

SKRIPSI

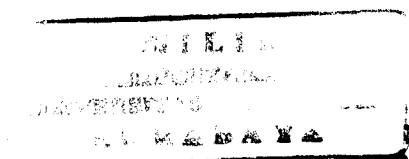
PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C DALAM DILUTER TERHADAP PERSENTASE HIDUP DAN MOTILITAS SPERMATOZOA SAPI FH *POST THAWING*



Oleh :

NUNIK MUSLIKHAH SOFIYANTI
TUBAN-JAWA TIMUR

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005



**PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C DALAM DILUTER
TERHADAP PERSENTASE HIDUP DAN MOTILITAS
SPERMATOZOA SAPI FH *POST THAWING***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh :

NUNIK MUSLIKHAH SOFIYANTI

Nim 060012812

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.)

Pembimbing Pertama

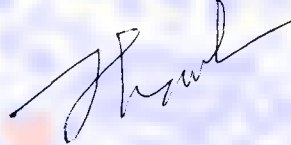


(Djoko Legowo, M.Kes., Drh.)

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitas dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

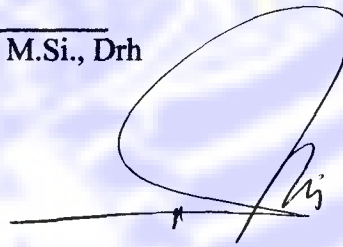
Menyetujui
Panitia Penguji,



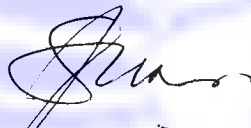
Herry Agoes Hermadi, M.Si., Drh
Ketua



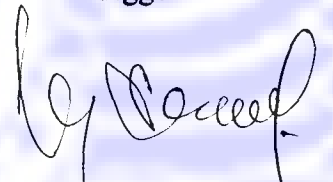
Nove Hidayati, M.Kes., Drh
Sekretaris



Dr. Hardijanto, M.S., Drh
Anggota



Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.
Anggota



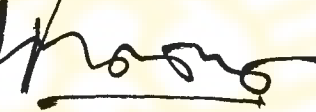
Djoko Legowo, M.Kes., Drh.
Anggota

Surabaya, 26 Desember 2005

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh
NIP 130687297

**PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C DALAM DILUTER
TERHADAP PERSENTASE HIDUP DAN MOTILITAS
SPERMATOZOA SAPI FH *POST THAWING***

Nunik Muslikhah Sofiyanti

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam diluter terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi FH *post thawing*.

Penelitian ini menggunakan sampel semen sapi sehat dengan libido baik. Setiap sampel dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yaitu kontrol tanpa vitamin C, vitamin C 0,05 mg/ml diluter, vitamin C 0,1 mg/ml diluter dan vitamin C 0,2 mg/ml diluter. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan proses pembekuan sampai dengan *post thawing* kemudian diikuti pemeriksaan persentase motilitas dan hidup spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji Anova Satu Arah dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dalam diluter dapat meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi, terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Analisis data menunjukkan peningkatan persentase hidup spermatozoa tertinggi pada kelompok P3 (vitamin C 0,2 mg/ml) dengan rata-rata dan simpangan baku $76,67 \pm 7,45$; sedangkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa sapi tertinggi pada kelompok P3 (vitamin C 0,2 mg/ml) dengan rata-rata dan simpangan baku $61,67 \pm 9,31$. Dapat disimpulkan bahwa penambahan vitamin C 0,2 mg/ml efektif untuk meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah, puji syukur atas berkah dan karunia Allah, sehingga penulis bisa menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **Pengaruh Penambahan Vitamin C Dalam Diluter Terhadap Persentase Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Sapi FH *Post Thawing***. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan akademis untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Keberhasilan penyusunan skripsi ini bukan hanya kerja keras penulis semata, melainkan juga dukungan dan bantuan dari segenap pihak. Pada kesempatan ini, perkenankan penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas pemberian kebijaksanaan dan fasilitasnya.
2. Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh. selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Djoko Legowo, M.Kes., Drh. selaku Dosen Pembimbing Kedua yang senantiasa memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
3. Trilas Sardjito, M.Si., Drh. dan seluruh Staf Laboratorium Taman Ternak Pendidikan Teaching Farm Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk melaksanakan penelitian.

4. Prof. Dr. Hj. Sri Subekti. DEA. Drh selaku dosen wali yang selalu membantu dan membimbing penulis selama kuliah.
5. Tim Penguji yang telah memberikan kritik dan saran guna kesempurnaan skripsi ini.
6. Keluargaku Tercinta : Mama, papa, adikku dan keluarga besar
H. Mohammad Imam Nurfaqih yang selalu memberikan dorongan moral dan spiritual.
7. Teman-teman seperjuangan : Tine, Lilis, Anang, Sinchan, Dian, Yulia, Erwin, Yudi, Rosa, Miko, Rifo, Abe, Dita, Rani, Sari, Ardith, Kiki atas bantuan dan semangatnya.
8. Keluarga besar Pagupon, Bapak Yusuf, Ibu Anik dan temen-temen kos atas bantuan dan perhatiannya.
9. Semua pihak yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan, pengarahan dan kerjasama dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran. Dengan segala kerendahan hati, penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat dan berguna bagi semua pihak yang berkepentingan.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Surabaya, Desember 2005

