segera sesudah penampungan semen. Dari hasil pengamatan semen segar secara mikroskopik diperoleh motilitas spermatozoa dengan rata-rata $77.5 \pm 5\%$. Hasil penelitian ini cukup baik karena sudah melebihi standar minimum kualitas semen yang dipakai untuk inseminasi buatan yaitu 50 % spermatozoa yang hidup dan motil (Toelihere, 1993). Hasil ini sedikit lebih rendah dari hasil penelitian Mohammad, Purwantara dan Djuwita (2006) terhadap sapi Bali yaitu $79,38 \pm 4,30\%$.

Persentase hidup spermatozoa yang diperoleh dari hasil evaluasi semen dengan rata-rata $84.125\% \pm 3.90$. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah baik. Karena menurut Toelihere (1993) standar minimum kualitas semen untuk inseminasi buatan adalah mempunyai 50 % spermatozoa yang hidup. Ditambahkan oleh Udin (2004), persentase hidup spermatozoa harus diatas 50 %.

Hasil penelitian ini lebih rendah dari hasil penelitian Rizal (2009) terhadap sapi Bali yaitu 86.75 %.

Dari penelitian yang dilakukan terhadap semen segar sapi Pesisir yang dievaluasi secara mikroskopik didapatkan persentase abnormalitas spermatozoa dengan rata-rata $10.375\% \pm 0.85$. Hasil penelitian ini sedikit lebih tinggi dari hasil penelitian Rizal (2009) yaitu 10.5 % yang dilakukan terhadap sapi Bali. Persentase abnormalitas spermatozoa yang didapat pada penelitian ini tergolong rendah dan masih baik untuk diolah menjadi semen beku, sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) bahwa kelainan morfologik di bawah 20% masih dianggap normal. Bentuk abnormal dari spermatozoa pada penelitian ini kebanyakan abnormalitas sekunder seperti ekor bergulung, leher patah, kepala dan leher putus. Abnormalitas sekunder disebabkan perlakuan ketika pembuatan preparat ulas (Solihati *et al.*, 2008). Selain itu, juga ditemui bentuk dari abnormalitas primer seperti kepala terlampau kecil (*microcephalic*), dan ekor berganda. Salisbury dan Van Demark (1985) menyatakan bahwa kesuburan sapi jantan tergantung kepada proporsi spermatozoa yang abnormal terhadap spermatozoa normal dalam semen.

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa yang diperoleh dari hasil evaluasi semen dengan rata-rata $84.75\% \pm 3.28$. Hasil penelitian ini sedikit lebih rendah dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Rizal (2009) terhadap sapi Bali yaitu 86.75 % dengan kisaran 85-89 %. Menurut Amin (1998) membran plasma utuh (baik) mutlak harus dimiliki oleh spermatozoa agar kelangsungan hidupnya tetap terjadi. Kerusakan membran plasma akan menyebabkan hilangnya daya motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi. Revell dan Mrode dalam Malvin (2004) menyatakan indikator infertilitas pada manusia ditentukan apabila

memiliki keutuhan Membran Plasma dibawah 50%, hal ini dapat dijadikan sebagai pembanding.

4.2. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Sapi Pesisir

4.2.1 Persentase Motilitas

Hasil dari penelitian terhadap persentase motilitas semen *pre* dan *post thawing* dapat dilihat pada Tabel 4. Motilitas merupakan gerakan massa ke depan. Menurut Pane yang dikutip oleh Umar dan Maharani (2005) bahwa daya gerak spermatozoa sangat penting karena diperlukan dalam saluran alat kelamin betina yang selanjutnya membuahi ovum. Motilitas digunakan sebagai ukuran kesanggupan membuahi suatu ovum (Hafez, 1987).

Tabel 4. Rataan persentase motilitas Spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur

Waktu Pengamatan	Perlakuan Ekuilibrasi (Jam)			
	2	4	6	8
<i>Pre Thawing</i>	37.5 ± 9.57 ^b	55 ± 5.77 ^a	52.5 ± 5 ^a	32.5 ± 5 ^b
<i>Post Thawing</i>	15 ± 5.77 ^b	25 ± 5.77 ^a	22.5 ± 5 ^a	12.5 ± 5 ^b

Keterangan : Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05),

Pengamatan motilitas terbaik terdapat pada ekuilibrasi 4 jam dan 6 jam. Dimana didapatkan rata-rata motilitas *pre thawing* 55 % ± 5.77 (4 jam) dan 52.5 % ± 5 (6 jam). *Post thawing* diperoleh rata-rata motilitas spermatozoa sebesar 25 % (4 jam) dan 22.5 % (6 jam). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berbagai waktu ekuilibrasi memberikan pengaruh yang berbeda nyata (P<0.05) terhadap motilitas spermatozoa *pre* dan *post thawing*. Berdasarkan analisis statistik ekuilibrasi 4 jam dan 6 jam menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0.05). Hal ini disebabkan karena motilitas meningkat pada ekuilibrasi 4 jam,

namun mengalami penurunan pada ekuilibrasi 5 jam, kemudian meningkat lagi pada ekuilibrasi 6 jam (Umar dan Maharani, 2005). Rata-rata penurunan motilitas dari *pre thawing* ke *post thawing* adalah 25 %. Motilitas terendah terdapat pada ekuilibrasi 8 jam yaitu 32.5 % *pre thawing* dan 12.5 % *post thawing*. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Umar dan Maharani (2005) pada sapi Limousin yaitu 47.25 % setelah ekuilibrasi 4 jam.

