

1. LACTOFERRIN

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2. VITAMIN E

3. SPERMATOZOA

KK
TKR 05/01
Sja
p

PENGARUH PENAMBAHAN LACTOFERRIN DAN VITAMIN-E SEBELUM SIMPAN BEKU, TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA SAPI POTONG PERANAKAN ONGOLE

TESIS



Oleh :

AGUS SJAFARJANTO
NIM. 099712650-M

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

PENGARUH PENAMBAHAN LACTOFERRIN DAN VITAMIN-E SEBELUM SIMPAN BEKU, TERHADAP VIABILITAS SPERMATOZOA SAPI POTONG PERANAKAN ONGOLE

TESIS

**Diajukan Untuk Disetujui Oleh Panitia Penguji Tesis
Memenuhi Persyaratan
Pendidikan Pascasarjana Program Magister
Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi**

Oleh :

**AGUS SJAFARJANTO
NIM. 099712650-M**



Pembimbing Ketua,

**Prof. Dr. H. Soehartojo H., M.Sc, drh
NIP. 130 820 554**

Pembimbing,

**Dr. Ismudiono, MS, drh
NIP. 130 687 297**

Mengetahui,
**Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Aucky Hinting, PhD, dr.
NIP. 130 873 509**

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, berkat limpahan rahmat, hidayah dan karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Terima kasih yang tulus dari lubuk hati yang paling dalam dan tak terhingga, penulis sampaikan kepada yang terhormat Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, M.Sc, drh, sebagai pembimbing ketua, atas semua bimbingan, saran serta dorongannya, sehingga penulis terdorong untuk segera menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan pula kepada yang terhormat Dr. Ismudiono, MS, drh, sebagai pembimbing dan sekaligus Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas bimbingan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Kepada Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, dr. Aucky Hinting, Ph.D, penulis sampaikan terima kasih atas saran dan kesabarannya untuk membimbing penulis, sejak pengajuan proposal judul penelitian hingga selesainya penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih yang tulus dan tak terhingga juga penulis sampaikan kepada :

- Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan (sekarang Menteri Pendidikan Nasional) yang telah memberikan kesempatan dan biaya untuk mengikuti studi lanjut di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

- Rektor Universitas Wijaya Kusuma Surabaya dan Dekan Fakultas Pertanian Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah memberikan ijin dan kesempatan menempuh studi lanjut di Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan bantuan biaya penelitian.
- Prof. IGB. Amitaba, drh selaku bapak, senior dan sekaligus sejawat penulis, yang dengan tulus memberikan saran dan dorongan semangat, sejak pengajuan proposal penelitian hingga selesainya penulisan tesis ini.
- Prof. Dr. H. Sarmanu, MS, drh, sebagai senior dan sejawat penulis, yang telah memberikan bantuan konsultasi statistik dan bimbingan penulisan tesis.
- Para dosen di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah memberikan arahan, bimbingan dan ilmu selama penulis menempuh studi lanjut.
- Sejawat drh. Herliantin dan staf Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari, yang telah membantu selama penulis melakukan penelitian.
- Sejawat drh. Kusnoto, yang dengan kesungguhannya membantu penulis menyelesaikan analisis data penelitian.
- Teman-teman seangkatan di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang dengan tulus membantu penulis dalam mencari data, literatur dan journal untuk mendukung penelitian ini.
- Bapak/Ibu Drs. Koetoet Santoso, B.Sc dan Ibu Hj. Tietah Retnadhi, yang dengan restunya telah membantu penulis selama menempuh studi lanjut.
- Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah sangat membantu dalam penyelesaian penelitian dan penulisan tesis ini

Akhirnya, kepada isteriku tercinta Ir. Henni Muhardini, MSi serta anak-anaku tersayang Rininta Putri Paramitha dan Prasetya Arispradangga, rasa kasih sayang dan terima kasihku yang tulus, penulis sampaikan atas pengorbanan, pengertian dan kesabarannya untuk mendampingi penulis selama masa studi, sejak perkuliahan hingga penyelesaian penulisan tesis ini.

RINGKASAN

Agus Sjarjanto. Pengaruh penambahan Lactoferrin dan Vitamin E sebelum simpan beku, terhadap viabilitas spermatozoa sapi potong Peranakan Ongole dibawah bimbingan Soehartojo Harjopranjoto sebagai pembimbing ketua dan Ismudiono sebagai pembimbing.

Penelitian ini menggunakan semen segar dari pejantan pemacek produktif sapi potong Peranakan Ongole, milik Balai Inseminasi Buatan Singosari, yang ditampung dengan vagina buatan. Penampungan semen dilaksanakan 7 kali ejakulat dengan interval 3 hari, sebagai perlakuan penambahan ulangan.

Setelah semen segar ditambahkan pengencer siap untuk dimasukkan dalam straw, sediaan dibagi menjadi 4 bagian. Masing-masing bagian ditambahkan bahan perlakuan dengan Lactoferrin (dosis 0,5 mg/ml), Vitamin E (dosis 0,15 mg/ml) dan kombinasi (dosis 0,5 mg/ml dan 0,15 mg/ml), serta kontrol.

Dengan peralatan *ultrasonic filling machine*, semua sediaan yang telah diberikan perlakuan penambahan dimasukkan kedalam straw, untuk disimpan beku dalam kontainer berisi nitrogen cair bersuhu -196°C .

Setelah 2 hari simpan beku, dilakukan *thawing* (pencairan kembali) untuk dilaksanakn pemeriksaan mikroskopis terhadap motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa.

Rataan motilitas spermatozoa dengan perlakuan penambahan Lactoferin menghasilkan peningkatan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan jumlah rataan $71,43 \pm 2,44$. Perlakuan penambahan Vitamin E menghasilkan peningkatan yang

sangat bermakna pula ($p < 0,01$) dengan jumlah rata-rata $66,34 \pm 4,76$, sedang perlakuan penambahan kombinasi menghasilkan peningkatan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan jumlah rata-rata $72,14 \pm 2,67$, dibanding kontrol dengan jumlah rata-rata $47,14 \pm 2,67$.

Rataan persentase hidup spermatozoa dengan perlakuan penambahan Lactoferrin menghasilkan peningkatan dengan sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan jumlah rata-rata $87,86 \pm 2,67$. Perlakuan penambahan Vitamin E menghasilkan peningkatan yang tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan jumlah rata-rata $82,14 \pm 2,67$, dan kombinasi menghasilkan peningkatan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) dengan jumlah rata-rata $86,43 \pm 2,44$. Sedang kontrol, hanya menghasilkan jumlah rata-rata $47,14 \pm 2,67$.

Rataan daya resistensi spermatozoa, dengan perlakuan penambahan Lactoferrin menghasilkan peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) dengan jumlah rata-rata $4785,71 \pm 636,21$, perlakuan penambahan Vitamin E menghasilkan peningkatan bermakna pula ($p < 0,05$) dengan jumlah rata-rata $4428,57 \pm 449,87$. Sedang perlakuan penambahan kombinasi menghasilkan pula peningkatan bermakna ($p < 0,05$) dengan jumlah rata-rata $4857,14 \pm 690,07$, dibanding kontrol dengan jumlah rata-rata $3928,57 \pm 449,87$.

Analisis statistik dengan menggunakan analisis varian satu arah didapatkan hasil yang sangat berbeda nyata ($p < 0,01$) untuk semua perlakuan penambahan terhadap motilitas spermatozoa, terutama perlakuan penambahan Lactoferrin dan kombinasi Lactoferrin dan Vitamin E, terhadap kontrol.

Sedang, perlakuan penambahan Lactoferrin dan kombinasi Lactoferrin dan Vitamin E sangat berbeda nyata ($p < 0,01$) untuk meningkatkan persentase hidup spermatozoa.

Semua perlakuan penambahan berbeda nyata ($p < 0,05$) untuk meningkatkan daya resistensi spermatozoa, dibandingkan dengan kontrol. Tetapi, diantara masing-masing perlakuan tidak berbeda ($p > 0,05$) untuk meningkatkan daya resistensi spermatozoa.

Perlakuan penambahan Vitamin E tampak sangat nyata ($p < 0,01$) untuk meningkatkan motilitas spermatozoa, tetapi tidak berbeda ($p > 0,05$) dengan kontrol, untuk meningkatkan persentase hidup spermatozoa.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan, untuk meneliti keberadaan Lactoferrin pada saluran reproduksi betina, yang ada kaitannya dengan antibodi antisperma (ASA), dan penelitian lain untuk menguji kemampuan daya fertilitas spermatozoa untuk membuahi sel ovum, serta penelitian untuk mengurangi konsentrasi spermatozoa pada produksi straw semen beku.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	i
RINGKASAN	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR BAGAN.....	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Fisiologi Semen	6
2.1.1. Spermatozoa	6
2.1.2. Plasma semen	8
2.1.3. Metabolisme spermatozoa	9
2.1.4. Motilitas spermatozoa	12
2.2. Teknologi Pendayagunaan Semen	13
2.2.1. Teknologi bantu reproduksi	13
2.2.2. Inseminasi buatan	15
2.2.3. Penampungan dan penilaian semen segar	16
2.2.4. Simpan beku	20
2.3. Radikal Bebas Oksigen	23
2.4. Lactoferrin Dan Vitamin E	27
2.5. Resistensi Spermatozoa	34

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	36
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	36
3.2. Hipotesis Penelitian.....	38
BAB 4. METODE PENELITIAN	39
4.1. Rancangan Penelitian	39
4.2. Sample Penelitian	39
4.3. Variabel Penelitian	40
4.4 Definisi Operasional Variabel	40
4.5. Materi Penelitian	43
4.6. Lokasi Dan Waktu Penelitian	44
4.7. Prosedur Pengambilan Dan Pengumpulan Data	44
BAB 5. HASIL DAN ANALISIS DATA.....	47
5.1. Motilitas Spermatozoa	47
5.2. Persentase Hidup Spermatozoa	49
5.3. Daya Resistensi Spermatozoa	52
BAB 6. PEMBAHASAN	56
6.1. Motilitas Spermatozoa	56
6.2. Persentase Hidup Spermatozoa	61
6.3. Daya Resistensi Spermatozoa	64
KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat-sifat semen sapi	17
2. Pengenceran, penyimpanan, dosis inseminasi pada ternak	19
3. Sumber radikal bebas dan antioksidan pada semen	26
4. Sistem antimikroba dari sel Phagosit	31
5. Kandungan Lactoferrin dalam berbagai cairan biologis tubuh.....	32
6. Rataan dan simpanan baku motilitas spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 Hari (%)	47
7. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap motilitas spermatozoa	48
8. Rataan dan simpanan baku persentase hidup spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari (%).....	50
9. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap persentase hidup spermatozoa.....	50
10. Rataan dan simpanan baku daya resistensi spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari.....	53
11. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap daya resistensi spermatozoa	53
12. Rekapitulasi analisis statistik hasil penelitian dengan analisis varian satu arah.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Spermatozoa Pada Hewan	10
2. Jalur <i>Second Messenger</i> c-AMP	11
3. Vagina Buatan Sapi	17
4. Struktur Molekul Lactoferrin	30
5. Struktur Kimia α -Tocopherol (Vitamin E).....	34
6. Rataan dan simpangan baku motilitas spermatozoa setelah penambahan LF dan VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.....	49
7. Rataan dan simpangan baku persentase hidup spermatozoa setelah penambahan LF dan VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.....	52
8. Rataan dan simpangan baku daya resistensi spermatozoa setelah penambahan LF dan VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.....	54
9. “Wailaga” Pejantan Pemacek Produktif Jenis PO Penghasil Semen Sebagai Bahan Penelitian	88
10. Bahan Pengencer Semen	88
11. Gliserolisasi Pada Suhu 5 ⁰ C.....	89
12. Penyimpanan Beku Dalam Kontainer Nitrogen Cair	89
13. Peralatan Uji Resistensi.....	90
14. Pemeriksaan Post Thawing 2 x 24 Jam (2 Hari).....	90

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Penelitian	79
2. Hasil Penilaian Semen Segar	80
3. Konversi Perhitungan Konsentrasi Spermatozoa Dengan Spectrophotometer	81
4. Teknik Simpan Beku Semen di BIB Singosari	82
5. Rekapitulasi Perolehan Data Hasil Penelitian	83
6. Ringkasan Hasil Pengukuran Motilitas, Persentase Hidup dan Angka Resistensi Spermatozoa Sapi Potong PO	84
7. Analisis Varian Satu Arah Dan Uji Beda Nyata Terkecil Untuk Motilitas Spermatozoa	85
8. Analisis Varian Satu Arah Dan Uji Beda Nyata Terkecil Untuk Persentase Hidup Spermatozoa	86
9. Analisis Varian Satu Arah Dan Uji Beda Nyata Terkecil Untuk Daya Resistensi Spermatozoa	87

DAFTAR BAGAN

Bagan	Halaman
1. Kerangka Konseptual Penelitian	37

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Program inseminasi buatan dan pengawasan gangguan reproduksi yang intensif ternyata berhasil mengungkap beberapa kelainan reproduksi yang terjadi pada ternak sapi potong, karena program ini mencakup pemeriksaan kebuntingan, pencatatan kelahiran, penambahan berat badan dan riwayat penyakit reproduksi, serta pemeriksaan gangguan reproduksi. Program dimaksud dapat dengan cepat menyentuh dan merebut simpati peternak, yang dalam perjalanannya ternyata bukan tanpa kendala, oleh karena itu hasil yang dicapai belum memenuhi harapan. Sementara itu, semen beku dari pejantan unggul terpilih justru semakin langka, karena keterbatasan sapi pejantan yang dimiliki Balai Inseminasi Buatan (BIB).

Kelangkaan semen beku memang akhirnya dapat diatasi dengan mengimpor semen beku dari luar negeri, yang sekaligus dikaitkan dengan upaya peningkatan produktifitas sapi potong di Indonesia.

Dengan dikembangkannya inseminasi buatan pada sapi potong ini, maka pemerintah telah mendatangkan semen beku sapi potong dengan sifat genetik yang baik dan unggul, antara lain semen beku sapi *Simental*, *Angus*, *Limousine* dan *Santa Gertrudis*.

Keberhasilan pelaksanaan inseminasi buatan sangat tergantung pada sapi induk, ketrampilan peternak untuk mendeteksi dini birahi, keahlian dan ketrampilan

inseminator dan tentunya yang tidak kalah pentingnya adalah kualitas semen yang dipakai.

Untuk mempertahankan agar kualitas semen tetap baik, sebelum digunakan untuk inseminasi, perlu diberikan perlakuan pengenceran semen dengan memperhatikan bahan-bahan yang dipakai dan berbagai perubahan yang terjadi selama penyimpanan. Bahan yang ideal hendaknya mudah didapat, murah harganya, dapat segera diperbanyak dan mudah disimpan (Campbell and Lasley, 1975), sederhana dan mudah dibuat, daya *preservasi* tinggi, tidak mengandung zat toksik, tidak mengganggu penilaian semen sesudah pengenceran (Toelihere, 1985).

Pada prinsipnya tujuan penyimpanan semen adalah untuk memperpanjang daya hidup tanpa mengurangi kemampuan membuahi spermatozoa, dengan cara menghambat gerakan dan aktifitas metabolisme spermatozoa (Evans and Maxwell, 1987).

Agar viabilitas spermatozoa lebih baik setelah penyimpanan beku, maka perlu diusahakan menambahkan bahan atau obat-obatan dalam bahan pengencer, sebelum dilakukan pembekuan semen. Beberapa bahan yang dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa pada manusia, antara lain *Caffein*, *Pentoxifyllin*, *Vitamin E (VE)*, *Vitamin C (VC)*, *Lactoferrin (LF)* dan *Albumin*, yang umumnya berkhasiat sebagai antioksidan (Tjokronegoro, 1979; Hinting dan Marlinata, 1981; Askari *et al.*, 1994).

Dengan mengetahui secara sekilas dari pustaka yang didapat, perihal pengaruh LF dan VE terhadap kualitas spermatozoa pada ternak, maka dirasa perlu

untuk mengetahui lebih mendalam tentang pengaruhnya terhadap viabilitas spermatozoa pada semen sapi potong Peranakan Ongole (PO), sebelum simpan beku.

Untuk tujuan tersebut, akan dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian LF dan VE sebelum simpan beku terhadap viabilitas spermatozoa sapi potong PO.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan, bahwa LF dan VE dapat memberikan pengaruh pada viabilitas spermatozoa sapi potong PO setelah dicairkan (*Thawing*) kembali, untuk memberikan nilai tambah bagi keberhasilan inseminasi buatan di kemudian hari.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, penelitian ini dirancang untuk menjawab beberapa masalah sebagai berikut :

1. Apakah dengan penambahan Lactoferrin dan Vitamin E dalam sediaan semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, dapat memacu gerak maju spermatozoa, setelah dicairkan kembali (*thawing*).
2. Apakah dengan penambahan Lactoferrin dan Vitamin E dalam sediaan semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, dapat menekan kematian spermatozoa, setelah dicairkan kembali (*thawing*).
3. Apakah dengan penambahan Lactoferrin dan Vitamin E dalam sediaan semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, dapat meningkatkan daya resistensi spermatozoa terhadap pengaruh dari luar, setelah dicairkan kembali (*thawing*).

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh LF dan VE terhadap viabilitas spermatozoa sapi potong PO, setelah simpan beku.

1.3.2. Tujuan Khusus

Untuk membuktikan, bahwa :

1. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, berpengaruh pada motilitas spermatozoa.
2. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, berpengaruh pada persentase hidup spermatozoa.
3. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, berpengaruh pada daya resistensi spermatozoa.

1.4. Manfaat Penelitian

Peningkatan viabilitas (motilitas, persentase hidup dan daya resistensi) spermatozoa sapi potong PO dengan penambahan LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, berarti terjadi peningkatan kualitas semen.

Hal ini tentunya akan meningkatkan pula angka konsepsi, sehingga nilai reproduktifitas semakin meningkat, guna menunjang peningkatan hasil produksi asal ternak.

Bila persentase hidup spermatozoa semakin meningkat, maka dimungkinkan pengurangan dosis spermatozoa dalam tiap straw semen beku, sehingga dapat dikembangkan dan dilipatgandakan jumlah straw yang dihasilkan, yang pada

gilirannya makin banyak betina dapat di inseminasi per ejakulat semen' (efisiensi ejakulat semen).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fisiologi Semen

2.1.1. Spermatozoa

Semen terdiri dari dua bagian, yaitu spermatozoa atau sel kelamin jantan dan cairan atau medium semi gelatinous yang disebut plasma semen (Ismudiono, 1999). Sekitar 90% volume semen terdiri dari plasma semen dan sisanya adalah spermatozoa. Spermatozoa berasal dari *spermatogonia* yang dihasilkan oleh tubulus seminiferous testes, melalui proses spermatogenesis. *Spermatogonia* berasal dari sel-sel epithelium germinal yang letaknya dekat dengan membran basal tubulus seminiferus testes.

Spermatogenesis merupakan suatu proses yang berkelanjutan, dibagi dalam 3 tahap, yaitu tahap produksi gamet (*Spermatogonia*), tahap diferensiasi fungsional untuk fertilisasi melalui meiosis (*Spermatisit*) dan tahap diferensiasi struktural yang memberi kemampuan untuk bergerak (*Spermatozoa*) (Rijnders *et al.*, 1996). Dalam proses spermatogenesis, secara morfologis akan terjadi perubahan secara berturut-turut sebagai berikut : *Spermatogonia*, *Spermatisit Primer*, *Spermatisit Sekunder*, *Spermatid* dan *Spermatozoa*. *Spermatogonia* merupakan sel benih yang sejati, karena dari sel inilah dihasilkan spermatozoa, melalui proses perubahan sel, reduksi kromosom serta perubahan bentuk dari poligonal menjadi sel berekor (Partodihardjo, 1992).

