

**SKRIPSI**

**PENGARUH SUPLEMENTASI TIROSIN KINASE TERHADAP  
INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN  
HOLSTEIN DALAM DILUTER YANG BERBEDA**



Oleh :

**ANGGORO SETYO KUNCORO**  
NIM 060610077

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**PENGARUH SUPLEMENTASI TIROSIN KINASE TERHADAP  
INTEGRITAS MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN  
HOLSTEIN DALAM DILUTER YANG BERBEDA**

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

**ANGGORO SETYO KUNCORO**

NIM 060610077

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



**(Suzanita Utama, drh., M.Phil.)**

**Pembimbing Utama**



**(Erma Safitri, drh., M.Si.)**

**Pembimbing Serta**

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

### **Pengaruh Suplementasi Tirosin Kinase Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Sapi Friesian Holstein Dalam Diluter Yang Berbeda**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 13 Februari 2012



Anggoro Setyo Kuncoro  
NIM. 060610077

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian  
Tanggal : 7 Februari 2012

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

Ketua : Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh, M.Si.  
Sekretaris : Dr.Pudji Srianto, drh, M.Kes.  
Anggota : Dr. Widjiati, drh, M.Si.  
Pembimbing Utama : Suzanita Utama, drh., M.Phil.  
Pembimbing Serta : Erma Safitri, drh., M.Si.

Telah diuji pada  
Tanggal : 14 Februari 2012

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh, M.Si.  
Anggota : Dr.Pudji Srianto, drh, M.Kes.  
Dr. Widjiati, drh, M.Si.  
Suzanita Utama, drh., M.Phil.  
Erma Safitri, drh., M.Si.

Surabaya, 15 Februari 2012  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh  
NIP. 19531216 197806 2 001



**ABSTRACT**

**TYROSINE KINASES SUPPLEMENTATION INCREASED  
THE INTEGRITY OF SPERMATOZOA PLASMA  
MEMBRANE OF FRIESIAN HOLSTEIN (FH) BULL IN  
DIFFERENT DILUTER**

Anggoro Setyo Kuncoro

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to determine Effect Of Tyrosine Kinases Supplementation on The Integrity of Spermatozoa Plasma Membrane Of FH Bull In Different Diluter. Fresh semen was collected from Holstein Friesian Bull using an artificial vagina. Semen was divided into four each was diluted in skim egg yolk, tris egg yolk, skim egg yolk with tyrosin kinase and tris egg yolk with tyrosine kinase. Diluted semen were then procesed for frozen semen Plasma Membran Integrity of Spermatozoa was examined by means of Hypoosmotic Swelling Test (HOS Test). Analysis of Variance (ANOVA) shomed that the addition of Tyrosin Kinase into Skim egg yolk and Tris egg yolk diluter increased that of Spermatozoa Plasma Membran Integrity.

**Keyword :** Integity Membrane Spermatozoa, Friesian Holstein, Extender, Tyrosin Kinase

# UCAPAN TERIMA KASIH



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Suplementasi Tirosin Kinase Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Sapi Friesian Holstein Dalam Diluter Yang Berbeda.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Suzanita Utama, drh., M.Phil. selaku pembimbing utama dan Erma Safitri, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh, M.Si. selaku ketua penguji skripsi, Dr. Pudji Srianto, drh, M.Kes. selaku sekretaris penguji skripsi, dan Dr. Widjiati, drh, M.Si. selaku anggota penguji skripsi atas masukan yang sangat berharga demi perbaikan skripsi ini.

Dr.Pudji Srianto, drh., M.Kes., Trilas Sardjito, drh., M.Si dan Tri Wahyu Suprayogi, drh., M. Si selaku dosen pembimbing penelitian atas segala arahan, bimbingan dan kesabaran selama penelitian. Almarhum Dr. Garry C. de Vries, drh., M.Sc. dan Dr. Abdul Samik, drh., M.Si. selaku dosen wali atas

bimbingan dan nasihat-nasihat yang membangun selama ini. Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ayahanda Setijono, drh., yang tiada henti-hentinya memberikan doa, kasih sayang yang berlimpah, dukungan, dorongan moral dan materiil, serta nasihat-nasihat yang sangat berharga sebagai bekal penulis dalam menjalani hidup. Almarhumah Ibunda Dra. Sri Dewi I., yang penulis hormati dan cintai, untuk Adik tercinta Nindita Setyowati dan Keluarga besarku terima kasih banyak telah memberikan semangat dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Sahabat – sahabat tercinta Hedwigijs Nico S. SKH., Surya Rachmad, SKH., Cahya Puspita D., SKH., Nena S., SKH., Ione N.D., SKH., Ginna Ayu K., SKH., Liamalah A., drh., Intan Dyah K., drh. dan Mas Wawan atas kasih sayang, doa, semangat dan dukungan yang telah diberikan sehingga terselesaikan skripsi ini. Dedi Kurniawan S.Si. atas bantuan, motivasi dan masukannya. Teman – teman penelitian *I'M HERE sub component b.2.c* Citra, Nancy, Intan SKH, Titi, Ika, Ima, Ochie, Nita, Dian drh, Rahmen drh, dan Mas Yuan terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan makalah ini. Semoga hasil yang ditulis dalam makalah ini dapat bermanfaat bagi pembaca sekalian.

Surabaya, 7 Februari 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS .....	iv
ABSTRACT .....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAN ARTI LAMBANG .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Landasan Teori .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
1.6 Hipotesis Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Semen (Spermatozoa).....	7
2.2 Motilitas Spermatozoa .....	8
2.3 Viabilitas Spermatozoa .....	9
2.4 Integritas Membran Plasma Spermatozoa.....	10
2.5 Protein Tirosin Kinase.....	10
2.6 Semen Beku ( <i>Frozen semen</i> ).....	11
2.7 Diluter Semen Beku.....	13
2.6.1 Diluter Skim Kuning Telur.....	14
2.6.2 Diluter Tris Kuning Telur.....	14
2.8 Post Thawing .....	15
<b>BAB 3 MATERI DAN METODE.....</b>	<b>16</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.1.1 Tempat Penelitian .....	16
3.1.2 Waktu Penelitian .....	16
3.2 Bahan dan Materi Penelitian.....	16
3.2.1 Bahan Penelitian.....	16
3.2.2 Peralatan Penelitian.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	17
3.3.1 Pengambilan Semen.....	17
3.3.2 Proses Pengenceran.....	17
3.3.3 Pemberian diluter pada semen.....	18
3.3.4 Gliserolisasi dan Equilibrasi.....	19
3.3.5 Filling dan sealling.....	20
3.3.6 Evaluasi Kualitas Spermatozoa.....	20



3.3.7 Uji <i>Hypo-Osmotic Swelling</i> .....	22
3.4 Rancangan Penelitian .....	23
3.5 Analisis Data .....	23
3.6 Variabel Penelitian .....	24
3.7 Skema Penelitian .....	25
<b>BAB 4 HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>
<b>BAB 5 PEMBAHASAN</b> .....	<b>29</b>
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>33</b>
6.1 Kesimpulan .....	33
6.2 Saran .....	33
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>34</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>36</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>40</b>

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Pembuatan bahan pengencer skim kuning telur.....	40
Lampiran 2. Pembuatan bahan pengencer Tris.....	42
Lampiran 3. Komposisi Eosin-Negrosin.....	44
Lampiran 4. Pemeriksaan <i>post thawing</i> .....	45
Lampiran 5. Komposisi Pembuatan Medium Hypoosmotic Swelling Test (HOST) .....	46
Lampiran 6. Analisis Data .....	47
Lampiran 7. Foto Penelitian .....	49

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ATP	: Adenosin Tri-Phosphat
ANOVA	: Analisis Of Variance
BIB	: Balai Inseminasi Buatan
BIBD	: Balai Inseminasi Buatan Daerah
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cAMP	: <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
FH	: Friesian Holstein
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
HOS Test	: <i>Hypo-osmotic swelling test</i>
IB	: Inseminasi Buatan
ICSH	: Interstitial Cell Stimulating Hormone
LH	: Luteinizing Hormone
pH	: Power of Hydrogen
PKA	: Protein Kinase A
PTK	: Protein Tyrosin Kinase
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ZP3	: Zona Pellucida 3

# BAB I PENDAHULUAN



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Peran teknologi di bidang peternakan merupakan bagian yang tak terpisahkan. Saat ini pemerintah berupaya meningkatkan populasi ternak untuk keperluan peningkatan produksi daging dan susu melalui penyediaan bibit ternak unggul, penerapan teknologi reproduksi (Direktorat jendral Peternakan, 2005). Salah satu teknologi yang telah diterima masyarakat peternak dalam peningkatan efisiensi reproduksi ternak adalah Inseminasi Buatan (IB). Penerapan teknologi IB dapat memperbaiki mutu genetik sapi melalui pembuatan semen beku yang berasal dari pejantan unggul, ini merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez, 2000). Meskipun teknologi IB telah diterima oleh masyarakat peternak akan tetapi bukan tanpa kendala, *Post Thawing Motility* merupakan kendala dalam teknologi IB yaitu hanya mencapai 40 %. (Tanaka *et al.*, 2000).

