

SKRIPSI

KEUTUHAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN HOLSTEIN (FH) DALAM BAHAN PENGECER SKIM KUNING TELUR, TRIS KUNING TELUR DAN ANDROMED® SETELAH PROSES PEMBEKUAN



Oleh :

YUNITA WIDYANINGRUM

NIM 060710277

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2011**

**KEUTUHAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI FRIESIAN HOLSTEIN
(FH) DALAM BAHAN PENGECER SKIM KUNING TELUR, TRIS
KUNING TELUR DAN ANDROMED® SETELAH PROSES
PEMBEKUAN**

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

YUNITA WIDYANINGRUM
NIM 060710277

Menyetujui
Komisi Pembimbing,



(Dr. Puji Sianto, drh., M.Kes)
Pembimbing Utama



(Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc.)
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

Keutuhan Membran Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH) dalam Bahan Pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed® Setelah Proses Pembekuan

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, 20 April 2011



Yunita Widyaningrum
NIM. 060710277

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 31 Maret 2011

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Abdul Samik, drh., M.Si.
Sekertaris : Dr. Suhermi Susilowati, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.
Pembimbing Utama : Dr. Pudji Sriananto, drh., M.Kes
Pembimbing Serta : Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc.

Telah diuji pada

Tanggal : 20 April 2011

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Abdul Samik, drh., M.Si.

Anggota : Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Dr. Pudji Sriananto, drh., M.Kes

Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc.

Surabaya,
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, drh., Ph.D.
NIP. 195312161978062001

SPERMATOZOA MEMBRANE INTEGRITY OF FRIESIAN HOLSTEIN (FH) BULL ON EGG YOLK SKIM, EGG YOLK TRIS AND ANDROMED® DILUTER AFTER FREEZING PROCESS

Yunita Widyaningrum

ABSTRACT

The purpose of this research is knowing the integrity of spermatozoa membrane on Friesian Holstein through *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) with three different diluter. The treatment of P1 used Egg Yolk Skim as diluter, while P2 used Egg Yolk Tris as diluter, and P3 used AndroMed® as diluter. The result of this research showed that the treatment on P3 have the highest spermatozoa membrane integrity, the second is P1 and the lowest is P2. The empirical result also showed that there is some significant differences of spermatozoa membrane integrity among three different diluter.

Keywords : integrity membrane, *Hypo-Osmotic Swelling Test*, diluter

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dengan judul **Keutuhan Membran Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH) dalam Tiga Bahan Pengencer Setelah Proses Pembekuan.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

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

Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Rahaju Ernawati, drh., M.Sc. selaku pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Dr. Abdul Samik, drh., M.Si. selaku ketua penguji, Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes. selaku sekretaris penguji dan Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si. selaku anggota penguji.

Trilas Sardjito, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing penelitian dan Ira Sari Yudaniyanti, drh., MP. selaku dosen wali di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

I-MHERE sub component b2c sebagai wadah dan penyedia sarana penelitian sehingga program penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak, ibu dan adik tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan, dan semangat.

Dendy Widyatama dan keluarga yang telah menemani setiap saat serta memberikan dukungan, doa, semangat, dan saran.

Teman-teman di kampus, Puput, Ima, Lilla, Nia dan teman-teman angkatan 2007 lainnya serta teman-teman kos yang telah banyak membantu sehingga terselesaikannya penulisan ini.

Teman-teman penelitian angkatan 2006 dan 2007 serta teman-teman S2 yang telah banyak membantu menyelesaikan penulisan ini.

Penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, April 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS	iii
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Landasan Teori	3
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
1.6. Hipotesis	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sapi Friesian Holstein	6
2.2 Anatomi Alat Kelamin Jantan	7
2.3 Spermatogenesis	9
2.4 Membran Plasma Spermatozoa	11
2.5 Tinjauan Tentang <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i>	12
2.6 Bahan Pengencer	13
2.7 Semen Beku	15
 BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	
3.1.1 Tempat Penelitian	17
3.1.2 Waktu Penelitian	17
3.2 Bahan dan Materi Penelitian	17
3.2.1 Hewan Percobaan	17
3.2.2 Bahan Penelitian	17
3.2.3 Alat Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Pembuatan Pengencer	19
3.3.2 Pengambilan Semen	19
3.3.3 Pemeriksaan Makroskopis	19
3.3.4 Pemeriksaan Mikroskopis	20

3.3.5 Gliserolisasi dan Equilibrase	21
3.3.6 <i>Filling</i> dan <i>Sealing</i>	22
3.3.7 <i>Pre Freezing</i> dan <i>Freezing</i>	23
3.3.8 Evaluasi.....	23
3.3.9 Uji <i>Hypo-Osmotic Swelling</i>	24
3.4 Rancangan Penelitian.....	26
3.5 Peubah yang Diamati	26
3.6 Analisis Data.....	26
3.7 Skema Penelitian.....	27
 BAB 4 HASIL PENELITIAN	 28
 BAB 5 PEMBAHASAN.....	 31
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan.....	36
6.2 Saran.....	36
 DAFTAR PUSTAKA	 40
 LAMPIRAN.....	 45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Hasil pemeriksaan HOST, makroskopis, dan mikroskopis semen segar sapi FH.....	28
4.2. Persentase rerata dan simpangan baku keutuhan membran plasma spermatozoa <i>post thawing</i> menggunakan metode HOST..	28
4.3. Analisa sidik ragam.....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Sapi Friesian Holstein.....	6
2.2. Bagan spermatogenesis.....	10
3.1. Spermatozoa yang tidak menggembung dan spermatozoa yang menggembung.....	25
4.1. Diagram batang persentase keutuhan membran plasma spermatozoa <i>post thawing</i> menggunakan metode HOST.....	29
4.2. Pemeriksaan mikroskopis spermatozoa dengan metode Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) dengan pembesaran 400 kali...	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi pembuatan medium <i>Hypo-Osmotic Swelling Test</i> (HOST).....	45
2. Komposisi pembuatan pengencer Skim Kuning Telur.....	46
3. Komposisi pengencer Tris Kuning Telur.....	48
4. Komposisi pengencer AndroMed®.....	49
5. Pengolahan data.....	50
6. Foto penelitian.....	53

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

ANAVA	: Analisis of variant
BBIB	: Balai Besar Inseminasi Buatan
BIBD	: Balai Inseminasi Buatan Daerah
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cc	: Centimeter per Cubic
CO ₂	: Carbon dyoxida
Depdiknas	: Departemen Pendidikan Nasional
FH	: Friesian Holstein
FKH	: Fakultas Kedokteran Hewan
HOST	: Hypo-Osmotic Swelling Test
IB	: Inseminasi Buatan
IU	: International Unit
M	: Molaritas
NaCl	: Natrium Chlorida
pH	: Power of Hydrogen
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
Tris	: Tris(Hydroxymethyl)aminomethane
USA	: United State of America
UU	: Undang-Undang
WHO	: World Health Organization
°C	: Derajat Celcius

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Salah satu teknologi reproduksi dalam dunia kedokteran hewan adalah Inseminasi Buatan (IB). Teknik ini bertujuan untuk meningkatkan percepatan penyebarluasan bibit unggul di suatu wilayah dengan cara mengambil semen dari seekor pejantan unggul, selanjutnya diproses menjadi semen beku. Awal pelaksanaan IB di Indonesia masih menggunakan semen yang berasal dari pejantan lokal hasil seleksi, namun dalam program pengembangan dan perbaikan mutu genetik ternak, pemerintah mengimpor semen beku dari beberapa negara baik penghasil susu maupun daging yang telah maju sampai tahun 1976 seperti Belgia, New Zeland, Australia, Denmark, Jepang, USA dan Belanda sehingga memperoleh pengalaman praktis dan pengetahuan manajemen untuk menunjang program pelaksanaan IB (Hardijanto dkk.,2009).

Inseminasi Buatan adalah salah satu bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak yang memungkinkan manusia mengawinkan ternak betina yang dimiliki tanpa perlu seekor pejantan. Inseminasi Buatan merupakan suatu rangkaian proses yang terencana dan terprogram karena menyangkut kualitas genetik ternak di masa yang akan datang. Pelaksanaan dan penerapan teknologi Inseminasi Buatan di lapangan dimulai dengan langkah pemilihan pejantan unggul sehingga akan lahir anak yang kualitasnya lebih baik dari induknya, selanjutnya dari pejantan tersebut dilakukan penampungan semen, penilaian kelayakan kualitas semen,

pengolahan dan pengawetan semen dalam bentuk cair dan beku, serta teknik inseminasi ke dalam saluran reproduksi ternak betina (Depdiknas,2001).