Spermatogonia setelah mengalami mitosis berubah menjadi *spermatisit primer* yang *diploid*, kemudian setiap *spermatisit primer* mengalami pembelahan reduksi melalui proses *meiosis I*, sehingga dihasilkan 2 buah *spermatisit sekunder* yang *haploid*. Selanjutnya setiap *spermatisit sekunder* mengalami *meiosis II*, sehingga dihasilkan *spermatid*. Dengan demikian, pada tahap *deferensiasi fungsional* dari *spermatisit primer* akan dihasilkan 4 buah *spermatid*.

Dengan *deferensiasi struktural*, *spermatid* mengalami perubahan *morfologis* menjadi spermatozoa yang matang, melalui proses *spermiogenesis*. Pada proses ini terjadi penonjolan pada sentriol spermatid yang terus memanjang membentuk ekor.

Bila proses *diferensiasi* telah selesai, maka spermatozoa masuk ke dalam *tubulus seminiferus*, dimana spermatozoa akan mengalami pendewasaan (*maturasi*) lebih lanjut di epididymis (Rijnders *et al.*, 1996). Waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan spermatozoa dari *spermatogonia* berkisar antara 60-70 hari pada sapi (Toelihere, 1985). Adanya berbagai spermatozoa yang masih muda dalam semen, biasanya merupakan tanda adanya gangguan spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus (Anonim, 1992).

Kemampuan testes pada sapi jantan normal untuk menghasilkan spermatozoa adalah sebanyak 12 – 17 juta per gram jaringan per hari, yang berarti dengan berat testes sapi 400 gram, akan diproduksi 12 milyar spermatozoa (Toelihere, 1985).

2.1.2. Plasma Semen

Plasma semen adalah campuran antara cairan epididymis dan kelenjar aksesoris (kelenjar vesikula seminalis dan kelenjar prostata), yang memberikan 90% volume semen ternak sapi (Ismudiono, 1999).

Plasma semen merupakan medium nutrisi bagi spermatozoa, 1/3 bagian dihasilkan oleh kelenjar prostata dan 2/3 bagian oleh kelenjar vesikula seminalis (Rijnders *et al.*, 1996). Plasma semen memiliki pH 7,0 dan tekanan osmotis sama dengan tekanan osmotis darah atau ekuivalen dengan 0,9% Natrium Chlorida (NaCl) (Toelihere, 1985; Partodihadjo, 1992).

Fungsi utama dari plasma semen adalah sebagai medium pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi jantan ke dalam saluran reproduksi betina. Selain itu, plasma semen juga berfungsi sebagai bahan penyanggah pH (*buffer*) dan sumber energi bagi spermatozoa baik secara langsung maupun tidak langsung.

Glyceryl Phosphorilcholine (GPC) di dalam plasma semen tidak dapat dipergunakan langsung oleh spermatozoa. Namun, sekresi saluran alat kelamin betina, terdapat enzim yang mampu melepaskan gugus choline dan membebaskan phosphoglycerol, sehingga dapat dikonsumsi oleh spermatozoa sebagai sumber energi. Jadi GPC merupakan tambahan sumber energi untuk spermatozoa, setelah semen diejakulasikan ke dalam saluran alat kelamin betina (Toelihere, 1985).

Plasma semen selain berfungsi sebagai pembawa spermatozoa, juga memiliki aktifitas antimikroba. Substansi yang diduga bertanggung jawab terhadap aktifitas antimikroba dalam semen adalah *Spermin* dan *Seminal Plasmin* (Na'im, 1996).

Bahan organik lain yang ditemukan dalam plasma semen adalah fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, ergothinin dan prostaglandin.

Pada sapi, fruktosa, sorbitol, asam sitrat dan inositol dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis, sedang prostaglandin sebagai hormon lokal disekresikan oleh kedua kelenjar prostata dan vesikula seminalis dengan konsentrasi tinggi, khususnya pada semen domba, kambing, kera dan manusia (Ismudiono, 1999). Kadar fruktosa dalam semen sapi sangat tinggi dan merupakan sumber makanan utama dari spermatozoa. Oleh karena itu fruktosa dapat menjadi *marker* yang spesifik untuk mengetahui normal tidaknya fungsi kelenjar vesikula seminalis.

2.1.3. Metabolisme Spermatozoa

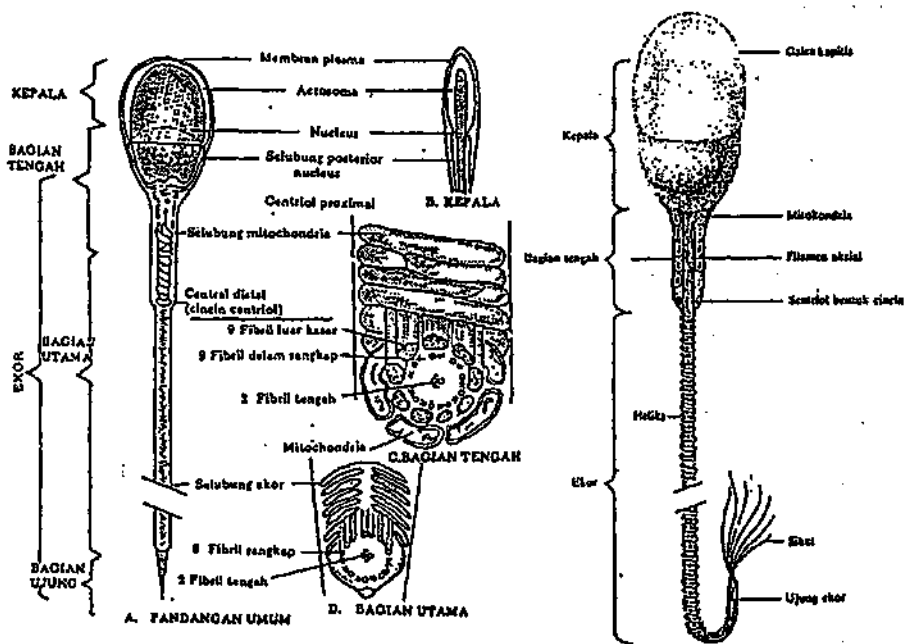
Secara morfologis, spermatozoa dibagi atas 3 bagian, yaitu kepala, leher dan ekor (Gambar 1) (Tournaye, 1994; Hunter, 1980). Sedang Hafez (1993), membagi morfologi spermatozoa hewan menjadi kepala dan ekor. Bagian ekor terbagi lagi menjadi tiga bagian, yaitu *middle piece*, *principle piece* dan *end piece*.

Secara fungsional, spermatozoa dibagi atas 4 bagian, yaitu inti pada kepala yang berisi genom, axial filamen yang menggerakkan spermatozoa, mitokondria sebagai tempat pembakaran energi dan akrosom sebagai penghasil enzim untuk penetrasi oosit pada saat fertilisasi (Tournaye, 1994).

Pada tingkat nukleus, proses metabolisme menjadi terbatas, karena genom tidak aktif selama proses spermatogenesis. DNA yang dikandung spermatozoa tidak memiliki kemampuan untuk menghasilkan protein, kecuali protein-protein binding DNA yang ikut terlibat dalam diferensiasi lanjut proses spermatogenesis (Hecht,

1990). Informasi genetik yang dibawa oleh spermatozoa diterjemahkan dan disimpan di dalam molekul DNA yang disusun oleh banyak nukleotida (Toelihere, 1985).

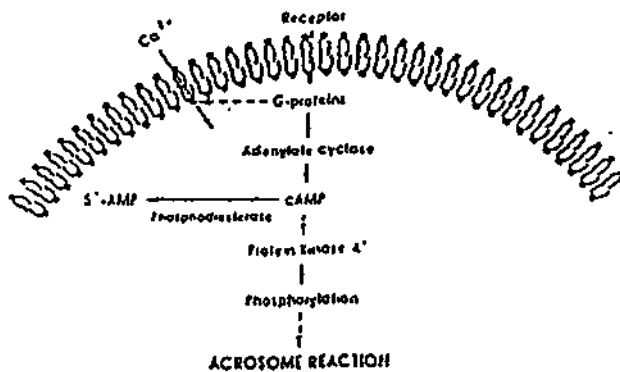
Gerakan ekor spermatozoa mempunyai peranan penting untuk fungsi reproduksi. Proses metabolisme yang menghasilkan energi menyebabkan terjadinya gerakan ekor tersebut. Ekor mengandung aksonema dengan mitokondria pada bagian *middle piece*.



Gambar 1. Morfologi Spermatozoa Pada Mamalia.
Sumber : Nalbandov (1990) dan Toelihere (1985). Dimodifikasi

Aksonema terdiri dari 9 pasang mikrotubulus yang terletak di perifer, tersusun radial mengelilingi sepasang mikrotubulus di bagian tengah. Pada bagian tengah, 9+2 susunan mikrotubulus ini dikelilingi oleh 9 fibril kasar dan padat yang tampak dihubungkan dengan 9 pasang aksonema dan dibungkus bagian luarnya oleh sejumlah mitokondria (Hafez, 1993), sehingga membentuk pola 9+9+2 (Tournaye, 1994).

Peranan kalsium terhadap motilitas spermatozoa tergantung pada tingkat maturasi spermatozoa. *Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (c-AMP)* merupakan nukleotida siklik yang berfungsi sebagai *second messenger*, telah diketahui ikut mengatur metabolisme dan motilitas spermatozoa (Vijayaraghavan and Hoskins, 1986), sedang pH intraseluler diduga juga berperan pada pengaturan motilitas spermatozoa (Goltz *et al.*, 1988; Tournaye, 1994). (Gambar 2).



Gambar 2 : Jalur *Second Messenger c-AMP*.
Sumber : Zaneveld *et al.* (1991) dalam Tournaye (1994)

Hunter (1980) menyatakan, bahwa plasma semen berfungsi untuk proses ejakulasi dan transport awal spermatozoa, dan sebagai media untuk kehidupan spermatozoa, karena mengandung bahan organik, seperti Fruktosa, Asam Sitrat, Inositol, Ergothionin, Glyceryl Phosphorylcholine (GPC) dan Sorbitol (Hafez, 1987). Bahan organik yang lain meliputi asam askorbat, asam amino, peptida, protein, lipida, asam-asam lemak dan sejumlah enzim (White and Aitken, 1989; Hafez, 1987).

Beberapa macam vitamin dan prostaglandin juga dapat ditemukan dalam plasma semen (Toelihere, 1985).

2.1.4. Motilitas Spermatozoa

Motilitas mempunyai arti penting terhadap fertilitas spermatozoa untuk menembus zona pelusida dan sitoplasma oosit pada saat proses fertilisasi (De Jonge *et al.*, 1993).

Kecepatan gerak spermatozoa dan pola motilitasnya di dalam saluran alat kelamin betina dipengaruhi oleh segmen dari saluran reproduksi betina tersebut (Ismudiono, 1999).

Zakaria (1995) menjelaskan, bahwa motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh faktor endogen, seperti umur spermatozoa, lama penyimpanan dalam epididymis, waktu setelah ejakulasi, morfologi, pergerakan ekor, kestabilan membran, sedangkan faktor eksogen, adalah faktor biofisik (pH, suhu, komposisi ion), cairan yang mempengaruhi (cairan epididymis, plasma semen, getah servik, cairan prostata) dan faktor yang merangsang dan menghambat (ion anorganik : Cu, Zn, C, Mn, Mg), obat-obatan, hormon dan faktor immunologis. Peningkatan percepatan motilitas spermatozoa dapat terjadi terutama di dalam oviduk, terutama saat mendekati waktu ovulasi dan ini berkaitan dengan terjadinya proses kapasitasi spermatozoa dan reaksi akrosom (Ismudiono, 1999).

Kecepatan motilitas spermatozoa diluar alat kelamin betina kurang lebih 100 mikrometer per detik (6 mm per menit). Spermatozoa sapi akan mencapai tuba



fallopian setelah didisposisi di dalam serviks dengan waktu kurang dari 15 menit (Hardjopranjoto, 1995).

Menurut (Hafez, 1993), motilitas dan daya tahan spermatozoa setelah ejakulasi tergantung pada rasio optimal antara cairan kelenjar prostat dan kelenjar vesikula seminalis. Sekresi kelenjar vesikula seminalis mengandung berbagai faktor yang mengurangi kemampuan motilitas dan daya tahan spermatozoa, sedang sebaliknya, sekresi kelenjar prostat mengandung faktor yang dapat merangsang motilitas spermatozoa.

2.2. Teknologi Pendayagunaan Semen

2.2.1. Teknologi Bantu Reproduksi

Reproduksi adalah proses perkembangbiakan suatu makhluk hidup, dimulai sejak bersatunya ovum dan spermatozoa menjadi zygote, disusul dengan kebuntingan dan diakhiri kelahiran anak (Hardjopranjoto, 1995). Selama proses reproduksi tidak jarang terjadi kegagalan, yang merupakan permasalahan sangat kompleks di bidang reproduksi dan terkait satu sama lain.

Salah satu permasalahan atau kegagalan proses reproduksi adalah terhambatnya pertemuan antara spermatozoa dan ovum, sehingga tidak terjadi pembuahan. Pada pasangan suami isteri (*Pasutri*), infertilitas adalah suatu keadaan dimana setelah melakukan senggama di dalam kurun waktu satu tahun, belum menghasilkan kehamilan pada isterinya (Adimoelja, 1988).

Infertilitas banyak terjadi baik pada manusia maupun hewan. Sebelum berkembangnya bioteknologi reproduksi, pengaturan reproduksi pada manusia hanya

ditujukan pada wanita, karena pengaturan pada pria jauh lebih sulit. Kemudian setelah berbagai teknologi dan bioteknologi reproduksi berkembang, maka penanganan reproduksi pada pria menjadi sangat penting, karena ternyata 30-50% infertilitas bersumber pada pria (Anonim, 1995).

Semakin banyak kasus infertilitas, maka semakin berkembang pula berbagai teknologi bantu di bidang reproduksi, dikenal dengan Teknik Bantu Reproduksi (*Asisted Reproductive Technique = ART*).

ART merupakan upaya bantuan teknik di bidang kedokteran untuk membantu proses reproduksi manusia pada pasangan infertil atau subfertil. Teknik mutakhir yang cukup berkembang saat ini adalah IVF (*Invitro Fertilization*), ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*), IUI (*Intra Uterine Insemination*), SHIF (*Synchronized Hysteroscopic Insemination Fallopian Tube*), IVF-ER (*Invitro Fertilization & Embryo Replacement*), GIFT (*Gamete Intrafallopian Transfer*), TET (*Tubal Embryo Transfer*), MIST (*Micro Insemination Sperm Transfer*), MIMIC (*Micro Insemination Micro Injection Into Cytoplasm*) (Wasito, 2000). Teknik ini sangat penting untuk menanggulangi infertilitas pada pria, karena pengobatan secara konvensional belum memberikan hasil yang memuaskan (Hinting, 1997).

Sedang pada hewan, hingga saat ini baru Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE) saja yang berkembang. Teknik lain yang pernah dilakukan pada manusia dan hewan, walaupun hanya terbatas pada penelitian di laboratorium, adalah rekayasa, baik pada semen maupun embrio. Teknologi IB dan TE merupakan teknik yang praktis dan ekonomis, karena dapat mempercepat penyebaran bibit dari pejantan

unggul. Dalam hal ini semen atau embrio dapat dikemas di dalam straw dan dibekukan, sehingga memudahkan dalam penyimpanan dan transportasi dan pelaksanaan IB dan TE dengan biaya yang murah (Evans and Maxwell, 1987; Hafez, 1987).

2.2.2. Inseminasi Buatan

Inseminasi buatan merupakan salah satu bioteknologi reproduksi diantara bioteknologi reproduksi yang lainnya. Inseminasi buatan sangat berperan dalam menunjang keberhasilan reproduksi ternak, baik dimasa sekarang maupun dimasa yang akan datang. Hal ini penting untuk menjawab berbagai tantangan atas kesenjangan antara pertambahan jumlah penduduk dengan produksi dari komoditi peternakan.

Dalam pelaksanaan inseminasi buatan, beberapa pejantan yang memiliki sifat genetik tinggi dapat menghasilkan cukup banyak semen, sehingga dapat dipakai untuk menginseminasi ribuan betina per tahun, sedangkan pada pelaksanaan transfer embrio, hanya sedikit keturunan yang dapat dihasilkan pertahunnya (Hafez, 1987).

Keuntungan utama inseminasi buatan adalah 1) dapat menyimpan semen dalam jangka waktu yang lama, 2) pejantan unggul masih tetap dapat dipergunakan, walaupun tidak dapat mengawini betina secara alamiah karena suatu sebab, dan 3) dapat mengawini lebih banyak betina per ekor pejantan. Di samping itu juga dapat untuk perkawinan di luar musim kawin setelah diadakan sinkronisasi birahi, dan dapat menunjang penerapan teknologi reproduksi yang telah ada (Evans and Maxwell, 1987).

Seekor sapi pejantan unggul, melalui inseminasi buatan, selama hidupnya mampu memberi keturunan yang baik antara 100.000 sampai 200.000 ekor betina atau lebih (Mulyo, 1979).

2.2.3. Penampungan dan Penilaian Semen Segar

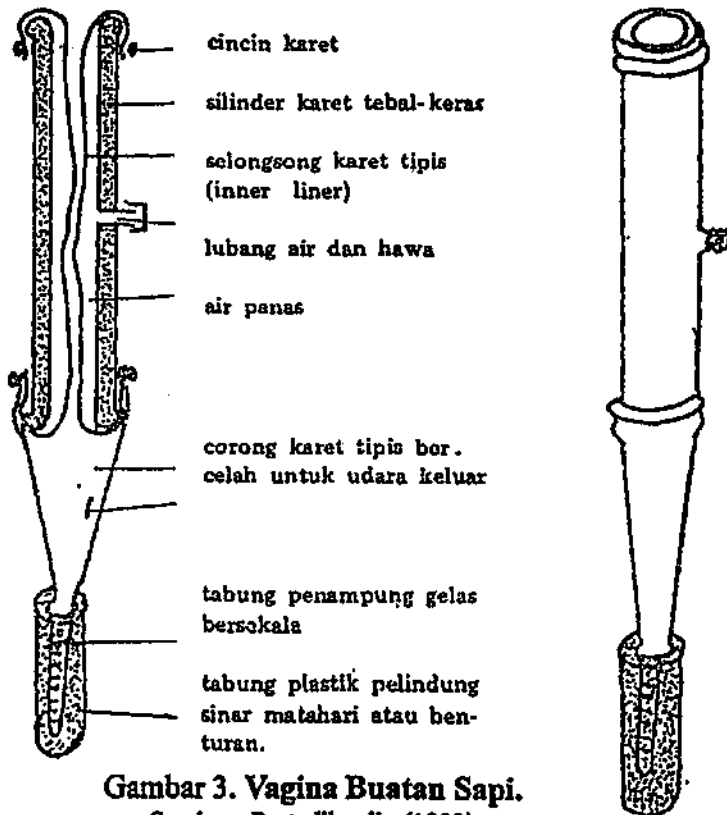
Metode penampungan semen pada sapi yang dipakai di Balai Inseminasi Buatan, adalah dengan vagina buatan sapi (Toelihere, 1985), karena dengan metode ini akan diperoleh semen yang bersih, maksimal dan spontan keluar (Gambar 3).

Setiap contoh semen per ejakulat, harus diperiksa secara rutin dan singkat terhadap konsentrasi dan persentase hidup, serta derajat motilitas spermatozoa. Hal ini mengingat semen harus diolah terlebih dahulu sebelum diinseminasikan ke dalam alat kelamin betina dan untuk mengetahui berapa dosis pengenceran yang dibutuhkan (Evans and Maxwell, 1987; Hafez, 1993), serta layak tidaknya semen tersebut diproses lebih lanjut untuk keperluan inseminasi buatan (Toelihere, 1985; Partodihardjo, 1992).

Metode penilaian semen yang biasa dilakukan adalah secara makroskopis dan mikroskopis (Salisbury *et al.*, 1978), meliputi pemeriksaan volume, warna, bau, pH, konsistensi, eritrosit, leukosit, spermatozoa, kristal, debris dan agglutinasi (Hafez, 1993).