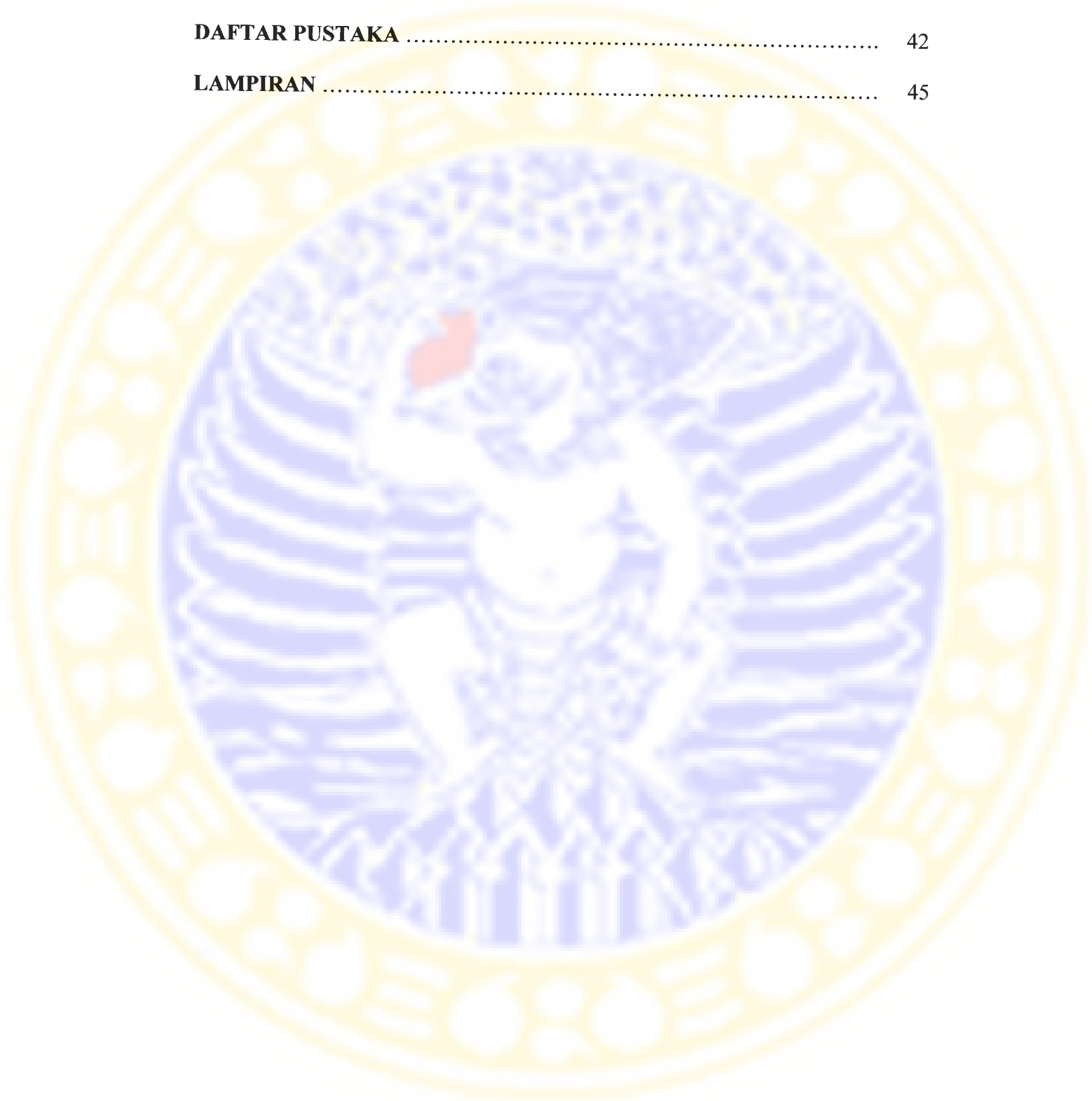
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Landasan Teori	3
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
1.6. Hipotesis Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Sapi FH	6
2.2. Reproduksi Sapi Jantan	7
2.3. Semen Sapi	9
2.3.1. Spermatozoa	10
2.3.2. Plasma Semen	11
2.4. Diluter	13
2.5. Vitamin C	15
2.6. Semen Beku	17

BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN	19
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2. Materi Penelitian	19
3.2.1. Sampel Penelitian	19
3.2.2. Peralatan Penelitian	19
3.2.3. Bahan Penelitian	20
3.3. Metode Penelitian	20
3.3.1. Pemeriksaan Semen Sapi Sebelum Perlakuan.....	20
3.3.2. Pemeriksaan Persentase Hidup Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	22
3.3.3. Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	23
3.4. Skema Jalannya Penelitian	24
3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data	25
BAB IV HASIL PENELITIAN	26
4.1. Pemeriksaan Semen Sapi Sebelum Perlakuan	26
4.2. Persentase Hidup Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	28
4.3. Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	29
BAB V PEMBAHASAN	31
5.1. Karakteristik Semen Segar	31
5.2. Persentase Hidup Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	34
5.3. Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	39

RINGKASAN	40
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Sapi Sebelum Perlakuan	26
2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Sapi Sebelum Perlakuan	27
3. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Hidup Spermatozoa Sapi <i>Post Thawing</i>	28
4. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi <i>Post Thawing</i>	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Susunan Spermatozoa Mamalia	12
2. Struktur Vitamin C	17
3. Alat-Alat Yang Digunakan Untuk Penelitian	20
4. Proses Pengambilan Semen Sapi	21
5. Grafik Rataan Persentase Hidup Spermatozoa	28
6. Grafik Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa	29
7. Spermatozoa Hidup dan Mati.....	30
8. Reaksi Oksidasi Asam Askorbat.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Pembuatan Diluter untuk Setiap Perlakuan	46
2. Proses Pembekuan Semen Sapi	47
3. Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	47
4. Pemeriksaan Persentase Hidup Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	48
5. Komposisi Susu Skim Tropicana Slim.....	48
6. Hasil Analisa Data Persentase Hidup Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	50
7. Hasil Analisa Data Persentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i>	52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi telah mendorong para ahli untuk membuat terobosan baru di bidang kedokteran hewan, khususnya pada usaha peternakan. Usaha-usaha yang menunjang keberhasilan reproduksi ternak terus dikembangkan untuk kemajuan dunia peternakan. Salah satu usaha yang dapat dilakukan adalah melakukan penelitian di bidang reproduksi dan inseminasi buatan dengan menggunakan semen beku.

Inseminasi Buatan di mulai tahun 1952 oleh Prof. Seit dari Denmark dan dibantu oleh beberapa staf dari para ahli FKH IPB. Prof Seit adalah staf ahli yang ditempatkan di Lembaga Penelitian Peternakan di Bogor. Pelaksanaan IB di Indonesia diperluas dengan mendirikan beberapa pusat IB di Grati (Purwokerto), Purworejo dan Ungaran (Jawa Tengah), Pengalengan (Bandung), Pokang (Madura), dan Padang (Sumatra Barat) pada tahun 1953. Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia diizinkan melaksanakan IB. Balai IB pertama didirikan tahun 1976 di Lembang (Jawa Barat) dengan bantuan pemerintah Selandia Baru kemudian diikuti oleh pendirian Balai Inseminasi Buatan (BIB) di Singosari (Jawa Timur) tahun 1984 (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1997).

Inseminasi Buatan memungkinkan kesempatan reproduksi sebanyak-banyaknya dari seekor pejantan per satuan waktu untuk mengawini beberapa ekor betina yang sejenis. Secara ekonomis, cara ini dapat diandalkan karena banyak

menghemat biaya. Keberhasilan pelaksanaan IB ditentukan oleh kualitas dan kuantitas semen yang digunakan. Semen perlu diencerkan terlebih dahulu sebelum pelaksanaan IB. Semen yang tidak diencerkan akan sukar mempertahankan hidupnya lebih dari 24 jam, walaupun disimpan dalam suhu yang rendah. Tujuan pengenceran semen antara lain adalah untuk meningkatkan volume semen dan supaya semen dapat disimpan lama tanpa mengurangi kesuburannya (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1997).

Menurut penelitian terdahulu spermatozoa dapat hidup bertahun-tahun pada suhu -196°C tanpa berkurang kesuburannya. Air mani beku adalah air mani yang diencerkan menurut prosedur biasa lalu dibekukan di bawah titik beku air (Partodiharjo, 1992). Air mani beku yang dipakai untuk frozen semen harus sesegar mungkin dengan kualitas yang baik (Hardijanto, 1995).