Pada waktu ekuilibrasi yang singkat (2 jam) terlihat bahwa motilitas lebih rendah bila dibandingkan dengan motilitas pada waktu ekuilibrasi yang lebih panjang (4 dan 6 jam). Motilitas akan meningkat dengan adanya peningkatan waktu ekuilibrasi, menurut pendapat Bearden dan Jhon (1984) bahwa ekuilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan gliserol pada suhu 5⁰ C. Gliserol membantu spermatozoa bertahan terhadap penurunan suhu sehingga akan mengurangi kerusakan spermatozoa akibat *cold shock*. *Cold shock* sangat mempengaruhi motilitas spermatozoa (Hafez, 1987).

Penambahan gliserol sebagai krioprotektan ke dalam bahan pengencer pada waktu ekuilibrasi membutuhkan waktu yang optimum. Pemaparan gliserol yang terlalu lama atau terlalu singkat sebelum dibekukan akan merusak spermatozoa. Ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak gliserol dengan spermatozoa yang berlebihan sehingga gliserol akan bersifat toksik terhadap sel spermatozoa (Umar dan Maharani, 2005). Selanjutnya dinyatakan oleh Best (2006) bahwa gliserol akan menarik air secara berlebihan dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan sel spermatozoa. Pada waktu ekuilibrasi gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu

ekuilibrasi yang yang lebih lama kemungkinan gliserol dapat bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas maupun viabilitas dari spermatozoa (Toelihere, 1979).

4.2.2 Persentase Hidup

Waktu ekuilibrasi mempengaruhi persentase hidup spermatozoa. Untuk membedakan sperma hidup dengan yang mati dapat dilakukan dengan penggunaan cairan eosin. Seperti pernyataan Bearden and Jhon (1984) bahwa eosin akan menembus selaput sperma mati dan tidak akan menembus selaput sperma yang hidup. Toelihere (1993) menyatakan, pada waktu semen dicampur dengan zat warna, sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap zat warna sedangkan sel-sel yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding sel meninggi waktu mati. Zat warna eosin akan mewarnai spermatozoa yang menjadi merah atau merah muda, sedangkan sperma yang hidup tetap tidak berwarna. Perbandingan persentase sperma hidup pada setiap pengamatan dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rataan persentase hidup spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur

Waktu pengamatan	Perlakuan Ekuilibrasi (Jam)			
	2	4	6	8
<i>Pre Thawing</i>	45.87 ± 10.02 ^b	65.75 ± 5.20 ^a	60.12 ± 5.40 ^a	35.62 ± 5.61 ^b
<i>Post Thawing</i>	20.25 ± 2.75 ^b	30.5 ± 3.85 ^a	26.37 ± 4.09 ^a	18.25 ± 4.05 ^b

Keterangan : Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05)

Pada ekuilibrasi 2 jam didapatkan persentase hidup 45.87 % (*pre thawing*) dan 20.25 % (*post thawing*). Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Arifiantini dkk (2005) pada semen kuda, dimana persentase hidup spermatozoa

setelah *thawing* tertinggi pada waktu ekuilibrase 3 jam (50 %), diikuti oleh waktu ekuilibrase 2 jam (44.60 %) dan terendah terdapat pada waktu ekuilibrase 1 jam (37.30 %). Persentase sperma hidup pada waktu ekuilibrase yang singkat lebih sedikit bila dibandingkan dengan persentase sperma hidup pada waktu ekuilibrase yang panjang. Dengan waktu ekuilibrase yang singkat efek toksik gliserol dapat diminimalkan, sehingga penurunan kualitas juga dapat ditekan. Han *et al.* (2005) menyatakan bahwa efek toksik krioprotektan berhubungan dengan konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan dan waktu pemaparan krioprotektan dengan semen sebelum dibekukan. Namun hal tersebut menyebabkan berkurangnya kesempatan gliserol untuk penetrasi secara sempurna ke dalam sel spermatozoa, sehingga terjadi kerusakan spermatozoa karena terbentuknya kristal es intraseluler.