Penurunan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa *pasca thawing* bisa terjadi terkait dengan proses pembekuan, yaitu sebagai akibat terjadinya penurunan temperatur secara drastis. Kerusakan spermatozoa secara keseluruhan dapat mencapai 20%, perbedaan temperatur menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga mengakibatkan terjadinya kematian sel (Suprayogi, 1996). Telah diketahui bahwa proses fertilisasi dapat terjadi apabila spermatozoa mempunyai motilitas dan integritas membran yang baik. Proses fertilisasi diawali dengan pengenalan spesifik yang melibatkan membran plasma spermatozoa dengan Zona Pelusida Tiga (ZP3) dari Ovum (Wassarman,

1990). Spermatozoa ditutupi oleh membran sel dari kepala sampai ekor yang mempunyai susunan sangat kompleks, baik komposisi molekulnya ataupun secara fungsional. Membran spermatozoa sama seperti membran sel lainnya, terdiri dari dua lapis lipoprotein (Pedersen dan Fawcett, 1976), yang komposisinya terdiri dari 52 % protein, 40 % lipid dan 8 % karbohidrat yang biasa tergabung dalam glikolipid dan glikoprotein (De Robertis and De Robert, 1980).

Seperti yang dikatakan oleh Pablo *et al.* (1990), membran plasma spermatozoa mengandung molekul – molekul kunci yang berperan dalam proses fertilisasi, molekul – molekul tersebut adalah lipid dan protein. Protein berfungsi sebagai antigen yang terlibat dalam proses rekognisi (pengenalan), induksi reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan zona pelusida. Protein yang terkandung dalam membran plasma spermatozoa yang mempunyai peran utama dalam fusi spermatozoa dengan zona pelusida adalah *protein tyrosin kinase* yang mengalami autofosforilasi ketika mengalami *cross linked* dengan ZP3 (Bunc *et al.* , 1994; Leyton and Saling, 1989; Leyton *et al.*, 1992). Kerusakan membran plasma spermatozoa karena proses pembekuan temperatur  $-79^{\circ}\text{C}$  mengakibatkan fungsi protein tyrosin kinase akan menurun dan mengganggu proses fertilisasi.

Morales *and* Llanos (1996) menyatakan bahwa tirosin kinase merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu protein. Tirosin kinase termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran, sehingga bila ditambahkan dalam

medium diluter semen beku diharapkan dapat mencegah putusya ikatan kovalen membran spermatozoa.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah dapat diajukan rumusan masalah sebagai berikut apakah suplementasi tirosin kinase kedalam berbagai diluter semen beku dapat meningkatkan integritas membran plasma spermatozoa sapi FH?

## 1.3 Landasan Teori

Menurut Toelihere (1993) semen adalah proses sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasi ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Semen mengandung banyak spermatozoa yang berada dalam medium cair, yaitu plasma semen. Tiap spermatozoa terdiri dari bagian kepala dimana terkumpul materi genetik dan bagian ekor yang menyebabkan spermatozoa dapat bergerak maju. Sel spermatozoa mempunyai fungsi dalam pembuahan ovum hewan betina.

Menurut penelitian terdahulu spermatozoa dapat hidup bertahun – tahun pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  tanpa berkurang kesuburannya. Semen beku adalah semen yang diencerkan menurut prosedur lalu dibekukan di bawah titik beku air (Partodiharjo,1992). Proses pembekuan dengan kecepatan penurunan suhu yang cepat pada umumnya sangat berpengaruh terhadap metabolisme dan daya hidup sel spermatozoa. Demikian pula sebelumnya pada proses *thawing* semen beku dimana mengalami proses peningkatan suhu yang cepat akan terjadilah penurunan

motilitas, viabilitas, dan fertilitas (Salomon *and* Maxwel, 2000). Penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa biasa terjadi akibat perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan meningkatkan permeabilitas membran spermatozoa sehingga pada akhirnya terjadilah kematian sel spermatozoa (Suprayogi, 1996).

Pelaksanaan inseminasi buatan, diperlukan kualitas semen yang baik. Kualitas semen akan cepat menurun pada proses penyimpanan tanpa bahan diluter. Penambahan bahan diluter selain digunakan untuk tujuan penyimpanan juga dapat untuk meningkatkan volume semen, sehingga dari satu ejakulasi seekor pejantan memungkinkan untuk dilaksanakan inseminasi beberapa ratus ekor betina, selain itu dimungkinkan pengiriman semen beku jarak jauh (Toelihere, 1979).

Setiap bahan diluter yang baik harus dapat memperlihatkan kemampuannya dalam memperkecil tingkat penurunan nilai motilitas (gerak progresif) spermatozoa sehingga pada akhirnya memperpanjang lama waktu penyimpanan pasca pengenceran. Tidak semua bahan pengencer memperlihatkan kemampuan yang sama baik dalam mempertahankan spermatozoa (Solihati dan Kune, 2006).

Penilaian jumlah spermatozoa yang hidup dan bergerak atau motil dibutuhkan untuk keperluan fertilisasi setelah IB. Ini disebabkan karena untuk dapat membuahi ovum maka spermatozoa harus menempuh perjalanan jauh yang memerlukan gerak progresif (maju ke depan) dengan cepat untuk dapat sampai pada tujuan (Subratha, 1998). Menurut Trianasari (2001), spermatozoa dalam



jumlah banyak, hidup dan motil akan menguntungkan sebab kemungkinan untuk mencapai dan membuahi ovum juga akan menjadi lebih besar.

Aktivitas tirosin kinase sangat penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa serta reaksi yang mengatur fosforilasi tirosin kinase. Kapasitas spermatozoa dapat ditingkatkan dengan adanya pengaturan fosforilasi tirosin kinase oleh redoks dan cAMP-mediated (Aitken *et al.*, 1998). Menurut Madyawati (2007) suplementasi tirosin kinase pada dosis 100 µg/ml ke dalam medium diluter semen beku sapi FH dapat meningkatkan persentase spermatozoa hidup, motilitas spermatozoa dan presentase integritas membran sebelum dan sesudah pembekuan.

*Hypo-osmotic swelling test (HOS Test)* merupakan tes yang digunakan untuk mengetahui apakah membran masih aktif dan integritas membran plasma spermatozoa sebagai indikator fertilitas (Samardzija, 2008). Integritas membran plasma spermatozoa sangat penting selama penyimpanan terutama setelah *freezing* dan *cold storage* (James *et al.*, 1999). Menurut Goyal *et al.* (1996) terdapat adanya korelasi positif antara persentase integritas membran plasma dengan tingkat fertilisasi. Semakin tinggi persentase integritas membran plasma semakin tinggi angka fertilisasinya, kemampuan untuk membran spermatozoa juga ditentukan oleh integritas membran plasma spermatozoa. Hasil uji *HOS Test* menunjukkan bahwa spermatozoa dengan membran plasma utuh akan menahan cairan hipoosmotik di dalam sel, sehingga ekornya terlihat melingkar atau membengkak sedangkan spermatozoa dengan ekor yang lurus menunjukkan membran plasma yang mengalami kerusakan karena tidak mampu menahan cairan hipoosmotik (Setiadi dkk., 2007)

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh suplementasi *tyrosin kinase* pada diluter *skim kuning telur* dan *tris kuning telur* terhadap integritas membran spermatozoa sapi FH untuk meningkatkan kualitas semen beku.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh data tentang integritas membran spermatozoa terhadap suplementasi *tyrosin kinase* pada diluter *skim kuning telur* dan *tris kuning telur* yang dapat digunakan untuk memperoleh informasi tentang diluter terbaik untuk meningkatkan kualitas semen beku sehingga nantinya dapat meningkatkan produktivitas dan populasi ternak sapi FH di Indonesia.