Air mani beku dapat disimpan sampai melebihi umur pejantan yang menghasilkannya, misalkan pejantan terlanjur mati. Dalam pelaksanaan IB, air mani beku ini dapat dikirim ke tempat yang membutuhkannya. Adanya penurunan kesuburan atau fungsi spermatozoa dalam semen, disebabkan antara lain karena penurunan motilitas progresif, berkurangnya waktu hidup spermatozoa dan adanya kelainan integritas atau keutuhan membran spermatozoa yang akan mengakibatkan terjadinya kegagalan spermatozoa dalam membuahi ovum (Subrata, 1998).

Vitamin C (asam askorbat) bekerja sebagai suatu ko-enzim dan pada keadaan tertentu merupakan reduktor dan antioksidan (Syarif dkk., 2003). Menurut beberapa peneliti, susu bubuk dapat memberikan fertilitas pada semen

sapi yang lebih baik selain air susu sapi, dengan perbandingan 1:10 dalam aquadest steril. Untuk pemakaian susu skim bisa mencapai 8-10% dari jumlah pelarutnya (Hardijanto dkk, 2002). Menurut berbagai informasi di atas, maka perlu diteliti lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam diluter terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut : Apakah penambahan vitamin C dalam diluter dapat meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing* ?

1.3. Landasan Teori

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian pendahuluan yang berjudul Pengaruh Penambahan Vitamin C Dalam Diluter Susu Skim Terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Keutuhan Membran Spermatozoa Domba (Juliana, 2004).

Penilaian jumlah spermatozoa yang hidup dan bergerak atau motil dibutuhkan untuk keperluan fertilisasi setelah IB, karena untuk dapat membuahi ovum maka spermatozoa harus menempuh perjalanan yang jauh dan diperlukan gerak progresif (maju ke depan) dengan cepat untuk dapat sampai pada tujuan dan menembus getah mulut rahim (Subratha, 1998).

Pengenceran air mani bertujuan meningkatkan volume air mani yang konsentrasinya masih memenuhi syarat untuk diinseminasikan pada lebih dari seekor betina dan memungkinkan sel mani tersebut dapat bertahan lebih lama baik untuk beberapa hari pada suhu dingin atau sampai beberapa tahun pada keadaan beku (Hardijanto dkk, 2002). Bahan pengencer yang menggunakan susu skim lebih disukai karena hanya terdapat sedikit butir-butir lemak yang dapat menghambat pemeriksaan mikroskopis (Toelihere, 1993).

Antioksidan merupakan suatu zat yang terdapat di dalam sel, baik pada membran sel maupun di dalam ruang ekstra sel dan yang mempunyai sifat menghambat atau mencegah kemunduran, kerusakan atau kehancuran sel akibat reaksi oksidasi (Widjaja, 1997). Peranan vitamin C sebagai antioksidan ternyata dapat mempertahankan integritas sel (Syarif dkk., 2003).

Vitamin C dapat bertindak sebagai ko-enzim dan pada keadaan tertentu merupakan reduktor dan antioksidan (Syarif dkk., 2003). Asam askorbat juga mempunyai manfaat lain yaitu sebagai antioksidan pemecah rantai yang hidrofilik, dapat bereaksi langsung menginaktifkan senyawa oksigen yang sangat reaktif seperti superoksida dan singlet oksigen (Martini, 1995). Vitamin C juga dapat menghambat oksidasi lemak dan protein (Decker *et al.*, 2000).

Asam askorbat sebagai donor elektron (*reducing agent*) untuk berbagai reaksi kimia yang terjadi baik di dalam atau di luar sel secara intraseluler dan ekstraseluler. Asam askorbat dapat mengurangi superoksida radikal hidroksil, asam hipoklor, dan senyawa oksidan reaktif (Papas, 1999).

Keutuhan membran spermatozoa yang meningkat juga akan mempengaruhi motilitas spermatozoa yang turut menunjang dan menentukan kemampuan spermatozoa untuk membuahi ovum (Subratha, 1998).

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam diluter terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat digunakannya vitamin C sebagai campuran diluter pada semen sapi untuk meningkatkan kualitas spermatozoa *post thawing* dalam proses fertilisasi, sehingga membantu keberhasilan IB pada sapi.

1.6. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan di atas, maka hipotesis penelitian sebagai berikut :
penambahan vitamin C dalam diluter akan meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi Friesian Holstein

Sapi adalah hewan ternak terpenting sebagai sumber daging, susu, tenaga kerja dan kebutuhan lainnya. Sapi menghasilkan sekitar 50% (45-55%) kebutuhan daging di dunia, 95% kebutuhan susu dan 85% kebutuhan kulit. Sapi berasal dari famili Bovidae. seperti halnya bison, banteng, kerbau (*Bubalus*), kerbau Afrika (*Syncherus*), dan anoa (Margono, 2004).

Domestikasi sapi mulai dilakukan sekitar 400 tahun SM. Sapi diperkirakan berasal dari Asia Tengah, kemudian menyebar ke Eropa, Afrika dan seluruh wilayah Asia. Menjelang akhir abad ke-19, sapi Ongole dari India dimasukkan ke pulau Sumba dan sejak saat itu pulau tersebut dijadikan tempat pembiakan sapi Ongole murni (Margono, 2004).

Para ahli berpendapat bangsa-bangsa sapi yang kini kita kenal seperti sapi Madura, Jawa, dan Sumatra berasal dari hasil persilangan antara *Bos indicus* (Zebu) dan *Bos sondaicus* (*Bos bibos*) alias sapi keturunan banteng (Sugeng, 2003).

Jenis sapi perah yang unggul dan paling banyak dipelihara adalah sapi Shorhorn (dari Inggris), Friesian Holstein (dari Belanda), Yersey (dari selat Channel antara Inggris dan Perancis), Brown Swiss (dari Switzerland), Red Danish (dari Denmark) dan Droughtmaster (dari Australia) (Margono, 2004).

Pejantan yang baik harus memenuhi kriteria sebagai berikut: (a) umur sekitar 4-5 tahun, (b) memiliki kesuburan tinggi, (c) daya menurunkan sifat produksi yang tinggi kepada anak-anaknya, (d) berasal dari induk dan pejantan yang baik, (e) besar badannya sesuai dengan umur, kuat, dan mempunyai sifat-sifat pejantan yang baik, (f) kepala lebar, leher besar, pinggang lebar, punggung kuat, (g) muka sedikit panjang, pundak sedikit tajam dan lebar, (h) paha rata dan cukup terpisah, (i) dada lebar dan jarak antara tulang rusuknya cukup lebar, (j) badan panjang, dada dalam, lingkaran dada dan lingkaran perut besar, serta (k) sehat, bebas dari penyakit menular dan tidak menurunkan cacat pada keturunannya (Margono, 2004).

Hasil survei di PSPB Cibinong menunjukkan bahwa jenis sapi perah yang paling cocok dan menguntungkan untuk dibudidayakan di Indonesia adalah Frisien Holstein (Margono, 2004).