Pada penelitian ini hasil terbaik pada pengamatan setelah ekuilibrase terdapat pada ekuilibrase 4 jam 65.75 % dan pada ekuilibrase 6 jam 60.12 %. Rata-rata penurunan persentase hidup spermatozoa dari *pre thawing* ke *post thawing* adalah 28 %. Arifiantini dkk (2005) menyatakan penurunan persentase hidup spermatozoa dari setelah ekuilibrase ke setelah *thawing* berkisar antara 18.80 % - 38,20 %. Hasil penelitian ini lebih rendah dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Umar dan Maharani (2005) terhadap semen sapi Limousin yaitu 81.54 % setelah ekuilibrase 4 jam. Pada semen sapi FH ekuilibrase biasanya dilakukan selama 4 jam dengan suhu 5° C (Arifiantini dkk, 2005). Menurut Raya (2000), ekuilibrase semen kambing PE pada suhu 3-5° C selama 4 jam lebih baik dibandingkan dengan 1, 2 ataupun 3 jam. Han *et al.* (2005) membandingkan lama ekuilibrase pada pembekuan semen itik yaitu 10 dan 60 menit, ternyata ekuilibrase

selama 10 menit menunjukkan kualitas semen setelah *thawing* lebih baik dibandingkan dengan 60 menit.

Persentase hidup spermatozoa terendah terdapat pada waktu ekuilibrasi 8 jam. Dimana persentase hidup spermatozoa *pre thawing* 8 jam hanya 35.62 % dan *post thawing* 18.25 %. Hal ini menurut Salisbury dan Van Demark (1985) semakin lama waktu ekuilibrasi, semakin maksimal gliserol berdifusi dan beradaptasi dengan sperma, namun sperma sapi yang terlalu lama berada pada suhu ekuilibrasi cenderung kehabisan energi dan terjadi penumpukan asam laktat yang akan berdampak pada penurunan viabilitas sperma.

4.2.3 Abnormalitas Spermatozoa

Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan setelah pemeriksaan persentase hidup spermatozoa. Ada dua macam spermatozoa abnormal menurut Partodihardjo (1992) yaitu abnormalitas primer yang meliputi kelainan pada kepala seperti kepala kecil, kepala besar, kepala kerucut, kepala miring, kepala dua, kepala salah bentuk, kepala bulat, berekor dua, akrosom salah bentuk, berleher besar, sedangkan abnormalitas sekunder meliputi kepala terpisah dari leher, leher patah, ekor kusut, ekor patah dan ekor tergulung.

Abnormalitas spermatozoa karena pengolahan bisa terjadi karena pengaruh pengenceran dan pendinginan. Penambahan gliserol ke dalam pengencer mampu memberikan perlindungan terhadap kerusakan yang dapat menimbulkan abnormalitas spermatozoa. Spermatozoa yang mengalami *cold shock* kadang-kadang ekor dan bagian tubuhnya melingkari bagian kepala, hal ini menyebabkan abnormalitas (Salisbury dan Van Demark, 1985). Setiap spermatozoa abnormal

tidak akan mampu membuahi ovum, tanpa memandang apakah abnormalitas primer atau sekunder (Toelihere, 1979)

Hasil penelitian sperma abnormal semen sapi Pesisir *pre thawing* dan *post thawing* dalam pengencer tris kuning telur dengan berbagai waktu ekuilibrasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi dalam pengencer tris kuning telur

Waktu Pengamatan	Perlakuan Ekuilibrasi (Jam)			
	2	4	6	8
<i>Pre Thawing</i>	12.87 ± 0.85 ^a	12.25 ± 0.64 ^a	12.5 ± 0.70 ^a	13.75 ± 0.64 ^a
<i>Post Thawing</i>	16.75 ± 1.55 ^a	15.62 ± 1.10 ^a	16.5 ± 1.58 ^a	18.5 ± 1.29 ^a

Keterangan : Superskrip dengan huruf kecil yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata (P>0.05)

Dari hasil penelitian terlihat bahwa perlakuan berbagai waktu ekuilibrasi terhadap semen sapi Pesisir dengan menggunakan pengencer tris kuning telur tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa *pre* dan *post thawing*. Hal ini didukung dari hasil analisis statistik yang menunjukkan bahwa perlakuan berbagai waktu ekuilibrasi tidak berpengaruh nyata (P>0.05) terhadap abnormalitas spermatozoa sapi Pesisir (Tabel 6).

Rataan abnormalitas spermatozoa *pre* dan *post thawing* adalah 12.25 ± 0.85% sampai 13.75 ± 0.64 % dan 15.62 ± 1.55 % sampai 18.5 ± 1.29 %. Hasil penelitian ini masih dalam batas normal abnormalitas spermatozoa untuk IB. Ini sesuai dengan yang dianjurkan Toelihere (1993) bahwa selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dan tidak melebihinya maka spermatozoa masih dalam keadaan baik dan dapat dipakai untuk program IB.