#### 1.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah suplementasi *tyrosin kinase* pada diluter *skim kuning telur* dan *tris kuning telur* dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa semen beku sapi FH melalui uji HOST.

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Semen ( Spermatozoa )

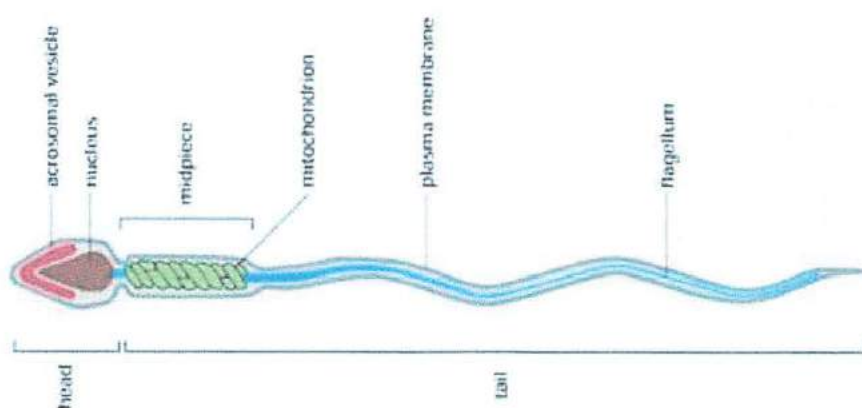
Menurut Toelihere (1985) semen adalah sekresi alat kelamin jantan yang secara normal diejakulasi ke dalam saluran kelamin betina pada waktu kopulasi, sedangkan menurut Hafez (2000) semen adalah cairan atau suspensi semigelatin yang mengandung gamet jantan (Spermatozoa) dan sekresi dari organ asesoris saluran reproduksi jantan berupa seminal plasma.

Menurut Toelihere (1985) volume semen sapi yang diejakulasi secara normal berkisar antara 10 – 15 ml, sedangkan menurut Hafez (2000), volume semen sapi yang diejakusikan sebanyak 5 – 8 ml setiap satu kali ejakulasi. Selanjutnya menurut Partodihardjo (1992), volume semen sapi dalam satu kali ejakulasi berkisar 4 – 6 ml akan tetapi konsentrasi spermatozoa sangat tinggi sehingga dapat memberikan warna putih kekuningan pada semen.

Sel spermatozoa terdiri dari bagian kepala, leher, dan ekor yang berbeda susunan kimiawinya. Kepala terdiri dari Deoksiribo nukleoprotein yang sebagian besar terdapat di dalam inti, sedangkan akrosomnya mengandung banyak ikatan protein dan karbohidrat yang disebut akrosomal polisakarida. Pada bagian leher sel spermatozoa selain mengandung kadar lipida yang umumnya lipoprotein, banyak juga didapatkan sitokrom yang penting dalam reaksi pernafasan sel spermatozoa. Kecuali itu di bagian ekor spermatozoa selain mengandung banyak plasmalogen juga protein keratin yang ada di benang-benang fibril dan kulit spermatozoa (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994).



Bagian tengah (midpiece) digambarkan sebagai pusat tenaga sperma karena keberadaan mitokondria berada terpusat di daerah ini. Mitokondria berderet – deret dari ujung ke ujung dalam untaian spiral untuk membentuk putaran Heliks. Mitokondria mengandung sistem enzim yang menggerakkan siklus asam trikarboksilat (tricarboxylic acid- siklus kreb) dan transport elektron serta fosforilasi oksidatif, yang menghasilkan energi dalam bentuk *adenosin triphosphat* (ATP) untuk gerakan spermatozoa (Frandsen, 1993).



Gambar 2.1 Morfologi spermatozoa  
Sumber : Simon & Shuster Inc., NY 1999

## 2.2 Motilitas Spermatozoa

Motilitas adalah gerak maju atau gerak progresif spermatozoa (Direktorat Jenderal Peternakan, 2007). Motilitas spermatozoa merupakan indikator untuk menentukan kualitas semen, karena parameter ini paling mudah dan cepat yang dapat ditentukan. Daya gerak progresif ini mempunyai peran yang sangat penting untuk keberhasilan fertilisasi (Kostaman dan Utama, 2006). Yang merupakan ciri utama spermatozoa adalah motilitas dan daya gerak yang dijadikan cara paling sederhana dalam penilaian kelayakan kualitas semen untuk iseminasi buatan. Motilitas spermatozoa secara keseluruhan atau rata – rata dari populasi

spermatozoa terhadap semen segar yang baru ditampung dan belum diencerkan dengan melakukan pemeriksaan gerakan massa atau individu (Hardijanto dkk, 2009).

Spermatozoa mampu bergerak karena adanya energi (ATP) yang dihasilkan oleh mitokondria dan karena adanya motor *dynein* (sitoskeleton untuk flagella atau ekor spermatozoa) yang pergerakannya diatur oleh  $Ca^{2+}$  dan cyclic Adenosyn mono phosphate (cAMP) (Yanagimachi, 1994). Kecepatan bergerak spermatozoa dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan suhu. Pada suhu  $37^{\circ}C$  kecepatan gerak spermatozoa adalah  $100 \mu m/detik$  dimana kecepatan pergerakan spermatozoa menunjukkan kemampuan membuahi sel telur (Poernomo dkk., 2005).

### 2.3 Viabilitas Spermatozoa

Kualitas semen salah satunya ditentukan oleh persentase spermatozoa yang hidup dan yang mati (Yuyun, 1996), akan tetapi nilai motilitas tidak berkaitan dengan persentase viabilitas spermatozoa. Penilaian persentase viabilitas spermatozoa dapat dievaluasi berdasarkan kemampuan zat warna dalam menembus spermatozoa yang mati.

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan pewarnaan 2% eosin B (Toelihere, 1981). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah disebabkan masuknya eosin kedalam spermatozoa yang telah mengalami kerusakan membran sehingga tidak mampu mencegah masuknya zat warna (Partodihardjo, 1992).

## 2.4 Integritas Membran Plasma Spermatozoa

Integritas membran plasma spermatozoa harus tetap terjaga agar kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas, dan kemampuan fertilisasi dapat dipertahankan. Hal tersebut dikarenakan selain sebagai pelindung secara fisik organel – organel spermatozoa dari kerusakan mekanik, membran plasma juga berfungsi sebagai penjaga keseimbangan elektrolit intra dan ekstraseluler (Hunter, 1981). Pablo *et al.*, (1990) mengatakan bahwa membran plasma spermatozoa mengandung molekul-molekul yang berperan dalam proses fertilisasi. Molekul-molekul tersebut adalah lipid dan protein. Protein yang terkandung dalam membran plasma spermatozoa mempunyai peran utama dalam fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3) salah satunya adalah protein tirosin kinase (Leyton *and* Saling, 1989; Bunch *et al.*, 1994; Leyton *et al.*, 1992).

## 2.5 Protein Tirosin Kinase

Tirosin kinase merupakan salah satu protein membran plasma spermatozoa yang mempunyai berat molekul 95 kDa. Tirosin kinase penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa dan mekanisme redoks yang mengatur fosforilasi tirosin kinase (Aitken *et al.*, 1995). Menurut Aitken *et al.*, (1998) isolat tirosin kinase yang ditambahkan pada semen mempunyai aktivitas yang penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa dan juga untuk mekanisme redoks yang mengatur fosforilasi tirosin kinase.

Kapasitasi spermatozoa dapat ditingkatkan dengan adanya pengaturan fosforilasi tirosin kinase oleh redoks dan cAMP-mediated (Aitken *et al.*, 1998). Fosforilasi tirosin kinase berhubungan dengan terjadinya kapasitasi spermatozoa

pada tikus, manusia dan sapi melalui peningkatan influks kalsium yang akan mngaktifkan enzim adenat siklase, selanjutnya akan berpengaruh pada peningkatan cAMP. *Cyclic adenosine monophospate* akan mengaktifkan protein kinase A (PKA), yang berpengaruh pada peningkatan tirosin kinase, selanjutnya tirosin kinase akan mengalami fosforilasi. Pada akhirnya fosforilasi tirosin yang meningkat akan menyebabkan kapasitasi dan hiperaktivasi motilitas spermatozoa (Visconti *and* Kopf, 1998 dalam Madyawati 2004).