2.2. Reproduksi Sapi Jantan

Hewan ternak umumnya mempunyai bentuk alat kelamin yang hampir sama, terdiri dari testis yang terletak di dalam skrotum, saluran-saluran alat kelamin, penis dan kelenjar aksesoris. Alat kelamin jantan dibagi menjadi alat kelamin primer berupa testis, dan alat kelamin sekunder berbentuk saluran-saluran yang menghubungkan testis dengan dunia luar yaitu vas deferens, epididimis, vas deferens, dan penis yang didalamnya terdapat uretra, dipakai untuk menyalurkan air mani dan cairan aksesoris keluar pada waktu ejakulasi (Hardjopranjoto, 1995).

Testes atau gonad merupakan alat kelamin utama, testes terletak pada daerah prepubis, merupakan kelenjar tubular berbentuk bulat lonjong terdapat sepasang kiri dan kanan. Testes terbungkus dalam kantong skrotum, dimana dalam skrotum berisi dual lobi testes yang masing-masing lobi mengandung satu testes (Ismudiono, 1999). Fungsi testes selain sebagai organ reproduksi juga sebagai organ hormonal yaitu dengan menghasilkan spermatozoa melalui proses spermatogenesis dan hormon testosteron yang dihasilkan oleh sel-sel interstitial (sel leydig) tubuli seminiferus testes. Hormon testosteron memacu perkembangan dan fungsi kelenjar pelengkap yang menyebabkan karakteristik sekunder. Seluruh perkembangan testes ada di bawah pengaturan kelenjar hipotalamus dan kelenjar hipofisa. Fungsi reproduksi dari testes dalam bentuk spermatogenesis diatur oleh hormon Gonadotropin yang terdiri dari Folicle Stimulating Hormon (FSH) dan sinergis dengan Luteinizing Hormon (LH) dalam mengatur fungsi testes (Partodiharjo, 1992).

Rete testis merupakan saluran yang membawa sel spermatozoa keluar dari tubulus seminiferus ke dalam mediastinum berdesak-desakkan menuju ke epididimis. Masa spermatozoa dialirkan dari rete testis ke dalam duktus eferens oleh tekanan cairan, jumlah spermatozoa dan gerakan silia dari sel-sel silia. Masa spermatozoa akan lebih lambat alirannya setelah sampai duktus epididimis karena lumen duktus epididimis lebih luas (Partodiharjo, 1992).

Epididymis merupakan saluran berkelok-kelok yang menghubungkan testis dengan vas deferens. Epididimis terbagi menjadi tiga bagian yaitu : kaput epididimis, korpus epididimis dan kauda epididimis. Fungsi penting epididimis

adalah terjadinya proses pendewasaan sel mani di dalam rongganya sehingga menambah gerakannya (Hardijanto, 1995).

Duktus deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididymis dengan uretra. Diameter vas deferens 2 mm dengan konsistensi seperti tali, berjalan sejajar dengan corpus epididymis. Dindingnya yang mengandung otot-otot licin penting dalam mekanisme pengangkutan spermatozoa pada waktu ejakulasi (Ismudiono, 1999).

Penis pada sapi mempunyai bentuk fibroelastika. Penis mempunyai fungsi sebagai alat kopulasi dan jalan keluar air mani pada waktu ejakulasi dan mendeposisikan air mani pada alat kelamin betina. Permukaan penis terutama kepala penis (glans penis) sangat kaya dengan syaraf (Hardijanto, 1995).

Pubertas pada sapi terjadi pada umur 8-12 bulan. Umur pubertas dipengaruhi oleh lingkungan fisik, fotoperiod, umur dan breed betina dan jantan, heterosis, temperatur lingkungan, berat badan yang dipengaruhi oleh nutrisi dan pertumbuhan sebelum dan sesudah sapih (Ismudiono, 1999).

2.3. Semen Sapi

Semen adalah cairan yang keluar dari alat kelamin jantan yang terdiri dari dua bagian yaitu sel kelamin jantan (spermatozoa) dan cairan semen (plasma semen). Spermatozoa dihasilkan oleh tubulus seminiferus di dalam testes, sedangkan plasma semen merupakan campuran sekresi yang berasal dari epididymis dan beberapa kelenjar kelamin, yaitu ampula, duktus deferens, vesikularis, bulbouretralis dan prostat (Frandsen, 1992; Ismudiono, 1999).

Perbedaan anatomis kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap pada berbagai spesies hewan, menyebabkan pula perbedaan volume dan komposisi semen pada spesies-spesies tersebut. Volume air mani per ejakulat berbeda-beda tergantung kepada umur, kondisi hewan, frekwensi pengambilan, jumlah cairan yang diminum dan musim (Hafez,1993).

Semen pada sapi mempunyai volume yang kecil karena kelenjar asesoris mengeluarkan cairan dalam jumlah yang rendah dengan konsentrasi spermatozoa yang tinggi sehingga semen sapi berwarna putih kekuningan. Volume per-ejakulat berkisar 3-7 cc dengan konsentrasi 300-5000 juta/ml (Hardjopranjoto, 1995 ; Ismudiono, 1999).

2.3.1. Spermatozoa

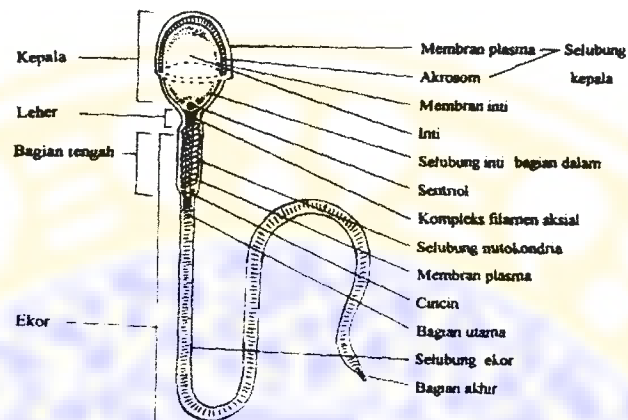
Spermatozoa merupakan sel benih yang tumbuh dan berkembang di dalam tubulus seminiferus testis melalui proses spermatogenesis. Berbentuk memanjang dengan satu ujung meruncing dan ujung lain lebih melebar yang berbentuk lonjong, seluruh bagian diselubungi oleh membran sel. Panjang keseluruhan dari kepala sampai ekor berkisar 50-70 μ , dengan berat satu sel spermatozoa mempunyai panjang berkisar 8,0-10,0 μ , lebar 4,0-4,5 μ , leher 1 μ , badan 8-10 μ (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Anterior kepala spermatozoa terdapat akrosom, sebagai suatu struktur yang mempunyai topi yang menutupi dua pertiga bagian anterior kepala dan mengandung beberapa enzim proteolitik seperti *akrosin*, *hyaluronidase* dan *corona penetrating enzim* (CPE) yang sangat penting untuk penetrasi sel telur pada proses pembuahan (Singh *et al.*, 1992).