Pada waktu ekuilibrasi 2 jam ($16.75 \pm 1.55 \%$) abnormalitas spermatozoa cukup tinggi, hal ini disebabkan karena waktu ekuilibrasi yang singkat menyebabkan berkurangnya kesempatan gliserol untuk penetrasi secara sempurna ke dalam sel spermatozoa, sehingga gliserol dalam bahan pengencer belum mampu mengurangi pengaruh *cold shock* yang terjadi selama proses pembekuan, sehingga kerusakan spermatozoa masih terjadi dan menyebabkan tingginya abnormalitas spermatozoa. Rata-rata penurunan abnormalitas spermatozoa dari *pre thawing* ke *post thawing* adalah 4.75% . Pada waktu ekuilibrasi 4 jam ($15.62 \pm 1.10 \%$) menunjukkan persentase abnormalitas spermatozoa yang relatif lebih rendah bila dibandingkan dengan waktu ekuilibrasi 6 jam ($16.5 \pm 1.58 \%$). Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Aquirre *et al* yang dikutip oleh Umar dan Maharani (2005) bahwa spermatozoa akan bertahan lebih baik setelah 4 jam ekuilibrasi bila dibandingkan setelah 2 atau 6 jam. Sedangkan pada waktu ekuilibrasi 8 jam abnormalitas spermatozoa lebih tinggi yaitu $18.5 \pm 1.29 \%$. Hal ini disebabkan karena ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak gliserol dengan spermatozoa yang berlebihan sehingga gliserol akan bersifat toksik terhadap sel spermatozoa. Gliserol akan menarik air secara berlebihan dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan spermatozoa (Best, 2006).

Bentuk abnormal dari spermatozoa pada penelitian ini kebanyakan abnormalitas sekunder seperti ekor bergulung, leher patah, kepala dan leher putus. Abnormalitas sekunder disebabkan perlakuan ketika pembuatan preparat ulas (Solihati *et al.*, 2008). Selain itu, juga ditemui bentuk dari abnormalitas primer seperti kepala terlampaui kecil (*microcephalic*) dan ekor berganda.

4.2.4 Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa

Hasil pengamatan Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa *pre* dan *post thawing* untuk masing-masing perlakuan dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Rataan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dalam berbagai waktu ekuilibrase pada pengencer tris kuning telur (%)

Waktu Pengamatan	Perlakuan Ekuilibrase (Jam)			
	2	4	6	8
<i>Pre Thawing</i>	42.75 ± 8.47 ^b	62.5 ± 4.91 ^a	57.5 ± 4.74 ^a	36.25 ± 4.87 ^b
<i>Post Thawing</i>	26.25 ± 2.22 ^b	36.75 ± 1.32 ^a	34.25 ± 1.19 ^a	23.375 ± 3.14 ^b

Keterangan : Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$)

Hasil analisis statistik menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0.05$) terhadap membran plasma utuh spermatozoa *post thawing*, dimana waktu ekuilibrase selama 4 jam ($36.75 \pm 1.32\%$) menghasilkan membran plasma utuh yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan ekuilibrase 2 jam ($26.25 \pm 2.22\%$), 6 jam ($34.25 \pm 1.19\%$) dan 8 jam ($23.375 \pm 3.14\%$). Membran plasma utuh yang didapatkan oleh Rizal (2009) yang dilakukan terhadap sapi Bali adalah 51,6 % yang dipreservasi pada suhu 5⁰ C. Dalam mempertahankan keadaan spermatozoa, gliserol membutuhkan waktu yang cukup untuk masuk ke dalam

membran sel dan menjaga keseimbangan cairan sel agar tetap stabil sehingga tidak merusak spermatozoa.

Setelah *thawing* nilai rataan persentase MPU menurun. Rata-rata penurunan MPU dari *pre thawing* ke *post thawing* adalah 19.60 %. Hal ini diduga bahwa pada tahap ini terjadi pencairan kristal-kristal es, perubahan tekanan osmotik dan arus keluar masuk elektrolit-elektrolit dari dalam sel ke luar sel yang terjadi secara hebat, sehingga akan membuat membran plasma sel spermatozoa bekerja secara ekstra jika tanpa perlindungan, akibatnya membran plasma sel akan mengalami kerusakan.

Dari hasil uji lanjut DMRT menunjukkan persentase MPU setelah *thawing* pada ekuilibrase 4 jam berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan waktu ekuilibrase 2 jam dan 8 jam. Sedangkan waktu ekuilibrase 2 jam dan 8 jam menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Sementara waktu ekuilibrase 4 jam dan 6 jam menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Hal ini disebabkan karena pada waktu ekuilibrase 5 jam terjadi penurunan kualitas spermatozoa, namun akan mengalami peningkatan pada ekuilibrase 6 jam (Umar dan Maharani, 2005).