Menurut Madyawati (2007) suplementasi tirosin kinase pada dosis 100 µg/ml ke dalam medium diluter semen beku sapi FH dapat meningkatkan persentase spermatozoa hidup, motilitas spermatozoa dan presentase integritas membran sebelum dan sesudah pembekuan.

## 2.6 Semen Beku (*Frozen semen*)

Semen beku adalah semen yang berasal dari pejantan unggul yang sehat, bebas penyakit hewan menular, diencerkan sesuai prosedur produksi dan dibekukan dalam rendaman nitrogen cair pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam kontainer kriogenik (Dirjennak, 2007). Pembuatan semen beku merupakan upaya manusia memperpanjang daya hidup dan daya fertilitas spermatozoa sehingga masa pakai semen tersebut dapat lebih lama (Kartasudjana, 2001).

Semen segar tanpa bahan pengencer bila disimpan hanya dapat hidup beberapa jam saja karena spermatozoanya akan mati disebabkan adanya asam laktat yang bersifat racun, sebagai hasil metabolisme fruktosa pada saat mengadakan pergerakan. Bahan diluter yang dipakai untuk penyimpanan semen

harus sedemikian rupa, sehingga kualitas yang baik dari semen yang disimpan dapat dipertahankan (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994)

Semen beku memiliki keuntungan dan kerugian. Keuntungan unik semen beku ialah dapat mengatasi hambatan-hambatan waktu dan jarak. Spermatozoa dalam semen beku dapat bertahan hidup bertahun-tahun. Spermatozoa yang dibekukan dan disimpan pada suhu  $-79^{\circ}\text{C}$  di dalam  $\text{CO}_2$  padat dan alkohol tahan hidup 3-4 tahun, sedangkan pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  di dalam nitrogen cair spermatozoa tahan hidup untuk waktu yang tidak terhingga (Feridis, 2010).

Kelemahan semen beku adalah sebagai berikut : a). penggunaan pejantan tidak unggul akan merusak peternakan secara luas, b). pemeliharaan dan pemeriksaan pejantan yang tidak baik berpotensi menyebarkan penyakit, c). peralatan untuk proses pembekuan dan penyimpanan mahal, d). selama proses pembekuan, 40-80% spermatozoa mati, dan e). 10-20% semen tidak tahan pembekuan. Problema proses pembekuan semen berkisar pada dua fenomena yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal (Toelihere, 1993).

Banyak metode yang dapat digunakan untuk proses pembekuan sperma salah satu metode yang lebih sering dipakai adalah dalam bentuk straw, beberapa kelebihan penggunaan straw diantaranya adalah relatif murah, lebih tahan terhadap perubahan-perubahan fisis dan khemis dalam pembekuan sampai pada suhu yang sangat rendah, penutupan dengan polyvinyl alcohol dapat dijamin kerapatannya, mudah diadaptasikan dengan permintaan-permintaan di luar negeri,

osmotik serta keseimbangan elektrolit. Asam sitrat berfungsi sebagai *buffer*, selain itu juga berfungsi mendispersikan butir – butir lemak kuning telur. Fruktosa berfungsi menyediakan zat – zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Selain sebagai anti *cold shock* dan sumber enenrgi, kuning telur mempunyai fungsi sebagai *buffer*. Antibiotik berfungsi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan gliserol untuk melindungi sperma terhadap efek *lethal* pada saat pembekuan (Departemen Pertanian Direktorat Jendral Produksi Peternakan., 2000).

Menurut Jones dan Martin (1973), kuning telur mampu mempertahankan motilitas dan integritas akrosom dan membran plasma mitokondria spermatozoa. Kuning telur juga mempunyai sifat *osmotic buffer* sehingga spermatozoa lebih toleran baik terhadap diluter hipotonik maupun hipertonik.

## 2.8 Post Thawing

*Post thawing* semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan karena menurut Evans dan Maxwell (1976) *post thawing* semen beku merupakan prosedur yang paling penting dalam inseminasi buatan. Hal ini dikarenakan penggunaan *post thawing* yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen. Untuk menghasilkan kualitas semen yang baik Direktorat Jenderal Peternakan membuat standarisasi *post thawing* yaitu penggunaan air suhu 37°C selama 30 detik.



**BAB III**  
**MATERI DAN METODE**

## **BAB III MATERI DAN METODE**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **3.1.1 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Semen Beku Universitas Airlangga, Desa Tanjung Kecamatan Kedamean Kabupaten Gresik. Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dilaksanakan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

#### **3.1.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan yaitu pada bulan Juli 2011 sampai Desember 2011.

### **3.2 Bahan dan Materi Penelitian**

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu seekor Sapi Perah Friesian Holstein (FH) jantan berumur  $\pm 3$  (tiga) tahun dengan berat badan sekitar 500 kg. Sapi Perah Friesian Holstein (FH) secara klinis tersebut di nyatakan sehat, alat kelamin normal dan berlibido baik.

#### **3.2.1. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian meliputi : semen pejantan sapi Friesian Holstein, pengencer Skim Kuning Telur, pengencer Tris Kuning Telur, pewarna eosin negrosin, alkohol 70%, larutan *Hypo-Osmotic Swelling*, Protein tyrosin kinase.

### 3.2.2 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Vagina buatan khusus sapi, tabung penampung semen berskala, mikroskop *inverted*, gelas obyek, gelas penutup, gelas beker, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung, *water bath*, pipet penghisap, pipet mikro, spatula, thermometer, aluminium foil, kertas pH, kertas tissue, Bunsen, korek api, timbangan, spektrofotometer, *cool top, filling, and sealing machine, water/dry incubator*, container N<sub>2</sub> cair, goblet dan canister.

## 3.3 Metode Penelitian

### 3.3.1 Pengambilan Semen

Pengambilan semen dilakukan pada sore hari. Pejantan dimandikan dan diberi pakan terlebih dahulu, kemudian dibawa ke kandang jepit dan dipertemukan pejantan dengan pemancing untuk memberi rangsangan libido kepada pejantan yang akan ditampung semennya. Sebelumnya vagina buatan yang telah disiapkan diisi air dengan suhu 37°C dan ujung corong karet diberi pelicin, apabila terdapat tanda – tanda pejantan akan menaiki pemancing, maka vagina buatan dipasang pada penis untuk menampung semen.

### 3.3.2 Proses Pengenceran

Setelah bahan diluter dibuat dan diketahui berapa banyak bahan pengencer yang ditambahkan, selanjutnya dilakukan proses pengenceran. Bahan pengencer (diluter) yang harus ditambahkan selanjutnya dibagi menjadi dua bagian sama banyak disebut larutan A dan diluter B. Larutan A nantinya akan ditambahkan

dengan semen (diluter A) sedangkan untuk diluter B ditambahkan gliserol. Larutan A yang ditambahkan pada semen dilakukan secara bertahap. Pada awalnya larutan A dicampurkan volumenya sama banyak dengan volume semen, selanjutnya ditambahkan sisa dari larutan A sampai volumenya sebanyak 50% volume akhir.

Diluter B pada P1 dan P3 ditambahkan gliserol sebanyak 16% dari diluter A, diluter B pada P2 dan P4 ditambah gliserol 13% dari diluter A. Pada saat yang bersamaan diluter B yang banyaknya 50% dari volume akhir dan diluter A dimasukkan ke dalam cold top yang bersuhu 3-5°C. kedua larutan tersebut akan mencapai suhu 3-5°C jika disimpan selama 1-1,5 jam dalam *cold top*.

### 3.3.3 Pemberian diluter pada semen

Setelah data pemeriksaan mikroskopis diperoleh maka selanjutnya dilakukan proses *water jacket* yaitu tabung erlenmeyer yang berisi semen dibagi menjadi empat bagian sama banyak. Kemudian ditambahkan diluter A dari masing – masing empat diluter yang digunakan Sebagai Perlakuan Pertama (P1) adalah semen yang diencerkan dengan diluter skim kuning telur. Perlakuan kedua (P2) adalah semen yang diencerkan dengan diluter tris kuning telur. Perlakuan ketiga (P3) adalah semen yang diencerkan dengan diluter skim kuning telur yang sebelumnya telah ditambah dengan tirosin kinase 100µg/ml. Perlakuan keempat (P4) adalah semen yang dencerkan dengan diluter tris kuning telur yang sebelumnya telah ditambah dengan tirosin kinase 100µg/ml. Kemudian tabung erlenmeyer dimasukkan ke dalam *becker glass* yang telah diisi air dari *water bath* yang bersuhu 37°C. Tujuan *water jacket* untuk melindungi spermatozoa dari

perbedaan suhu atau yang disebut dengan *thermo shock*, karena untuk pemeriksaan lebih lanjut spermatozoa akan dikembalikan pada suhu 5<sup>0</sup>C. Air dipilih sebagai media *water jacket* karena massa jenisnya yang besar sehingga tidak mudah untuk menjadi panas atau dingin. Kenaikan suhu atau penurunan suhu pada air terjadi secara perlahan.