Menurut Hardjopranjoto (1985) dan Rijnders *et al.* (1996), pemeriksaan semen secara mikroskopis antara lain menaksir kualitas semen, menghitung konsentrasi spermatozoa, menghitung persentase spermatozoa hidup-mati dengan

pewarnaan vital, melihat morfologi spermatozoa dan menghitung spermatozoa yang normal-abnormal, daya gerak spermatozoa dan gerakan massa spermatozoa.



Gambar 3. Vagina Buatan Sapi.

Sumber : Partodihardjo (1992)

Oleh Toelihere (1985) dijabarkan lebih lanjut tentang sifat-sifat semen sapi, seperti yang terpampang pada tabel berikut.

Tabel 1. Sifat-sifat semen sapi

Jumlah penampungan per minggu (kali)	1 - 6
Volume (ml)	5-8 (1 - 15)
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	1000 - 1800 (800 - 2500)
Jumlah spermatozoa per ejakulat (milyard)	4,8 (5 - 15)
Spermatozoa motil (%)	65
pH	6,8 (6,2 - 7,5)
Morfologi spermatozoa normal (%)	85

Sumber : Toelihere (1985). Dimodifikasi

Konsentrasi semen menentukan jumlah minimum derajat konsistensi ejakulat, karena secara umum menggambarkan jumlah minimum spermatozoa yang diinseminasikan untuk mencapai konsepsi (Hunter, 1980). Penilaian konsentrasi dapat dilakukan dengan melihat penampilan semen dengan haemositometer (Arsyad dan Hayati, 1984), kalorimeter atau menghitung partikel elektronik (Evans and Maxwell, 1987). Dosis per inseminasi dalam pengolahan semen, menentukan dosis spermatozoa per straw sebelum pembekuan 20×10^6 spermatozoa, sedang semen cair 2×10^6 spermatozoa tiap 0,5 cc sediaan semen cair (Mulyo, 1979).

Penilaian motilitas spermatozoa berdasarkan dua hal, yaitu pergerakan dalam persen (%) untuk membandingkan spermatozoa bergerak dan tidak bergerak; pergerakan individu spermatozoa, yang dikenal dengan gerakan maju (*progresif*), mundur (*reserve*), bergetar (*vibratory*) dan berputar (*sirkuler*) (Partodihardjo, 1992).

Gerakan individu spermatozoa yang terbaik adalah pergerakan progresif atau gerakan aktif maju kedepan. Gerakan melingkar dan gerakan mundur merupakan tanda "*cold shock*" atau media yang tidak isotonis dengan semen (Toelihere, 1985).

Motilitas spermatozoa yang *progresif* menunjukkan bahwa spermatozoa tersebut sehat, tetapi tidak menjamin akan kemampuan fertilitas (Hafez, 1993).

Sebaliknya, belum tentu spermatozoa yang abnormal motilitasnya, tidak dapat membuahi ovum. Kebanyakan pejantan fertil mempunyai 50-80% spermatozoa *motil aktif progresif* (Toelihere, 1985).

Toelihere (1985) menjabarkan lebih lanjut tentang pengenceran, penyimpanan dan dosis inseminasi pada ternak, yang dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Pengenceran, penyimpanan, dosis inseminasi pada ternak

	SEMEN BEKU	SEMEN CAIR
Suhu penyimpanan ($^{\circ}\text{C}$)	- 196	+ 5
Lama penyimpanan (hari)	tak terhingga	3 - 4
Kadar pengenceran, terhadap 1 ml semen (ml)	65	160
Dosis inseminasi :		
Volume (ml)	1	1
Spermatozoa motil (juta)	12	5
Waktu terbaik untuk insemi- nasi sewaktu oestrus	tengah - akhir	tengah - akhir
Tempat deposisi semen	uterus	uterus
Jumlah betina yang dapat di Inseminasi per jantan	600	1400
per ejakulat	1700	4000
per minggu		
Konsepsi pada inseminasi (% bunting)	65	65

Sumber : Toelihere (1985). Dimodifikasi

Gambaran gerakan massal semen segar merupakan kriteria penting untuk menilai kualitas semen secara cepat (Hafez, 1993), mudah dan dipakai secara umum (Memon and Ott, 1981), untuk menentukan apakah ejakulat dapat diproses lebih lanjut atau tidak.

Namun, untuk keakuratan penilaian semen segar dapat dilihat pada motilitas individu spermatozoa, meskipun sangat bervariasi antar laboratorium yang berbeda, cara pengamatan dan ketrampilan laboran (Evans and Maxwell, 1987).

Dari penilaian gerakan massa spermatozoa dapat disimpulkan tingkat kualitas semen, dengan kriteria sebagai berikut (Toelihere, 1985):

- a. Sangat Baik (+++), terlihat gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif seperti gumpalan awan hitam, bergerak cepat berpindah-pindah,

- b. Baik (++), terlihat gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan gerak lambat,
- c. Lumayan (+), terlihat gelombang, hanya gerakan individu aktif progresif,
- d. Buruk (*Necrospermia*), nampak spermatozoa hanya sedikit, tidak ada gerakan individu.

Pemeriksaan secara periodik terhadap morfologi spermatozoa juga dipandang penting dalam membantu memperbaiki kesuburan hewan jantan dan sangat berguna untuk membedakan spermatozoa yang fertilitasnya tinggi atau rendah (Peter and Ball, 1986).

Menurut Morrow (1980), bahwa penilaian kelayakan kualitas semen seekor pejantan lebih cenderung ditentukan secara morfologis daripada motilitas. Karena kadang-kadang estimasi rendahnya kualitas semen dari motilitas lebih mencerminkan cara pemeriksaan dan penanganan yang kurang baik.

Morfologi yang kurang baik menyebabkan motilitas rendah. Morfologi abnormal dapat dilihat pada kepala, badan dan ekor spermatozoa, yang secara garis besar diklasifikasikan sebagai abnormalitas primer dan sekunder. Perhatian khusus yang diberikan pada penilaian morfologi spermatozoa adalah pada akrosom, karena ini memegang peranan penting dalam proses fertilisasi (Toelihere, 1985).

2.2.4. Simpan Beku

Spermatozoa tidak tahan lama diluar tubuh. Untuk itu, ke dalam semen harus ditambahkan pengencer yang mengandung zat makanan sebagai sumber energi yang dapat melindungi spermatozoa terhadap gangguan dari luar, bertindak sebagai

penyangga pH, mempertahankan tekanan osmotik, dapat mencegah pertumbuhan kuman dan memperbanyak volume (Toelihere, 1985), sehingga dapat disimpan lama sebelum dipakai untuk inseminasi buatan.

Semen untuk inseminasi buatan dapat disimpan dalam bentuk cair (*Chilled Semen*) maupun bentuk beku (*Frozen Semen*).

Selama penyimpanan semen, baik dalam bentuk dingin maupun beku dapat terjadi perubahan struktur dan fungsi spermatozoa. Hal ini terjadi akibat metabolisme dan perlakuan saat pengolahan dan penyimpanan. Perubahan yang mungkin terjadi adalah pada morfologi, menurunnya motilitas, daya tahan dan kemampuan penetrasi pada zona pelusida serta kerusakan akrosom (Cross and Hanks, 1991).

Sebelum penyimpanan beku, lebih dahulu dilakukan pendinginan di mana semen diletakkan dalam lemari pendingin dengan suhu 5°C untuk tujuan ekuilibrasi (Evans and Maxwell, 1987; Hunter, 1980). Penurunan suhu dilakukan secara tertahap, dari suhu kamar sampai pada suhu 5°C dalam waktu 1-1,5 jam dan suhu harus tetap dipertahankan pada suhu ini. Penyimpanan dalam bentuk dingin ini hanya mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa selama 4 hari (Toelihere, 1985). Pada kondisi seperti ini, semen siap diinseminasikan pada betina produktif yang sedang birahi. Pada suhu lebih dari 5°C, spermatozoa tidak mampu menghambat aktifitas metabolisme dan motilitasnya. Sebaliknya penyimpanan pada suhu dibawah 0°C dapat mengakibatkan kematian bagi spermatozoa.

Simpan beku adalah penyimpanan semen untuk jangka panjang yang dilakukan dalam nitrogen cair (N₂ cair) pada suhu -196°C. Penyimpanan beku ini

dapat menghentikan proses metabolisme dalam tubuh spermatozoa secara komplit (Evans and Maxwell, 1987).

Untuk penyimpanan semen dalam bentuk beku, perlu ditambahkan 8% glycerol ke dalam bahan pengencer sebagai bahan pelindung bagi spermatozoa, agar tidak terjadi pembentukan kristal es. Penambahan pengencer yang mengandung glycerol ke dalam semen dilakukan setelah equilibrasi pada suhu 5°C.

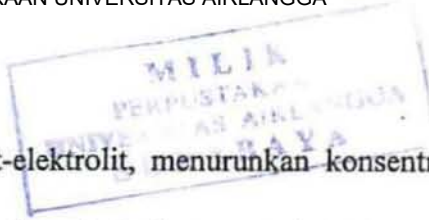
Pembuatan semen beku, dikenal dengan 2 cara (sistem Selandia Baru) (Mulyo, 1979):

- a. Pembuatan semen beku dalam kemasan mini straw atau medium straw dengan *extender* dasar susu dicampur D-glukosa.
- b. Pembuatan semen cair dalam *extender* susu kaprogen katalase.

Pembuatan semen beku di BIB Singosari, mempergunakan pengencer semen berupa susu skim, D-glukosa dan kuning telur.

Pemindahan *semen straw* (semen beku dalam straw) dari penyimpanannya, harus dilakukan dengan cepat, sebab dalam waktu 10 detik saja semen beku straw yang diangkat dari dalam kontainer berisi nitrogen cair, dan kemudian dikembalikan lagi, spermatozoa hidup akan berkurang 15% (Mulyo, 1979). Thawing pada air bersuhu 38°-40°C menghasilkan viabilitas spermatozoa yang lebih baik (Toelihere, 1985).

Menurut Toelihere (1985), dinding sel spermatozoa sangat permeabel terhadap glycerol, sehingga glycerol dapat berdifusi menembus dan memasuki sel spermatozoa. Glycerol yang memasuki sel akan menggantikan sebagian air yang



bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya perusakannya terhadap spermatozoa.

Penurunan suhu dilakukan dengan perlahan-lahan dengan memasukkan semen straw ke dalam uap nitrogen cair secara bertahap, agar diperoleh motilitas dan jumlah spermatozoa hidup *post thawing* yang baik (Sahni and Roy, 1972). Fertilitas spermatozoa *post thawing* hanya berkisar antara 58-60% (Evans and Maxwell, 1987). Hal ini berkaitan dengan penurunan motilitas selama pembekuan dan saat pencairan kembali (Hammit *et al.*, 1989), dan peningkatan peroksida lipida membran serta hilangnya aktifitas *Superoxide Dismutase (SOD)* (Wang *et al.*, 1993).

2.3. Radikal Bebas Oksigen

Pada keadaan aerob, sel dapat membentuk bahan oksidan atau radikal bebas yang berakibat toksik terhadap sel. Radikal bebas dibentuk terus menerus oleh tubuh, seperti sebagian besar reaksi redoks biokimia, yang melibatkan oksigen sebagai bagian dari metabolisme sel normal. Setiap radikal bebas yang terbentuk akan menyebabkan reaksi berantai sampai radikal bebas itu hilang, oleh sebab bahan antioksidan. Karena oksidan atau radikal bebas mempunyai oksigen yang reaktif, maka kelompok bahan tersebut dinamakan *Reactive Oxygen Species (ROS)* (Soehadi, 1996).

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih tanpa pasangan. Radikal bebas sangat berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upayanya mendapatkan pasangan elektronnya. Radikal bebas yang terbentuk melalui proses radiasi maupun oksidasi yang

menghasilkan senyawa beracun dapat merusak sel dan berlanjut dengan kurang berfungsinya suatu jaringan atau terjadinya perubahan struktur sel dan jaringan, sehingga fungsi organ sangat berkurang. *Proses degeneratif* terjadi melalui reaksi radikal bebas (Ridwan, 1997).

Antioksidan sebagai salah satu unsur sistem *proteksi* dalam mekanisme yang sudah ada dalam tubuh, mempunyai kemampuan menetralkan terbentuknya radikal bebas oksigen, sehingga dapat menghambat kerusakan yang diakibatkannya. Dalam keadaan normal tubuh sudah dilengkapi dengan sistem perlindungan terhadap aktifitas radikal bebas oksigen ini, misalnya enzim-enzim *Superoxide Dismutase*, *Katalase* dan senyawa penangkap elektron, seperti *Sistem Gluthation*. Antioksidan endogen dapat ditemukan pada plasma semen, sedangkan antioksidan eksogen didapatkan dari luar tubuh, misalnya *α-Tocopherol* (Vitamin E), Vitamin C (Zakaria, 1995).

Menurunnya motilitas pasca pembekuan dapat mencapai 50-60%, sehingga angka fertilitas semen setelah dicairkan kembali menjadi menurun. Hal ini disebabkan karena kerusakan struktur membran sel dan akrosom. Keadaan ini diduga sebagai akibat terjadinya akumulasi ROS dengan meningkatnya peroksidasi dari membran lipida. Sumber ROS dalam semen berasal dari komponen seluler semen, antara lain spermatozoa, leukosit, sel muda dan sel lain dalam semen (Askari *et al.*, 1994; Iwasaki and Gagnon, 1992).

Semen yang normal juga merupakan sumber ROS. Spermatozoa yang abnormal, misalnya abnormalitas terdapat pada bagian tengah dapat sebagai sumber

ROS. Hal ini karena bagian tengah spermatozoa mengandung mitokondria dan perangkat seluler lainnya. Spermatozoa abnormal dapat menjadi sumber ROS, terutama yang abnormalitasnya disebabkan, karena kegagalan *spermiogenesis* (Gavell *et al.*, 1996), demikian pula spermatozoa yang tidak bergerak (Iwasaki and Gagnon, 1992).

Semen mengandung berbagai macam radikal bebas, namun baik pada spermatozoa maupun pada plasma semen mengandung pula antioksidan (Tabel 3), yang mampu menetralkan efek radikal bebas tersebut.

Zakaria (1995) menyebutkan, bahwa faktor penyebab terjadinya reaksi radikal bebas oksigen adalah adanya gangguan metabolisme oksigen dalam tubuh karena infeksi, alergi, latihan, trauma, atau kekurangan antioksidan, seperti Vitamin E, Vitamin C, *Katalase*, *Gluthation Peroksidase*, *Superoxide Dismutase*.

Pengolahan semen yang kurang benar dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Kerusakan ini dapat menghasilkan beberapa zat yang dapat mengganggu keutuhan membran sel, sehingga mempengaruhi struktur dan fungsi spermatozoa (Check *et al.*, 1991), merusak mitokondria dan akrosom serta enzim, sehingga mengganggu motilitasnya (Wheeler, 1996).

Beberapa enzim alamiah, seperti *Superoxide Dismutase*, *Katalase*, *Gluthation Peroksidase* dan *Reductase* bersifat antioksidan, demikian pula dengan *Vitamin E*, *Vitamin C*, *Beta-Caroten*, *Asam Urat*, *Bilirubin* dan *Albumin* (Soehadi, 1996). Golongan antioksidan ini mampu melindungi keutuhan DNA dari spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS, akan tetapi Vitamin C dan Vitamin E yang

diberikan bersamaan dapat menyebabkan gangguan keutuhan DNA (Hughes *et al.*, 1998).

Tabel 3. Sumber radikal bebas dan antioksidan pada semen

SUMBER RADIKAL BEBAS PADA SEMEN	RADIKAL BEBAS PADA SPERMATOZOA	ANTIOKSIDAN PADA SEMEN
1. Spermatozoa Abnormal 1.1. Abnormal Kepala 1.2. Abnormal Leher @ 1.3. Abnormal Ekor 1.4. Spermatozoa Muda 2. Sel-sel bulat 3. Leukosit 4. Bakteri 5. Virus	1. <i>Hidrogen Peroxidase</i> (H_2O_2) 2. <i>Anion Superoxide</i> ($-O_2$) 3. <i>Radikal Peroxide</i> (ROO) 4. <i>Single Oxygen</i> (O)	1. Spermatozoa 1.1. <i>Superoxide Dismuthase</i> (SOD) 1.2. <i>Glutathion Peroxidase</i> (GSPx) 1.3. <i>Reductase</i> 1.4. <i>Katalase</i> 2. Plasma Semen 2.1. <i>Superoxide Dismuthase</i> (SOD) 2.2. <i>Katalase</i> 2.3. Vitamin C 2.4. Zinc (Zn) 2.5. <i>Transferrin</i> 2.6. <i>Lactoferrin</i> 2.7. <i>Albumin</i> 2.8. <i>Uric acid</i>
@ Paling banyak sebagai sumber Radikal Bebas		

Sumber : Soehadi (1996). Dimodifikasi

Menurut Surai *et al.* (1998), α -*Tocopherol* dan *Gluthation Peroksidase* merupakan komponen utama sistem antioksidan pada semen. Penambahan Vitamin E dapat menyebabkan peningkatan kadar α -*Tocopherol* di dalam semen, testis dan hati. Peningkatan konsentrasi α -*Tocopherol* di dalam semen berkaitan dengan berkurangnya kepekaan spermatozoa terhadap peroksida lipida.

Hsu *et al.* (1998) menerangkan, bahwa penambahan Vitamin E atau Vitamin C dapat mengurangi generasi ROS, mencegah hilangnya motilitas dan kemampuan penetrasi spermatozoa pada oosit tikus. Menurut O'Flaherty *et al.* (1997), Vitamin E

dapat melindungi membran spermatozoa pada sapi dari kerusakan oksidatif. Proses kapasitasi pada spermatozoa dapat menyebabkan perubahan struktur membran plasma. ROS dapat dihasilkan di dalam proses kapasitasi pada semen beku sapi setelah dicairkan kembali. Oleh karena itu Vitamin E maupun kombinasi Vitamin E dan Vitamin C dapat menurunkan persentase kapasitasi dari spermatozoa. Akan tetapi pada manusia justru sebaliknya, dimana Vitamin E dapat meningkatkan angka fertilisasi sampai satu bulan dengan mengurangi potensi peroksidasi lipida (Geva *et al.*, 1996).

Kerusakan peroksidatif, yang diinduksi oleh kelebihan jenis oksigen reaktif (*hidrogen peroksida*) dapat mempengaruhi kelainan fungsi spermatozoa. Kelainan spermatozoa yang dicirikan dengan tingginya aktivitas enzim tertentu yang abnormal, seperti *kreatin fosfatase*. Kelebihan jenis oksigen reaktif dan tingginya kadar *kreatin fosfatase* dapat menggambarkan kelainan spermatozoa yang dicirikan dengan bagian tengah yang abnormal (Anonim, 1992).

2.4. Lactoferrin dan Vitamin E

Menurut Thaler *et al.* (1990), setelah semen diejakulasikan, Lactoferrin sebagai *iron binding protein* terikat erat pada permukaan spermatozoa dan merupakan komponen utama *sperm coating antigen (SCA)*, yang dalam keadaan stabil, artinya dapat disimpan dalam bentuk beku tanpa mengalami perubahan. Sebagai suatu jenis protein, Lactoferrin merupakan salah satu SCA, di samping immunoglobulin G (IgG) yang melekat erat dipermukaan spermatozoa (Sosroatmodjo dan Tjokronegoro, 1979).

Bahan organik ini yang dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis dan mempunyai sifat sebagai protein pengikat zat besi.

Lactoferrin dan *inhibitor proteinase* pada semen dengan berat molekul rendah, juga dijumpai dalam cairan vesikula seminalis (Moelock, 1979).