Untuk mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan dibutuhkan waktu ekuilibrase yang tepat agar terjadi perlindungan yang optimal. Pada penelitian ini persentase MPU terbaik didapatkan pada waktu ekuilibrase 4 jam dan 6 jam. Hal ini diduga karena waktu ekuilibrase 4 jam dan 6 jam mampu memberikan kesempatan optimal gliserol untuk masuk ke dalam membrane plasma dan mengikat gugus fosfolipid sehingga mampu mengatasi ketidakstabilan membrane. Sedangkan pada waktu ekuilibrase 2 jam persentase

MPU spermatozoa rendah diduga karena gliserol belum sepenuhnya masuk ke dalam sel dan belum sepenuhnya mengikat fosfolipid sehingga pada spermatozoa terjadi kerusakan akibat pembekuan. Pada waktu ekuilibrase 8 jam, persentase MPU lebih rendah dibandingkan ekuilibrase 4 jam, hal ini diduga karena waktu ekuilibrase yang panjang akan merusak struktur membran. Pada waktu ekuilibrase gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrase yang lebih lama kemungkinan gliserol bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas dan viabilitas dari spermatozoa (Toelihere, 1993). Selanjutnya ditambahkan oleh Correa dan Zavos (1994) bahwa akibat efek toksik dari gliserol maka membran plasma spermatozoa akan mengalami modifikasi struktur dan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino dan asam lemak. Akibat terganggunya mekanisme ini spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitas serta motilitasnya menurun.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa :

1. Waktu ekuilibrase memberikan pengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Pesisir *pre* dan *post thawing*. Waktu ekuilibrase terbaik terdapat pada ekuilibrase selama 4 sampai 6 jam.
2. Kualitas semen *pre thawing* setelah diekuilibrase 4 jam dilihat dari aspek motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh berturut-turut adalah $55 \pm 5.77 \%$, $65.75 \pm 5.20 \%$, $12.25 \pm 0.64 \%$ dan $62.5 \pm 4.91 \%$.
3. Kualitas semen *post thawing* setelah diekuilibrase 4 jam dilihat dari aspek motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh berturut-turut adalah $25 \pm 5.77\%$, $30.5 \pm 3.85\%$, $15.62 \pm 1.10\%$ dan $36.75 \pm 1.32\%$.
4. Rata-rata penurunan kualitas semen beku sapi Pesisir dari *pre thawing* ke *post thawing* adalah motilitas 25 %, persentase hidup 28 %, abnormalitas 4.75 %, membran plasma utuh 19.60 %.

5.2 Saran

1. Berdasarkan hasil yang didapatkan dari penelitian ini disarankan dalam pembuatan semen beku khususnya sapi Pesisir dengan menggunakan tris kuning telur sebagai pengencer sebaiknya ekuilibrase dilakukan selama 4 jam.
2. Kepada pemerintah atau instansi terkait diharapkan dapat menyediakan semen beku sapi Pesisir sebagai *plasma nutfah* Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriantini, R. I, S. Iman dan Samsurizal. 2005. Penentuan waktu ekuilibrase pada pembekuan semen kuda menggunakan bahan pengencer susu skim. *Jurnal Animal Production*. Vol 9. No 3 : 145-152.
- Arifiantini, R. I dan T.L. Yusuf dan N. Graha. 2005. *Longivitas dan recovery rate* pasca *thawing* semen beku sapi Friesian Holstein menggunakan bahan pengencer yang berbeda. *Buletin Peternakan*. 28 (3): 53-61.
- Arifiantini, R. I dan T.L. Yusuf. 2006. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Friesian Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*. 9 (3) 89-93.
- Amin, M.R. 1998. Efektifitas Plasma Semen Sapi dan Kerbau dari Berbagai Pengencer dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur. Tesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Azizah dan R I. Arifiantini. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal Veteriner* 10 (2) : 63-70.
- Andry. 1982. Pengaruh penggunaan kuning telur itik di dalam sitrat kuning telur sebagai pengencer semen terhadap daya tahan hidup spermatozoa sapi FH. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang.
- Anggorodi, C.E. 1979. Ilmu Makanan Ternak. Gramedia, Jakarta.
- Bearden, H.J. and John W. Fuguay. 1980. *Applied Animal Reproduction* Reston Publishing Company. Inc. A. Printice Hall Company, Reston Virginia.
- Best, B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. *Anim. Reprod. Sci.* 60:41-51.
- Correa, J.R, and P.M. Zavos. 1994. The hipoosmotic swelling test: it is employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membran. *Theriogenology*. 42: 351-360.
- Dhami, A.J. and K.L. Sahni. 1994. Effects of Various cooling_ from 30⁰ C to 5⁰ C, equilibration and diluents treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. *Buffalo J.* 2:147-159
- Gomes, W. R. 1997. *Artificial Insemination in H. N. Cole and P.T C upps Reproduction in Domestica Animals*^{3rd} Edition. Academic Press. New York, San Fransisco and London.