Indonesia memiliki dua Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Nasional yang terdapat di Lembang (Jawa Barat) dan Singosari (Jawa Timur). UU no 22 th 1999 mengenai otonomi daerah memberikan kewenangan dalam mengatur dan memajukan daerahnya sendiri tanpa ada campur tangan pemerintah pusat, maka daerah terpacu dalam mendirikan Balai Inseminasi Buatan skala lokal yang dikenal dengan nama BIBD, seperti di Lampung, Palembang, Padang, Medan, Bali, Jawa Tengah, Kalimantan Selatan dan Blora (Arifiantini dan Yusuf,2004).

Pembuatan semen beku membutuhkan pengencer yang tepat. Penelitian ini menggunakan tiga macam pengencer, yaitu Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur dan AndroMed®. Pengencer Skim Kuning Telur terdiri dari satu bagian kuning telur segar yang dicampur dengan satu bagian susu skim. Pengencer Tris Kuning Telur berfungsi sebagai *buffer* yaitu penyanggah untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa serta berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Pengencer AndroMed® adalah pengencer semen komersial berisi bahan kimia yang komplit namun tidak mengandung kuning telur, sehingga diharapkan tidak ada kontaminasi mikroorganisme.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah :

Apakah terdapat perbedaan keutuhan membran spermatozoa sapi Friesian Holstein *post thawing* dalam pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur dan AndroMed®?

1.3 Landasan Teori

Berhasilnya suatu program Inseminasi Buatan (IB) pada ternak tidak hanya tergantung pada kualitas dan kuantitas semen yang diejakulasikan seekor pejantan, tetapi tergantung juga pada kesanggupan untuk mempertahankan kualitas dan memperbanyak volume semen tersebut untuk beberapa saat lebih lama setelah ejakulasi sehingga lebih banyak betina akseptor yang akan diinseminasi. Usaha untuk mempertahankan kualitas semen dan memperbanyak semen dari pejantan unggul adalah dengan melakukan pengenceran menggunakan beberapa bahan pengencer. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan spermatozoa dapat bergerak secara progresif, tidak bersifat racun bagi spermatozoa, menjadi penyanggah bagi spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) untuk semen beku (Solihati dan Kune, 2010).

Bahan pengencer yang baik harus mempunyai tekanan osmosa isotonis dan dapat mempertahankan tekanan isotonis selama penyimpanan, memberikanimbangan unsur mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan spermatozoa,

menyediakan bahan makanan bagi spermatozoa untuk proses metabolisme, memiliki lipoprotein atau lesitin untuk melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin, menyediakan penyanggah terhadap produksi akhir metabolisme yang bersifat racun terhadap spermatozoa, sumber bahan reduksi untuk melindungi enzim seluler, serta bebas dari substansi produk kuman atau organisme penyakit menular yang berbahaya terhadap spermatozoa, alat reproduksi betina, proses fertilisasi, dan pengembangan ovum yang difertilisasi (Feradis,2010).

Uji kualitas semen merupakan langkah lanjutan dari pemilihan pengencer yang tepat, salah satunya adalah uji keutuhan membran. Keutuhan membran spermatozoa dapat ditentukan berdasarkan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa yang diuji dengan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang mempunyai integritas membran utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala dan ekor yang berputar (Jayendra,1990).

Membran plasma yang menyelubungi sebuah sel berfungsi membatasi keberadaan sebuah sel dan memelihara perbedaan pokok antara isi sel dengan lingkungannya. Membran tersebut tidak hanya sebuah penyekat pasif, tetapi juga sebuah filter yang mempunyai kemampuan memilih bahan yang melintas dengan tetap memelihara perbedaan kadar ion di luar dan di dalam sel. Bahan-bahan yang diperlukan oleh sel dapat masuk dan bahan yang tidak diperlukan dapat melintas keluar sel (Nawang,2005).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

Mengetahui keutuhan membran spermatozoa sapi Friesian Holstein melalui *Hypo-Osmotic Swelling Test post thawing* dalam pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur dan AndroMed®.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan pengencer yang baik dalam pembuatan semen beku dengan melihat hasil keutuhan membran spermatozoa *post thawing* sapi Friesian Holstein.

1.6 Hipotesis

Hipotesis penelitian yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan keutuhan membran spermatozoa sapi Friesian Holstein dalam pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur dan AndroMed®.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Friesian Holstein

Sapi FH merupakan jenis sapi perah yang populasinya terbanyak dan telah tersebar luas di berbagai belahan dunia, baik di negara beriklim tropis maupun subtropis. Bangsa sapi FH ini dinilai mudah beradaptasi dengan keadaan iklim di lingkungan hidup yang baru. Ciri khas dari sapi jenis ini antara lain terlihat di bagian dahinya terdapat warna kulit dan bulu yang putih di antara kedua mata dengan ukuran yang berbeda untuk masing-masing individu, warna putih di bagian dada, perut bagian bawah, kaki dan ekor. Persentase warna antara putih dan hitam untuk setiap individu bervariasi, umumnya warna hitam lebih dominan (Lemboepasang Dairy Farm, 2010).



Gambar 2.1 Sapi Fresian Holstein
(Sumber: Koleksi Taman Ternak Pendidikan, 2010)

2.2 Anatomi Alat Kelamin Sapi Jantan

Alat reproduksi sapi jantan terdiri dari sepasang testis sebagai alat reproduksi utama; saluran alat kelamin yang terdiri dari vas eferens, epididimis, vas deferens, ampula dan urethra; kelenjar aksesoris seperti kelenjar vesicular seminalis atau vesicularis, prostat dan bulbourethralis atau cowper; serta alat kelamin luar yaitu penis, preputium dan skrotum (Hardijanto dkk.,2009).

Testis terletak pada daerah prepubis, terbungkus dalam kantong scrotum, scrotum berisi dua lobi testis yang masing-masing lobi mengandung satu testis dan digantung oleh funiculus spermaticus. Sapi jantan, testis berbentuk oval memanjang dan terletak dengan sumbu panjangnya vertical di dalam scrotum. Testis terbungkus oleh kapsul berwarna putih mengkilat yang disebut dengan tunika albugenia (Toelihere,1985).

Testis terdiri dari jaringan tubuli seminiferi, sel stroma, sel interstisial dan sel-sel Leydig. Tubuli seminiferi terdiri dari dua macam epitel yang berbeda yaitu : (1) sel germinatif adalah sel yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis, sebelum siap untuk mengadakan fertilisasi. (2) sel sertoli adalah sel yang berbentuk panjang dan seperti piramid, terletak dekat atau di antara sel-sel germinatif. Fungsi sel ini memberi makan kepada spermatozoa yang masih muda selain itu juga memfagosit sel-sel spermatozoa yang telah mati atau telah mengalami degenerasi. Pada jaringan ini terdapat pembuluh darah, limfe serta saraf dan sel makrofag (Salisbury dan Van Demark,1985).

Epididimis merupakan saluran eksternal pertama yang keluar dari testis dan dibatasi oleh tunica vaginalis dan testis. Epididimis dibagi menjadi tiga bagian, yaitu, caput (kepala), corpus (badan), dan cauda (ekor) epididimis. Corpus epididimis memanjang dari apeks menurun sepanjang sumbu memanjang testis dan merupakan saluran tunggal yang bersambungan dengan cauda epididimis. Lumen cauda epididimis lebih lebar daripada lumen corpus epididimis (Keiko,2009).

Duktus (vas) deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis dengan urethra. Dindingnya mengandung otot polos yang berperan dalam pengangkutan spermatozoa. Diameter vas deferens 2 mm dengan konsistensi seperti tali, berjalan sejajar dengan corpus epididimis, dekat dengan kepala epididimis. Vas deferens menjadi lurus dan bersama-sama dengan pembuluh darah, limfe dan saraf pembentuk funikulus spermatikus yang berjalan melalui kanalis inguinalis ke dalam cavum abdominal. Kedua vas deferens (kiri dan kanan) terletak di atas vesika urinaria yang menebal dan membesar membentuk ampula duktus deferens (Toelihere,1985).

Urethra merupakan saluran tunggal yang membentang dari persambungan antara ampulla sampai ke pangkal penis. Fungsi urethra adalah sebagai saluran kencing dan semen. Pada sapi dan domba, selama ejakulasi terjadi pencampuran yang kompleks antara spermatozoa dari vas deferens dan epididymis dengan cairan sekresi dari kelenjar-kelenjar tambahan dalam urethra yang berada di daerah pelvis menjadi semen (Keiko,2009).