Lactoferrin terdiri dari rangkaian 703 asam amino glycoprotein yang juga dapat diisolasi dari air susu. Lactoferrin dalam cairan tubuh didapatkan dalam bentuk tidak terikat oleh zat besi. Receptor Lactoferrin banyak dijumpai pada jaringan usus, monosit, makrofag, neutrofil, limposit, platelets dan beberapa bakteri (Levay and Viljoen, 1995). Di samping itu, Lactoferrin sebagai protein pengikat zat besi, merupakan faktor pelindung non immunologis yang terdapat pada jaringan dan cairan tubuh. Ia mempunyai aktifitas melawan bakteri gram positif dan gram negatif, melalui mekanismenya dalam bersaing dengan bakteri untuk memperoleh zat besi (Tizard, 1988).

Dengan demikian, Lactoferrin dapat menghambat perkembangbiakan bakteri pengguna zat besi (Roitt, 1986), karena zat besi yang dibutuhkan bakteri diikat lebih dulu oleh Lactoferrin (Tizard, 1995), dan protein ini secara langsung dapat berfungsi sebagai bakteristatik dengan jalan menghalangi masuknya zat besi ke dalam tubuh mikroba (Ellison, 1994).

Roitt (1986) menyatakan, bahwa Lactoferrin menghambat perkembangbiakan bakteri pengguna zat besi, karena zat besi diikat oleh Lactoferrin (Tizard, 1995), sebagai protein pengikat zat besi, merupakan faktor pelindung non immunologis yang terdapat pada jaringan dan cairan tubuh, mempunyai aktifitas

terhadap gram positif dan gram negatif (Tizard, 1988), yang sekaligus merupakan *Sperm Coating Antigen (SCA)* (Sosroatmodjo dan Tjokronegoro, 1979).

Untuk mengantisipasi invasi bakteri dalam semen, neutrofil melepaskan sediaan Lactoferrin ke dalam semen, sehingga akan meningkatkan daya bakterisidalnya (Bellanti, 1985; Tizard, 1988).

Angka keasaman (pH) yang rendah (asam), Lysozyme, Lactoferrin dan protein kationik merupakan faktor bakteriostatik dan bakterisidal dalam semen, yang tidak tergantung oksigen oleh karena itu dapat berfungsi pada kondisi anaerob (Roitt, 1986).

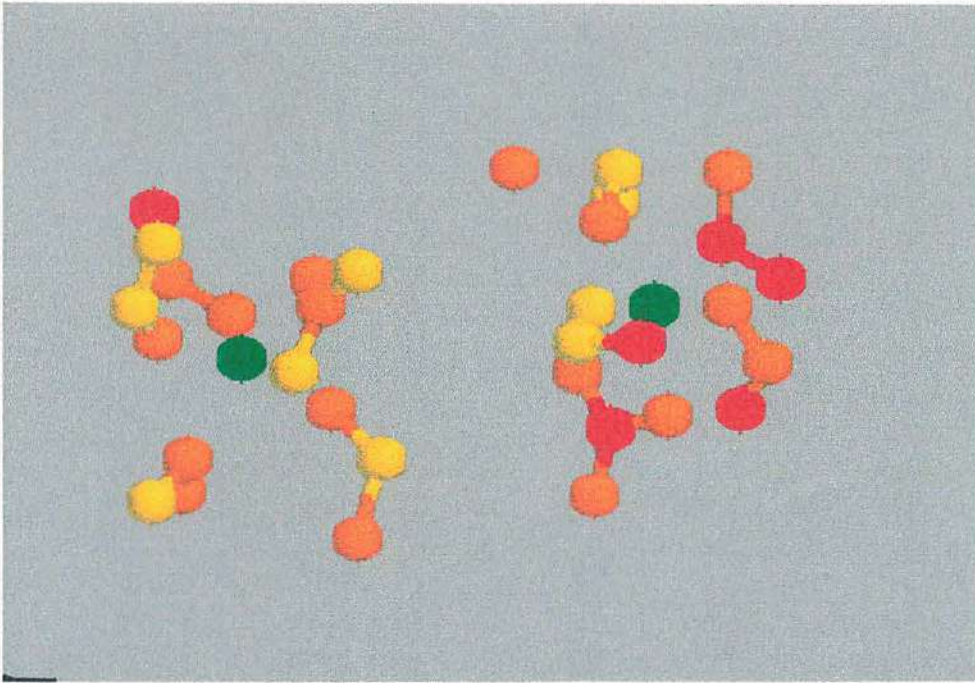
Menurut Rona (1996), Lactoferrin sebagai anti viral, anti bakterial, anti inflammasi, *iron binding protein* dengan efek terapi pada kanker, *HIV*, *Cytomegalovirus*, *Herpes*, *Chronic Fatigue Syndrome*, *Candida albicans* dan infeksi lainnya. Lactoferrin membantu menangkap Fe yang digunakan bakteri untuk perkembangannya dan memasukkan Fe ke dalam sel darah merah dan merangsang oksigenasi jaringan.

Struktur molekul Lactoferrin yang mempunyai dua tangan, yang masing-masing tangan mengikat ion Fe^{3+} (Ward *et al.*, 1996) (Gambar 4).

Lactoferrin sebagai *forward motility protein*, yang dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis yang banyak dikeluarkan dalam semen sapi dan kuda dapat merangsang motilitas spermatozoa agar bergerak lebih cepat (Tjokronegoro, 1979).

Rodman *et al.* (1997) menyatakan, bahwa Lactoferrin sebagai komponen protein pembungkus tubuh spermatozoa dapat merangsang proses kapasitasi,

sehingga memudahkan spermatozoa menembus zona pelusida dari oocyte, saat fertilisasi. Lactoferrin selalu berada pada permukaan spermatozoa, di dalam epididymis, karena antiserum anti lactoferrin menyebabkan agglutinasi ekor dari spermatozoa dewasa (Jin *et al.*, 1997).



Gambar 4. **Struktur Molekul Lactoferrin.**
Sumber : Ward *et al.* (1996)

Buckett *et al.* (1997) dalam penelitiannya pada semen manusia, menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar Lactoferrin dalam plasma semen yang ada dalam keadaan *oligospermia* (13,3 mg/100 ml) atau *oligoasthenospermia* (13,4 mg/100 ml), dibandingkan dengan kondisi *normospermia* (11,2 mg/100 ml).

Pada pemurnian protein plasma semen manusia dengan teknik kromatografi cair bertekanan tinggi, elektroforesis dan enzim assay teridentifikasi tiga protein, yaitu *Lactoferrin*, *Albumin* dan *Asam Phosphatase* (Autiero *et al.*, 1991).

Lactoferrin dapat diperoleh dari susu, saliva dan spermatozoa (Nikolaev, 1985), sebagian besar diproduksi oleh sel neutrofil dan mungkin sel-sel lainnya (Levay and Viljoen, 1995).

Pada tabel 4 di bawah ini ditunjukkan sistem antimikroba dari sel phagosit.

Tabel 4. Sistem antimikroba dari sel Phagosit

MEMBUTUHKAN OKSIGEN (O ₂)	TIDAK MEMBUTUHKAN OKSIGEN (- O ₂)
a. Myeloperoxidase (MPO)-Mediated b. MPO – Independent : 1. H ₂ O ₂ 2. Superoxide Anion (O ₂ ⁻) 3. Hydroxyl Radikal (OH [•]) 4. Ascorbate Peroxide Metal Ion 5. Amino Acid Oxidation	a. Acid b. Lysozyme c. Lactoferrin d. Granular Cationic Proteins

Sumber : Bellanti (1985). Dimodifikasi.

Selanjutnya Levay and Viljoen (1995) dan Ward *et al* (1996), menjelaskan bahwa *Lactoferrin* terikat dengan beberapa molekul cairan biologis tubuh, antara lain spermatozoa dan merupakan komponen dari seminal plasma (Tabel 5). Kandungan tertinggi *Lactoferrin* terdapat pada air susu ibu, tetapi molekul *Lactoferrin* juga didapatkan pada air susu mamalia lain, seperti sapi, babi, kuda, kambing dan tikus. Sebagai bagian dari air susu, *Lactoferrin* umumnya didapat sebagai produk kelenjar

eksokrin yang bertempat di muara saluran pencernaan, saluran respirasi dan saluran reproduksi, seperti saliva, air mata, sekresi nasal dan seminal plasma.

Untuk keperluan komersial, Lactoferrin dapat diisolasi dari air susu sapi, dan digunakan untuk pengkayaan (*enrichment*) formula makanan bayi, pasta gigi dan kosmetik (Rona, 1996).

Lactoferrin berguna sebagai faktor utama pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri, antigen diserap oleh spermatozoa selama ejakulasi untuk melindungi spermatozoa terhadap sistem imun pada saluran reproduksi betina (Veselky, 1981).

Tabel 5. Kandungan Lactoferrin dalam berbagai cairan biologis tubuh

CAIRAN BIOLOGIS TUBUH	JUMLAH
Kolostrum air susu manusia	7 mg/ml
Air susu manusia	1-2 mg/ml
Air mata	2,2 mg/ml
Seminal plasma	0,4-1,9 mg/ml
Cairan sinovial	10-80 ug/ml
Air ludah	7-10 ug/ml
Kolostrum air susu sapi	1 g/l
Air susu sapi	20-200 ug/ml

Sumber : Levay and Viljoen (1995). Dimodifikasi

Pada ejakulat manusia (seluruh plasma semen), mengandung *Fruktosa*, *Immunoglobulin G (IgG)*, *Immunoglobulin A (IgA)*, *Albumin*, *Lactoferrin*, *Transferrin*, *Ceruloplasmin*, *Fibrinogen* dan komponen dari komplemen lainnya. Fruktosa dan Lactoferrin tertinggi kandungannya pada split terakhir ejakulasi (Tauber *et al.*, 1975).

DNA spermatozoa terlindungi dari kerusakan oleh *Vitamin C* (600 mikrogram), *α-Tocopherol* (30 dan 60 mikrogram) dan *Asam Urat* (400 mikrogram)(Hughes *et al.*, 1998).

Pada pria, dengan pengobatan menggunakan *Vitamin E* selama 1 bulan, dapat merangsang laju fertilisasi dengan *normospermia* dan hambatan kemampuan fertilisasi (Geva *et al.*, 1996).

Vitamin E melindungi membran spermatozoa terhadap kerusakan oksidatif (O'Flaherty *et al.*, 1997). Penambahan *Vitamin E* meningkatkan motilitas spermatozoa *post thawing* (Askari *et al.*, 1994).

Adisetya *et al.* (1979), menjelaskan bahwa *Vitamin E (α-Tocopherol)* mempunyai efek terhadap metabolisme karbohidrat dan lipida yang pengaruhnya selalu pada berbagai enzim oksidatif, sehingga dapat melindungi sel dari toksin, *hipoksia* dan kelelahan (Gambar 5). Dinyatakan lebih lanjut, bahwa pada jaringan testes dapat meningkatkan metabolisme sehingga mengakibatkan proses spermatogenesis menjadi lebih baik, morfologi spermatozoa menjadi normal dan motilitas menjadi tinggi.

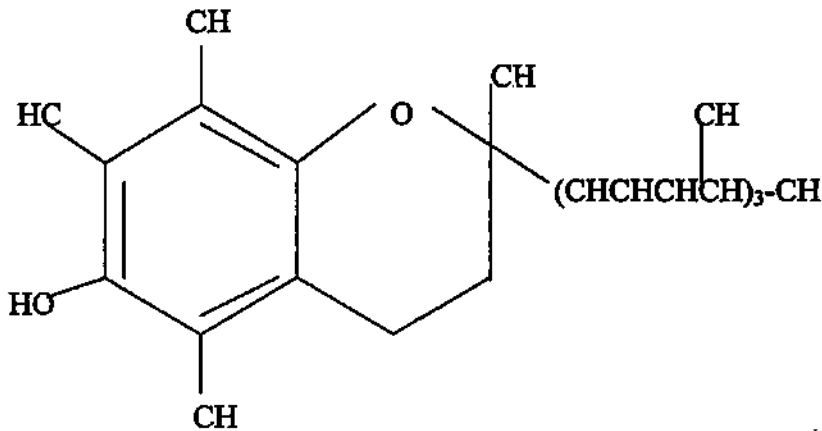
Secara *in-vitro*, *Vitamin E* dalam spermatozoa dapat mengikat bahan-bahan oksidan atau radikal bebas dan mencegah akumulasi *Reactive Oxygen Species (ROS)*, akibat meningkatnya peroksidasi lipida yang dapat merusak membran (Askari *et al.*, 1994).

Peningkatan konsentrasi *Vitamin E* dapat mengurangi kepekaan spermatozoa terhadap peroksidasi lipida (Surai *et al.*, 1998), memperbaiki morfologi dan motilitas

spermatozoa (Adisetya *et al.*, 1979) dan meningkatkan kemampuan terhadap penetrasi pada oosit (Hsu *et al.*, 1998).

Suspensi semen yang diinkubasikan dengan Vitamin E, aktifitas superoxide dismutase-nya lebih tinggi (Beconi *et al.*, 1991).

Menurut Stephens *et al.* (1996), Vitamin E adalah larutan lemak antioksidan dan melindungi tubuh dari radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme asam lemak. Sangat efektif menghambat efek penuaan, membantu oksigenasi dalam darah. Sebagai vasodilatator dan anti koagulan, dapat menurunkan tekanan darah dan memperbaiki sirkulasi darah. Dibutuhkan pada respirasi sel dan membantu sistem yang sedang dalam kondisi kekurangan oksigen, serta sangat baik berperan pada sistem reproduksi.



Gambar 5. Struktur Kimia α -Tocopherol (Vitamin E).
Sumber : Merck KgaA, Darmstadt.

2.5. Resistensi Spermatozoa.

Daya resistensi atau daya tahan spermatozoa terhadap lingkungannya merupakan suatu indikasi terhadap kualitas semen (Toelihere, 1985). Uji daya tahan

(*resistensi test*) spermatozoa merupakan salah satu uji biologis bagi spermatozoa, dilakukan dengan mencampur spermatozoa dengan larutan NaCl 1% (Hardjopranjoto, 1995).

Daya resistensi [R] adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan terhadap pengaruh NaCl 1%. Angka resistensi dimaksudkan sebagai angka yang menunjukkan banyaknya NaCl 1% yang dibutuhkan spermatozoa untuk menghentikan aktifitasnya.

Angka resistensi spermatozoa yang tinggi menunjukkan daya resistensi yang tinggi pula, dan berarti menunjukkan kualitas spermatozoa yang baik, dan sebaliknya spermatozoa yang berkualitas rendah mempunyai daya resistensi yang rendah (Hardjopranjoto, 1979).

Di dalam larutan yang kuat, NaCl 1% akan menghentikan gerakan spermatozoa, karena rusaknya membran lipoid spermatozoa.

Daya tahan spermatozoa dihitung dengan memperhatikan daya tahan spermatozoa terhadap NaCl 1%, dengan rumus :

$$R = \frac{\text{Jumlah larutan yang dipakai (ml)}}{\text{Jumlah semen yang dipakai (ml)}}$$

Untuk sapi jantan, angka resistensi berkisar antara 500 – 20.000, sedang semen yang baik untuk keperluan inseminasi buatan harus mempunyai angka resistensi > 3000. Pada pengamatan daya tahan spermatozoa ini harus selesai dalam waktu 15 menit (Toelihere, 1985; Hardjopranjoto, 1995).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Angka kematian spermatozoa setelah pencairan kembali (*post thawing*) mencapai 20 – 80%, keadaan ini membuat produsen straw semen beku melipatgandakan konsentrasi spermatozoa, untuk keperluan inseminasi buatan, menjadi 25 juta spermatozoa per mini straw beku (0,25 ml).

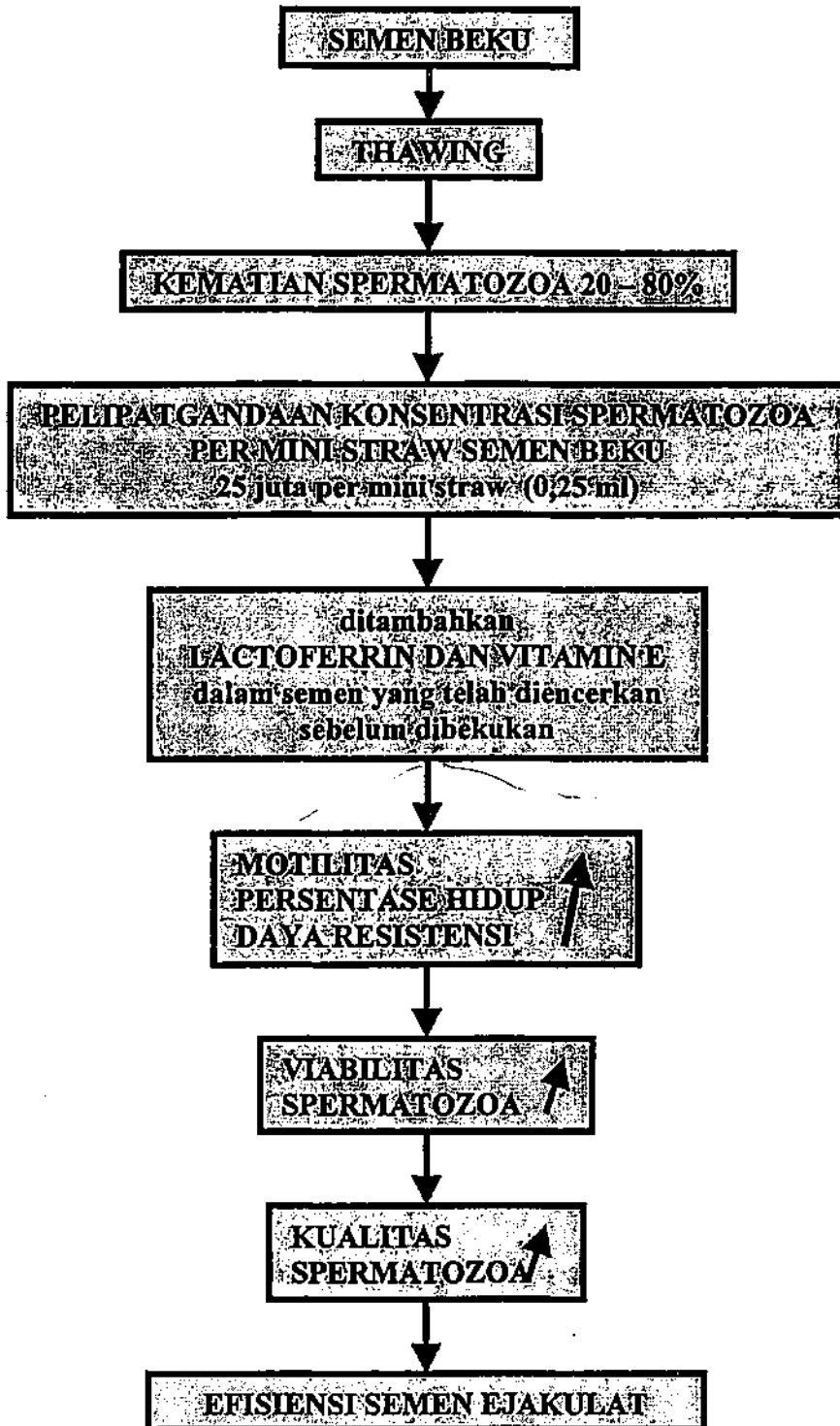
Kematian spermatozoa akibat rusaknya membran lipida dan akrosom spermatozoa, yang diduga sebagai akibat terjadinya akumulasi ROS dengan meningkatnya peroksidasi dari membran lipida.

Vitamin E berdasarkan penemuan peneliti terdahulu, telah diyakini dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, dengan cara melindungi sel membran spermatozoa terhadap kerusakan oksidatif. Demikian pula dengan Lactoferrin, sebagai *sperm coating antigen*, *forward motility sperm* dan *iron binding protein*, dapat melindungi sel membran dan memacu gerak maju spermatozoa, sehingga diharapkan dapat meningkatkan motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa.