### 3.3.4 Gliserolisasi dan Equilibrasi

Spermatozoa yang masing-masing telah dicampur dengan pengencer Skim Kuning Telur dan Tris Kuning Telur dimasukkan ke dalam *cool top* hingga suhu spermatozoa menjadi 5<sup>0</sup>C, suhu ini dapat dicapai selama ±1 jam. Prosedur pelaksanaan gliserolisasi dan tahap equilibrasi meliputi :

- Penambahan pengencer yang mengandung gliserol secara perlahan tetes demi tetes atau dibagi menjadi empat bagian, penambahan dilakukan secara perlahan dan bertahap dengan interval 15 menit hingga selesai dalam waktu 1 jam melalui dinding erlenmeyer, keseluruhan proses ini dilakukan dalam ruangan bersuhu 3-5<sup>0</sup>C. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari *osmotic shock* dan toksisitas terhadap spermatozoa secara langsung.
- Tahap equilibrasi yakni proses adaptasi spermatozoa dengan pengencer yang mengandung gliserol dalam waktu 2-6 jam (setiap 30 menit diaduk secara perlahan) pada suhu 3-5<sup>0</sup>C untuk menuju suhu *pre freezing*(-140<sup>0</sup>C) dan suhu *freezing* (-196<sup>0</sup>C).

- Pemeriksaan motilitas spermatozoa (pemeriksaan *before freezing*), syarat untuk dilakukan proses selanjutnya adalah jika pemeriksaan motilitas menunjukkan persentase 60-70%.

### 3.3.5 *Filling dan Sealing*

Setelah dilakukan proses gliserolisasi dan equilibrasi maka tahap selanjutnya dilakukan filling dan sealing. Kemudian dilakukan filling and sealing straw. Pengemasan dengan menggunakan mini straw dengan volume 0,25 ml, menggunakan ultrasonic filling and sealing machines. memasukkan spermatozoa yang sudah dicampur diluter ke dalam straw atau yang dikenal dengan *filling* dengan tekanan 200 mbar. Sebelumnya straw tersebut didinginkan di dalam *cool top* agar suhunya menjadi sama dengan suhu spermatozoa dan diluter kemudian disegel menggunakan *sealing machine* yang juga berada dalam *cool top*.

### 3.3.6 *Evaluasi kualitas spermatozoa*

Proses evaluasi dilakukan sebanyak dua kali yaitu sebelum *freezing* dan setelah *freezing*. Evaluasi ini dilakukan dengan mengamati gerakan individu dari spermatozoa yang telah mengalami serangkaian perlakuan dalam tahapan pengolahan semen metode straw.

Evaluasi sebelum *freezing* dilakukan setelah spermatozoa melalui tahap gliserolisasi. Caranya dengan meletakkan setetes spermatozoa pada gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup untuk selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Evaluasi ini dimaksudkan untuk mengetahui gerakan individu setelah gliserolisasi dan menjadi pertimbangan dilakukannya

proses selanjutnya. Syarat kualitas spermatozoa untuk dapat dilakukan proses *pre-freezing* minimal 55%/3. Gerakan individu dalam spermatozoa tersebut cepat dengan persentase 55% menunjukkan individu sperma menunjukkan daya hidup dan bergerak aktif (motil). Spermatozoa yang mengalami gliserolisasi biasanya mengalami penurunan kuantitas yang ditandai dengan banyaknya spermatozoa yang mati akibat penurunan suhu yang terjadi selama penambahan gliserol.

Evaluasi yang dilakukan setelah *freezing* bertujuan untuk mengetahui kualitas sperma apakah sudah sesuai dengan standar minimal yaitu 40%/3. Straw yang telah di*freezing* dikeluarkan dari *container* dan di*thawing*  $\pm 10$  detik di dalam *water bath* untuk selanjutnya dipotong bagian tengah dan 1/3 distal dari straw untuk mengeluarkan spermatozoa tepat di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa. Pemeriksaan viabilitas dapat dilakukan dengan pewarnaan menggunakan eosin negrosin kemudian dikeringkan di atas lampu spirtus dan dilihat jumlah yang hidup dan yang mati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali (Dirjennak, 2007).

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. Semen ditetaskan pada bagian ujung gelas obyek, kemudian zat warna eosin negrosin ditetaskan di bagian ujung gelas obyek yang telah ditetesi semen dan dicampur hingga homogen. Dengan menggunakan gelas obyek yang lain, gelas obyek ditempelkan pada bagian ujung pada campuran semen kemudian dengan posisi miring bersudut  $45^\circ$  gelas obyek didorong sepanjang gelas obyek yang telah disiapkan untuk mendapatkan lapisan semen yang terwarnai setipis mungkin. Selanjutnya diangin-anginkan hingga kering. Perhitungan dilakukan



dibawah mikroskop dengan pembesaran 400X. spermatozoa yang tidak terwarnai adalah spermatozoa yang masih hidup, sedangkan spermatozoa yang terwarnai merupakan spermatozoa yang telah mati (Partodihardjo, 1992).

### 3.3.7 Uji *Hypo-Osmotic Swelling*

Pemeriksaan keutuhan membran menggunakan *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Prosedur pemeriksaan menggunakan medium HOS Test berupa NaCl hipotonik (komposisi terdapat di lampiran 1). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 0,9 ml medium HOST, selanjutnya diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama satu jam pada suhu 37°C. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x. Jumlah spermatozoa yang dihitung dengan skala 0% sampai 100%. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologik bila diinkubasi pada medium hipotonik. Perubahan yang terjadi antara lain pembengkakan pada ujung ekor, ekor yang pendek dan tebal atau pembengkakan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang dibentuk oleh ekor spermatozoa.

Hasil uji *Hypo-Osmotic Swelling* pada membran plasma spermatozoa sapi Friesian Holstein dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Spermatozoa normal} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang menggebung}}{\text{Jumlah total spermatozoa yang dihitung}} \times 100 \%$$

### 3.6 Variabel Penelitian

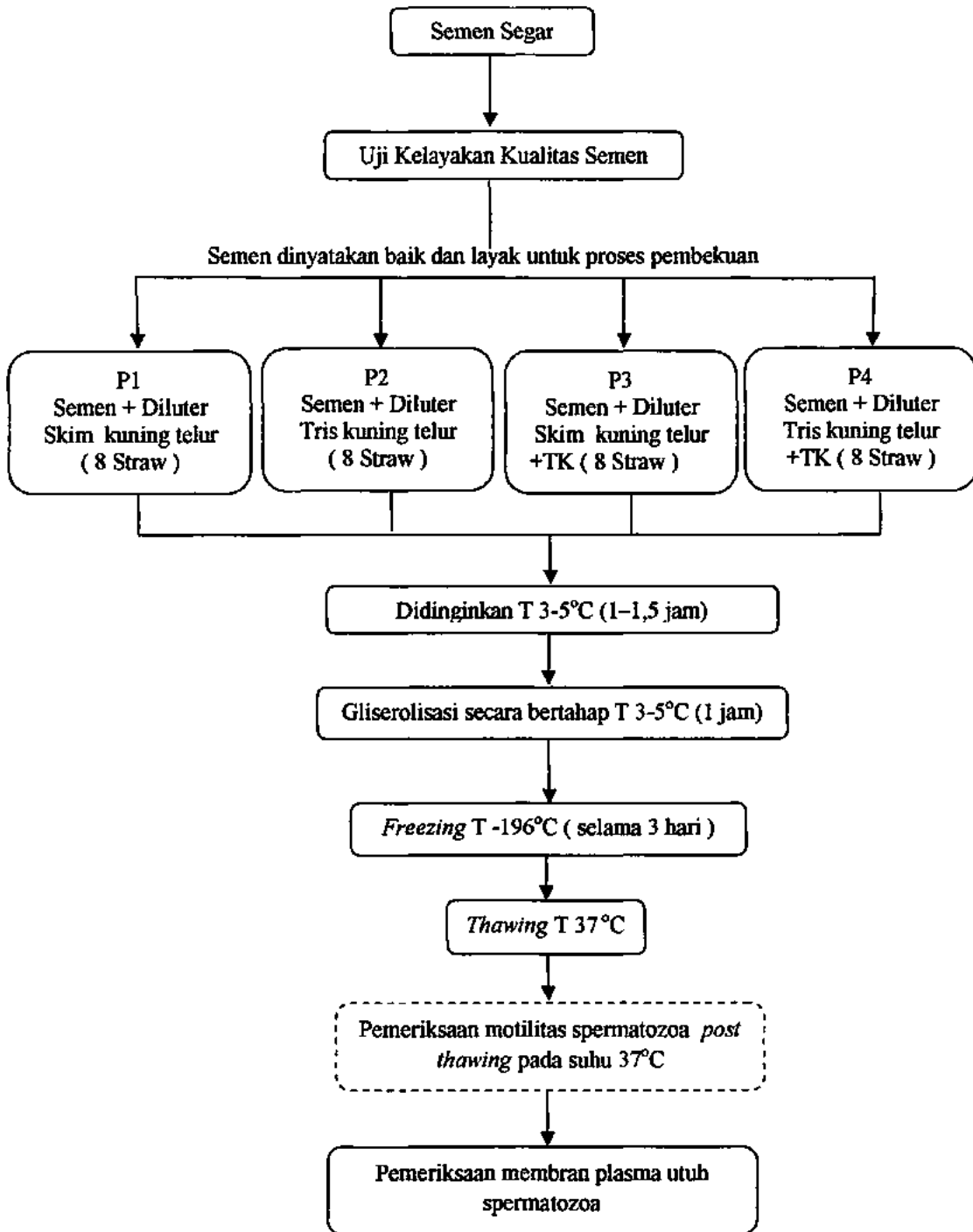
Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah integritas membran spermatozoa *post thawing* semen beku dari pejantan FH dalam dua diluter yang berbeda yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga.