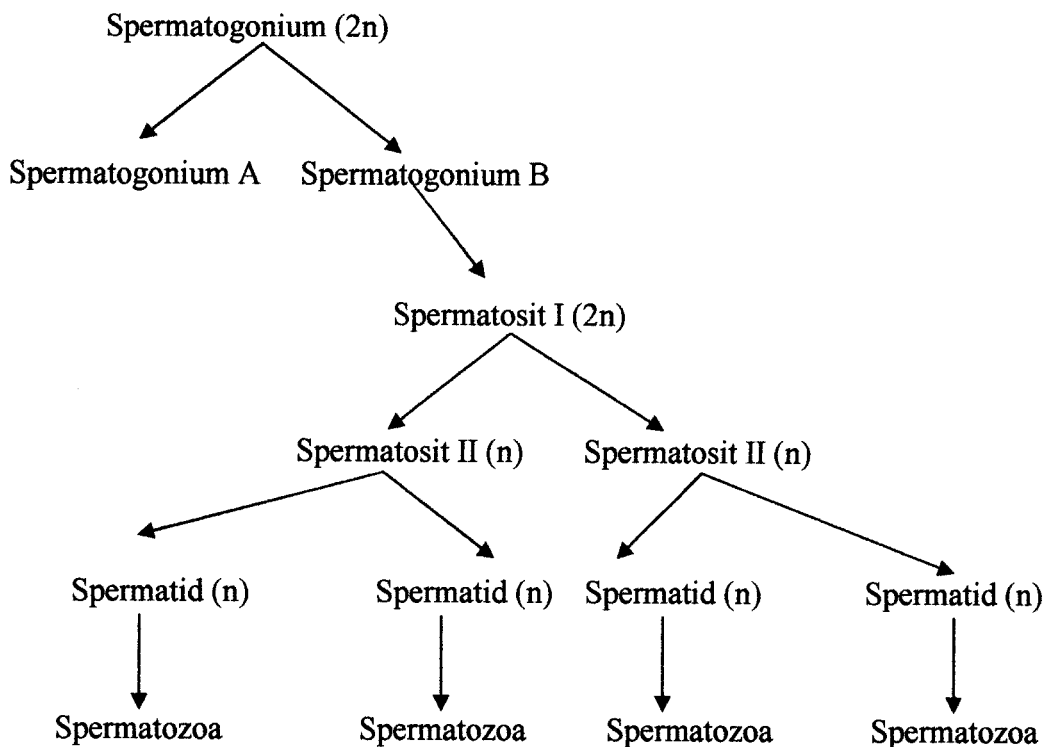
Kelenjar kelamin aksesoris pada hewan jantan terdiri dari vesikula seminalis, kelenjar prostat dan bulbo uretralis. Ampula merupakan pembesaran kelenjar pada bagian ujung duktus deferens. Kelenjar ampula ini bermuara ke dalam duktus deferens dan memberikan cairan semen. Vesikula seminalis merupakan sepasang kelenjar yang biasanya bermuara dengan duktus deferens melalui bermacam-macam duktus ejakulatori ke dalam urethra pelvic kemudian ke kaudal leher kandung kemih. Kelenjar prostat merupakan kelenjar yang mengelilingi pelvis urethra. Kelenjar ini menghasilkan sekresi alkalin yang membantu memberikan bau khas pada semen. Kelenjar bulbourethralis merupakan sepasang kelenjar yang terletak pada tiap sisi pelvis urethra (Frandsen, 1992).

Bentuk penis sapi silindris dan sedikit menipis dari pangkal penis ke ujung yang bebas. Bagian ujung penis memiliki sedikit sekali jaringan, kecuali bagian pangkal. Penis membesar sedikit pada waktu ereksi dan menjadi lebih tegang. Penis sapi jantan padat dan keras (Salisbury dan Van Demark, 1985).

2.3 Spermatogenesis

Proses spermatogenesis dibagi menjadi dua tahap yaitu: spermatositogenesis adalah pertumbuhan jaringan spermatogenik dengan pembelahan mitosis yang diikuti dengan pembelahan reduksi (meiosis). Pada pembelahan meiosis jumlah kromosom dibagi dua sama banyak yaitu dari diploid ($2n$) menjadi haploid ($1n$) sehingga pada saat yang bersamaan sel benih primordial juga berkembang menjadi spermatogonia yang selanjutnya akan berdiferensiasi

menjadi spermatosit primer. Spermatosit primer akan berkembang menjadi spermatosit sekunder. Spermatosit sekunder melalui pembelahan meiosis akan menghasilkan spermatid. Tahap berikutnya adalah spermiogenesis. Pada fase ini sel spermatid akan mengalami metamorfosa dan membentuk spermatozoa secara sempurna. Perubahan proses metamorfosa ini meliputi pembentukan akrosom, kepala, badan dan ekor dari spermatozoa. Spermiogenesis dibagi dalam tahap Golgi, tahap tudung (cap phase), tahap akrosom, dan tahap pemasakan (Djuwita et al., 2000).



Gambar 2.2 Bagan spermatogenesis
(Sumber : Hardijanto dkk., 2009)

2.4 Membran Plasma Spermatozoa

Membran plasma yang menyelubungi sebuah sel selain membatasi keberadaan sebuah sel, juga memelihara perbedaan pokok antara isi sel dengan lingkungan, namun membran tersebut tidak hanya sebuah penyekat pasif, melainkan juga merupakan sebuah filter yang memiliki kemampuan memilih bahan-bahan yang melintasinya dengan tetap memelihara perbedaan kadar ion di dalam dan di luar sel. Bahan-bahan yang diperlukan oleh sel dapat masuk sedang bahan-bahan yang merupakan limbah sel dapat melintas ke luar sel (Nawang,2005).

Menurut model mozaik cairan, membran plasma terdiri atas tiga lapisan, seperti yang tampak pada mikroskop elektron. Kedua lapisan yaitu lapisan terluar dan lapisan terdalam disusun oleh protein, sedangkan lapisan tengah disusun oleh dua lapis molekul fosfolipid dan lapisan tipis mukopolisakarida (Frandsen,1992).

Adanya protein dan mukopolisakarida pada permukaan membuat membran hidrofil, yang berarti bahwa air melekat dengan mudah pada membran tersebut. Lipid terletak di tengah membran dan tidak dapat ditembus oleh zat yang tidak larut dalam lipid, bagian lemak molekul fosfolipid melekat pada fase lipid yang terletak di tengah membran sel, dan bagian polar (terionisasi) molekul menonjol ke permukaan yang terikat secara elektrokimia dengan lapisan dalam dan lapisan luar protein. Lapisan mukopolisakarida yang tipis pada permukaan membran sel membantu membuat permukaan membran luar berbeda dengan permukaan dalam, jadi mempolarisasi membran sehingga reaktivitas kimia permukaan dalam sel berbeda dengan permukaan luar. Interpretasi membran sel

lain dan salah satu yang mempunyai banyak bukti mutakhir yang menyokong adalah bahwa struktur dasar membran hampir seluruhnya lipid dengan sedikit protein pada kedua permukaan. Protein ini tampak tersebar di seluruh lipid dan mempunyai banyak fungsi yaitu 1) memberi kekuatan struktural pada membran; 2) bekerja sebagai enzim untuk mempermudah reaksi-reaksi kimia; 3) bekerja sebagai protein pengemban (carrier) untuk transport zat-zat melalui membran; 4) menguraikan zat lipid dan oleh karena itu memberi porsi pada membran (Guyton dan Hall,1997).

2.5 Tinjauan Tentang *Hypo-Osmotic Swelling Test*

Hypo-Osmotic Swelling Test merupakan tes sederhana yang didasarkan pada semipermeabilitas membran sel, yang mengakibatkan spermatozoa menggembung 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).

Spermatozoa yang terpapar pada medium *hypo-osmotic* akan mengalami pembengkokan ekor sehingga berbentuk spiral. Pembengkokan ini adalah akibat gangguan kontraksi-relaksasi ekor oleh adanya aliran ion atau bahan yang berat molekulnya rendah dari ekor ke medium *hypo-osmotic* tersebut. Tes klinik ini diperkenalkan oleh Jayendran (1984). Tes ini memberikan informasi tambahan mengenai integritas dan kerusakan pada membran ekor spermatozoa. Membran spermatozoa yang normal apabila diberi larutan HOS akan mengalami suatu

pengembangan dan tidak terjadi suatu pengembangan apabila membran sel mengalami kerusakan.

2.6 Bahan Pengencer

Semen beku yang berkualitas tinggi membutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat *thawing*, karena itu, bahan pengencer semen beku harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik, dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing* (Aboagla dan Terada,2004).

Sumber nutrisi yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat terutama fruktosa yang paling mudah dimetabolisasi oleh spermatozoa (Toelihere,1985). *Buffer* berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dan juga berfungsi menetralkan asam laktat yang dihasilkan dari sisa metabolisme spermatozoa. Bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan adalah kuning telur atau kacang kedelai yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibriasi (5°C) (Aboagla dan Terada,2004).