- Hafez, E. S. E. 1980. *Reproduction In Farm Animals*, 4 Ed. Lea and Febringer Philadelphia, USA.
- _____ 1987. *Reproduction in farm Animal*. 4 th Ed. Lea Febringer. Philadelphia, USA.
- Han, X.F, Z. Y. Niu, F.Z. Liu and C.S. Yang, 2005. Effect of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *Poultry Science* 4 : 197-201.
- Jauzanoey. 2010. Profil Sapi Pesisir. Diakses 29 Mei 2011. <http://jauzanoey.wordpress.com/2010/10/07/profil-sapi-pesisir/>
- Malvin, T. 2004. Kaji bidang motilitas dan integritas membran plasma spermatozoa semen beku sapi Simmental pada beberapa waktu *thawing*. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang.
- Mann, T. 1968. Evaluation of Sement by Chemical Analysis. p. 61 – 75. in E. J. Perry ed. Ed. *The Artificial Ed.* Rutgers University Press, New York.
- Marshall CE, 1984: Considerations for cryopreservation of semen. *Zoo Biol.* 3:343–356.
- Mohammad, K, B. Purwantara dan I. Djuwita. 2006. Evaluasi fisiologi semen dan variasi genetik sapi Bali dalam rangka seleksi pejantan bibit guna menunjang program inseminasi buatan. Hibah Bersaing Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Penerbit Mutiara, Cet. Ke-3, Jakarta.
- Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small. Rumin. Res.* 63:215:327-344.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S. and Ahmad N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59:31–41.
- Rizal, M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3-5⁰ C dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *JITV* Vol. 14 No. 2 th. 2009 : 142-149.
- Robert, S.J. 1971. *Veterinary Obstetries and Genital Diseases* . 2nd Ed. Published by the Anthor Ithaca.
- Rollinson, d.H.L. 1951. Studies on the Abnormalitas Spermatozoa of Bull Semen. *Brit. Veterinay Jour.* 107 : 451 – 468.

- Rusfidra. 2007. Pengembangan Peternakan Di Wilayah Pesisir Untuk Mewujudkan Ketahanan Pangan Hewani dan Pengentasan Kemiskinan. Makalah Kongres Ilmu Pengetahuan Nasional (KIPNAS). Mercure Convention Centre Jakarta.
- Saladin, R. 1983. Penampilan Sifat-sifat produksi dan reproduksi sapi lokal Pesisir Selatan di Propinsi Sumatera Barat. Disertasi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Salamon S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62:77-111.
- Salisbury, G.W., dan Van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Terjemahan R. D januar). Gajah Mada Universitas Press, Yogyakarta.
- Sansone. G, M.J.F. Natri and A. Fabbrocini. 2000. Storage of Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod.Sci.62:55-76.
- Siddique M., R. Ali and A. Raza. 2006. Effect of Buffers on Freezing of Buffalo Bull Semen. Journal of Agriculture and Social Sciences. 2(2):117-119
- Singh J, G.R. Pangawkar, R.K. Biswas, A.K. Srivastava and R.D. Sharma. 1990. Studies on lactic dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase release in relation to deep freezing of buffalo semen in certain extenders. Theriogenology. 34:371-378.
- Solihati, N., R. Idi, S.D. Rasad, M. Rizal dan M. Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda *epididymis* sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5⁰ C. J. Anim. Prod. Vol. 10 No. 1 : 22-29.
- Steel, R.G.D.dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Parametrik Edisi 2 alih Bahasa B. Sumantri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1979. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa, Bandung.
- _____. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa, cetakan ke-3, Bandung.
- Umar, S dan M. Maharani. 2005. Pengaruh berbagai waktu ekuilibrasi terhadap daya tahan sperma sapi Limousin dan uji kebuntingan. Jurnal Agribisnis Peternakan. Vol 1. No.1 : 17-21
- Vale, W.G.1994.Deep freezing buffalo semen-state of art. Proc. 9th World Buffalo Congr., Argentine, Buenos Aires. 83-92.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik Motilitas Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (6 jam)	D (8 jam)	
I	30	50	50	30	160
II	40	60	50	30	180
III	50	60	60	40	210
IV	30	50	50	30	160
jumlah	150	220	210	130	710
rataan	37.5	55	52.5	32.5	177.5

$$FK = \frac{(710)^2}{16} = 31506.25$$

$$JKP = \frac{150^2 + 220^2 + 210^2 + 130^2}{16} - FK$$

$$= 1468.75$$

$$JKT = 30^2 + 40^2 + \dots + 30^2 - FK$$

$$= 1993.75$$

$$JKS = JKT - JKP$$

$$= 525$$

Analisa Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
			489.583	11.19047619*	3.4	5.9
Perlakuan	3	1468.75	3	*	9	5
Sisa	12	525	43.75			
Total	15	1993.75				

Keterangan : ** = sangat berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Motilitas Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi

$$S_x = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 3.31$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	10.1948
3	3.23	10.6913
4	3.33	11.0223