Ekor spermatozoa merupakan bagian terpanjang yaitu 35-45 μ dengan diameter 0,4-0,8 μ terdiri dari empat bagian yaitu leher (midpiece), ekor bagian tengah (principle piece), ekor bagian tengah (middle piece) dan ekor bagian ujung (end piece). Ekor bagian atas merupakan bagian terpenting dari keseluruhan sel spermatozoa, karena disini terletak mitokondria yang merupakan pusat metabolisme yang menghasilkan energi dalam bentuk *Adenosin Tri Phospat* (ATP) untuk kehidupan dan pergerakan spermatozoa. Bagian ini juga mengandung sentriol proksimal dengan pusat kinetik untuk mengamati koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian tengah terletak antara *principle piece* dan *end piece* dengan diameter yang lebih kecil dari *middle piece*. Bagian ujung ekor merupakan bagian yang terpanjang dan berfungsi untuk menggerakkan spermatozoa maju ke depan (Hardjopranjoto, 1995).

Substrat energi yang utama dari air mani adalah fruktosa, sorbitol, GPC yang ditemukan dalam plasma air mani. Plasmalogen terdapat dalam spermatozoa itu sendiri, yang merupakan pengganti energi ketika substrat lain dalam keadaan terbatas (Bearder dan Fuguay, 1992).

Lama hidup sel mani terbatas kepada persediaan energi yang terkandung di dalam tubuhnya. Namun demikian, diluar alat kelamin jantan sel spermatozoa ini mampu untuk memakai sumber energi dari luar untuk melanjutkan hidupnya. Bahan utama yang dipakai sebagai sumber energi dari luar, adalah fruktosa yang akan diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin (Hardjopranjoto, 1995).



Gambar 1. Susunan Spermatozoa Mamalia (Hafez, 1993)

2.3.2. Plasma Semen

Plasma semen merupakan cairan yang disekresikan oleh kelenjar vesikula seminalis dan kelenjar aksesoris lainnya. Plasma semen berfungsi sebagai media spermatozoa dalam saluran alat kelamin hewan jantan, yang membawa spermatozoa ke dalam saluran kelamin hewan betina pada waktu perkawinan alami dan sebagai sumber makanan yang penting untuk kehidupan spermatozoa. Fungsi ini dapat berjalan baik karena plasma semen mengandung bahan penyanggah dan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Ismudiono, 1999).

Plasma semen dibedakan dengan cairan-cairan tubuh lainnya karena mengandung bahan-bahan organik dalam kadar yang lebih tinggi. Bahan-bahan organik tersebut antara lain : kolin dalam bentuk bebas maupun terikat (*phosphoryl choline* dan *glyceryl phosphoryl choline*), asam sitrat, fruktosa, sorbitol, inositol, ergotionin dan bahan-bahan organik lainnya yang hanya sedikit terdapat didalam cairan tubuh. Bahan-bahan anorganik yang kadarnya tinggi di

dalam plasma semen adalah kalium, kalsium, karbonat dan fosfat (Hardijanto dan Hardjoprajoto, 1994).

Plasma semen juga mengandung bahan-bahan yang dapat menghambat pengikatan oksidatif dan beberapa bahan yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan untuk melindungi kerusakan membran spermatozoa. Bahan-bahan antioksidan yang ada dalam plasma semen untuk melindungi spermatozoa antara lain : vitamin C, Zn, transferin, laktoferin, albumin dan asam urat sangat bervariasi antara satu individu dengan individu yang lain (Subratha, 1998).

2.4. Diluter

Syarat-syarat bahan pengencer yang baik diantaranya mengandung zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, memiliki lipoprotein (lecitin) untuk melindungi terhadap kejutan dingin, bebas dari kuman, sebagai buffer atau penyangga untuk mencegah perubahan pH, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, memperbanyak volume air mani, dan isotonis (Partodiharjo, 1992).

Air susu sapi umumnya memenuhi kriteria persyaratan sebagai pengencer semen, namun di dalam air susu mentah masih mengandung beberapa faktor yang beracun bagi sel spermatozoa. Umumnya digunakan untuk pengencer, air susu sapi dipanaskan lebih dulu pada suhu $(92-98)^{\circ}\text{C}$ atau rata-rata 95°C selama 10 menit. Pemanasan ini akan melepaskan gugusan sulfidril sebagai zat reduktif yang dapat menetralkan pengaruh toksik laktenin dari susu. Manfaat lain dari pemanasan air susu adalah untuk mematikan mikroorganisme, mengikat ion kalsium menjadi kalsium-kaseinat yang mudah mengendap dan dapat

menguraikan laktosa menjadi bentuk sakarida yang lain yang dapat digunakan sebagai energi oleh sel spermatozoa (Hardijanto dkk., 2002).

Air susu yang dipergunakan sebagai diluter mengandung sejumlah glukosa tertentu yang menyediakan zat karbohidrat yang tidak jelas identifikasinya, substansi pelindung lecitin dan substansi untuk proses oksidasi metabolisme, termasuk penguraian komponen lemak seperti gliserol dan asam lemak. Spermatozoa tidak menghidrolisis laktosa, tetapi menggunakan glukosa dan mungkin beberapa karbohidrat yang tidak dikenal di dalam susu (Salisbury dan Van Demark, 1985).

Susu bubuk juga dapat digunakan untuk diluter yang dilarutkan dalam aquades steril dengan perbandingan 1:10. Pemakaian susu skim bisa mencapai 8-10% dari jumlah pelarutnya. Bahan pengencer yang menggunakan susu skim lebih disukai karena hanya terdapat sedikit butir-butir lemak yang dapat menghambat pemeriksaan mikroskopis (Toelihere, 1993). Susu skim yang digunakan sebagai pengencer mempunyai nilai energi dari lemak 0 gram (Margono dkk, 2005) dan mengandung vitamin C 115 mg 25% dengan angka kecukupan gizi sebesar 2000 kalori untuk takaran persaji 22,5 gram.

Selain susu bubuk diluter juga ditambahkan kuning telur yang bermanfaat untuk mempertahankan integritas selubung sel spermatozoa dan mencegah *cold shock* karena mengandung lecithine (derivate lipoprotein). Penambahan kuning telur pada bahan pengencer dapat mempertahankan atau memelihara motilitas spermatozoa saat pembekuan. Kuning telur juga mengandung glukosa sebagai sumber energi sel spermatozoa dan beberapa zat protein serta vitamin baik yang

larut dalam air maupun minyak yang memiliki viskositas yang menguntungkan spermatozoa (Hardijanto dkk., 2002).

Polge, Smith dan Porkes membuka jalan dalam penelitian tentang pengawetan air mani dengan menambahkan glyserol pada bahan pengencer untuk mencegah terjadinya kristal es dalam air mani pada tahun 1950. Menurut penelitian glyserol mampu melindungi air mani terhadap suhu yang rendah bahkan pada suhu di bawah titik beku (Hardijanto dan Hardjoprajoto, 1997).

2.5. Vitamin C

Vitamin C pertama kali dimurnikan pada tahun 1928 oleh ahli Biokimia Hungaria Albert Szent-Gyorgyi yang bekerja di Cambridge, Inggris, Mayo-Clinic, Minnesota dan Hungaria. Szent-Gyorgyi merumuskan suatu komponen yang disebut asam heksurat yang akhirnya ilmuwan Amerika Waugh dan King diberi nama vitamin C (Goodman, 2000).