Peningkatan ini berarti terjadi peningkatan pula pada viabilitas spermatozoa, yang berarti pula terjadi peningkatan kualitas spermatozoa.

Dengan kualitas spermatozoa yang tinggi, maka konsentrasi dimungkinkan dapat dikurangi untuk dosis per mini straw semen beku, sehingga akan terjadi efisiensi semen ejakulat.

Bagan 1. Kerangka Konseptual Penelitian



3.2. Hipotesis Penelitian

- 3.2.1. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen sapi potong Peranakan Ongole yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.**
- 3.2.2. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen sapi potong Peranakan Ongole yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa.**
- 3.2.3. Penambahan Lactoferrin dan Vitamin E pada semen sapi potong Peranakan Ongole yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, dapat meningkatkan daya resistensi spermatozoa.**



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini adalah penelitian murni (*true experimental*), dirancang menggunakan *Rancangan Acak Lengkap (RAL)* dengan *The Posttest Only Control Group Design* menurut Zainuddin (1988).

Data hasil penelitian yang terkumpul dari masing-masing perlakuan dilakukan analisis statistik dengan uji ANAVA satu arah. Bila hasilnya terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (Steel and Torrie, 1980; Sarmanu, 1992), untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah semen segar, yang diperoleh dari pejantan produktif sapi potong Peranakan Ongole, bernama *Wailaga*, dengan kode 29118, berumur 9 tahun, milik Balai Inseminasi Buatan Singosari Malang, yang ditampung dengan vagina buatan interval 2 kali seminggu, pada hari Selasa dan Kamis, sebanyak 7 kali penampungan dan setiap penampungan hanya 1 x ejakulasi.

Semen segar setelah ditambahkan pengencer, dibagi menjadi 4 bagian, dimana volume tiap bagian 10 ml. Selanjutnya, tiap bagian ditambahkan bahan perlakuan berupa larutan Lactoferrin (dosis 5 mg) sebagai kelompok I ; larutan Vitamin E (dosis 1,5 mg) sebagai kelompok II ; kombinasi larutan Lactoferrin (dosis 5 mg) dan larutan Vitamin E (dosis 1,5 mg) sebagai kelompok III dan kelompok IV

sebagai kelompok kontrol, tanpa diberikan perlakuan. Selanjutnya keempat kelompok perlakuan disimpan beku dalam kontainer Nitrogen cair bersuhu -196°C , selama 2 hari. Teknik pengolahan semen dan penyimpanan beku sesuai dan sejalan dengan yang dilakukan oleh BIB Singosari (Lampiran 4).

Untuk mengetahui tingkat viabilitas spermatozoa setelah simpan beku, dari masing-masing perlakuan diambil secara acak 3 buah mini straw. Selanjutnya di *thawing* dan semen dikeluarkan dari mini straw untuk dilakukan pemeriksaan motilitas, persentase hidup-mati dan uji resistensi.

Hasil pemeriksaan semen setiap perlakuan setelah pembekuan, ditabulasikan dan dianalisa secara statistik.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. **Variable Tergantung**, berupa : Motilitas, Persentase Hidup dan Daya Resistensi Spermatozoa (Viabilitas Spermatozoa).

4.3.2. **Variable Bebas**, meliputi : Macam bahan (Lactoferrin dan Vitamin E) dan Kombinasi macam bahan.

4.3.3. **Variabel Kendali**, meliputi : Kualitas semen segar, Interval penampungan semen, Bahan pengencer semen, Bentuk penyimpanan, Lama penyimpanan, Waktu pengamatan, Waktu penambahan bahan dan Hari pengamatan.

4.4. Definisi Operasional Variabel

4.4.1. Variabel Tergantung

4.4.1.1. Motilitas Spermatozoa, yaitu mengamati pergerakan spermatozoa motil, setelah dicairkan kembali (*thawing*). Penelitian ini hanya mengamati motilitas individual spermatozoa, dengan melihat pergerakan spermatozoa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 x.

4.4.1.2. Persentase Hidup Spermatozoa, yaitu jumlah spermatozoa hidup dalam suatu populasi spermatozoa. Pengamatan ini dengan cara menghitung jumlah spermatozoa hidup dalam 100 buah spermatozoa (persen), dengan bantuan pewarnaan Eosin (**Mati** : menyerap warna merah/merah muda; **Hidup** : tidak menyerap warna = mengkilap).

4.4.1.3. Daya Resistensi Spermatozoa

Besarnya ditunjukkan oleh angka resistensi, yaitu banyaknya jumlah larutan NaCl 1% yang diperlukan untuk menghentikan pergerakan spermatozoa.

Daya resistensi (R) spermatozoa, merupakan pembagian jumlah larutan NaCl 1% yang terpakai (ml) dengan jumlah semen yang dipakai (0,02 ml).

4.4.2. Variabel Bebas

4.4.2.1. Macam Bahan : Bahan terdiri dari larutan Lactoferrin (LF) dan Vitamin E (VE) pada masing-masing perlakuan.

4.4.2.2. Kombinasi Macam Bahan : Penambahan secara bersama-sama larutan Lactoferrin (LF) dan Vitamin E (VE), pada perlakuan.

4.4.3. Variabel Kendali

- 4.4.3.1. **Kualitas Spermatozoa** : Kualitas semen segar diharapkan sama (*homogen*) pada setiap kali perlakuan, karena berasal dari sapi pejantan yang sama dan berasal dari satu ejakulat spontan yang ditampung dengan vagina buatan. Setiap kali penampungan semen hanya ditampung dari 1 kali ejakulasi.
- 4.4.3.2. **Interval Penampungan Semen** : Agar diperoleh spermatozoa dengan konsentrasi tinggi dan volume yang cukup, penampungan semen segar dilakukan dengan interval 3 hari. Hal ini dilakukan untuk memberi kesempatan kepada spermatozoa agar diproduksi oleh testes dan mengalami pematangan di epididymis, serta siap diejakulasikan setelah 70 jam (3 hari).
- 4.4.3.3. **Bahan Pengencer** : Digunakan pengencer standar pada produksi straw semen beku sapi di Balai Inseminasi Buatan Singosari, berupa Susu Skim, D-glukosa dan Kuning Telur.
- 4.4.3.4. **Bentuk Penyimpanan** : Penyimpanan beku dalam straw, dimasukkan dan direndam dalam kontainer berisi Nitrogen cair, bersuhu -196°C .
- 4.4.3.5. **Lama Penyimpanan** : Penyimpanan beku dalam straw, yang direndam dalam Nitrogen cair bersuhu -196°C , selama 2 hari.
- 4.4.3.6. **Waktu Pengamatan** : Pengamatan dilakukan segera setelah sampel semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dalam air bersuhu $38 - 42^{\circ}\text{C}$.

4.4.3.7. **Waktu Penambahan Bahan** : Bahan ditambahkan setelah waktu gliserolisasi, sesaat sebelum dimasukkan ke dalam straw (*filling and sealing*).

4.4.3.8. **Hari Pengamatan** : Sampel semen beku, diamati pada hari ke II setelah penyimpanan beku dalam bentuk straw semen beku.

4.5. Materi Penelitian

4.5.1. Alat-alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain : Vagina buatan sapi, thermometer, inkubator, penangas air, *Spectrophotometer*, mikroskop, haemositometer, pipet (biasa dan mikro), seperangkat alat gelas, pH meter, kapas steril, kertas tissue, kontainer N₂ cair (goblet, canister, penutup), alat pengocok, *ultrasonic filling machine* dan plastik straw berwarna biru, merah, hijau dan putih.

4.5.2. Bahan-bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain : Semen segar dan semen straw (semen beku), Susu skim, D-glukosa, Lactoferrin (*Agricell, USA*), Vitamin E larut air (*Merck, Germany*), Natrium Chlorida (NaCl) 1%, Natrium Chlorida (NaCl) 0,9%, Gliserol, Nitrogen cair (N₂ cair), Penisilin dan Streptomisin, Tragacanth/Vaselin, Alkohol 70%, Aquadestilata dan Eosin.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari, Malang.

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan sejak bulan Agustus 2000 sampai September 2000.

4.7. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1. Penampungan dan Penilaian Semen Segar

- a. Semua peralatan penampungan semen dibersihkan dan disterilkan dari segala bahan kontaminan (darah, urine, runtuan epitel) yang dapat merusak semen.
- b. Pejantan produktif sapi potong Peranakan Ongole (PO) "*Wailaga*" yang akan diambil semennya, dibersihkan pada bagian bawah perut dan sekitar preputium, kemudian dilakukan pemanasan dengan mengelilingi dan menaiki sapi pemancing (*Teaser*), sebanyak 2-3 kali. Perlakuan ini diharapkan untuk merangsang guna membangkitkan libido, sehingga akan mendapatkan ejakulat dalam jumlah maksimal. Pada saat pejantan menaiki *Teaser*, dan penis telah ereksi penuh, segera vagina buatan yang telah dipersiapkan dipasangkan pada penis.
- c. Semen yang diejakulasikan dari 1 kali ejakulasi ditampung dalam tabung ukur, dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan cepat untuk penilaian makroskopis terhadap warna, konsistensi, pH dan volume. Penilaian

mikroskopis, dilakukan untuk pemeriksaan cepat terhadap konsentrasi dengan alat *Spectrophotometer*, motilitas massa dan individu.

- d. Manakala, semen segar tersebut memenuhi syarat dan layak pakai, seperti telah ditentukan dalam prosedur tetap pengolahan semen beku di Balai Inseminasi Buatan Singosari, proses pengolahan dilanjutkan.

4.7.2. Pengenceran, Pembuatan dan Penyimpanan Semen Beku

- a. Setelah konsentrasi semen telah diketahui, kemudian dihitung jumlah pengencer semen yang telah dipersiapkan, berupa susu skim, D-glukosa, kuning telur, antibiotika dan gliserol 16%. Selanjutnya semen segar dicampurkan dengan pengencer, kemudian dilakukan gliserolisasi sampai suhu 5°C.
- b. Setelah gliserolisasi selesai, ke dalam 4 gelas *Erlemeyer* diisi masing-masing 10 ml semen yang telah diberi pengencer, untuk 4 kelompok perlakuan.
- c. Ke dalam masing-masing gelas *Erlemeyer*, untuk kelompok I ditambahkan bahan perlakuan berupa larutan Lactoferrin (LF) 5 mg, kelompok II ditambahkan larutan Vitamin E (VE) 1,5 mg, kelompok III ditambahkan kombinasi larutan Lactoferrin 5 mg dan larutan Vitamin E 1,5 mg dan kelompok IV sebagai kontrol tanpa penambahan bahan perlakuan.
- d. Dengan peralatan *ultrasonic filling machine*, seluruh perlakuan dimasukkan ke dalam straw, dengan warna berbeda (Merah : LF; Hijau : VE; Putih : Kombinasi dan Biru : Kontrol).

- e. Kemudian seluruh straw dimasukkan ke dalam kontainer Nitrogen cair, dan diletakkan di atas Nitrogen cair, untuk dilakukan *prae freezing* pada suhu -140°C , selama 9 menit.
- f. Sebelum dilakukan *freezing* pada suhu -196°C dengan cara direndam dalam cairan Nitrogen, diambil sampel dari masing-masing warna straw untuk dilakukan *evaluasi before freezing*. Evaluasi ini untuk mengetahui motilitas spermatozoa dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 x.

4.7.3. Pemeriksaan Post Thawing dan Pengumpulan Data

- a. Setelah disimpan beku dalam Nitrogen cair selama 2 hari, dari masing-masing kelompok perlakuan diambil 3 buah straw, untuk dilakukan pemeriksaan motilitas, persentase hidup dan uji daya resistensi.
- b. Semua hasil pemeriksaan dari seluruh sample, sejak penampungan I hingga VII, dicatat dan ditabulasikan (Lampiran 5).

Pengulangan dilakukan sebanyak 7 kali, dengan interval penampungan semen 2 kali seminggu.

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA

5.1. Motilitas Spermatozoa

Pengukuran motilitas spermatozoa dari semen sapi potong PO, setelah diberi perlakuan penambahan Lactoferrin (LF), Vitamin E (VE) dan kombinasi Lactoferrin (LF) dan Vitamin E (VE) pada semen yang telah diencerkan, sebelum disimpan beku selama 2 hari, hasilnya dapat dilihat pada Lampiran 6. Sedangkan uji statistik dengan menggunakan ANAVA satu arah dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 6 dibawah ini.

Tabel 6. Rataan dan simpangan baku motilitas spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), kelompok Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol, pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari (%)

PERLAKUAN	RATAAN \pm SIMPANGAN BAKU
LF	71,43 \pm 2,44 ^a
VE	66,43 \pm 4,76 ^b
Kombinasi LF dan VE	72,14 \pm 2,67 ^a
Kontrol	47,14 \pm 2,67 ^c

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Dari Tabel 6 tampak, bahwa kelompok kombinasi LF dan VE dengan rata-rata 72,14 \pm 2,67, kelompok LF dengan rata-rata 71,43 \pm 2,44 dan kelompok VE dengan rata-rata 66,43 \pm 4,67 pada semen yang telah diencerkan sebelum disimpan beku selama 2 hari, menunjukkan adanya peningkatan motilitas spermatozoa yang sangat nyata ($p < 0,01$), dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan rata-rata 47,14 \pm 2,67. Hasil analisis varian satu arah, dapat dilihat pada Tabel 7 berikut ini.

Table 7. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap motilitas spermatozoa

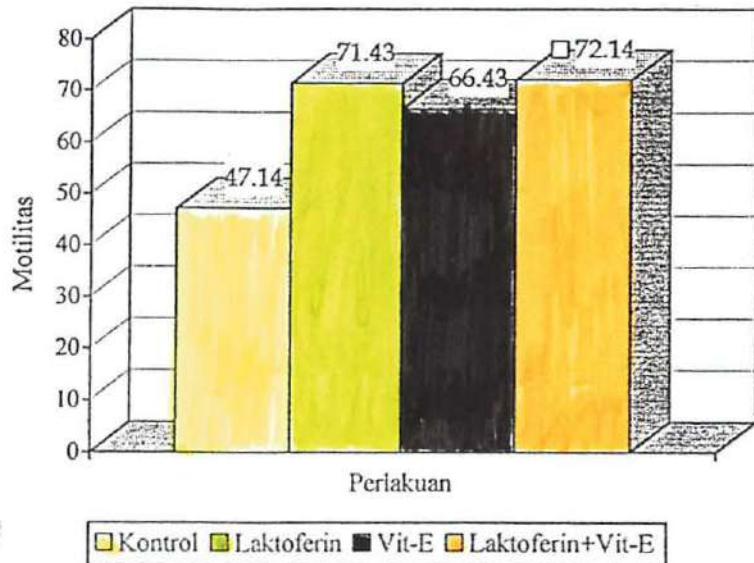
SUMBER	JK	db	KT	F	Sig.
Kel.	2878,571	3	959,524	89,556	.000
Galat	257,143	24	10,714		

Berdasarkan hasil rangkuman analisis varian satu arah pada Tabel 7, ternyata terdapat perbedaan yang sangat nyata, antara motilitas spermatozoa dengan perlakuan pada kelompok kontrol, kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari ($p < 0,01$). Ini berarti dengan penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

Selanjutnya untuk menentukan perbedaan kelompok mana paling baik, diperlukan uji Beda Nyata Terkecil, yang hasilnya tersaji pada Lampiran 7.

Dari hasil uji Beda Nyata Terkecil terhadap motilitas spermatozoa dapat ditunjukkan, bahwa kelompok kontrol, bila dibandingkan dengan kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$). Kelompok LF dengan kelompok VE memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$), sedang kelompok LF dengan kelompok kombinasi LF dan VE tidak ada perbedaan ($p > 0,05$), yang artinya antara kelompok LF dan kelompok kombinasi LF dan VE sama baiknya. Demikian pula kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Ini berarti, dengan penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, mampu meningkatkan motilitas spermatozoa sapi potong PO.



Gambar 6. Rataan dan simpangan baku motilitas spermatozoa setelah penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.

5.2. Persentase Hidup Spermatozoa

Pemeriksaan mikroskopis untuk menghitung persentase hidup spermatozoa sapi potong PO, dilakukan 2 hari setelah simpan beku pada kelompok kontrol, kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan, hasilnya dapat dilihat pada Lampiran 6. Sedangkan uji statistik dengan menggunakan ANAVA satu arah dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 8 berikut ini.

Tabel 8. Rataan dan simpangan baku persentase hidup spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), kelompok Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol, pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari (%)

PERLAKUAN	RATAAN ± SIMPANGAN BAKU
LF	87,86 ± 2,67 ^a
VE	82,14 ± 2,67 ^b
Kombinasi LF dan VE	86,43 ± 2,44 ^a
Kontrol	81,43 ± 2,44 ^b

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) dan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Dari Tabel 8 tampak, bahwa perlakuan pada kelompok LF menghasilkan rataannya $87,86 \pm 2,67$ dan kelompok kombinasi LF dan VE dengan rataannya $86,43 \pm 2,44$, pada semen yang telah diencerkan sebelum disimpan beku selama 2 hari, menunjukkan peningkatan persentase hidup spermatozoa yang sangat nyata ($p < 0,01$), dibandingkan dengan kelompok VE dengan rataannya $82,14 \pm 2,67$ dan kelompok kontrol dengan rataannya $81,43 \pm 2,44$, menunjukkan peningkatan persentase hidup spermatozoa yang nyata ($p < 0,05$). Untuk membuktikannya, dilakukan analisis varian satu arah, yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 9.

Table 9. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap persentase hidup spermatozoa

SUMBER	JK	Db	KT	F	Sig.
Kel.	209,821	3	69,940	10,682	.000
Galat	157,143	24	6,548		

Berdasarkan hasil rangkuman analisis varian satu arah seperti tertera pada Tabel 9, dapat dibuktikan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$) pada kelompok LF dan kelompok kombinasi LF dan VE pada semen yang telah

diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, sedang dengan kelompok VE tidak memperlihatkan peningkatan persentase hidup spermatozoa.

Ini berarti dengan penambahan LF dan kombinasi LF dan VE sangat bermakna untuk meningkatkan persentase spermatozoa ($p < 0,01$).

Selanjutnya untuk menentukan perbedaan antar kelompok mana paling baik, diperlukan uji Beda Nyata Terkecil, yang hasilnya tersaji pada Lampiran 8.

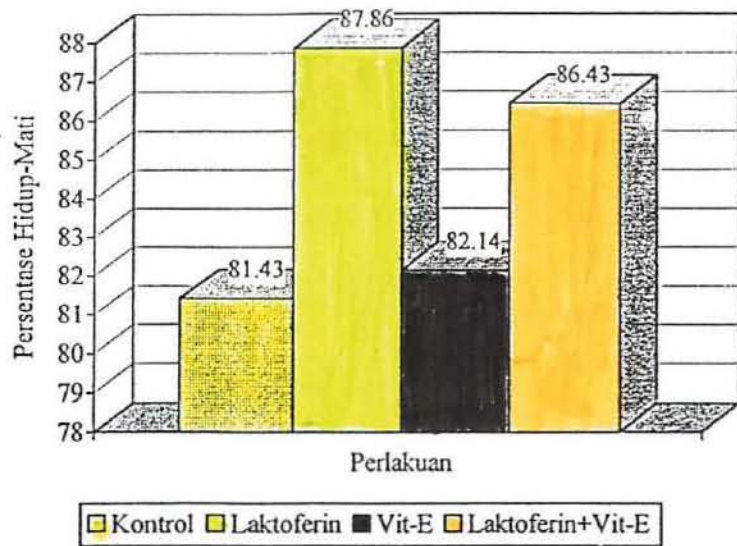
Dari hasil uji Beda Nyata Terkecil dapat ditunjukkan, bahwa kelompok LF dan kelompok kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan yang diberikan sebelum simpan beku selama 2 hari, dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa sama baiknya dengan sangat bermakna ($p < 0,01$). Sedang kelompok VE tidak mampu meningkatkan persentase hidup spermatozoa.