Urutan rataan perlakuan

B = 55

C = 52.5

A = 37.5

D = 32.5

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	Keterangan
B-C	2.5	10.1948	ns
B-D	22.5	11.0223	*
B-A	17.5	10.6913	*
C-D	20	10.6913	*
C-A	15	10.1948	*
A-D	5	10.1948	ns

Lampiran 2. Analisis Statistik Persentase Hidup Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A(2 jam)	B(4 jam)	C(6 jam)	D(8 jam)	
I	38.5	58	54.5	32	183
II	54	69	56.5	33.5	213
III	55	68.5	64.5	44	232
IV	36	67.5	65	33	201.5
Jumlah	183.5	263	240.5	142.5	829.5
Rataan	45.875	65.75	60.125	35.625	207.375

Perhitungan

$$FK = \frac{829.5^2}{16} = 43004.39$$

$$JKP = \frac{183.5^2 + 263^2 + 240.5^2 + 142.5^2}{16} - FK$$

$$= 2242.547$$

$$JKT = 38.5^2 + 54^2 + \dots + 33^2 - FK$$

$$= 2807.359$$

$$JKS = JKT - JKP$$

$$= 564.8125$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	2242.547	747.5156	15.88171**	3.49	5.95
Sisa	12	564.8125	47.06771			
Total	15	2807.359				

Keterangan : ** = sangat berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Persentase Hidup Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi

$$S_x = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 3.43$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	10.5644
3	3.23	11.0789
4	3.33	11.4219

Urutan rata-rata perlakuan

B = 65.75

C = 60.125

A = 45.875

D = 35.625

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	Keterangan
B-C	5.625	10.5644	ns
B-D	30.125	11.4219	*
B-A	19.875	11.0789	*
C-D	24.5	11.0789	*
C-A	14.25	10.5644	*
A-D	10.25	10.5644	ns

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (6 jam)	D (8 jam)	
I	14	13	13.5	14.5	55
II	12	12.5	12	13.5	50
III	12.5	11.5	12	13	49
IV	13	12	12.5	14	51.5
Jumlah	51.5	49	50	55	205.5
Rataan	12.875	12.25	12.5	13.75	51.375

Perhitungan

$$FK = \frac{205.5^2}{16} = 2639.391$$

$$JKP = \frac{51.5^2 + 49^2 + 50^2 + 55^2}{16} - FK = 5.171875$$

$$JKT = 14^2 + 12^2 + \dots + 14^2 - FK = 11.35938$$

$$JKS = JKT - JKP$$

$$= 6.1875$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	5.171875	1.723958	3.343434 ^{ns}	3.49	5.95
Sisa	12	6.1875	0.515625			
Total	15	11.35938				

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata

Lampiran 4. Analisis Statistik Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (6 jam)	D (8 jam)	
I	37	58.5	55.5	34.5	185.5
II	44.5	67	56	34	201.5
III	54	66.5	64.5	43.5	228.5
IV	35.5	58	54	33	180.5
Jumlah	171	250	230	145	796
Rataan	42.75	62.5	57.5	36.25	199

Perhitungan

$$FK = \frac{796^2}{16} = 39601$$

$$JKP = \frac{171^2 + 250^2 + 230^2 + 145^2}{16} - FK = 1815.5$$

$$JKT = 37^2 + 44.5^2 + \dots + 33^2 - FK = 2242$$

$$JKS = 426.5$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	1815.5	605.167	17.027**	3.49	5.95
Sisa	12	426.5	35.5417			
Total	15	2242				

Keterangan : ** = sangat berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Membran Plasma Utuh Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi

$$Sx = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 2.98$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	9.1784
3	3.23	9.6254
4	3.33	9.9234

Urutan rataa perlakuan

B = 62.5

C = 57.5

A = 42.75

D = 36.25

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	Keterangan
B-C	5	9.1784	ns
B-A	19.75	9.6254	*
B-D	26.25	9.9234	*
C-A	14.75	9.1784	*
C-D	21.25	9.6254	*
A-D	6.5	9.1784	ns

Lampiran 5. Analisis Statistik motilitas Spermatozoa Setelah *Thawing* (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (6 jam)	D (8 jam)	
I	10	20	20	10	60
II	20	30	20	10	80

III	20	30	30	20	100
IV	10	20	20	10	60
Jumlah	60	100	90	50	300
Rataan	15	25	22.5	12.5	75

Perhitungan

$$FK = \frac{300^2}{16} = 5625$$

$$JKP = \frac{60^2 + 100^2 + 90^2 + 50^2}{16} - FK = 425$$

$$JKT = 10^2 + 20^2 + \dots + 10^2 - FK = 775$$

$$JKS = JKT - JKP = 350$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	425	141.667	4.85714*	3.49	5.95
Sisa	12	350	29.1667			
Total	15	775				