Variabel bebas : Diluter skim kuning telur ditambah tirosin kinase 100  $\mu\text{g/ml}$ , dan tris kuning telur ditambah tirosin kinase 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Variabel tergantung : Persentase Integritas membran plasma spermatozoa.

Variabel terkontrol : Semen sapi Friesian Holstein, pakan, medium, dan inkubator  $\text{CO}_2$ .

## 3.7 Skema Penelitian



**Gambar 3.2** Diagram alir prosedur penelitian

Keterangan----- : Prosedur *post thawing* hanya sebagai data pendukung

**BAB IV**  
**HASIL PENELITIAN**

**BAB IV HASIL PENELITIAN**

Proses pembuatan semen beku diawali dengan uji kelayakan kualitas semen dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna, konsistensi, pH, dan bau. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerak massa, gerak individu, motilitas, konsentrasi, dan integritas membran plasma.

**Tabel 4.1.** Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi FH

<b>Makroskopis</b>	Volume	7,3 ml
	Konsistensi	Sedang
	Warna	Putih
	Bau	Khas
	pH	6 – 7
<b>Mikroskopis</b>	Gerakan Massa	+++
	Motilitas	80 %
	Gerak Individu	3
	Konsentrasi	1638 jt/ml

Uji *Hypo-Osmotic Swelling* merupakan uji laboratories yang digunakan untuk mengetahui fungsi dan kerusakan pada membran, bila membran sel mengalami kerusakan ekor akan terlihat lurus atau tidak terjadi penggembungan tetapi apabila membran sel normal atau tetap utuh maka akan terjadi penggembungan atau melingkarnya ekor.

Hasil dari penambahan tirosin kinase kedalam diluter semen beku berpengaruh terhadap integritas membran plasma spermatozoa secara lengkap pada lampiran 7, sedangkan rata – rata dan simpangan baku (standar deviasi) dapat dilihat pada Tabel 4.2.

**BAB V**  
**PEMBAHASAN**

## BAB V PEMBAHASAN

*Hypo-Osmotic Swelling Test (HOS Test)* merupakan tes yang digunakan untuk mengukur apakah fungsi membran plasma masih aktif integritas keutuhan membran plasma spermatozoa sebagai indikator fertilisasi (Sarmardzija *et al.*,2008). Metode HOS Test merupakan suatu metode yang baik untuk mengevaluasi integritas membran spermatozoa hewan domestik, hal tersebut dapat dilihat dengan mengamati terjadinya perubahan pada ekor spermatozoa. Pada spermatozoa yang hidup atau mempunyai membran plasma yang baik, maka media HOST yang dipaparkan akan mengaktifkan biokimia aktif yang terdapat pada membran untuk menyeimbangkan cairan di dalam dan di luar sel spermatozoa sehingga larutan *hypo-osmotic* dapat masuk ke dalam spermatozoa. Masuknya media HOST menyebabkan perluasan membran ekor spermatozoa sehingga menggembung dan puncaknya membuat ekor melingkar (Fonseca, 2005). Ekor spermatozoa sapi akan membengkok dan melingkar seperti spiral bila spermatozoa tersebut berada di dalam cairan hipoosmotik (Drevious, 1972 yang dikutip Arifanti dkk.,1999).

Tirosin kinase yang disuplementasikan dalam medium Ddiluter semen beku diharapkan dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh suhu. Tirosin kinase adalah kelompok protein enzim yang berada dalam cairan ekstraseluler akan melindungi kelenturan membran spermatozoa terhadap perubahan suhu. Pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen asam amino penyusun protein membran sehingga akan menyebabkan destabilisasi membran yang berpengaruh terhadap proses metabolisme sel



ini berbeda dengan penelitian Madyawati (2007) terutama pada perlakuan tanpa suplementasi Tirosin Kinase, yang menunjukkan hasil dibawah standart untuk proses semen beku. Hal ini dimungkinkan adanya kesalahan porsedur pelaksanaan dalam proses melakukan Uji HOS Tes. Namun penurunan tersebut dapat juga dikarenakan oleh tahap – tahap yang dilalui yaitu proses post thawing dan proses inkubasi CO<sub>2</sub> sehingga persentase menurun drastis. Akan tetapi semen beku tanpa suplementasi Tirosin Kinase tersebut masih layak digunakan untuk proses semen beku.

Menurut Arifiantini dan Yusuf (2004) diluter Skim Kuning Telur merupakan diluter organik yang mengandung bahan anti *cold shock* yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu equilibrasi (5°C ). Hal ini disebabkan pengencer susu mempunyai beberapa keunggulan, diantaranya susu mengandung substansi pelindung lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap cekaman dingin selama proses pembekuan (Toelihere *et al.*, 1993).

Tirosin kinase berpengaruh terhadap persentase integritas membran plasma sebelum dan setelah pembekuan. Menurut Breibart (1999) Tirosin Kinase merupakan satu kelompok enzim yang mempunyai peran dalam proses pengenalan awal membran spermatozoa dengan zona pelusida sel telur autofosforilasi dan berfungsi untuk stabilisasi membran melalui ikatan kovalen protein penyusun membran ( Rubinsky, 2000 ). Melemahnya ikatan kovalen yang terjadi akan diikuti dengan putusya ikatan tersebut, jika sel spermatozoa terpapar pada suhu yang rendah dalam waktu yang lama. Hal ini akan menyebabkan komposisi penyusun membran spermatozoa dan akan mengakibatkan penurunan

fungsi dan destabilisasi membran. Ekor spermatozoa sapi akan membengkok dan melingkar seperti spiral bila spermatozoa tersebut berada di dalam cairan hiposmotik (Drevius, 1972 yang dikutip Arifanti dkk., 1999).

Tanpa Suplementasi tirosin kinase presentase integritas plasma membran spermatozoa tidak berbeda diantara kelompok sampel semen dalam diluter Skim kuning telur dan Tris kuning telur. Suplementasi tirosin kinase kedalam kedua diluter memungkinkan persentase integritas membran plasma spermatozoa baik pada semen dengan diluter Skim kuning telur maupun Tris kuning telur yang saling tidak berbeda.

**BAB VI**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## **BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini dapat diketahui bahwa integritas membran plasma spermatozoa lebih baik dengan suplementasi *tyrosin kinase* kedalam diluter *Skim kuning telur* dan *Tris kuning telur* dibandingkan tanpa suplementasi *tyrosin kinase* dalam diluter spermatozoa sapi FH .