Kelompok kontrol, bila dibandingkan dengan kelompok LF dan kelompok kombinasi LF dan VE, tampak sangat berbeda nyata ($p < 0,01$), sedang bila dibandingkan dengan kelompok VE tampak tidak berbeda ($p > 0,05$).

Kelompok LF dibandingkan dengan kelompok VE tampak sangat berbeda nyata ($p < 0,01$), dan dibandingkan dengan kelompok kombinasi LF dan VE yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Kelompok VE bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi LF dan VE menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Ini berarti, dengan penambahan LF dan kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, mampu meningkatkan persentase hidup spermatozoa sapi potong PO.



Gambar 7. Rataan dan simpangan baku persentase hidup spermatozoa setelah penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.

5.3. Daya Resistensi Spermatozoa

Daya resistensi ditunjukkan oleh besarnya angka resistensi, diperoleh dari hasil uji dengan menggunakan larutan NaCl 1% yang ditambahkan ke dalam semen, dan diperiksa secara mikroskopis pergerakan spermatozoa sapi potong PO, dilakukan 2 hari setelah simpan beku dari semen kelompok kontrol, kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 10 dibawah ini.

Tabel 10. Rataan dan simpangan baku daya resistensi spermatozoa kelompok penambahan Lactoferrin (LF), kelompok Vitamin E (VE), kelompok kombinasi LF dan VE dan kelompok kontrol, pada semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari

PERLAKUAN	RATAAN ± SIMPANGAN BAKU
LF	4785,71 ± 636,21 ^a
VE	4428,57 ± 449,87 ^a
Kombinasi LF dan VE	4857,14 ± 690,07 ^a
Kontrol	3928,57 ± 449,87 ^c

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) diantara perlakuan.

Dari Tabel 10 tampak, bahwa pada kelompok LF dengan rataannya $4785,71 \pm 636,21$, kelompok VE dengan rataannya $4428,57 \pm 449,87$ dan kelompok kombinasi LF dan VE dengan rataannya $4857,14 \pm 690,07$ pada semen yang telah diencerkan sebelum disimpan beku selama 2 hari, dan kelompok kontrol dengan rataannya $3928,57 \pm 449,87$, menunjukkan peningkatan daya resistensi spermatozoa dengan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Untuk membuktikannya, dilakukan analisis varian satu arah, yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 11.

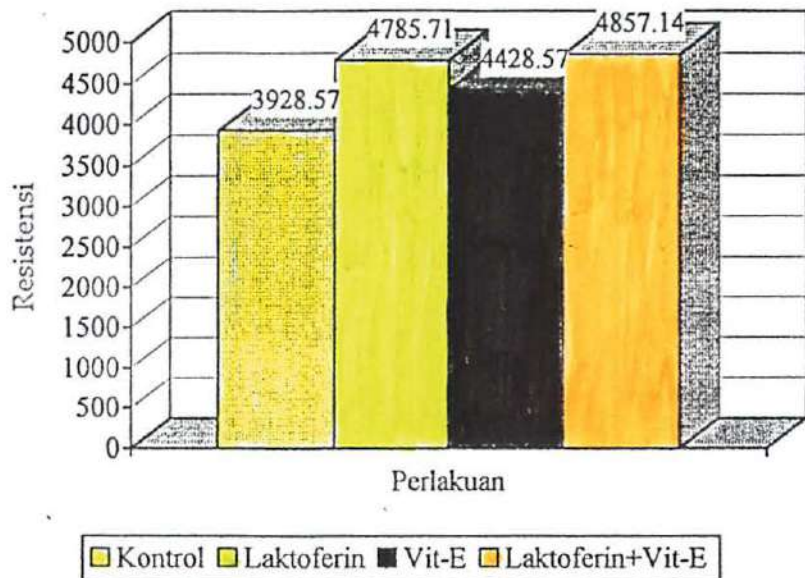
Table 11. Rangkuman analisis varian satu arah terhadap daya resistensi spermatozoa

SUMBER	JK	db	KT	F	Sig.
Kel.	3785714,3	3	1261904,762	3,926	.021
Galat	7714285,7	24	321428,571		

Berdasarkan hasil seperti tertera pada Tabel 11, dapat dibuktikan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) peningkatan daya resistensi spermatozoa pada semua kelompok perlakuan pada semen yang telah diencerkan sebelum disimpan beku selama 2 hari.

Ini berarti dengan penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, bermakna untuk meningkatkan daya resistensi spermatozoa sapi potong PO.

Selanjutnya untuk menentukan perbedaan antar kelompok yang mana paling baik, diperlukan uji Beda Nyata Terkecil, yang hasilnya tersaji pada Lampiran 9.



Gambar 8. Rataan dan simpangan baku daya resistensi spermatozoa setelah penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE, dibandingkan dengan kontrol.

Dengan uji Beda Nyata Terkecil dapat ditunjukkan, bahwa kelompok kontrol tampak sangat berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) bila dibandingkan kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE, pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari. Kelompok LF dibandingkan dengan

kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE, terlihat tidak berbeda ($p>0,05$). Demikian pula, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE, tampak tidak berbeda ($p>0,05$).

Ini berarti, bahwa dengan penambahan kedua bahan perlakuan secara sendiri-sendiri (LF / VE) maupun dalam bentuk kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, mampu meningkatkan daya resistensi spermatozoa sapi potong PO, dengan bermakna ($p<0,05$).

Secara keseluruhan, data yang telah dianalisis statistik dengan analisis varian satu arah, tentang pengaruh penambahan LF dan VE, kombinasi LF dan VE serta kontrol, terhadap motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa, dapat disajikan pada Tabel 12 berikut ini.

Tabel 12. Rekapitulasi Analisis Statistik Hasil Penelitian dengan ANAVA Satu Arah

PENGAMATAN PERLAKUAN	MOTILITAS	PERSEN TASE HIDUP	DAYA RESISTENSI
LACTOFERRIN	71,43±2,44 ^a	87,86±2,67 ^a	4785,71±636,21 ^a
VITAMIN E	66,43±4,76 ^b	82,14±2,67 ^b	4428,57±449,87 ^a
KOMBINASI LF-VE	72,14±2,67 ^a	86,43±2,44 ^a	4857,14±690,07 ^a
KONTROL	47,14±2,67 ^c	81,43±2,44 ^b	3928,57±449,87 ^c
PROB.	P<0,01	P<0,01	P<0,05

Superskrip berbeda pada kolom yang sama berbeda sangat nyata ($p<0,01$) dan berbeda nyata ($p<0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Motilitas Spermatozoa

Berdasarkan penelitian perlakuan penambahan Lactoferrin (LF) dan Vitamin E (VE) pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, terhadap motilitas spermatozoa sapi potong Peranakan Ongole (PO), setelah dianalisis dengan ANAVA satu arah, hasilnya ternyata dapat meningkatkan motilitas spermatozoa dengan sangat bermakna ($p < 0,01$).

Ternyata, walaupun telah ada di permukaan spermatozoa dan di dalam seminal plasma, peran LF terhadap motilitas spermatozoa berdasarkan penelitian ini, pada kelompok kontrol menunjukkan hasil yang paling rendah, bila dibandingkan dengan ketiga kelompok perlakuan yang lain. Sedangkan kelompok kontrol ini, merupakan standar kualitas semen beku yang diproduksi oleh Balai Inseminasi Buatan Singosari.

Hal ini mungkin terjadi akibat kurangnya kadar LF dalam seminal plasma, karena memang kondisi tubuh maupun kualitas spermatozoa pejantan produktif sapi potong PO yang ditampung semen segarnya sebagai sampel penelitian, dalam keadaan baik. Bila dikaitkan dengan pendapat Buckett *et al.* (1997) dalam penelitiannya pada semen manusia, yang menyatakan bahwa terjadi peningkatan kadar LF dalam seminal plasma pada keadaan *oligospermia* maupun *oligoasthenospermia*.

Secara fisiologis, LF sebenarnya telah dihasilkan sendiri oleh tubuh. Menurut Nikolaev (1985) dan Levay and Viljoen (1995), LF diproduksi oleh sel neutrofil dan sel-sel lainnya, yang didapatkan dalam jumlah banyak pada kolostrum air susu manusia (7 mg/ml), seminal plasma sapi (0,4 – 1,9 mg/ml) serta cairan biologis tubuh lainnya, seperti saliva, spermatozoa, air mata, air susu mamalia, cairan sinovial.

Penambahan LF dengan dosis kecil sekalipun ternyata spermatozoa telah memberikan respon, dengan meningkatnya motilitas. Sehingga pada perlakuan penambahan kombinasi LF dan VE, dimungkinkan peningkatan motilitas spermatozoa, sebagian besar sebagai peran LF.

Pada penelitian ini, dengan perlakuan penambahan LF dengan dosis (0,5 mg/ml) ke dalam semen yang telah diencerkan dan disimpan beku selama 2 hari, ternyata menunjukkan peningkatan motilitas spermatozoa sapi potong PO dengan sangat bermakna. Hasil ini sesuai dengan pendapat Tjokronegoro (1979), yang menyatakan bahwa LF sebagai *forward motility protein*, yang dihasilkan oleh kelenjar vesikula seminalis yang banyak dikeluarkan pada sapi, dapat merangsang motilitas spermatozoa agar bergerak lebih cepat.

Menurut Zakaria (1995), LF sebagai antioksidan endogen berfungsi menangkal dan menetralsir terbentuknya radikal bebas oksigen dan menghalangi menumpuknya peroksida lipida pada permukaan membran sel spermatozoa, yang dapat mengakibatkan rusaknya membran sel dan akrosom. Dengan tetap utuhnya membran sel dan akrosom, berikut perangkat struktur

spermatozoa, maka spermatozoa akan tetap hidup dan tetap bergerak maju, untuk melaksanakan fungsinya membuahi sel ovum.

Menurut Sosroatmodjo dan Tjokronegoro (1979) yang didukung pendapat Roitt (1986), menyatakan bahwa LF sebagai *sperm coating antigen* dan *iron binding protein* menghambat perkembangbiakan bakteri pengguna zat besi, dengan cara mengikat zat besi (Fe^{3+}) yang dibutuhkan oleh bakteri gram positif dan negatif. Pendapat ini ditekankan lebih lanjut oleh Tizard (1995), bahwa sebagai protein pengikat zat besi, LF merupakan pelindung non immunologis yang terdapat pada jaringan dan cairan biologis tubuh.

Oleh Rona (1996), ditambahkan bahwa LF membantu menangkap zat besi yang diperlukan bakteri dan memasukkannya ke dalam sel darah merah dan merangsang oksigenasi sel maupun jaringan tubuh. Oksigenasi yang tetap berjalan dalam sel menjamin berlangsungnya proses metabolisme, yang akan menghasilkan energi untuk pergerakannya.

Sedang Veselky (1985) berpendapat, bahwa LF berguna sebagai faktor utama pertahanan tubuh terhadap invasi bakteri, antigen diserap oleh spermatozoa selama ejakulasi untuk melindungi spermatozoa terhadap sistem imun pada saluran reproduksi betina. Memang sampai saat ini belum ada penelitian yang dapat membuktikan, bahwa LF terdapat juga dalam saluran reproduksi betina, yang mungkin dapat menimbulkan antibodi terhadap LF yang berasal dari saluran reproduksi jantan, maupun keadaan toksik bagi sapi betina.

Pengaruh toksik oleh akibat adanya LF dalam tubuh, sampai saat ini memang belum pernah dilaporkan. Bila hal ini terjadi, tetapi belum terbukti

kebenarannya, maka tentunya tidak mungkin LF ditambahkan (*enrichment*) pada produk komersial keperluan manusia, seperti makanan bayi, pasta gigi dan produk kosmetik, yang telah dilakukan dalam waktu cukup lama (Rona, 1996).

Perlakuan penambahan pada kelompok VE, ternyata hasilnya lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kombinasi LF dan VE maupun kelompok LF, untuk meningkatkan motilitas spermatozoa sapi potong PO.

Vitamin E, menurut Zakaria (1995) merupakan antioksidan eksogen, yang harus diperoleh dari luar tubuh, dalam bentuk *natural* dari makanan maupun bentuk sintesis yang telah dikemas. Dari penelitian ini, ternyata VE dapat meningkatkan motilitas spermatozoa sapi potong PO. Bahkan pemberian penambahan bersama-sama dengan LF, memperlihatkan peningkatan motilitas spermatozoa dengan sangat signifikan, di mana hasilnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan pemberian dengan cara sendiri-sendiri (LF / VE).

Penelitian dengan menambahkan VE dengan dosis 0,15 mg/ml dalam semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, ternyata hasilnya dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, pada kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE. Hasil ini sesuai dengan pendapat Askari *et al* (1994), yang menyatakan bahwa penambahan VE dalam semen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Lebih lanjut dijelaskan, bahwa secara invitro, VE dalam spermatozoa dapat mengikat bahan-bahan oksidan atau radikal bebas dan mencegah akumulasi ROS, akibat meningkatnya peroksidasi lipida yang dapat merusak membran sel dan akrosom.

Dengan terlindungnya spermatozoa dari pengaruh luar yang merugikan dan terjamin ketersediaan oksigen yang dibutuhkan dalam metabolisme spermatozoa, maka aktifitas spermatozoa akan stabil dan baik kualitasnya.

Menurut Adisetya *et al* (1979), bahwa VE mempunyai efek terhadap metabolisme karbohidrat dan lemak, yang pengaruhnya selalu pada berbagai enzim oksidatif, sehingga dapat melindungi sel dan jaringan tubuh. Pada jaringan testes, VE dapat meningkatkan metabolisme, sehingga berakibat proses *spermatogenesis* menjadi lebih baik, morfologi spermatozoa menjadi normal dan motilitas menjadi lebih cepat.

Hsu *et al.* (1998) menerangkan, bahwa penambahan VE dapat mengurangi generasi ROS, mencegah hilangnya motilitas dan kemampuan penetrasi spermatozoa pada oosit tikus.

Dari hasil penelitian dengan perlakuan penambahan kombinasi LF dan VE, menunjukkan adanya *efek sinergistik* antara LF dan VE, untuk meningkatkan motilitas spermatozoa sapi potong PO.

Pengolahan semen yang kurang benar dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Kerusakan ini, menurut Check *et al.* (1991) dan Wheeler (1996), dapat menghasilkan beberapa zat yang dapat mengganggu keutuhan membran sel, merusak mitokondria dan akrosom serta enzim, sehingga mempengaruhi struktur dan fungsi, serta mengganggu motilitas spermatozoa.

Perlakuan penambahan LF maupun penambahan kombinasi LF dan VE ternyata sama baiknya, tidak ada perbedaan dalam meningkatkan motilitas

spermatozoa, dibandingkan penambahan dengan VE, lebih-lebih bila dibandingkan dengan kontrol.

Dengan demikian, untuk meningkatkan motilitas spermatozoa pada produksi semen beku guna keberhasilan inseminasi buatan pada sapi potong PO, secara ekonomis, dapat dilakukan dengan menambahkan LF atau VE atau kombinasi keduanya dalam semen yang telah diencerkan.

Tetapi apakah dengan peningkatan motilitas spermatozoa, dapat menjamin peningkatan fertilitas spermatozoa untuk membuahi sel ovum. Ini suatu masalah lain dan harus ditindak lanjuti dengan penelitian berikutnya.

6.2. Persentase Hidup Spermatozoa

Berdasarkan hasil penelitian dengan perlakuan penambahan LF dan VE pada kelompok LF, kelompok VE dan kelompok kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, untuk mengetahui pengaruhnya terhadap persentase hidup spermatozoa, ternyata menghasilkan perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$), khususnya kelompok LF dan kelompok kombinasi LF dan VE. Kedua kelompok ini ternyata paling baik dan sama baiknya untuk meningkatkan motilitas spermatozoa sapi potong PO, dibandingkan kelompok VE dan kelompok kontrol.

Dari analisis statistik, ternyata kelompok VE sama dengan kelompok kontrol, tidak dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

Thaler *et al.* (1990) serta Sosroatmodjo dan Tjokronegoro (1979) menjelaskan, bahwa LF terikat erat pada permukaan spermatozoa dan

merupakan komponen utama *sperm coating antigen*, bersama-sama *immunoglobulin G (Ig G)*. LF berfungsi melapisi dan melindungi spermatozoa dari pengaruh luar yang sangat merugikan. Karena tidak ada kerusakan pada membran sel dan akrosom, spermatozoa tetap bertahan hidup.

Selanjutnya, menurut Bellanti (1985) dan Tizard (1988), untuk mengantisipasi invasi bakteri dalam semen, yang akan menghasilkan metabolit sebagai hasil metabolisme, *neutrofil* melepaskan sediaan LF, sehingga di dalam semen akan berfungsi meningkatkan daya bakteriosidal. Ditunjang pula dengan antibiotika (*Penisilin dan Streptomisin*) pada saat pembuatan pengencer semen, dan LF sebagai bahan perlakuan saat semen yang telah diencerkan dimasukkan straw untuk disimpan beku dalam Nitrogen cair, akan lebih meningkatkan daya bakteriosidalnya. Akibatnya, spermatozoa dapat tetap hidup dan jumlah spermatozoa yang bertahan hidup menjadi semakin meningkat, sehingga dapat meningkatkan kualitas spermatozoa.

Tidak meningkatnya persentase hidup spermatozoa setelah ditambahkan VE dengan dosis 0,15 mg/ml pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, mungkin karena kurangnya dosis yang ditambahkan ke dalamnya. Dimungkinkan pula, kadar Vitamin E dalam tubuh pejantan sapi potong PO sangat rendah, karena tidak dapat diserap oleh usus ataupun rendahnya kandungan Vitamin E dalam ransum pakan.

Hasil penelitian dengan perlakuan penambahan VE dalam semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, ternyata tidak sejalan dengan pendapat O'Flaherty *et al.* (1997). Peneliti ini menyatakan, bahwa VE melindungi

membran sel spermatozoa terhadap kerusakan oksidatif, di samping VE dibutuhkan dalam respirasi sel dan membantu sistem berjalan lebih baik pada kondisi kekurangan oksigen. Dengan mekanisme ini, spermatozoa dapat tetap mempertahankan hidupnya, karena terhindar dari kerusakan membran sel dan akrosom.

Askari *et al* (1994), berpendapat bahwa secara invitro, VE dalam spermatozoa dapat mengikat bahan-bahan oksidan atau radikal bebas dan mencegah akumulasi ROS, akibat meningkatnya peroksidasi lipida yang dapat merusak membran sel dan akrosom, sehingga spermatozoa tetap hidup.

Menurut Surai *et al* (1998), bahwa peningkatan konsentrasi VE dalam spermatozoa dan seminal plasma dapat mengurangi kepekaan spermatozoa terhadap peroksidasi lipida, sehingga mampu meningkatkan metabolisme dan memperbaiki morfologi spermatozoa.

Menurut Hughes *et al.* (1998), Vitamin E dapat melindungi spermatozoa, karena Vitamin E dalam spermatozoa dapat mengikat bahan-bahan oksidan atau radikal bebas dan mencegah akumulasi ROS, akibat meningkatnya peroksidasi lipida yang dapat merusak membran sel dan akrosom, serta melindungi keutuhan DNA spermatozoa.

Menurut Adisetya *et al* (1979), bahwa VE mempunyai efek terhadap metabolisme karbohidrat dan lemak, yang pengaruhnya selalu pada berbagai enzim oksidatif, sehingga dapat melindungi sel dan jaringan tubuh dari kerusakan membran sel.

Menurut Stephens *et al.* (1996), VE adalah larutan lemak antioksidan yang melindungi tubuh dari radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme asam lemak. Sangat efektif menghambat efek penuaan, membantu oksigensi dalam darah. Dibutuhkan pada respirasi sel dan membantu sistem yang sedang dalam kondisi kekurangan oksigen, serta sangat baik berperan pada sistem reproduksi.