Vitamin C mempunyai 2 bentuk yaitu asam askorbat (bentuk reduksi) dan asam dehidroaskorbat (bentuk oksidasi). Vitamin ini sangat tidak stabil pada pH netral atau alkali, juga terhadap panas tetapi sangat stabil terhadap asam dan selama penyimpanan sementara dalam keadaan dingin dan segar (Girindra, 1990). Vitamin C atau asam askorbat termasuk vitamin yang larut dalam air (Syarif dkk., 2003).

Vitamin C merupakan zat organik yang relatif sederhana, hampir mendekati bentuk gula (monosakarida). Pada beberapa hewan, zat ini dapat disintesis di dalam tubuh sendiri dari glukosa atau gula-gula sederhana lainnya.

Sintesis vitamin C dipengaruhi oleh vitamin E, A, Thiamin dan Riboflavin. Vitamin C cepat rusak oleh panas, oksidasi dan dalam lingkungan alkali (Kurnyawan, 1994).

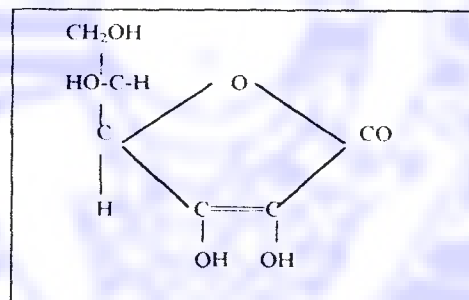
Vitamin C dapat bertindak sebagai ko-enzim dan pada keadaan tertentu merupakan reduktor dan antioksidan (Syarif dkk., 2003). Asam askorbat juga mempunyai manfaat lain yaitu sebagai antioksidan pemecah rantai yang hidrofilik, dapat bereaksi langsung menginaktifkan senyawa oksigen yang sangat reaktif seperti superoksida dan singlet oksigen (Martini, 1995).

Peran vitamin C antara lain untuk transport elektron (redoks sistem) dalam proses hidroksilasi prolin dan lisin pada pembentukan kolagen, membantu pembentukan jaringan feritin, meningkatkan peranan vitamin B kompleks, bersama-sama dengan ATP dan $MgCl_2$ merupakan ko-faktor dalam menghambat *adipose tissue lipase*, memacu hidrolitik deaminasi dari peptida atau protein, serta mempertahankan integritas sel (Kurnyawan, 1994). Vitamin C juga dapat menghambat oksidasi lemak dan protein (Decker *et al.*, 2000).

Suatu radikal berdasarkan definisi adalah suatu atom yang memiliki sebuah elektron tidak berpasangan di orbital sebelah luar. Zat ini sangat reaktif dan dapat mencetuskan reaksi berantai dengan mengekstraksikan sebuah elektron dari molekul didekatnya untuk melengkapi orbitalnya sendiri (Marks *et all*, 2000). Vitamin C (asam askorbat) dapat bereaksi langsung dengan radikal bebas yang sangat reaktif dan larut dalam air, seperti radikal hidroksil dan radikal peroksil. Asam askorbat memberikan satu elektronnya, sehingga radikal bebas yang berbahaya tadi akan dijinakkan, sedangkan asam askorbat sendiri akan berubah

menjadi radikal bebas askorbit yang kurang reaktif dan kemudian dapat direduksi kembali menjadi asam askorbat atau dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat (Martini, 1995).

Asam askorbat sebagai donor elektron (reducing agent) untuk berbagai reaksi kimia yang terjadi baik di dalam atau di luar sel secara intraseluler dan ekstraseluler. Asam askorbat dapat mengurangi superoksida radikal hidroksil, asam hipoklor, dan senyawa oksidan reaktif (Papas, 1999). Menurut Philips di dalam setiap 100 ml semen yang cukup subur akan mengandung 3-8 mg asam ascorbin. Bila kadar asam ascorbin setiap 100 ml semen < 3 mg, maka semen tersebut dianggap rendah kesuburannya (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1997).



Gambar 2. Struktur kimia Vitamin C (Donalds, 2003)

2.6. Semen Beku

Air mani beku adalah air mani yang diencerkan menurut prosedur biasa lalu dibekukan di bawah titik beku air. Air mani beku memiliki keuntungan dan kerugian. Keuntungannya adalah tersedianya air mani yang dikehendaki setiap waktu dimana merupakan anugerah bagi peternak yang bercita-cita membentuk peternakan, memungkinkan penggunaan air mani seekor hewan secara maksimal

selama hidupnya, biaya transportasi menjadi lebih murah, dan penyebaran bibit ternak yang baik bukan merupakan persoalan yang sulit (Partodiharjo, 1992).

Kerugian air mani beku adalah pemakaian air mani beku secara besar-besaran akan membatasi jumlah pejantan yang dipakai dan mungkin mempersempit dasar genetik suatu bangsa tertentu, beberapa pejantan kira-kira 30% spermatozoanya tidak tahan terhadap pembekuan, dalam proses pembekuan rata-rata 50% spermatozoanya akan mati sehingga konsentrasi spermatozoa tersebut perlu dipertinggi untuk setiap dosis inseminasinya, air mani beku relative mahal, jika kesehatan tidak dipertahankan maka air mani beku mempunyai potensi menyebarkan penyakit viral dan bakterial (Partodiharjo, 1992).

Semen beku tipe straw lebih banyak dipakai, karena mempunyai kebaikan, diantaranya adalah : relatif murah, lebih tahan terhadap perubahan-perubahan fisis dan khemis dalam pembekuan sampai pada suhu yang sangat rendah, penutupan dengan polyvinyl alkohol dapat dijamin kerapatannya, mudah diadaptasikan dengan permintaan-permintaan diluar negeri, memberikan angka konsepsi (conception rate) yang cukup tinggi (Hardijanto dan Hardjopranto, 1994).

Semen beku tipe straw sebelum digunakan dilakukan pencairan (*thawing*) menggunakan waterbath pada suhu $37,5^{\circ}\text{C}$ selama kurang lebih 10 detik. Suhu tersebut disesuaikan dengan suhu semen saat ejakulasi yaitu sekitar suhu tubuh (Evans dan Maxwell, 1987). Pemeriksaan kualitas semen *post thawing* dapat dilakukan dengan mengevaluasi motilitasnya pada suhu tubuh (Toelihere, 1980).

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Taman Ternak Pendidikan (Teaching Farm) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Gresik-Surabaya. Penelitian ini dimulai bulan November 2004 sampai dengan Februari 2005.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah semen sapi dalam keadaan sehat, alat kelamin normal dan libido baik. Sapi yang digunakan adalah satu ekor sapi jantan dan sapi ekor betina sebagai hewan pemancing agar libido sapi jantan meningkat maksimal dan pengambilan semennya dapat berjalan dengan lancar. Pakan yang diberikan adalah rumput segar, kecambah, konsentrat dan minum secara *ad libitum*.