### **6.2 Saran**

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini pentingnya suplementasi tirosin kinase dalam diluter merupakan faktor yang menentukan tingkat Integritas membran spermatozoa dari semen beku.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

**Anggoro Setyo Kuncoro.** Pengaruh suplementasi tirosin kinase terhadap integritas membran spermatozoa sapi friesian holstein dalam diluter yang berbeda dengan Suzanita Utama, drh., M.Phil. Selaku pembimbing pertama dan Erma Safitri, drh., M.Si. Selaku dosen pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi protein *tyrosin kinase* pada pengencer skim kuning telur dan tris kuning telur terhadap integritas membran spermatozoa sapi FH. Sampel yang digunakan adalah semen segar sapi Friesian Holstein berumur tiga tahun. Semen ditampung dengan vagina buatan dan dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis untuk mengetahui kelayakannya untuk diproses menjadi semen beku. Kemudian semen dibagi menjadi empat perlakuan yaitu semen dengan pengencer skim kuning telur (P1), semen dengan pengencer tris kuning telur (P2), semen dengan pengencer skim kuning telur yang ditambah tirosin kinase 100  $\mu\text{g/ml}$  (P3) dan semen dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah tirosin kinase 100  $\mu\text{g/ml}$  (P4). Selanjutnya dilakukan proses pembekuan meliputi gliserolisasi, *equilibrasi*, *filling* dan *sealing*, *before freezing*, dan *freezing*. Kemudian dilakukan pemeriksaan Uji *Hypo-Osmotic Swelling Test Post Thawing*.

*Hypo-Osmotic Swelling Test* merupakan tes sederhana yang didasarkan pada semipermeabilitas membran sel, yang mengakibatkan spermatozoa mengembang pada kondisi hipo-osmotik. Air yang masuk akan mengakibatkan pembesaran volume sel. Membran spermatozoa yang normal akan mengalami

suatu penggembungan dan tidak terjadi suatu penggembungan apabila membran spermatozoa mengalami kerusakan (Setiadi, 2007).

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Data analisis menggunakan Analisis Ragam yang dilanjutkan dengan Uji Duncan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan P3 Skim kuning telur yang ditambah dengan TK ( 48,9 ) merupakan hasil tertinggi diantara perlakuan yang lain. Hal ini dikarenakan penambahan suplemen tirosin kinase dapat meningkatkan integritas membran spermatozoa sapi FH.

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan bahwa pentingnya penambahan tirosin kinase dalam diluter merupakan faktor yang menentukan tingkat keutuhan membran spermatozoa dari semen beku. Perlu dilakukan lebih lanjut untuk mengetahui ketahanan tirosin kinase dengan dalam suatu diluter.



## DAFTAR PUSTAKA

### DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, R.J., D. Harkiss, W. Knox, M. Peterson and D.S Irvine, 1998. A Novel Transduction cascade in Capacitating Human Spermatozoa Characterised by a Redox-regulated, camp-mediated Induction Of Tyrosine Phosphorylation. MRC Reproductive Biology Unit. 27 Chalmers Steet. Edinburgh EH3 9EQ, Scotland. Hal.645-654
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf dan D. Yanti. 2005. Kaji Banding Kualitas Semen Beku Sapi Friesian Holstein menggunakan Pengencer dari Berbagai Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Hal. 168-176.
- Arifiantini, R.I dan T.L. Yusuf. 2004. Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer dalam Dua Jenis Kemasan pada Proses Pembekuan Semen Sapi *Friesian holstein*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Breibart H. An Z. Naor, 1999. Protein Kinase in Mammalian Sperm Capacitation and The Acrosomal Reaction. Revisi Reproduction. J.Soc. Reprod and Fert.4:151-159
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2007. Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (PROTAP) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan. Jakarta. 29 – 47.
- Elbein, A.D., Y.T.Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. 2003. New Insight on Trehalose: a Multifunctional Molecule. *Glycobiology*13: 17R-27R
- Evans, G. and Maxwell W.M.C. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Pty Limited. Australia. 17-23, 79-107.
- Fatimah, S. 2011. Motilitas dan Persentase Hidup Spermatozoa Sapi Friesian Holstein Post Thawing dalam Pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed® [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Franson, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Hewan Ternak (Anatomy and Physiology of Farm Animal). 4<sup>th</sup> ed. Diterjemahkan oleh B. Srigandono and K.Praseno. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. [disertasi]. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

- Feridis, 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta.Bandung. 18,53,74 - 75,84 - 85.
- Fonseca. J. F, C.A.A. Torres., V.V. Maffili., A.M. Borges., A.D.F. Santos., M.T. Rodrigues., and R.F.M. Oliviera. 2005. Hypoosmotic Swelling Test in Fresh Goat Spermatozoa. *Anim.Reprod.*2:139-144.
- Goyal, R.L., R.K. Tuli, G.C. Georgie and D. Chand. 1996. Comparison of Quality and Freezability of Water Buffalo Semen After Washing or Shepadex Filtration. *Theriogenology*
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> ed. Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA.
- Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati., T.W. Suprayogi. 2008. *Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjoprاندjoto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hunter, R. H. F. 1981. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB. Bandung.
- Ismudiono, H. Anwar, P. Srianto, S. P. Madyawati, A. Samik dan E. Safitri. 2007. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Bagian Reproduksi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- James, P.S., C.A. Wolfe, A. Mackie, S. Ladha, A. Prentice and R. Jones. 1999. *Lipid Dynamics in The Plasma Membrane of Fresh and Cryopreserved Human Sperm*. <http://humrep.oupjournal.org/>
- Kartasudjana. 2001. *Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak*. Departemen Pendidikan Nasional. 2000.
- Kostaman, T. Dan I.K. Sutana. 2006. *Studi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer pada Pengencer Tris-Sitrat-Fruktosa*. *Jurnal Sain Veteriner*.
- Kusriningrum, RS. 2009. *Buku Ajar Perancangan Percobaan*. Cetakan kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penerbit Dani Abadi. Surabaya.
- Lestari, Diena. 2010. *Populasi Kambing Ettawa di Indonesia*. *Bisnis Indonesia*. Jakarta. File://D: populasi.htm.download (25 Juli 2010).
- Leyton L. and P.M. Saling, 1989. Evidence that Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers the Acrosome Reaction.*J.Celf.Biol.* 108: 2163-2168.

- Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P.M. Saling., 1992. Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:11692-11695
- Madyawati, S.P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi Friesien Holstein (FH) terhadap Kualitas Semen Beku. Disertasi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Madyawati, S.P., H.A. Hermani dan T. Sardjito, 2004. Produksi Protein Tyrosin Kinase hasil Isolasi Spermatozoa Sapi Potong; Alternative Meningkatkan Produksi Semen Beku. Penelitian Proyek due-like batch III. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Partodiharjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi Ketiga. Penerbit Mutiara. Jakarta. 530-560.
- Poernomo, B., M. Mafruchati, Widjiati, E.M. Luqman, E.D. Masithah dan A.T. Mukti. 2005. Penuntun Emriologi. Pustaka Melati. Surabaya.
- Rubinsky, B. 2000. Cryosurgery Annual Review in Biomedical Engineering. University of California at Berkeley. Berkeley.
- Salamon, S. and Maxwell W.M.C. 2000. Storage of Ram Semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
- Samardzija M., Tomislav D., Suzana K., Marijan C., Martina K., Nikica P., and Jurac G. 2008. The Use Of The Hypoosmotic Swelling Test And Supravital Staining In Evaluation Of Sperm Quality In Boars. *Veterinarski Arhiv* 78 (4): 279-287.
- Setiadi, M.A. Yulnawati Dan Suprayogi A. 2007. Kualitas Spermatozoa Epididimis Anjing selama Penyimpanan pada Suhu 4°C. *JITV*: 134-138
- Solihati, N. dan Kune, P. 2006. Pengaruh jenis Pengencer terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental. Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. Bandung. 2-3. //http.www.google.com. [25 Mei 2010].
- Subratha, I.M. 1998. Pemberian Fosfolipid Esensial dan Antibiotik (Vitamin E) Meningkatkan Integritas Membran Spermatozoa. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suprayogi, T. W. 1996. Pengaruh Waktu penyimpanan Bahan Pengencer Kuning Telur Sifat Terhadap Daya Fertilisasi Sel mani Domba. Lembaga Penelitian, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tanaka H., Herliantien, E. Herwiyanti, O.P. Lubis, Buwono dan J. Pujiyanto., 2002. Reproduksi Klinik. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project Japan International Cooperation Agency. Hal. 2.