Menurut Check *et al.* (1991) dan Wheeler (1996), kerusakan akibat pengolahan semen yang kurang baik dapat menghasilkan beberapa zat yang dapat mengganggu keutuhan membran sel, merusak mitokondria dan akrosom serta enzim, sehingga mempengaruhi struktur dan fungsi spermatozoa. Hal ini dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

6.3. Daya Resistensi Spermatozoa

Dari hasil penelitian dengan perlakuan penambahan LF dan VE pada kelompok LF, kelompok VE, kelompok kombinasi LF dan VE, pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum disimpan beku selama 2 hari, untuk mengetahui pengaruhnya terhadap daya resistensi spermatozoa (yang ditunjukkan dengan besarnya daya resistensi), diperoleh hasil berupa perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada semua perlakuan, dibandingkan kelompok kontrol.

Angka resistensi yang tinggi memberi makna akan tingginya daya resistensi spermatozoa. Hal ini tentunya dapat memberikan nilai tambah pada kualitas spermatozoa yang diproduksi Balai Inseminasi Buatan Singosari, untuk keperluan inseminasi buatan.

Menurut Hardjopranjoto (1995), di dalam larutan kuat, NaCl 1% akan menghentikan gerakan spermatozoa, karena berkemampuan merusak membran lipida spermatozoa.

Selanjutnya menurut Thaler *et al.* (1990), peran LF sebagai *sperm coating antigen* yang melekat erat pada permukaan spermatozoa akan melindungi membran sel dan akrosom spermatozoa dari pengaruh luar, sehingga membran sel spermatozoa tetap kuat dan utuh untuk menanggulangi pengaruh larutan NaCl 1%.

Sosroatmodjo dan Tjokronegoro (1979) menjelaskan, bahwa LF berfungsi melapisi dan melindungi dari pengaruh luar yang sangat merugikan bagi spermatozoa. Karena tidak adanya kerusakan pada membran sel dan akrosom, maka spermatozoa tetap bertahan untuk menanggulangi pengaruh dari luar, sampai batas toleransi kemampuan pertahanan membran selnya.

Menurut O'Flaherty *et al.* (1997), VE melindungi membran sel spermatozoa terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh pengaruh luar. Seperti halnya LF, maka VE akan melindungi pula membran sel spermatozoa dari pengaruh larutan kuat NaCl 1%.

Sedang oleh Stephens *et al.* (1996) dijelaskan, bahwa VE adalah larutan lemak antioksidan yang melindungi tubuh dari radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme asam lemak, sehingga spermatozoa juga terlindung dari pengaruh radikal bebas, yang dihasilkan oleh spermatozoa sendiri maupun dari seminal plasma.

Adisetya *et al* (1979), menerangkan bahwa VE mempunyai efek terhadap metabolisme karbohidrat dan lemak, yang pengaruhnya selalu pada berbagai enzim oksidatif, sehingga dapat melindungi sel dan jaringan tubuh dari kerusakan membran sel.

Secara sendiri-sendiri (LF / VE) maupun kombinasi LF dan VE akan melindungi membran sel spermatozoa dari pengaruh kuat larutan NaCl 1% dan tetap hidup walaupun dalam pengenceran tinggi dalam larutan NaCl 1%.

Menurut Toelihere (1985), spermatozoa sapi jantan yang baik, angka resistensinya berkisar pada 500 – 20.000, sedang semen yang baik untuk keperluan inseminasi buatan harus mempunyai daya resistensi > 3.000.

Hardjopranto (1979) menjelaskan, bahwa angka resistensi spermatozoa yang tinggi menunjukkan daya resistensi yang tinggi pula, dan berarti menunjukkan kualitas spermatozoa yang baik. Sebaliknya, spermatozoa yang berkualitas rendah, mempunyai daya resistensi yang rendah, yang ditunjukkan dengan angka resistensi yang rendah.

Hasil penelitian yang telah dianalisis statistik, menunjukkan bahwa kelompok kombinasi LF dan VE, kelompok LF, kelompok VE sama baiknya untuk meningkatkan daya resistensi spermatozoa. Ini berarti perlakuan penambahan LF dan atau VE sama baiknya, dan ini menunjukkan adanya *efek sinergisme* antara LF dan VE, untuk meningkatkan daya resistensi spermatozoa sapi potong PO.

Hal ini dapat membuktikan pula, bahwa dengan perlakuan penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE dalam semen sapi potong PO yang telah

diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, menunjukkan daya resistensi yang tinggi dibandingkan dengan daya resistensi yang disyaratkan untuk keperluan inseminasi buatan.

Berdasarkan penelitian yang telah dianalisis statistik, menunjukkan bahwa dengan perlakuan penambahan LF dan kombinasi LF dan VE pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, ternyata dapat meningkatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa dengan sangat bermakna ($p < 0,01$).

Demikian pula halnya terhadap daya resistensi spermatozoa. Dari hasil penelitian, membuktikan adanya peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) untuk daya resistensi spermatozoa, setelah ditambahkan LF dan VE maupun kombinasi LF dan VE.

Pada perlakuan penambahan VE pada kelompok VE dalam semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, ternyata pengaruhnya tidak sama baiknya bila dibandingkan dengan penambahan LF atau kombinasi LF dan VE. Hal ini mungkin disebabkan karena VE sebagai antioksidan eksogen yang larut dalam lemak, harus selalu diperoleh dari luar tubuh dan tidak dapat larut maksimal dalam cairan biologis tubuh, sehingga sulit diserap dan menyatu dengan sel dan jaringan tubuh.

Pada penelitian ini, dosis VE (0,15 mg/ml) yang ditambahkan pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku, sangat mungkin kurang, sehingga masih memerlukan dosis yang lebih tinggi pada pemberian tunggal, agar pengaruhnya pada peningkatan viabilitas spermatozoa dapat sejajar dengan penambahan LF maupun kombinasi LF dan VE.

Pada kontrol, rataan persentase hidup spermatozoa dapat mencapai lebih dari 81%, sedang pada sampel yang sama motilitasnya hanya mencapai rataan 47% lebih. Persentase hidup spermatozoa yang tinggi tidak selalu diikuti dengan motilitas yang tinggi pula. Sehingga dapat diartikan, walaupun spermatozoa hidup, tetapi mungkin tidak bergerak. Hal ini dapat terjadi karena, spermatozoa tidak dapat menerima kondisi media yang dibuat pada pengencer semen, lingkungan suhu yang dibuat sehingga mengalami *cold shock*, atau adanya pengaruh dari radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme sel sebagai komponen plasma semen maupun sel spermatozoa sendiri. Kemungkinan lain, adalah masih kuatnya pengaruh bakteri dalam plasma semen, sehingga mempengaruhi fungsi spermatozoa dan adanya gangguan pada fungsi ekor sebagai penggerak spermatozoa.

Berkat penelitian ini, yang ditunjang oleh hasil penelitian terdahulu pada semen hewan lain, menunjukkan bahwa benar, dengan penambahan LF dan kombinasi LF dan VE pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari dapat meningkatkan motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa, yang dapat diartikan pula terjadinya peningkatan kualitas spermatozoa. Khususnya perlakuan penambahan VE, hanya tampak berpengaruh pada peningkatan daya resistensi spermatozoa.

Harapan akan terjadinya efisiensi ejakulat semen, dengan pengurangan konsentrasi spermatozoa pada produksi *mini straw* semen beku untuk keperluan inseminasi buatan, dapat ditindak lanjuti, setelah melalui berbagai rangkaian penelitian lagi.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan dengan penambahan LF, VE dan kombinasi LF dan VE pada semen sapi potong Peranakan Ongole (PO) yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Penambahan LF dengan dosis 0,5 mg/ml dan penambahan kombinasi LF dan VE dengan dosis 0,5 mg/ml dan 0,15 mg/ml, pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, ternyata dapat meningkatkan motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa.
2. Penambahan VE dengan dosis 0,15 mg/ml pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, ternyata hanya dapat meningkatkan daya resistensi spermatozoa.
3. Penambahan LF atau kombinasi LF dan VE pada semen yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, ternyata dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa sapi potong PO.

SARAN

1. Penelitian ini merupakan penelitian awal dengan memberikan perlakuan penambahan pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, dengan dosis perlakuan penambahan LF (0,5 mg/ml) dan kombinasi LF dan VE (0,5 mg/ml dan 0,15 mg/ml), ternyata terjadi peningkatan

yang sangat bermakna pada motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa. Bila dimungkinkan, dapat dilakukan penelitian lanjutan tentang apakah dengan peningkatan motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa dan menjamin peningkatan daya fertilitas spermatozoa untuk membuahi sel ovum. Penelitian lanjutan yang dapat diterapkan untuk menguji kemampuan daya fertilitas spermatozoa, setelah ditambahkan LF dan kombinasi LF dan VE sebelum simpan beku, adalah uji *Oosit Hamster* bebas zona, uji pengikatan zona pellusida dan uji reaksi akrosom pada semen sapi potong Peranakan Ongole (PO).

2. Memperhatikan Lactoferrin diproduksi oleh sel-sel di dalam tubuh (khususnya sel *neutrofil*), yang berada dalam sistem sirkulasi darah, penelitian lanjutan dapat diterapkan dengan meneliti ada tidaknya pengaruh Lactoferrin pada saluran reproduksi betina dan pengaruhnya pada spermatozoa yang telah di inseminasikan (penelitian *AntiSperm Antibodi : ASA*).
3. Memperhatikan keberhasilan penelitian dengan perlakuan penambahan LF, kombinasi LF dan VE pada semen sapi potong PO yang telah diencerkan sebelum simpan beku selama 2 hari, yang ditunjukkan oleh peningkatan motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa dengan sangat bermakna, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk pengurangan konsentrasi spermatozoa pada produksi semen beku per straw, agar diperoleh manfaat efisiensi ejakulat semen.
4. Penelitian lanjutan untuk mengetahui fungsi spermatozoa secara lengkap, dapat mendasari perubahan yang akan dilakukan. Tentunya harus diperhatikan pula nilai ekonomis penambahan bahan tersebut (LF sendiri atau kombinasi LF dan VE)

pada produksi straw semen beku, ditinjau dari segi biaya produksi dan manfaat di lapangan, mungkin, dengan makin tingginya harga yang harus dipikul peternak dan keberhasilan konsepsi pada sapi potong betina Peranakan Ongole.

DAFTAR PUSTAKA

- Adimoelja F.X.A., 1988. Infertilitas, hormon seks dan poros hipotalamus-pituitari-gonad. **Program pustaka prodia**. Seri hormon reproduksi 01. Laboratorium Biomedik. Fakultas Kedokteran UNAIR. Surabaya.
- Adisetya P., Tendean O., Amitaba I.G.B. dan Adimoelja F.X.A., 1979. Treatment of male infertility with adenosine tri phosphate and tocopherol. **Spermatologi. Prosiding simposium spermatologi**. Surabaya.
- Anonim, 1992. **Penuntun laboratorium WHO untuk pemeriksaan semen manusia dan interaksi sperma getah servik**. Edisi ke-3. Dalam bahasa Indonesia. Bagian Biologi Medik. Fakultas Kedokteran. Universitas Sriwijaya.
- Anonim, 1995. **Biennial report**. 1994-1995. WHO. Geneva.
- Arsyad K.M. dan Hayati L., 1994. **Pemeriksaan semen manusia dan interaksi sperma - getah servik**. Edisi ke-3. Bagian Biomedik. Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Palembang.
- Askari H.A., Check J.H., Peymer N. and Bollendorf A., 1994. Effect of natural antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. **Archives of andrology** 33 : 11 - 15.
- Autiero M., Sansone G. and Abrescia P., 1991. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **J. Androl.** 12(3) : 191-200.
- Beconi M.T., Affranchino M.A., Schang L.M. and Beorlegui N.B., 1991. Influence of antioxidant on SOD activity in bovine sperm. **Biochem. Int.** (3) : 545 - 53.
- Bellanti J.A., 1985. **Immunology III**. Igaku-shoin / Saunders International Editon. WB. Saunders Co. : 26-30.
- Buckett W.M., Luckas M.J., Gazvani M.R., Aird I.A. and Lewis-Jones D.I., 1997. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. **J. Androl.** 18(3) : 302-4.
- Campbell J.R. and Lasley J.F., 1975. **The science of animal that serve mankind**. Second edition. Mc Graw-Hill Book Co. New York. pp. 23 - 261.



- Check M.L., Check J.H. and Long R., 1991. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Archives of andrology* 27 : 155 - 160.
- Cross N.L. and Hanks S.E., 1991. Effects of cryopresevation on human sperm acrosomes. *Human reprod.* 6 : 1279 - 1283.
- De Jonge C.J., Tarchala S.M., Rawlins R.G., Binor Z. and Radvanska E., 1993. Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and invitro fertilization. *Human reprod.* 8 : 253 - 257.
- Ellison R.T., 1994. The effect of lactoferrin on gram negative bacteria. *Adv.Exp.Med.Biol.* 357 : 71-90.
- Evans G. and Maxwell W.M.C., 1987. *Salamon artificial insemination of sheep and goats.* Butter Worths. Sydney.
- Gavella M., Lipovac V., Uuck M. and Rock B., 1996. Superoxide anion scavenging capacity of human plasma sperma. *Int. J. Androl.* 19 : 82-90.
- Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N., Lessing J.B., Lerner-Geva L. and Amit A., 1996. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in-vitro fertilization program. *Fertil. Steril.* 66(3) : 430 - 4.
- Goltz J.S., Gardner T.K., Kanous K.S. and Lindemann C.B., 1988. The interaction of pH and adenosine 3',5'-monophosphate on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. *Biol. Reprod.* 39 : 1129-1136.
- Hafez E.S.E., 1987. Semen evaluation. In : *Reproduction in farm animals.* 5th ed. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 455-480.
- Hafez E.S.E., 1993. *Reproduction in farm animals.* 5th ed. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 189-210.
- Hammit D.G., Bedia E., Rogers P., Syrop C.H., Donovan J.F. and Williamson R.A., 1989. Comparison of motility stimulants for cryopreseved human semen. *Fertility and Sterility* 52 : 495-502.
- Hecht N.B., 1990. Regulation of haploid expressed genes in male germ cells. *J. Reprod. Fert.* 88 : 679-693.

- Hardjopranjoto S., 1979. Pengaruh musim terhadap kualitas dan kuantitas sperma pada domba ekor gemuk. **Prosiding simposium spermatologi Surabaya. Perkumpulan Andrologi Indonesia.**
- Hardjopranjoto S., 1995. **Ilmu kemajiran pada ternak.** Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 306.
- Hidiroglou M., Batra T.R. and Zhao X., 1997. Bioavailability of vitamin E compounds and the effect of supplementation on release of superoxide and hydrogen peroxide by bovine neutrophils. **J. Dairy Sci.** 80(1) : 187-93.
- Hinting A. dan Marlinata A., 1981. Beberapa obat yang meningkatkan energi spermatozoa. In : **Spermatogenesis. Prosiding seminar.** (Arsyad KM. ed.). PANDI. Surabaya.
- Hinting A., 1997. **ART pada infertilitas pria. Pelatihan standarisasi penatalaksanaan infertilitas wanita dan pria.** Gramik FK. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hsu P.C., Liu M.Y., Hsu C.C., Chen L.Y. and Guo Y.L., 1998. Effect of vitamin E and/or vitamin C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology** 128(3) : 169 - 79.
- Hunter R.H.F., 1980. **Physiology and technology of reproduction in female domestic animals.** Academic Press. School of agriculture. University of Edinburgh.
- Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J. and Thompson W., 1998. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation human sperm DNA integrity. **Hum. Reprod.** 13(5) : 1240-7.
- Ismudiono, 1999. **Fisiologi reproduksi pada ternak.** Edisi kedua. Laboratorium fisiologi reproduksi. Jurusan reproduksi dan kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Iwasaki A. and Gagnon C., 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and sterility.** Volume 57 no. 2.
- Jin Y.Z., Bannai S., Dacheux F., Dacheux J.L. and Okamura N., 1997. Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis. **Mol. Reprod. Dev.** 47(4) : 490-6.

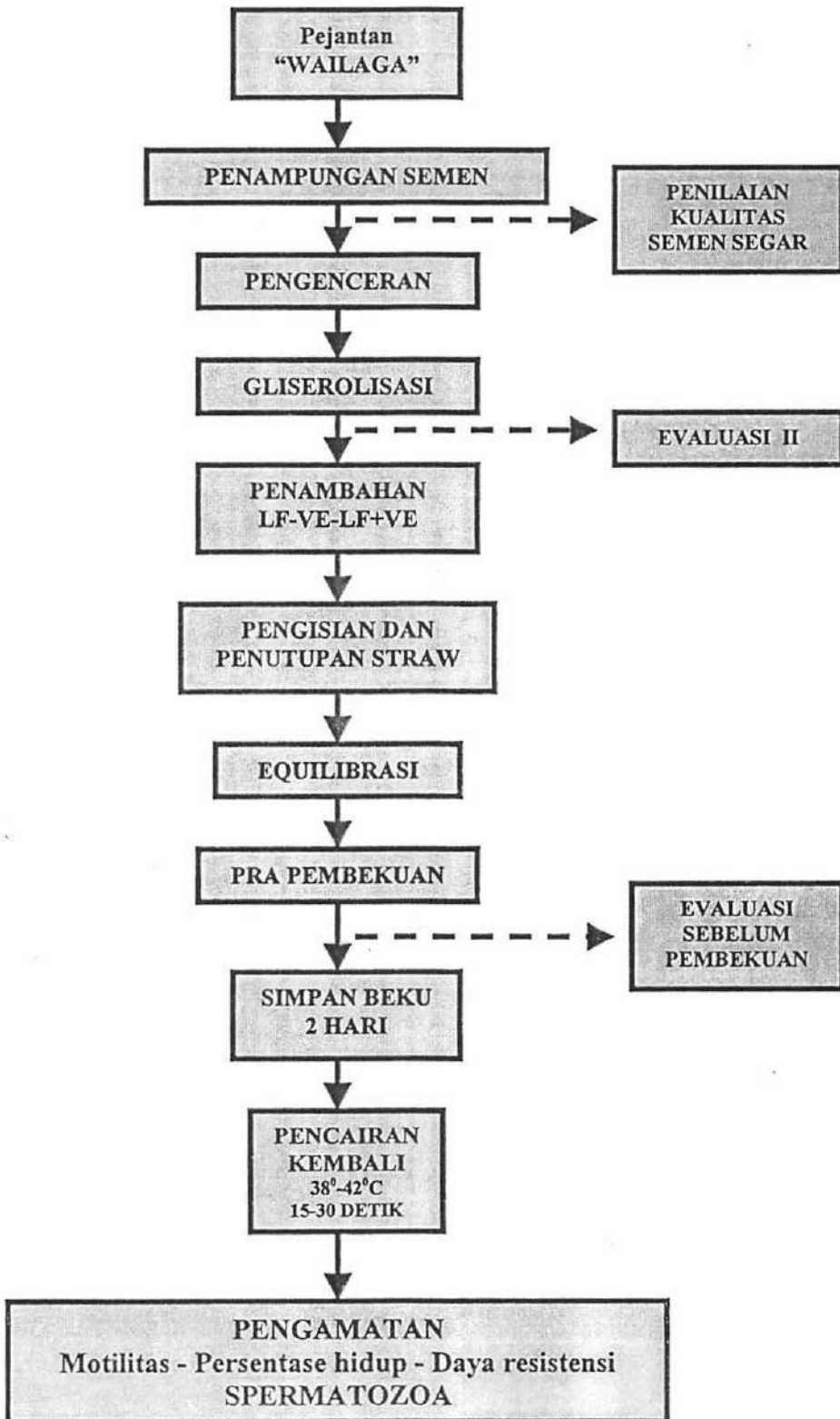
- Levay P.F. and Viljoen M., 1995. Lactoferrin : A general review. *Spermatologia* 80(3) : 252-67.
- Memon V.A. and Ott R.S., 1981. Methodes of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Rev. Anim. Prod.* 17 : 19-26.
- Morrow D.A., 1980. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia. W.B. Saunders.
- Moeloek N., 1979. Sperma manusia. *Spermatologi. Prosiding simposium spermatologi*. Surabaya.
- Mulyo S., 1979. Spermatologi untuk peningkatan mutu genetik dan produktifitas ternak dalam rangka penyediaan pangan. *Spermatologi. Prosiding simposium spermatologi*. Surabaya.
- Na'im R., 1996. Aktifitas antimikroba plasma semen. *Fertilitas. Cermin Dunia Kedokteran* 112 : 19.
- Nalbandov A.V., 1990. *Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas*. Edisi ketiga. Penerbit Universitas Indonesia.
- Nikolaev A.A. and Anshakova N.I., 1985. Immunochemical and physico-chemical characteristics of lactoferrin in human body fluids. *Vopr. Med. Khim.* 31 (3) : 128-32.
- O'Flaherty C., Beconi M. and Beorlegui N., 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation on frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* (5) : 269-75.
- Partodihardjo S., 1992. *Ilmu reproduksi hewan*. Cetakan ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Peter A.R. and Ball P.J.H., 1986. *Reproduction in cattle*. Butterworths. London. p. 58.
- Ridwan E., 1997. Tempe mampu menghambat proses ketuaan. *Gizi dan fertilitas. Cermin dunia kedokteran* 120 : 13-15.
- Rijnders P.M., Verveld M., Piederiet M.H, Bras M., Lens J.W. and Zeilmaker G.H., 1996. *Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. IVF Lab. N.V. Organon. pp. 21-48.