Pengencer Skim Kuning Telur merupakan pengencer 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 ekuilibriasi (5°C) (Arifiantini dan Yusuf,2004). Hal ini disebabkan pengencer susu mempunyai beberapa keunggulan, diantaranya susu mengandung substansi pelindung lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap suhu dingin

selama proses pembekuan (Toelihere,1985). Kuning telur juga sebagai sumber makanan karena mengandung banyak protein yang larut dalam air atau minyak serta asam amino esensial. Karbohidrat dari kuning telur berupa glukosa dan gabungan karbohidrat yaitu galaktosa dan manosa yang menghasilkan energi dan dalam proses metabolisme sehingga dapat didayagunakan oleh spermatozoa. Penggunaan kuning telur 12,5% sampai 20% dapat melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin dan dapat mencapai daya hidup optimal pada suhu 5 ° C (Rizal dan Herdis, 2006). Penggunaan susu skim lebih disukai karena terdapat sedikit butir-butir lemak yang dapat menghambat pemeriksaan dengan mikroskop (Feradis,2010).

Pengencer Tris Kuning Telur telah umum digunakan dalam proses pembuatan semen beku berbagai jenis hewan dan ternak. Salah satu komponen di dalamnya yaitu *Tris aminomethan* merupakan *buffer* dan dapat mempertahankan tekanan 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. Kuning telur mempunyai fungsi sebagai *buffer*, sumber energi dan krioprotektan. 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 Salisbury dan VanDenmark (1985), kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin sebagai bahan pelindung dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein pada membran sel untuk mencegah *cold shock*. Kuning telur

mengandung zat-zat yang dapat mencegah kerusakan sel spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan.

Salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur adalah AndroMed® produksi Minitube Jerman. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Pengencer AndroMed® juga telah mengandung gliserol sehingga dalam proses kriopreservasi semen, pemanfaatan pengencer tersebut tidak perlu lagi ditambahkan senyawa krioprotektan. Penggunaan pengencer semen komersial seperti AndroMed® dalam proses kriopreservasi semen selain dapat meningkatkan kualitas semen beku, juga dapat mencegah terjadinya penularan bibit penyakit yang mungkin terdapat di dalam kuning telur (Surachman dkk.,2006).

2.7 Semen Beku

Semen atau mani adalah cairan benih yang merupakan campuran dari produk yang dihasilkan oleh testes, kelenjar kelamin termasuk vesikularis, prostata, bulbouretralis, kelenjar pada dinding ampula dan uretra. Semen terdiri dari sel-sel spermatozoa dan cairan seminal plasma. Pada ternak, sel-sel spermatozoa pada umumnya hanya merupakan 1/10 bagian dari seluruh volume semen (Partodihardjo,1992).

Orang yang pertama kali mengadakan percobaan tentang pembekuan spermatozoa adalah Devenport pada tahun 1897 bahwa spermatozoa manusia tetap hidup pada pendinginan -17°C . Penemuan ini hanya sedikit mendapat

perhatian dari para peneliti terhadap pembekuan sebagian suatu kemungkinan untuk pengawetan. Pada tahun 1938, F.Jahnel berhasil menghidupkan kembali spermatozoa manusia yang telah didinginkan selama 40 hari pada suhu -79°C dan penyimpanan pada waktu yang lebih pendek pada suhu -196°C sampai -269°C . Semen beku mempunyai pengertian sebagai semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku antara -79°C sampai -196°C . Semen yang telah diencerkan, bila dibekukan maka akan terbentuk kristal-kristal es atau terjadi penumpukan elektrolit dan zat-zat lain di dalam sel spermatozoa yang berbahaya atau dapat mematikan (Hardijanto dkk.,2009).

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Taman Ternak Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Gresik. Pemeriksaan keutuhan membran spermatozoa dilaksanakan di Laboratorium *In Vitro*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan, yaitu bulan Agustus sampai September 2010.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sapi pejantan Friesian Holstein bersertifikat yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian meliputi : semen pejantan sapi Friesian Holstein, pengencer Skim Kuning Telur, pengencer Tris Kuning Telur, pengencer

AndroMed®, NaCl fisiologis, pewarna eosin negrosin, alkohol 70%, larutan *Hypo-Osmotic Swelling*.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat penelitian untuk mengambil semen meliputi : kandang penjepit, vagina buatan, tabung penampung semen, thermometer, dan tali *handling*.

Alat-alat untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen meliputi : kertas catatan, bolpoin, kertas lakmus, mikroskop, spektrofotometer, tabung penampung semen, gelas objek, gelas penutup, mikropipet, pipet tetes, batang pengaduk gelas, kertas tisu, kapas, bunsen.

Alat-alat untuk mengencerkan semen dan pengemasan meliputi : mikroskop, tabung penampung semen, gelas objek, gelas penutup, timbangan analitik kapasitas 100 gram, batang pengaduk gelas, pipet tetes, labu erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, pipet ukur, thermometer, scalpel, lemari es, *cool top*, aluminium foil, rak besi, container gas nitrogen cair, mini straw, *filling* dan *sealing machine*.

Alat-alat untuk uji *Hypo-Osmotic Swelling* meliputi : inkubator CO₂, tissue culture dish, pipet tetes, gelas objek, gelas penutup, eosin negrosin, bunsen, mikroskop.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pembuatan Pengencer

Pembuatan dan komposisi pengencer dijelaskan di lampiran. Pengencer 1 (Skim Kuning Telur), pengencer 2 (Tris Kuning Telur), pengencer 3 (AndroMed®).

3.3.2 Pengambilan Semen

Pengambilan semen dilakukan pada sore hari. Pejantan dimandikan dan diberi pakan terlebih dahulu, kemudian dibawa ke kandang jepit dan dipertemukan dengan pejantan atau betina pemancing untuk memberi rangsangan libido kepada pejantan yang akan ditampung semennya. Vagina buatan yang telah disiapkan diberi pelicin, apabila terdapat tanda-tanda pejantan akan menaiki pejantan atau betina pemancing, maka vagina buatan dipasang pada penis untuk menampung semen.

3.3.3 Pemeriksaan Makroskopis

Melihat dan mencatat :

1. Volume semen (rata-rata sapi 5 cc)
2. Warna semen (susu, krem, kuning)
3. Kekentalan semen (encer, sedang, kental)
4. Derajat keasaman/pH (6,2-6,8) atau rata-rata pH = 7
5. Bau (normal seperti susu)

3.3.4 Pemeriksaan Mikroskopis

1. Gerak massa

Menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10x10. Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan massa minimal 2+.

0 : Tidak ada gerak spermatozoa maupun gerak massa sperma

1+ : Gerakan massa spermatozoa lemah

2+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tipis, jarang, dan sedang.

3+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tebal, gelap, cepat dan berpindah-pindah.

4+ : Gerakan massa spermatozoa berupa gelombang tebal, gelap, dan sangat cepat.

2. Gerak individu

Menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x10. Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan individu minimal 70% sel spermatozoa bergerak aktif ke depan (progresif).

0 : Tidak ada gerakan individu spermatozoa

1 : Gerakan individu spermatozoa lamban

2 : Gerakan individu spermatozoa sedang

3 : Gerakan individu spermatozoa cepat

4 : Gerakan individu spermatozoa sangat cepat

3. Konsentrasi semen

Pemeriksaan konsentrasi semen digunakan sampel sebanyak 30 μ l dan diperiksa menggunakan spektrofotometer. Hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometer berupa *print out* yang berisi data mengenai kondisi spermatozoa.

Proses *water jacket* yaitu tiga tabung erlenmeyer yang berisi spermatozoa dan masing-masing ditambah pengencer Skim Kuning Telur, pengencer Tris Kuning Telur, dan pengencer AndroMed® 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*, pemeriksaan lebih lanjut semen akan dikembalikan pada suhu 5°C. Air dipilih sebagai media *water jacket* karena massa jenisnya besar sehingga tidak mudah menjadi panas atau dingin. Kenaikan suhu atau penurunan suhu pada air terjadi secara perlahan, selanjutnya dilakukan proses gliserolisasi dan equilibrasi dengan menggunakan *cool top* yang terdiri dari dua ruang dan empat pintu yang masing-masing digunakan untuk adaptasi suhu, proses gliserolisasi, tahap equilibrasi, dan proses *filling* dan *thawing*

3.3.5 Gliserolisasi dan Equilibrasi

Spermatozoa yang masing-masing telah dicampur dengan pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed® dimasukkan ke dalam *cool top* hingga suhu spermatozoa menjadi 5°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°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 4 jam (setiap 30 menit diaduk secara perlahan) pada suhu 3-5°C untuk menuju suhu *pre freezing* (-140°C) dan suhu *freezing* (-196°C).
- Pemeriksaan motilitas spermatozoa (pemeriksaan *before freezing*), syarat untuk dilakukan proses selanjutnya adalah jika pemeriksaan motilitas menunjukkan persentase 60-70%.