3.2.2. Peralatan Penelitian

Seperangkat vagina buatan lengkap dengan tabung penampung berskala, termos, penangas air, *waterbath*, termometer 100⁰C, gelas ukur, gelas beker, erlenmeyer, kertas pH indikator universal, rak tabung, tabung reaksi, gelas obyek, gelas penutup, pemanas bunsen, pengaduk, pipet pasteur, alat penghitung, spuit

tuberculin 1 ml, mikroskop cahaya, timbangan mikro, kertas saring, aluminium foil, kertas label, tipe straw, kasa penyaring, cooltop, alarm, container.

3.2.3. Bahan Penelitian

Semen sapi, vaselin, susu skim, kuning telur, 1 vial Penicillin-G-Meiji 3.000.000 IU, 1 vial Streptomycin Sulfate Meiji, vitamin C 50 mg, glukosa, fruktosa, glycerol, larutan pewarna *Eosin-Negrosin*, air hangat, alkohol 70%, nitrogen cair dalam container, aquadest.



Gambar 3. Alat-alat yang digunakan untuk penelitian

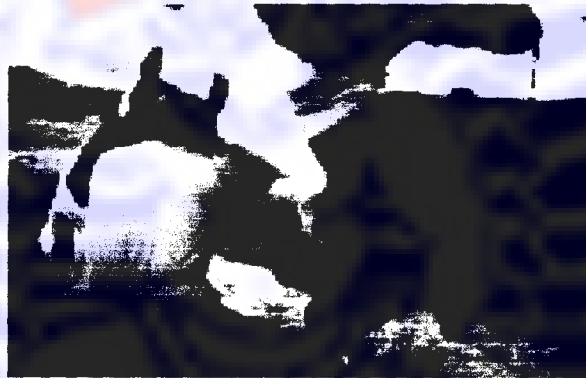
3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pemeriksaan Semen Sapi Sebelum Perlakuan

Penelitian ini diawali dengan pengamatan awal keadaan fisik sapi yang digunakan untuk penelitian, kemudian dilakukan pengambilan semennya menggunakan vagina buatan yang telah dipersiapkan sebelumnya. Selanjutnya

dilakukan uji makroskopis dan uji mikroskopis sebelum semen diencerkan dan diberi perlakuan.

Uji makroskopis semen meliputi evaluasi terhadap volume semen, konsistensi semen, bau semen, warna semen dan pH semen. Uji mikroskopis semen meliputi uji terhadap konsentrasi semen, gerakan massa spermatozoa, gerakan individu spermatozoa, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa (Hardijanto dkk, 2002).



Gambar 4. Proses Pengambilan Semen Sapi

Semen yang telah memenuhi syarat pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis dicampur dengan diluter A sebanyak $\frac{1}{2}$ volume akhir sesuai perlakuan. Masing-masing perlakuan di atas dibiarkan atau disimpan dalam suhu kamar $(20-27)^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit untuk memberi waktu vitamin C bekerja. Semen yang sudah dicampur dengan diluter A dimasukkan dalam cooltop berikut diluter B dengan volume yang sama, setelah cooltop mencapai suhu 5°C tambahkan diluter B ke diluter A secara bertahap dengan selang waktu 15 menit sebanyak $\frac{1}{4}$ volume diluter B, komposisi keempat perlakuan tersebut adalah :

1. Kontrol (K) : semen + susu skim + kuning telur + antibiotik + fruktosa + glukosa + glyserol.
2. Perlakuan I (PI) : semen + susu skim + kuning telur + antibiotik + fruktosa + glukosa + glyserol + vitamin C 0,05 mg/ml
3. Perlakuan II (P2) : semen + susu skim + kuning telur + antibiotik + fruktosa + glukosa + glyserol + vitamin C 0,1 mg/ml
4. Perlakuan III (P3) : semen + susu skim + kuning telur + antibiotik + fruktosa + glukosa + glyserol + vitamin C 0,2 mg/ml.

Waktu equilibrasi kurang lebih 1 jam setelah penambahan selesai, dilanjutkan dengan pemeriksaan motilitas minimal 55% untuk mengetahui layak tidaknya semen yang akan dibekukan. Proses selanjutnya adalah filling atau pengisian 0,25 ml dalam tipe straw, sealing atau penutupan straw dan pada tahap terakhir dilakukan prefreezing diatas permukaan container pada suhu -140°C sebelum straw dibekukan dalam suhu -196°C (lampiran 2).

3.3.2. Pemeriksaan Persentase Hidup Spermatozoa *Post Thawing*

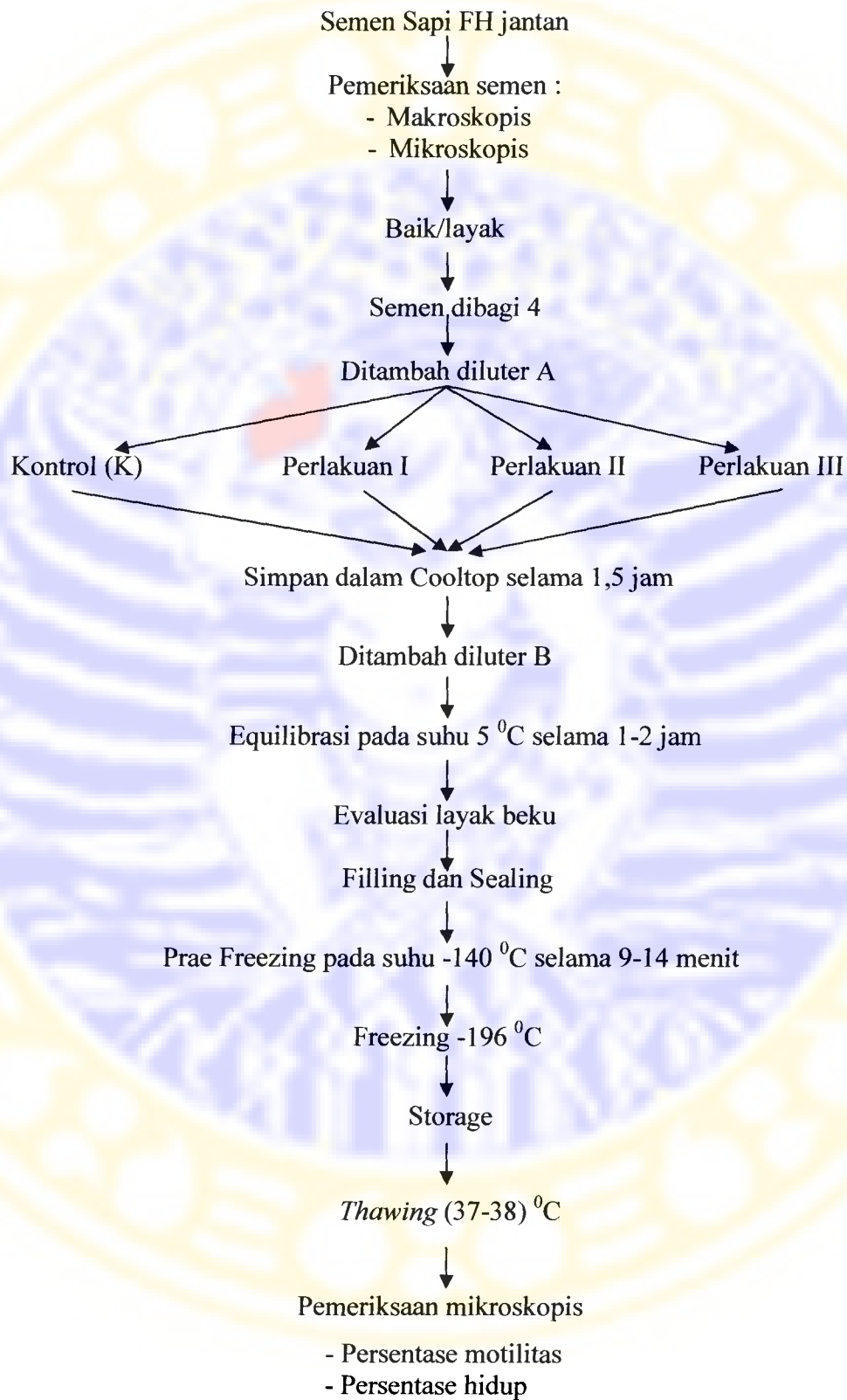
Pemeriksaan persentase hidup spermatozoa *post thawing* dengan cara membuat preparat ulas *Eosin Negrosin*. Straw yang akan diperiksa dimasukkan air hangat pada suhu $(37-38)^{\circ}\text{C}$ di dalam gelas beker selama 10 detik. Gunting straw pada ujungnya dan sedikit bagian tengahnya. Teteskan semen dan *eosin negrosin*