- Toelihere, M.R. 1979. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. Hal. 45-48, 95-100.
- Toelihare, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Trianasari, R. 2001. Pengaruh Bahan Pengencer dalam Proses Pembekuan terhadap Daya Hidup Spermatozoa Domba. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wassarman, P.M., 1990. *Profile of Mammalian Sperm Receptor Development*, 108: 1 - 17
- Yanagimachi. 1994. Mammalian Fertilization. In : The Physiology of Reproduction. E. Knobil, J. Neil, L.L. GS. Greenwald, C.L. Market, DW. Plaff. Raven Pers LTD. New York.
- Yuyun. 1996. Motilitas dan Persentase Hidup Spermatozoa Semen Sapi FH dalam Larutan Lugol. Skripsi. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.

# LAMPIRAN

*Lampiran I*

**Pembuatan Bahan Diluter Skim Kuning Telur**

**Organik (Skim Milk)**

A. Bahan : susu skim, aquabidest, antibiotika, kuning telur, dan gliserol

B. Cara membuat :

1. Membuat buffer (untuk 1000 cc)

- Menimbang susu skim 100 gram dan siapkan aquabides 960 cc dalam tabung
- Masukkan susu skim ke dalam bowling glass 3000 cc dan masukkan aquabides 960 cc
- Campur sampai homogen
- Masukkan bowling glass ke dalam pemanas elektrothermal sampai suhu 92-95<sup>0</sup>C
- Setelah mencapai suhu 92<sup>0</sup>C, angkat bowling glass dan dinginkan sampai suhu 37<sup>0</sup>C lalu di saring
- Masukkan buffer ke dalam tabung (measuring cylinder) 1000 cc kemudian simpan dalam lemari es
- Setelah buffer dingin tambahkan antibiotika (buffer antibiotika) dengan perbandingan 100:1. Antibiotika yang digunakan penicyllin sebanyak 3 juta IU dan Streptomycin 3 gram, lalu dicampur dengan aquabides sampai volumenya 30 cc.

2. Membuat bahan diluter A (untuk 1000 cc)

- Buffer antibiotika : 950 cc



- Kuning telur : 50 cc

3. Membuat bahan diluter B (untuk 1000 cc)

- Buffer antibiotika : 770 cc
- Gliserol : 160 cc
- Kuning telur : 50 cc
- Glukosa : 20 cc

Masing-masing bahan diluter dicampur sampai homogen

Sumber : Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan (2000)

*Lampiran 2***Pembuatan Bahan Diluter Tris Kuning Telur**

Bahan diluter Tris dalam 1.000 ml terdiri dari :

**1. Diluter A**

- Tris amino methan : 13,63 gram
- Citric acid : 7,62 gram
- Lactosa : 15,00 gram
- Fructose/levulose : 3,75 gram
- Raffinosa : 27,00 gram
- Kuning telur : 200 cc
- Penicyllin : 1.000.000 IU
- Streptomycin : 1 gram
- Aquabides : 755 ml

**2. Diluter B**

Diluter A + Gliserol 13 %

Cara Pembuatan :

- Bahan Tris amino methan, citric acid, lactosa, fructose, levulosa, raffinosa, setelah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer 1.000 cc:
- Ditambah 755 cc aquabidestilata/aquades dan dihomogenkan ;

- Kemudian gelas erlenmeyer dimasukkan ke dalam panci yang berisi air dimasak di atas nyala api;
- Setelah air dalam panci mendidih, gelas erlenmeyer diangkat dan didinginkan. Bila bahan-bahan dalam gelas erlenmeyer suhunya turun sampai 30<sup>0</sup>C, dimasukkan penstrep kemudian dihogenkan;
- Masukkan kuning telur dan homogenkan selama 15 menit;
- Setelah itu gelas erlenmeyer yang berisi larutan pengencer tersebut disimpan dalam lemari es dan tahan penyimpanan paling lama 1 minggu;
- Setelah menyimpan 2-3 hari terdapat endapat dari larutan diluter;
- Bila Diluter akan digunakan, supernatan dipisahkan terlebih dahulu dengan menggunakan pipet.

Sumber : Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan (2000)

*Lampiran 3***Komposisi Eosin-Negrosin**

Zat warna yang digunakan untuk pembuatan preparat ulas adalah zat warna eosin-negrosin dengan takaran sebagai berikut :

- Eosin 1
- Negrosin 5
- Citrat Na 3
- Aquadest ad 100

*Lampiran 4***Pemeriksaan Post Thawing**

1. Siapkan air hangat suhu 37-38<sup>0</sup>C di beker glass
2. Masukkan semen beku yang akan diperiksa ke dalam beker glass selama 15-30 detik
3. Kemudian gunting semen beku pada ujungnya dan juga sedikit bagian tengahnya, setelah itu teteskan 1 tetes ke objek glass yang telah dibersihkan dengan alcohol 70 %, kemudian kita tutup dengan cover glass
4. Objek glass tersebut diletakkan di atas slide warmer yang telah kita pasang pada mikroskop, tutup dengan cover glass;
5. Melihat gerakan spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x
6. Jangan lupa member label kode semen beku pada objek glass.
7. Menghitung prosentase spermatozoa yang masih hidup dengan penilaian 0-70% dari minimal 5 bidang pandang. Standar minimal prosentase Post Thawing Motility (PTM) untuk sapi 40 %.
8. Melihat gerakan individu spermatozoa, dengan nilai sebagai berikut :
  - a. 0 = tidak ada gerakan
  - b. 1 = gerakan lambat
  - c. 2 = gerakan sedang
  - d. 3 = gerakan cepat

Standar minimal untuk sapi prosentase hidup PMT 40 % dengan gerakan sperma ditulis 40/3.

Sumber : Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan (2000)

*Lampiran 5***Komposisi Pembuatan Medium Hypoosmotic Swelling Test (HOST)**

Sodium Sitrat Dyhidrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,753 gram
Fruktosa	1,351 gram
Aquabidest ad.	100 ml.

Sumber : WHO Laboratory (1992)

## Lampiran 6

## ANALISIS VARIAN

## Summarize

Case Summaries <sup>a</sup>

			Persen hidup (%)
Perlakuan	Skim K telur	1	20.35
		2	19.31
		3	19.11
		4	21.55
		5	21.42
		6	20.19
		7	19.08
		8	20.89
	Total	Sum	161.90
		Mean	20.2375
	Std. Deviation	1.00235	
Tris		1	18.78
		2	16.69
		3	16.31
		4	17.89
		5	18.17
		6	17.44
		7	16.57
		8	17.57
	Total	Sum	139.42
		Mean	17.4275
	Std. Deviation	.85715	
Skim K telur + TK		1	48.52
		2	45.21
		3	49.78
		4	49.35
		5	47.56
		6	42.21
		7	53.35
		8	55.89
	Total	Sum	391.87
		Mean	48.9838
	Std. Deviation	4.30773	
Tris + TK		1	42.15
		2	56.82
		3	20.25
		4	43.69
		5	43.44
		6	36.60
		7	45.68
		8	56.17
	Total	Sum	344.80
		Mean	43.1000
	Std. Deviation	11.53540	
Total	Sum	1037.99	
	Mean	32.4372	
	Std. Deviation	15.20440	

<sup>a</sup>. Limited to first 100 cases.

**Oneway****Descriptives**

Persen hidup (%)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Skim K telur	8	20.2375	1.00235	.35438	19.08	21.55
Tris	8	17.4275	.85715	.30305	16.31	18.78
Skim K telur + TK	8	48.9838	4.30773	1.52301	42.21	55.89
Tris + TK	8	43.1000	11.53540	4.07838	20.25	56.82
Total	32	32.4372	15.20440	2.68778	16.31	56.82

**ANOVA**

Persen hidup (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6092.859	3	2030.953	52.972	.000
Within Groups	1073.530	28	38.340		
Total	7166.389	31			

**Post Hoc Tests****Persen hidup (%)**

Duncan<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tris	8	17.4275	
Skim K telur	8	20.2375	
Tris + TK	8		43.1000
Skim K telur + TK	8		48.9838
Sig.		.372	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.



## Lampiran 7

## Foto Penelitian



Peralatan penelitian : *filling and sealing machine*, spektrofotometer, mikroskop, *printing machine*, water bath



Sapi Pejantan Fresian Holstein



Proses penampungan semen segar



Pengencer Skim kuning telur dan Tris kuning telur