Keterangan : * = berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Motilitas Spermatozoa Setelah *Thawing*

$$S_x = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 2.7$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	8.316

3	3.23	8.721
4	3.33	8.991

Urutan rata-rata perlakuan

B = 25

C = 22.5

A = 15

D = 12.5

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	Keterangan
B-C	2.5	8.316	ns
B-D	12.5	8.991	*
B-A	10	8.721	*
C-D	10	8.721	*
C-A	7.5	8.316	*
A-D	2.5	8.316	ns

Lampiran 6. Analisis Statistik Persentase Hidup Spermatozoa Setelah *Thawing* (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (6 jam)	D (8 jam)	
I	19	26.5	24.5	15	85
II	22	33	22.5	21.5	99
III	23	34.5	32	22	111.5

IV	17	28	26.5	14.5	86
Jumlah	81	122	105.5	73	381.5
Rataan	20.25	30.5	26.375	18.25	95.375

Perhitungan

$$FK = \frac{381.5^2}{16} = 9096.391$$

$$JKP = \frac{81^2 + 122^2 + 105.5^2 + 73^2}{16} - FK = 379.6719$$

$$JKT = 19^2 + 22^2 + \dots + 14.5^2 - FK = 546.3594$$

$$JKS = JKT - JKP = 166.6875$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	379.672	126.557	9.11099**	3.49	5.95
Sisa	12	166.688	13.8906			
Total	15	546.359				

Keterangan : ** = sangat berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Persentase Hidup Spermatozoa Setelah *Thawing*

$$Sx = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 1.86$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	5.7288
3	3.23	6.0078

4

3.33

6.1938

Urutan rata-rata perlakuan

B = 30.5

C = 26.375

A = 20.25

D = 18.25

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	keterangan
B-C	4.125	5.7288	ns
B-D	12.25	6.0078	*
B-A	10.25	6.1938	*
C-D	8.125	5.7228	*
C-A	6.125	6.0078	*
A-D	2	5.7288	ns

Lampiran 7. Analisis Statistik Abnormalitas Spermatozoa Setelah *Thawing* (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A (2 jam)	B (4 jam)	C (4 jam)	D (8 jam)	
I	16.5	16	17	19	68.5
II	16	15	15.5	18	64.5
III	19	17	18.5	20	74.5
IV	15.5	14.5	15	17	62
Jumlah	67	62.5	66	74	269.5

Rataan	16.75	15.625	16.5	18.5	67.375
--------	-------	--------	------	------	--------

Perhitungan

$$FK = \frac{269.5^2}{16} = 4539.391$$

$$JKP = \frac{67^2 + 62.5^2 + 66^2 + 74^2}{16} - FK = 17.42188$$

$$JKT = 16.5^2 + 16^2 + \dots + 17^2 - FK = 40.85938$$

$$JKS = JKT - JKP = 23.4375$$

Analisis ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	17.4219	5.80729	2.97333 ^{ns}	3.49	5.95
Sisa	12	23.4375	1.95313			
Total	15	40.8594				

Keterangan : ns = tidak berbeda nyata

Lampiran 8. Analisis Statistik Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Setelah *Thawing* (%)

Ulangan	Perlakuan				Jumlah
	A(2 jam)	B(4 jam)	C(6 jam)	D(8 jam)	
I	25	35	32.5	21	113.5
II	27	38	35	22.5	122.5
III	29	36.5	34.5	28	128
IV	24	37.5	35	22	118.5
Jumlah	105	147	137	93.5	482.5
Rataan	26.25	36.75	34.25	23.375	120.625

Perhitungan

$$FK = \frac{482.5^2}{16} = 14550.39$$

$$JKP = \frac{105^2 + 147^2 + 137^2 + 93.5^2}{16} - FK = 485.9219$$

$$JKT = 25^2 + 27^2 + \dots + 22^2 - FK = 539.8594$$

$$JKS = JKT - JKP = 53.9375$$

Analisis Ragam

SK	db(n-1)	JK	KT	F hit	F Tabel	
					0.05	0.01
Perlakuan	3	485.922	161.974	36.0359**	3.49	5.95
Sisa	12	53.9375	4.49479			
Total	15	103.484				

Keterangan : ** = sangat berbeda nyata

Uji Lanjut DMRT Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Setelah *Thawing*

$$S_x = \sqrt{\frac{KTS}{r}} = 1.19$$

Perlakuan	SSR 5%	LSR 5%
2	3.08	3.6652
3	3.23	3.8437
4	3.33	3.9627

Urutan rata-rata perlakuan

B = 36.75

C = 34.25

A = 26.25

D = 23.375

Pengujian

Perlakuan	Selisih	0.05	Keterangan
B-C	2.5	3.6652	ns
B-A	10.5	3.8437	*
B-D	13.375	3.9627	*
C-A	8	3.6652	*
C-D	10.875	3.8437	*
A-D	2.875	3.6652	ns