3.3.6 *Filling dan Sealing*

Filling adalah memasukkan spermatozoa yang sudah dicampur pengencer ke dalam straw. Straw yang digunakan adalah mini straw dengan ukuran 0,25 mililiter. Spermatozoa pada mini straw minimal berjumlah 25 juta spermatozoa. Straw tersebut didinginkan terlebih dahulu dalam *cool top* agar suhunya menjadi sama dengan suhu spermatozoa dan pengencer kemudian disegel menggunakan *sealing machine*.

3.3.7 *Pre freezing* dan *freezing*.

Straw yang telah dikemas atau diatur di atas rak straw, kemudian diletakkan di atas Nitrogen cair ± 1 cm di atas permukaan Nitrogen cair, processing dalam container sampai suhunya mencapai -140°C (membutuhkan waktu 9 menit).

Freezing dilanjutkan setelah *pre freezing* yaitu straw direndam dalam Nitrogen cair yang suhunya -196°C .

3.3.8 Evaluasi

Proses evaluasi dilakukan sebanyak tiga kali yaitu sebelum pengenceran, 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 semen yang sudah dicampur pengencer pada gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup, selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Evaluasi ini dimaksudkan untuk mengetahui gerakan individu setelah gliserolisasi dan menjadi pertimbangan dilakukan 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 spermatozoa memiliki daya hidup dan bergerak aktif (motil). Spermatozoa yang mengalami gliserolisasi biasanya mengalami penurunan kualitas yang ditandai

dengan banyaknya spermatozoa yang mati akibat penurunan suhu yang terjadi selama penambahan gliserol.

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

3.3.9 Uji *Hypo-Osmotic Swelling*

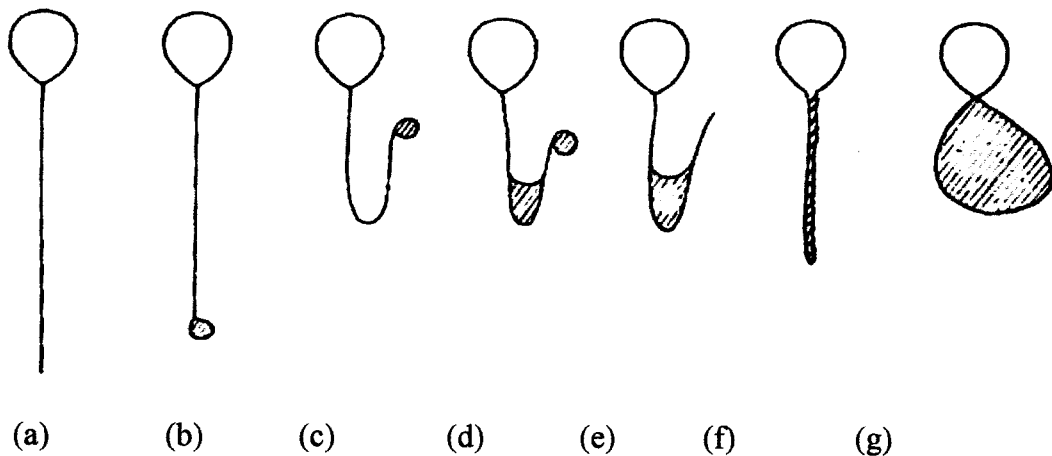
Pemeriksaan keutuhan membran menggunakan *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Prosedur pemeriksaan menggunakan medium HOST berupa NaCl hipotonik (komposisi terdapat di lampiran 1). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 0,9 ml medium HOST, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama satu jam pada suhu 37°C. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x. Jumlah spermatozoa dengan membran utuh dihitung dalam bentuk persen. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologik bila diinkubasi pada medium hipotonik. Perubahan yang terjadi antara lain pembengkokan pada ujung ekor, ekor yang pendek dan tebal

atau pembengkokan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang dibentuk oleh ekor spermatozoa.

Prinsip HOST adalah pengangkutan cairan Hypo-Osmotic Swelling untuk masuk melalui membran plasma spermatozoa di bawah kondisi hipoosmotik. Ketidakstabilan membran plasma dan konsentrasi ion intraseluler akan mempengaruhi keutuhan membran. Membran spermatozoa yang normal akan mengalami suatu pengembangan dan tidak terjadi suatu pengembangan apabila membran plasma mengalami kerusakan.

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

$$\text{Spermatozoa normal} = \frac{\text{Spermatozoa yang menggembung}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100 \%$$



Gambar 3.1 Spermatozoa yang tidak menggembung dan spermatozoa yang menggembung (WHO,1999)

- Keterangan 1. spermatozoa yang tidak menggembung/ekor lurus (a)
2. spermatozoa yang menggembung atau ekor melingkar (b-g)

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ulangan yang sama. Rancangan ini hanya ada satu sumber keragaman yaitu perlakuan disamping pengaruh acak, sehingga hasil perbedaan antar perlakuan hanya disebabkan oleh pengaruh perlakuan dan pengaruh acak saja (Kusriningrum,2008).

3.5 Peubah yang diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah keutuhan membran spermatozoa *post thawing* semen beku dari pejantan Friesian Holstein dalam tiga pengencer yang berbeda yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga.

Variabel bebas : Pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed®.

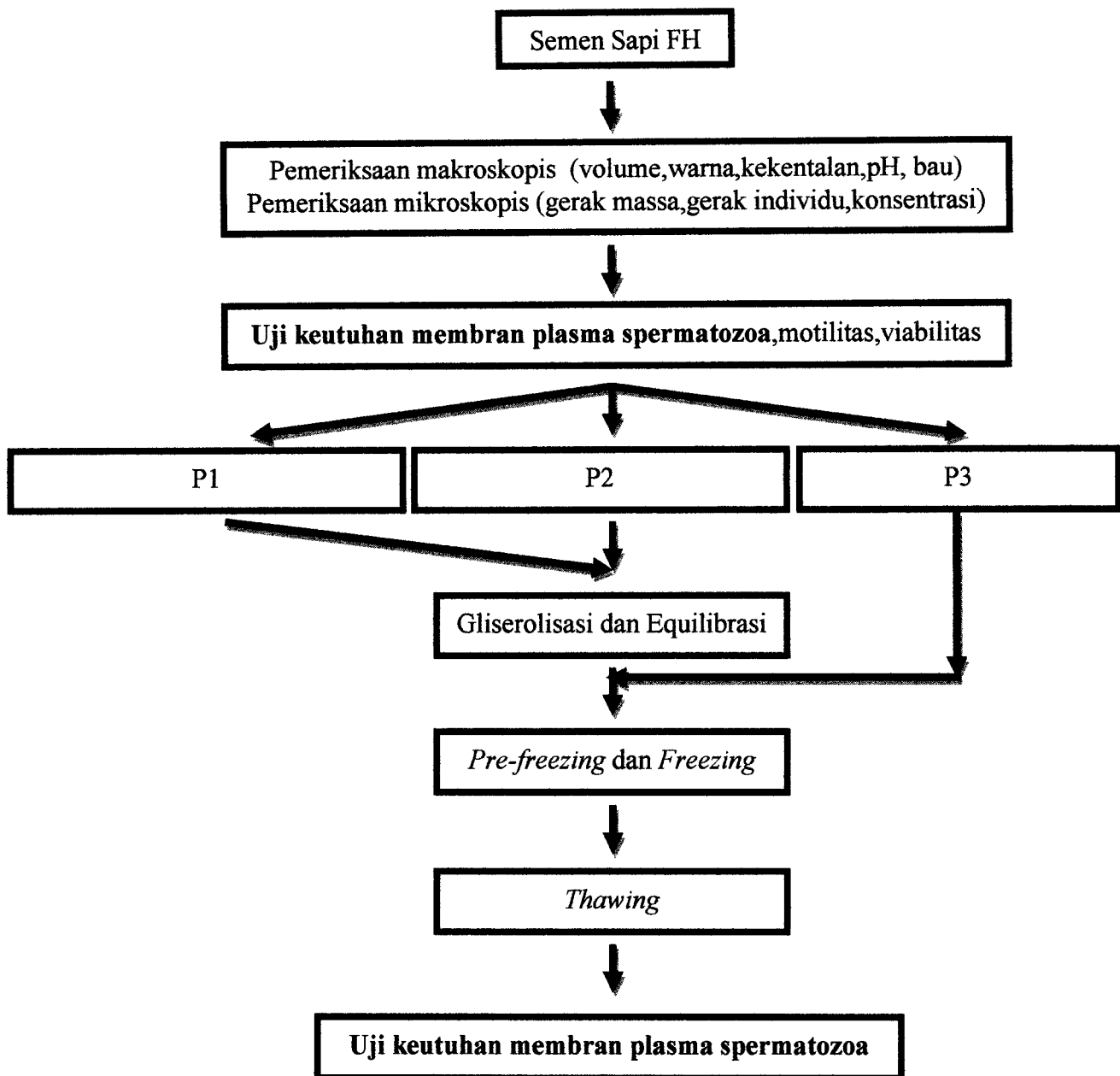
Variabel tergantung : Persentase membran plasma utuh spermatozoa.