- Rodman T.C., Winston R., Sullivan J.J., Yan X.J. and Chiorazzi N., 1997. An innate natural antibody is reactive with a cryptic sequence of lactoferrin exposed on sperm head surface. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216(3) : 404-9.
- Roitt I., 1986. *Essential Immunology*. Fifth Ed. PG Publishing PTE Ltd. Blackwell Scientific Publications. PG Asian Economy Edition.
- Rona, Z., 1996. Clinical applications : Bovine colostrum as immune system modulator. *The American Journal Of Natural Medicine* 5 (2) : 19-23.
- Sahni K.L. and Roy A., 1972. A study on the effect of deep-freezing (-79⁰C) on post-thawing revival of sheep and goat spermatozoa. *India J. Anim. Sci.* 42(2) : 102-105.
- Salisbury G.W., Van Demark N.L. and Lodge J.R., 1978. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. 2nd ed. San Fransisco. W.H. Freeman and Co.
- Sarmanu, 1992. *Diktat Pengantar Uji t dan Anova*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Sikka S.C. and Hellstrom W.J.G., 1990. Functional evaluation and motility parameters of pentoxifylline stimulated cryopreserved human sperm. *Arta* 1 : 309-319.
- Sosroatmodjo S. dan Tjokronegoro A., 1979. Antigen didalam sperma manusia. *Spermatologi. Prosiding simposium spermatologi Surabaya*.
- Steel, R.G.D. dan Torrie, J.H., 1991. *Prinsip dan prosedur statistika; Suatu pendekatan biometrik*. Ed.2. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Stephens, N.G., Parson, A. and Schofield, P.M., 1996. Randomised controlled trial of vitamin E in patient with coronary disease. *Gambridge Heart Antioxidant study (CHAOS)*. *Lancet* 347 : 781-86.
- Sudjana, 1996. *Metoda statistika*. Edisi ke-6. Penerbit Tarsito. Bandung. Hal. 299-309.
- Suhadi K., 1979. *Spermatologi. Prosiding simposium*. Diterbitkan oleh PANDI. F.K. Unair. Surabaya.
- Suhadi K., 1996. Spesies oksigen reaktif dan kualitas sperma. *Medika* 10 : 786-789.

- Surai P., Kostjuk I., Wishart G., Macpherson A., Speake B., Noble R., Ionov I. and Kutz E, 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biol. Trace Elem. Res.** 64(1-3) : 119-32.
- Tauber P.F., Zaneveld L.J., Propping D. and Schumacher G.F., 1975. Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins. **J. Reprod. Fertil.** 43(2) : 249-67.
- Thaler C.J., Vanderpuye O.A., McIntyre J.A. and Faulk W.P., 1990. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biol. Reprod.** 43(4) : 712-7.
- Tizard I.R., 1988. **Pengantar imunologi veteriner.** Airlangga University Press.
- Tizard I.R., 1995. **Immunology an introduction.** Fourth edition. Saunders College Publishing.
- Tjokronegoro A., 1979. Aspek imunologi pada sistem reproduksi pria. **Spermatologi. Prosiding simposium spermatologi Surabaya.**
- Toelihere M.R., 1985. **Inseminasi buatan pada ternak.** Cetakan II. Penerbit Angkasa. Bandung. Hal. 42-62, 75-88, 93-105.
- Toelihere M.R., 1985. **Fisiologi reproduksi pada ternak.** Penerbit Angkasa. Bandung. Hal. 92-115.
- Tournaye H., 1994. The effect of pentoxifylline on sperm function and embryonic development and its use in the treatment of male-factor infertility. **Thesis.** Vrije Universiteit Brussel. Belgium.
- Veselsky L., 1981. Immunological properties of seminal vesicle fluid. **Arch. Androl.** 7(1) : 1-7.
- Vijayaraghavan S. and Hoskin D.D., 1986. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by adenosine and its analogues. **Biol. Reprod.** 34 : 468-477.
- Wang R., Sikka S.C., Veeraragavan K., Bell M. and Hellstrom W.J.G., 1993. Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectant. **Fertility and Sterility** 60 : 711-5.

- Ward, P.P., Zhou, X. and Conneely, O.M., (1996). Cooperative interactions between the amino and carboxyl terminal lobes contribute to the unique iron binding stability of lactoferrin. *J.Biol.Chem.* 271 (22) : 12790-12794.
- Wasito B., 2000. Perbandingan persiapan sperma manusia dengan tiga macam kolom bertingkat percol yang berbeda. *Journal Kedokteran Yarsi* 8(1) : 38.
- Watson P.F. and Martin I.C.A., 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5⁰C. *Aust. J. Biol. Sci.* 28 : 145-152.
- Weiss W.P., Hogan J.S., Todhunter D.A. and Smith K.L., 1997. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80(8) : 1728-37.
- Wheeler M., 1996. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. *Int. Outline.* Dec. 09.
- White D.R. and Aitken R.J., 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete res.* 22 : 163-177
- Zainuddin M., 1988. Metodologi penelitian. *Diktat.* Hal. 73-76.
- Zakaria S., 1995. Pengaruh pentoksifilin secara invitro sebagai antioksidan terhadap motilitas sel sperma. *Tesis.* Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Zimecki M., W(łstrok)aszczyk A., Cheneau P., Brunel A.S., Mazurier J., Spik G. and Kubler A., 1998. Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 46(4) : 231-40.

Lampiran 1. Prosedur Penelitian



PENILAIAN SEMEN														
PEJANTAN PEMACEK : "WAILAGA" 29118 (PEJANTAN PRODUKTIF)														
9 TAHUN														
Asal : SUMBAWA														
BALAI INSEMINASI BUATAN SINGOSARI														
N O M O R	T G L. T A M P U N G	MAKROS KOPIS			MIKROS KOPIS		SEMEN		PENGOLAHAN SEMEN					EVAL. II B.F (%)
		W A R N A	pH	KON SIS TEN SI	GM	GI (%)	KON SEN TRA SI (juta / ml)	VOL (ml)	A-1		A-2	B		
									WKT	VOL (ml)	V O L T O T	(ml)	(ml)	
1	05.09	PS	6,6	S	2+	70	1.389	2	8.47	2	28	10,9	12,9	60
2	07.09	PS	6,4	S	2+	70	1.000	5,5	9.05	5,5	55	19,3	24,8	50
3	12.09	PS	6,4	K	2+	70	1.471	8	8.53	8	118	46,8	54,8	55
4	14.09	PS	6,5	K	2+	75	3.000	9	9.05	9	270	121,5	130,5	60
5	19.09	PS	6,4	S	2+	70	1.190	7	9.00	7	83	31,2	38,2	55
6	21.09	PS	6,6	S	2+	75	1.351	8	8.51	8	108	42	50	60
7	26.09	PS	6,5	S	2+	75	1.551	6	9.12	6	81	31,5	37,5	55

Keterangan : PS = putih susu, K = kental, S = sedang, GM = gerakan massa, GI = gerakan individu
A-1, A-2, B = jenis pengencer semen

Lampiran 3. Konversi perhitungan konsentrasi spermatozoa dengan Spectrophotometer

**KONVERSI PERHITUNGAN
KONSENTRASI SPERMATOZOA**

READING	SPERM COUNT	READING	SPERM COUNT	READING	SPERM COUNT	READING	SPERM COUNT
5.0	29.41	20.0	15.63	35.0	10.64	50.0	7.87
5.5	28.57	20.5	15.38	35.5	10.53	50.5	7.79
6.0	27.78	21.0	15.15	36.0	10.42	51.0	7.70
6.5	27.02	21.5	14.93	36.5	10.31	51.5	7.61
7.0	26.32	22.0	14.71	37.0	10.20	52.0	7.53
7.5	25.64	22.5	14.49	37.5	10.10	52.5	7.44
8.0	25.00	23.0	14.29	38.0	10.00	53.0	7.35
8.5	24.39	23.5	14.08	38.5	9.90	53.5	7.27
9.0	23.81	24.0	13.89	39.0	9.80	54.0	7.18
9.5	23.26	24.5	13.69	39.5	9.71	54.5	7.09
10.0	22.73	25.0	13.51	40.0	9.62	55.0	7.00
10.5	22.22	25.5	13.33	40.5	9.52	55.5	6.92
11.0	21.74	26.0	13.16	41.0	9.43	56.0	6.83
11.5	21.28	26.5	12.99	41.5	9.35	56.5	6.75
12.0	20.83	27.0	12.82	42.0	9.26	57.0	6.66
12.5	20.41	27.5	12.66	42.5	9.17	57.5	6.57
13.0	20.00	28.0	12.50	43.0	9.09	58.0	6.49
13.5	19.61	28.5	12.35	43.5	9.00	58.5	6.40
14.0	19.23	29.0	12.19	44.0	8.91	59.0	6.31
14.5	18.87	29.5	12.05	44.5	8.83	59.5	6.23
15.0	18.52	30.0	11.90	45.0	8.74	60.0	6.14
15.5	18.18	30.5	11.76	45.5	8.65	60.5	6.05
16.0	17.86	31.0	11.63	46.0	8.57	61.0	5.97
16.5	17.54	31.5	11.49	46.5	8.48	61.5	5.88
17.0	17.24	32.0	11.36	47.0	8.39	62.0	5.79
17.5	16.95	32.5	11.24	47.5	8.31	62.5	5.71
18.0	16.67	33.0	11.11	48.0	8.22	63.0	5.62
18.5	16.39	33.5	10.99	48.5	8.13	63.5	5.53
19.0	16.13	34.0	10.87	49.0	8.05	64.0	5.45
19.5	15.87	34.5	10.75	49.5	7.96	64.5	5.36

BALAI INSEMINASI BUATAN SINGOSARI

Lampiran 4.

TEKNIK SIMPAN BEKU SEMEN DI BIB SINGOSARI
--

1.	PERSIAPAN	Pejantan produktif, vagina buatan sapi, <i>teaser</i> , catatan
2.	PENAMPUNGAN SEMEN	1 ekor pejantan produktif ditampung 2 kali perminggu, dengan 1 ejakulasi.
	EVALUASI SEMEN SEGAR (EVALUASI I)	Makroskopis : warna , bau, konsistensi, pH, volume. Mikroskopis : gerakan massa, gerakan individu.
3.	PENGENCERAN	Susu skim, D-glukosa, kuning telur, antibiotika
4.	GLISEROLISASI	Gliserol 8%
	EVALUASI II	Mikroskopis : gerakan spermatozoa
5.	IDENTIFIKASI STRAW	- Warna mini straw disesuaikan dengan bangsa pejantan - Konsentrasi spermatozoa = 25 juta/0,25 ml.
6.	FILLING AND SEALING	Mengisi dan menutup straw dengan <i>Ultrasonic Filling Machine</i> .
7.	EQUILIBRASI	Keseimbangan kondisi semen pada penurunan suhu dari 3 ⁰ C s/d - 196 ⁰ C.
8.	PRAE FREEZING	Mengkondisikan semen pada suhu - 140 ⁰ C selama 9 menit
	EVALUASI BEFORE FREEZING	Mikroskopis : gerakan spermatozoa
9.	FREEZING	Penyimpanan beku pada suhu - 196 ⁰ C dalam Nitrogen cair
	EVALUASI III	% PTM (<i>Post Thawing Motility</i>) : 37 ⁰ - 38 ⁰ C, 15-30 detik, 2 x 24 jam penyimpanan.
10.	STORAGE (PENYIMPANAN)	Dalam kontainer berisi Nitrogen cair bersuhu - 196 ⁰ C.
	EVALUASI IV	% PTM (<i>Post Thawing Motility</i>) : 37 ⁰ - 38 ⁰ C, 15-30 detik.
11.	DISTRIBUSI SEMEN BEKU	

Sumber : BIB Singosari. Dimodifikasi.

Lampiran 5. Rekapitulasi Perolehan Data Hasil Penelitian

REKAPITULASI												
PEJANTAN PEMACEK : "WAILAGA" (29118)												
No	MOTILITAS (M) %				PERSENTASE HIDUP (% H)				DAYA RESISTENSI (R)			
	K	LF	VE	LF VE	K	LF	VE	LF VE	K	LF	VE	LF VE
1	50	75	70	75	85	90	85	90	4500	5000	5000	5500
2	45	70	65	75	80	90	80	85	4000	4500	4500	4500
3	45	70	60	70	80	85	80	85	3500	4500	4000	4500
4	50	70	70	70	80	85	80	85	4000	5000	4500	5000
5	45	70	60	70	80	90	85	85	3500	4000	4000	4000
6	50	75	70	75	85	90	85	90	4500	6000	5000	6000
7	45	70	70	70	80	85	80	85	3500	4500	4000	4500

Keterangan :

- K = Kontrol
 LF = Lactoferrin
 VE = Vitamin E
 LF-VE = Lactoferrin + Vitamin E

Lampiran 6. Ringkasan hasil pengukuran motilitas, persentase hidup dan daya resistensi spermatozoa sapi potong PO

KELOMPOK		MOTILITAS	PERSENTASE HIDUP	DAYA RESISTENSI
Kontrol	1	50	85	4500
	2	45	80	4000
	3	45	80	3500
	4	50	80	4000
	5	45	80	3500
	6	50	85	4500
	7	45	80	3500
	Total N	7	7	7
	Sum	330	570	27500
	Mean	47.14	81.43	3928.57
Std. Dev.	2.67	2.44	449.87	
Lactoferrin	1	75	90	5000
	2	70	90	4500
	3	70	85	4500
	4	70	85	5000
	5	70	90	4000
	6	75	90	6000
	7	70	85	4500
	Total N	7	7	7
	Sum	500	615	33500
	Mean	71.43	87.86	4785.71
Std. Dev.	2.44	2.67	636.21	
Vitamin E	1	70	85	5000
	2	65	80	4500
	3	60	80	4000
	4	70	80	4500
	5	60	85	4000
	6	70	85	5000
	7	70	80	4000
	Total N	7	7	7
	Sum	465	575	31000
	Mean	66.43	82.14	4428.57
Std. Dev.	4.76	2.67	449.87	
Lactoferrin Vitamin E	1	75	90	5500
	2	75	85	4500
	3	70	85	4500
	4	70	85	5000
	5	70	85	4000
	6	75	90	6000
	7	70	85	4500
	Total N	7	7	7
	Sum	505	605	34000
	Mean	72.14	86.43	4857.14
Std. Dev.	2.67	2.44	690.07	
Total	N	28	28	28
	Sum	1800	2365	126000
	Mean	64.29	84.46	4500.00
	Std. Dev.	10.78	3.69	652.63

Lampiran 7. Analisis Varian Satu Arah dan Uji Beda Nyata Terkecil untuk Motilitas Spermatozoa

Oneway, Analyzed by SPSS rel 10.0 for Windows

ANOVA

Motilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2078.571	3	699.524	89.556	.000
Within Groups	257.143	24	10.714		
Total	3135.714	27			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Motilitas

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol	Lactoferrin	-24.29*	1.75	.000
	Vitamin-E	-19.29*	1.75	.000
	Lactoferrin+Vit-E	-25.00*	1.75	.000
Lactoferrin	Kontrol	24.29*	1.75	.000
	Vitamin-E	5.00*	1.75	.009
	Lactoferrin+Vit-E	-.71	1.75	.687
Vitamin-E	Kontrol	19.29*	1.75	.000
	Lactoferrin	-5.00*	1.75	.009
	Lactoferrin+Vit-E	-5.71*	1.75	.003
Lactoferrin+Vit-E	Kontrol	25.00*	1.75	.000
	Lactoferrin	.71	1.75	.687
	Vitamin-E	5.71*	1.75	.003

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 8. Analisis Varian Satu Arah dan Uji Beda Nyata Terkecil untuk Persentase Hidup Spermatozoa

Oneway, Analyzed by SPSS rel 10.0 for Windows

ANOVA

% Hidup-Mati

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	209.821	3	69.940	10.682	.000
Within Groups	157.143	24	6.548		
Total	366.964	27			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: % Hidup-Mati

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol	Lactoferrin	-6.43*	1.37	.000
	Vitamin-E	-.71	1.37	.606
	Lactoferrin+Vit-E	-5.00*	1.37	.001
Lactoferrin	Kontrol	6.43*	1.37	.000
	Vitamin-E	5.71*	1.37	.000
	Lactoferrin+Vit-E	1.43	1.37	.307
Vitamin-E	Kontrol	.71	1.37	.606
	Lactoferrin	-5.71*	1.37	.000
	Lactoferrin+Vit-E	-4.29*	1.37	.005
Lactoferrin+Vit-E	Kontrol	5.00*	1.37	.001
	Lactoferrin	-1.43	1.37	.307
	Vitamin-E	4.29*	1.37	.005

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 9. Analisis Varian Satu Arah dan Uji Beda Nyata Terkecil untuk Daya Resistensi Spermatozoa

Oneway, Analyzed by SPSS rel 10.0 for Windows

ANOVA

Resistensi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3785714.3	3	1261904.762	3.926	.021
Within Groups	7714285.7	24	321428.571		
Total	11500000	27			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Resistensi

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Kontrol	Lactoferrin	-857.14*	303.05	.009
	Vitamin-E	-500.00	303.05	.112
	Lactoferrin+Vit-E	-928.57*	303.05	.005
Lactoferrin	Kontrol	857.14*	303.05	.009
	Vitamin-E	357.14	303.05	.250
	Lactoferrin+Vit-E	-71.43	303.05	.816
Vitamin-E	Kontrol	500.00	303.05	.112
	Lactoferrin	-357.14	303.05	.250
	Lactoferrin+Vit-E	-428.57	303.05	.170
Lactoferrin+Vit-E	Kontrol	928.57*	303.05	.005
	Lactoferrin	71.43	303.05	.816
	Vitamin-E	428.57	303.05	.170

* The mean difference is significant at the .05 level.



Gambar 9. "Wailaga" pejantan pemacek produktif jenis PO penghasil semen sebagai bahan penelitian.



Gambar 10. Bahan pengencer semen.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SABAYA



Gambar 11. Gliserolisasi pada suhu 5⁰C.



Gambar 12. Penyimpanan beku dalam kontainer Nitrogen cair.





Gambar 13. Peralatan Uji Resistensi.



Gambar 14. Pemeriksaan Post Thawing 2 x 24 jam (2 hari).



Gambar 13. Peralatan Uji Resistensi.



Gambar 14. Pemeriksaan Post Thawing 2 x 24 jam (2 hari).