Variabel terkontrol : Semen sapi Friesian Holstein, pakan, medium, dan inkubator CO₂.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya perbedaan keutuhan membran spermatozoa dilakukan uji ANAVA, bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (Kusriningrum,2008).

3.7 Skema Penelitian



Keterangan :

P1 = Semen+Skim Kuning Telur

P2 = Semen+Tris Kuning Telur

P3 = Semen+AndroMed®

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Proses pembuatan semen beku diawali dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, warna, kekentalan, pH, dan bau. Pemeriksaan mikroskopis meliputi pemeriksaan gerak massa, gerak individu, viabilitas, konsentrasi, dan keutuhan membran plasma.

Uji *Hypo-Osmotic Swelling* merupakan uji laboratories sederhana 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.

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

Pemeriksaan Makroskopis		Pemeriksaan Mikroskopis	
Volume	11 ml	Gerak massa	+++
Warna	kuning	Gerak individu	90% / 4
Kekentalan	sedang	Viabilitas	94%
pH	6,5	Konsentrasi	941×10^6 spz/ml
Bau	normal	Keutuhan membran	41%

Tabel 4.2. Rerata dan simpangan baku keutuhan membran plasma spermatozoa *post thawing* menggunakan metode HOST

Perlakuan	($\bar{x} \pm sd$) (%)
P1 (Skim Kuning Telur)	$20,2375^b \pm 1,00235$
P2 (Tris Kuning Telur)	$17,4275^c \pm 0,85715$
P3 (AndroMed®)	$23,3025^a \pm 0,83301$

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$)

Pada tabel 4.2. terlihat rata-rata keutuhan membran plasma spermatozoa *post thawing* pada P1($20,2375 \pm 1,00235$)%, P2($17,4275 \pm 0,85715$)%,

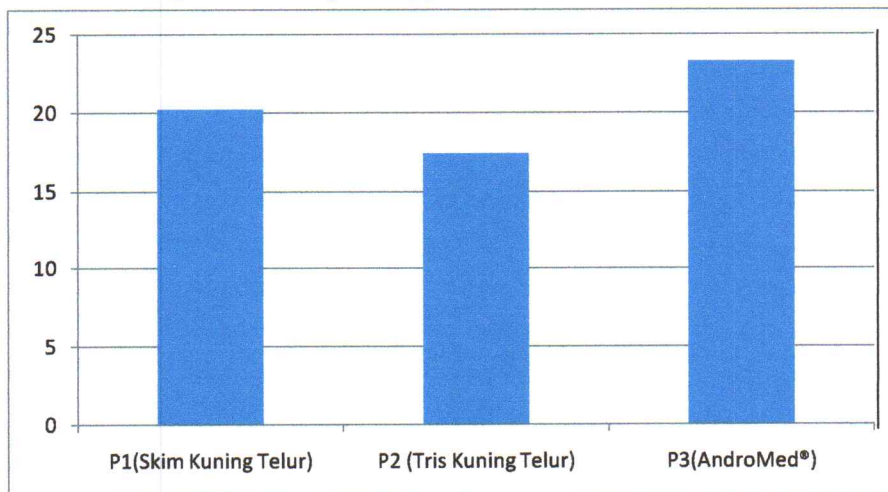
P3(23,3025±0,83301)%. Selanjutnya, dilakukan uji ANAVA untuk mengetahui adanya perbedaan di antara tiga perlakuan. Hasil uji ANAVA dapat dilihat pada tabel 4.3 di bawah ini.

Tabel 4.3. Analisis Sidik Ragam

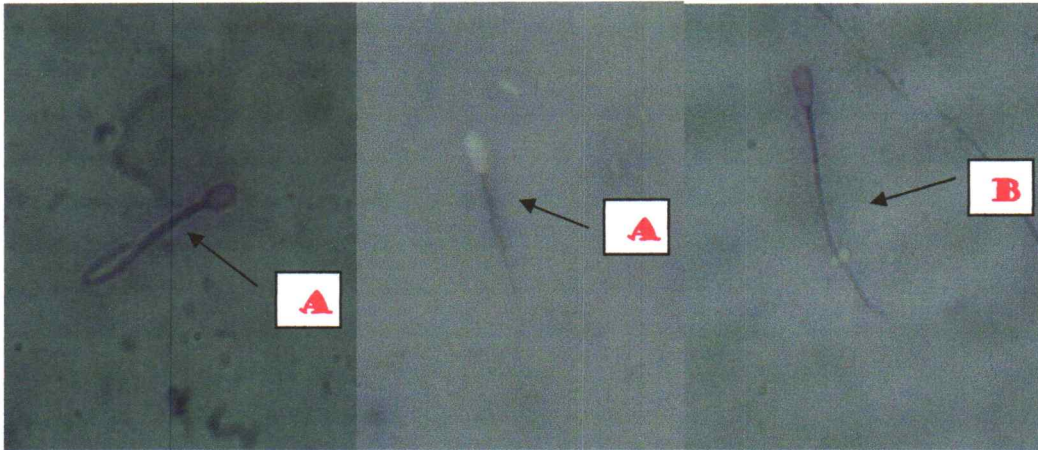
S.K	d.b	J.K	K.T	F.Hitung	F.Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	138,149	69,075	85,161	3,47	5,78
Galat Percobaan	21	17,033	0,811			
Total	23	155,182				

Hasil uji ANAVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata di antara tiga perlakuan. Uji BNJ dilakukan sebagai uji lanjutan untuk mengetahui perlakuan yang tertinggi dan terendah dalam menghasilkan keutuhan membran spermatozoa *post thawing* menggunakan metode HOST. Uji BNJ menunjukkan perlakuan P1 berbeda sangat nyata dengan P2 dan P3.

Gambar 4.1. Diagram batang persentase keutuhan membran plasma spermatozoa *post thawing* menggunakan metode HOST



Gambar 4.2. Pemeriksaan mikroskopis spermatozoa dengan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST)* dengan pembesaran 400 kali.



Keterangan : A. spermatozoa dengan membran plasma utuh (ekor melengkung dan menggembung).
B. spermatozoa dengan membran plasma rusak (ekor lurus)

BAB 5 PEMBAHASAN

Pengencer Skim Kuning Telur merupakan pengencer 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 ekuilibriasi (5°C) (Arifiantini dan Yusuf,2004).

Pengencer Tris Kuning Telur telah umum digunakan dalam proses pembuatan semen beku berbagai jenis hewan dan tenak. Tris Aminomethan berfungsi sebagai penyanggah untuk mencegah perubahan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa, dan mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. *Citric acid* digunakan sebagai *buffer* dan mendispersikan butir – butir lemak dari kuning telur. Laktosa berfungsi menyediakan zat – zat makanan sebagai sumber energi spermatozoa waktu *freezing*. Fruktosa berfungsi menyediakan zat – zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Raffinosa berfungsi menyediakan zat – zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa waktu *freezing*, *zwitter buffer ion* dan krioprotektan. *Egg yolk* (kuning telur berfungsi sebagai *buffer*, sumber energi dan krioprotektan (Departemen Pertanian Direktorat Jendral Produksi Peternakan,2000).

Pengencer AndroMed® mengandung lesitin nabati sehingga mengurangi kemungkinan kontaminasi mikroorganisme yang mungkin terjadi pada lesitin hewani (Surachman dkk.,2006). Pengencer AndroMed® juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Fruktosa sebagai substrat energi utama yang terkandung dalam bahan pengencer dasar AndroMed®. AndroMed®

mengandung lesitin yang cukup tinggi, yakni 6,76 g/100 ml (Rizal, 2005). Lesitin kacang kedelai yang terkandung dalam AndroMed® diduga mengandung komponen dan komposisi bahan yang lebih sesuai untuk pembuatan semen beku (Arifiantini dkk., 2005).

Menurut Toelihere (1985) untuk mengurangi kerusakan spermatozoa akibat cekaman dingin semen harus ditambahkan bahan pelindung sebelum didinginkan pada suhu 5°C. Bahan pelindung spermatozoa selama penyimpanan dalam suhu dingin adalah lesitin. Sumber lesitin utama yang telah lama digunakan untuk preservasi dan kriopreservasi semen adalah kuning telur dan susu, lebih lanjut dinyatakan bahwa untuk mempertahankan kualitas semen pada proses preservasi semen pada mamalia minimal dibutuhkan 20% kandungan telur dalam setiap 100 ml bahan pengencer. Beberapa studi melaporkan penggunaan kuning telur dan susu sebagai sumber lesitin untuk mencegah efek dari cekaman dingin mengandung resiko terjadinya kontaminasi mikroorganisme yang membahayakan spermatozoa dan saluran reproduksi betina.

Hypo-Osmotic Swelling Test merupakan tes sederhana yang digunakan untuk mengukur fungsi apakah membran plasma masih aktif atau tidak dan integritas keutuhan membran plasma spermatozoa sebagai indikator fertilisasi (Sarmardzija et al., 2008). Metode HOST merupakan suatu metode yang baik untuk mengevaluasi integritas membran spermatozoa hewan domestic, 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. Media HOST menyebabkan perluasan membran ekor spermatozoa sehingga menggembung dan puncaknya membuat ekor melingkar (Fonseca,2005). Membran plasma yang utuh ditandai dengan pemutaran ekor, karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik, sebaliknya spermatozoa dengan membran plasma yang rusak atau permeabilitasnya menurun, larutan *hypo-osmotic* dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus (Mafruchati dkk,1997).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil keutuhan membran tertinggi didapatkan pada perlakuan P3 dengan pengencer AndroMed®, urutan kedua pada perlakuan P1 dengan pengencer Skim Kuning Telur, dan yang terendah pada perlakuan P2 dengan pengencer Tris Kuning Telur.

Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) karbohidrat yang terkandung dalam AndroMed® merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap motilitas (daya gerak) dan daya hidup spermatozoa. Metabolisme akan berlangsung dengan baik jika membran plasma sel tetap dalam keadaan utuh. Hal ini, menurut Lehninger (1994) membran plasma sel berperan dalam mengatur lalu lintas masuk dan keluar seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Membran plasma mengandung karbohidrat yang berikatan

dengan lipid (glikolipid) atau dengan protein (glikoprotein) yang disebut dengan selubung sel atau glikokaliks. Glikokaliks menyebabkan karbohidrat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler untuk melindungi membran dari kerusakan selama penyimpanan pada suhu rendah. Membran yang terlindungi menghasilkan persentase hidup lebih tinggi dalam bahan pengencer AndroMed® (Aisen et al.,2002).

Hasil penelitian membuktikan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada keutuhan membran spermatozoa dengan menggunakan tiga pengencer yang berbeda. AndroMed® dapat mempertahankan keutuhan membran spermatozoa dengan baik, hal ini karena kandungan yang berfungsi sebagai *buffer* pada pengencer AndroMed® mempunyai jenis dan persentase lebih besar daripada yang terkandung di dalam pengencer Skim Kuning Telur dan Tris Kuning Telur.

Penurunan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa terjadi akibat kerusakan membran plasma spermatozoa oleh pengerasan lapisan phospholipid karena suhu yang rendah (Sankai et al.,2001). Kuning telur yang terkandung dalam medium Tris Kuning Telur dan Skim Kuning Telur memiliki kemampuan perlindungan terhadap membran plasma dan akrosom sehingga dapat menurunkan tingkat kejadian reaksi akrosom dini (Iguer-ouada dan Verstegen,2001). Keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan viabilitas spermatozoa, apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian. Pengencer AndroMed® menunjukkan kualitas membran plasma dapat dipertahankan karena komposisi

bahan pengencer yang digunakan sangat berpengaruh dalam mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C. Krioprotektan pada media AndroMed® ikut berperan dalam mempertahankan membran plasma spermatozoa melalui HOST yang ditandai dengan ekor spermatozoa yang melengkung atau penggembungan kepala spermatozoa, meskipun adanya krioprotektan tersebut meningkatkan osmolaritas larutan yang mengakibatkan penurunan motilitas.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa bahan pengencer AndroMed® mempunyai kualitas yang baik untuk proses pembuatan semen beku.

6.2. Saran

1. Pengencer AndroMed® dapat digunakan sebagai pilihan untuk bahan pembuatan semen beku.
2. Perlu dilaksanakan penelitian dengan menggunakan parameter lain untuk mengetahui kualitas masing-masing bahan pengencer.

RINGKASAN

Keutuhan Membran Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH) dalam Bahan Pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed® Setelah Proses Pembekuan. Salah satu teknologi reproduksi dalam dunia kedokteran hewan adalah Inseminasi Buatan (IB). Teknik ini bertujuan untuk meningkatkan percepatan penyebarluasan bibit unggul di suatu wilayah dengan cara mengambil semen dari seekor pejantan unggul, selanjutnya diproses menjadi semen beku.

Membran plasma yang menyelubungi sebuah sel selain membatasi keberadaan sebuah sel, juga memelihara perbedaan pokok antara isi sel dengan lingkungan, namun membran tersebut tidak sekedar merupakan sebuah penyekat pasif, melainkan juga merupakan sebuah filter yang memiliki kemampuan memilih bahan-bahan yang melintasinya dengan tetap memelihara perbedaan kadar ion di dalam dan di luar sel. Bahan-bahan yang diperlukan oleh sel dapat masuk dan bahan-bahan yang merupakan limbah sel dapat melintas ke luar sel (Nawang,2005).

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

Pengencer Skim Kuning Telur merupakan pengencer 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 ekuilibrase (5°C) (Arifiantini dan Yusuf, 2004). Pengencer Tris Kuning Telur telah umum digunakan dalam proses pembuatan semen beku berbagai jenis hewan dan ternak. Salah satu komponen di dalamnya yaitu *Tris aminomethan* merupakan *buffer* dan dapat mempertahankan tekanan osmotik serta keseimbangan elektrolit. Salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur adalah AndroMed® produksi Minitube Jerman. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keutuhan membran spermatozoa sapi Friesian Holstein melalui *Hypo-Osmotic Swelling Test post thawing* dalam pengencer Skim Kuning Telur, Tris Kuning Telur, dan AndroMed®. Perlakuan P1 dengan pengencer Skim Kuning Telur, perlakuan P2 dengan pengencer Tris Kuning Telur, dan perlakuan P3 dengan pengencer AndroMed®. Pengambilan semen dilakukan tiap sore hari. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Data analisis menggunakan Analisis Ragam yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada keutuhan membran spermatozoa dengan menggunakan tiga pengencer yang berbeda. Keutuhan membran tertinggi diperoleh pada perlakuan P3. Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan menggunakan pengencer AndroMed®

sebagai pilihan untuk processing semen beku serta perlu dilaksanakan penelitian dengan menggunakan parameter lain untuk mengetahui kualitas masing-masing bahan pengencer.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla, E.M.E and T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62:1160-1172.
- Aisen, E.G., V. H. Mediana and A. Venturino. 2002. Cryopreservation And Postthawed Fertility Of Ram Semen Frozen In Different Trehalose Concentration. *Theriogenology* 57 : 1801 – 1808.
- 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 *Frisien holstein*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Basrizal. 2007. Gambaran Morfologi Dan Frekuensi Tahapan Spermatogenesis Pada Domba Garut [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Dasrul. 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Karbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll [Disertasi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Dewantari, I.P. 2011. Uji Mutu Semen Beku Domba Ekor Gemuk (Deg) dalam Tiga Macam Bahan Pengencer yang Berbeda [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Dian, F. P. 2005. Pengaruh Paparan Sinar Ultra Violet C dengan Berbagai Jarak Penyinaran terhadap Integritas Membran Plasma Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Menggunakan Metode Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Direktorat Jendral Produksi Pertanian. 2000. Prosedur Tetap (Protap) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Jakarta : Direktorat Perbibitan.
- Direktorat Pendidikan Menengah Kejuruan Jakarta. 2001. Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak. Departemen Pendidikan Nasional.

- Djuwita, I, A. Boediono., dan K. Mohamad. 2000. *Bahan Kuliah Embriologi. Laboratorium Embriologi*. Bagian Anatomi. Fakultas kedokteran Hewan. Institut pertanian Bogor. Bogor.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung : Alfabeta.
- 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.* V.2,n.2,p.139-144.
- Frandsen, R. D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak Edisi Keempat*. Alih Bahasa : Ir. B. Srigandono, MSc., Drs. K. Praseno, S.U. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Gadjah Mada University Press.
- Guyton, A. C and J.E. Hall. 1997. *Textbook of Medical Physiology 9th Ed.* Dalam : Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Setiawan, I., (Ed). Alih Bahasa : Setiawan I., Tengadi, dan A. Santoso. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC (kelenjar pineal) hal 1267.
- Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito., T.W. Suprayogi. 2009. *Buku Ajar Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Iguer-ouada, M. and J.P. Versteegen. 2001. Long-Term Preservation Of Chilled Canine Semen : Effect Of Commercial And Laboratory Prepared Extenders. *Theriogenology* 55(2) : 671 -684.
- Iqbal, A. 2008. Spermatogenesis vs Oogenesis [05 Desember 2010].
- Jayendran, R.S, H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo and L. J. Zaneveld. 1984. Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics. *J Reprod Fertil* 70, 219-28.
- Keiko. 2009. *Anatomi Organ Reproduksi Jantan* [05 Desember 2010].
- Kumara, I.K.B. 2010. Efek Fraksi Air Kulit Citrus nobilis Lour Terhadap Integritas Membran Plasma Spermatozoa Mencit (Mus Musculus).[skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusriningrum. 1990. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya

Lehninger, A.L. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publisher. Inc., California.

Lemboepasang Dairy Farm. 2010. About Our Cattle [30 Mei 2010].

Mafruchati., M., M.E. Luqman., N. Harjani., Widjiati., dan B. Poernomo. 1997. Pemeriksaan Membran Spermatozoa pada Semen Beku Domba Setelah Diencerkan. Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Hal 1-6.

Nawang, S. S. 2005. Integritas Membran Spermatozoa Mencit Pada Pemberian Per Oral Fasa Air Daun *Justicia gendarussa* Burm.f dengan Metode Hypo-Osmotic Swelling Test [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.

Nur, F. 2010. Kadar Testosteron Sapi Pejantan Yang Digunakan Untuk Proses Produksi Semen Beku Di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

Partodiharjo, S., 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ketiga Fakultas Kedokteran Veteriner Jurusan Reproduksi IPB. Mutiara Sumber Widya. Jakarta Pusat.

Rizal, M. dan Herdis., 2006. Inseminasi Buatan Pada Domba. Penerbit Rineka Cipta Jakarta.

Salisbury, G.W. and N.L.Van Demark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 200-221.

Samardzija M., D. Tomislav., K. Suzana., C. Marijan., K. Martina., P. Nikica., and G. Jurac. 2008. The Use of The Hypoosmotic Swelling Test and Supravital Staining In Evaluation of Sperm Quality In Boars. *Veterinarski Arhiv* 78 (4), 279-287, 2008.

Sankai T, H., Tsuchiya and N. Ogonuki. 2001. Shortterm Nonfrozen Storage Of Mouse Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology* 55(8) : 1759-1768

Setiadi, M. A., Yulnawati dan A. Suprayogi. 2007. Kualitas Spermatozoa Epididimis Anjing Selama Penyimpanan pada Suhu 4°C. *JITV* Vol.12 No.2 :134-138.

Solihati, N dan P. Kune. 2010. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental. Universitas Padjajaran.

Standar Nasional Indonesia. 2005. Semen Beku.pdf. [29 Mei 2010].

Supriatna, I. Dan F.H. Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat antar Universitas, institut Pertanian Bogor, Bogor.

Surachman, M., Herdis., M. A. Setiadi., dan M. Rizal. 2006. Kriopreservasi Spermatozoa Epididimis Domba Menggunakan Pengencer Berbasis Lesitin. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.

Toelihere. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Bandung : Angkasa.

WHO.2010. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, Ed 5th United Kingdom : Cambridge University Press.

Yu I, and SP. Leibo. 2002. Recovery Motile, Membrane-Intact Spermatozoa From Canine Epididymus - Mides Stored For 8 Days At 4°C. Theriogenology 57(3) : 1179-1190.

Lampiran 1. Komposisi pembuatan medium *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST).

Fruktosa	1,351 gram
Aquabidest ad.	100 mili liter.

Sumber : WHO Laboratory (1992)

Lampiran 2. Komposisi pembuatan pengencer Skim Kuning Telur.**ORGANIK / SKIM MILK**

A. Bahan : Susu skim, aquabidest, antibiotika, kuning telur, gliserol

B. Cara Membuat :

1. Membuat buffer (untuk 1000 cc)

- Menimbang susu skim 100 gram dan mempersiapkan 960 cc aquabidest dalam tabung.
- Masukkan susu skim ke dalam beker glass 3000 cc dan tambahkan 960 cc aquabidest.
- Mencampur susu skim dan aquabidest (buffer) sampai homogen.
- Masukkan bowling glass ke dalam pemanas electrothermal sampai suhu 92-95°C.
- Setelah buffer suhunya mencapai 92°C, bowling glass diangkat dan didinginkan sampai suhunya mencapai 37°C lalu saring.
- Masukkan buffer ke dalam tabung (measuring cylinder) 1000 cc kemudian disimpan di dalam lemari es.
- Setelah dingin buffer ditambahkan antibiotika (buffer antibiotik) dengan perbandingan 100:1. Antibiotik yang digunakan Streptomycin 3 gram dicampur lalu ditambahkan aquabidest sampai volumenya 30 cc.

2. Membuat bahan pengencer A (untuk 1000 cc)

- Buffer antibiotika : 950 cc
- Kuning telur : 50 cc

3. Membuat bahan pengencer B (untuk 1000 cc)

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

Masing-masing bahan pengencer dicampur sampai homogen/rata.

Sumber : Departemen Pertanian Direktorat Jendral Produksi Peternakan (2000)

Lampiran 3. Komposisi pengencer Tris

Bahan pengencer dalam 1000 mili liter terdiri dari :

(a). Pengencer A

1. Tris Aminomethan	: 13,63 gram
2. Citric acid	: 7,62 gram
3. Lactosa	: 15 gram
4. Fruktosa/levulosa	: 3,75 gram
5. Rafiinosa	: 27 gram
6. Kuning telur	: 200 cc
7. Aquabidest	: 755 mili liter

(b). Pengencer B

Pengencer A + Glycerol 13%

Cara Pembuatan :

1. Bahan Tris aminomethan, citric acid, lactose, fruktosa, levulosa, raffinosa ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer 1000 cc.
2. Ditambah aquabidestilata/aquadest dan dihomogenkan.
3. Gelas Erlenmeyer dipanaskan dalam air mendidih kemudian gelas Erlenmeyer diangkat dan didinginkan hingga suhu larutan turun menjadi 30°C.
4. Masukkan kuning telur dan homogenkan.
5. Larutan pengencer disimpan dalam lemari es dan lama penyimpanan maksimal 1 minggu.
6. Bila larutan pengencer akan digunakan, supernatant dipisahkan terlebih dahulu dengan menggunakan pipet.

Sumber : Departemen Pertanian Direktorat Jendral Produksi Peternakan (2000)

Lampiran 4. Komposisi pengencer AndroMed®

1. Fosfolipid
2. Tris
3. Asam sitrat
4. Gula
5. Antioksidan
6. Buffers
7. Gliserol
8. Antibiotik
9. Aquabidest

100 cc dari kemasan siap pakai mengandung unit :

1. Tylosin 5,0 mili gram
2. Gentamicin 25,0 mili gram
3. Spectinomycin 30,0 mili gram
4. Lincomycin 15,0 mili gram

Tiap botol AndroMed® mengandung 200 cc konsentrat untuk memproduksi 1000 cc diluter siap pakai.

Persiapan pembuatan Pengencer

Hangatkan isi dari satu botol AndroMed® (200 cc) dalam waterbath dengan suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Hangatkan 800 cc air ateriil pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ dan masukkan ke dalam konsentrat. Amati rasio pengencer (1 bagian konsentrat + 4 bagian air), juga dapat disiapkan dalam skala kecil.

Lampiran 5. Pengolahan Data

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
HOST	24	16.31	24.69	20.3225	2.59751
Valid N (listwise)	24				

Case Summaries(a)

				HOST
Perlakuan	SKT	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		N	8
			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		N	8
			Mean	17.4275
			Std. Deviation	.85715
	ANDROMED	1		23.31
		2		23.07
		3		22.57
		4		24.69
		5		24.44
		6		22.60
		7		22.57
		8		23.17
	Total		N	8
			Mean	23.3025
			Std. Deviation	.83301
Total		N		24
		Mean		20.3225
		Std. Deviation		2.59751

a Limited to first 100 cases.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		HOST
N		24
Normal Parameters(a,b)	Mean	20.3225
	Std. Deviation	2.59751
Most Extreme Differences	Absolute	.140
	Positive	.110
	Negative	-.140
Kolmogorov-Smirnov Z		.685
Asymp. Sig. (2-tailed)		.736

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.312	2	21	.735

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	138.149	2	69.075	85.161	.000
Within Groups	17.033	21	.811		
Total	155.182	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable : HOST
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SKT	TRIS	2.81000(*)	.45031	.000	1.6750	3.9450
	ANDROMED	-3.06500(*)	.45031	.000	-4.2000	-1.9300
TRIS	SKT	-2.81000(*)	.45031	.000	-3.9450	-1.6750
	ANDROMED	-5.87500(*)	.45031	.000	-7.0100	-4.7400
ANDROMED	SKT	3.06500(*)	.45031	.000	1.9300	4.2000
	TRIS	5.87500(*)	.45031	.000	4.7400	7.0100

* The mean difference is significant at the .01 level.

Homogeneous Subsets

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
TRIS	8	17.4275		
SKT	8		20.2375	
ANDROMED	8			23.3025
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 7. Foto Penelitian

Pengambilan semen sapi Friesian Holstein



Pembuatan Pengencer Skim Kuning Telur



Pengencer Tris Kuning Telur



Pengencer AndroMed®



Pemeriksaan mikroskopis