masing-masing satu tetes ke atas obyek gelas yang telah kita bersihkan dengan alkohol 70%, secepat mungkin kedua larutan tersebut dicampur hingga homogen kemudian dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan diatas nyala api maksimal 15 detik. Setelah kering periksa pada mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Penilaian jumlah sel spermatozoa hidup berdasarkan banyaknya jumlah sel yang tidak menyerap zat warna *eosin negrosin* (lampiran 4). Semen dengan nilai fertilitas yang baik dan layak untuk diinseminasikan harus mengandung minimal 55% spermatozoa hidup.

3.3.3. Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa *post thawing* dilakukan dengan memasukkan straw ke dalam air hangat pada suhu $(37-38)^{\circ}\text{C}$ di dalam gelas beker selama 10 detik. Gunting straw pada ujungnya dan sedikit bagian tengahnya. Teteskan satu ke atas obyek gelas yang telah kita bersihkan dengan alkohol 70% dan ditutup cover gelas kemudian periksa pada mikroskop dengan pembesaran 100 kali (lampiran 3). Semen dengan nilai fertilitas yang baik dan layak untuk diinseminasikan harus mengandung minimal 40% spermatozoa motil.

3.4. Skema Jalannya Penelitian



3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Semua perolehan data yang terdiri dari persentase hidup dan motilitas spermatozoa disusun dalam bentuk tabel, kemudian dianalisis dengan Uji Anova Satu Arah, apabila terdapat perbedaan di antara perlakuan maka dilanjutkan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5% (Kusriningrum, 1990).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Pemeriksaan Semen Sapi Sebelum Perlakuan

Semen sapi sebelum perlakuan terlebih dulu dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan semen sangat penting artinya sebelum melakukan proses lebih lanjut terhadap semen tersebut. Pemeriksaan tersebut meliputi volume, konsistensi, bau, warna, pH, konsentrasi, gerakan massa, gerakan individu, persentase hidup dan abnormalitas. Hasil pemeriksaan semen sapi sebelum perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Sapi Sebelum Perlakuan

Ulangan	Volume (ml)	Warna	Bau	Konsistensi	pH
1	9	Putih	Khas	Sedang	6-7
2	4	Putih	Khas	Kental	6-7
3	5,5	Putih	Khas	Kental	6-7
4	10	Putih	Khas	Kental	6-7
5	7	Putih	Khas	Sedang	6-7
6	8	Putih	Khas	Kental	6-7
7	5	Putih	Khas	Kental	6-7
8	6	Putih	Khas	Kental	6-7
Rata-rata ± SD	6,8 ± 2.1	Putih	Khas	Sedang-Kental	6-7

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Spermatozoa Sapi Sebelum Perlakuan

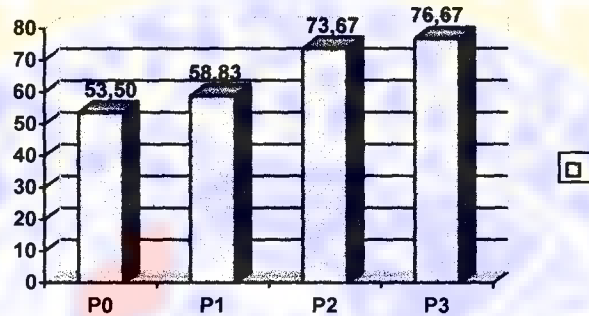
Ulangan	Konsentrasi (jt)/ml	SPZ HDP (%)	SPZ ABN (%)	G M	G I	M (%)
1	870	87	6	++	P	75
2	1.150	89	4	++	P	75
3	1.130	89	6	++	P	75
4	1.270	90	5	+++	P	80
5	850	88	7	++	P	75
6	1.300	89	3	+++	P	80
7	1.100	86	4	++	P	75
8	1.210	88	5	++	P	75
Rata-rata ± SD	1.110 ±168.61	88,25± 1,28	5±1,31	++(+)	P	76.25±2.31

Keterangan :

SPZ HDP : Spermatozoa Hidup
 SPZ ABN : Spermatozoa Abnormal
 G M : Gerakan Massa
 G I : Gerakan Individu
 M : Motilitas
 P : Progresif
 ++ : Baik
 +++ : Sangat Baik

4.2. Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Hasil dari pemeriksaan persentase hidup spermatozoa sapi *post thawing* setelah diberi penambahan vitamin C dapat dilihat pada Grafik 2 :



Grafik 2. Rataan Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Berdasarkan data analisa dengan uji Anova (lampiran 14) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan ($p < 0,05$). Analisis dilanjutkan dengan uji BNJ 5% untuk menunjukkan perbedaan yang nyata dari masing-masing kelompok perlakuan. Adanya perbedaan yang nyata pada P0 terhadap P2 dan P3, P1 terhadap P2 dan P3, tapi tidak berbeda nyata pada P0 terhadap P1, dan P2 terhadap P3. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4 berikut ini :

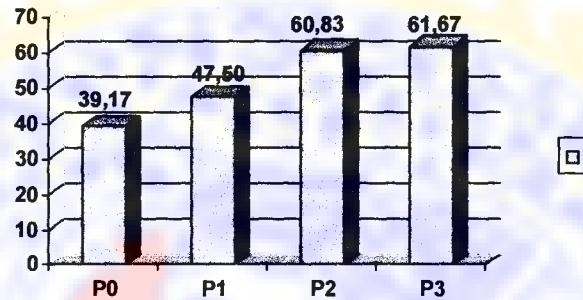
Tabel 4. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Perlakuan	Rataan dan Simpangan Baku Persentase Hidup Spermatozoa
P0 ^b	53,50 ± 8,43
P1 ^b	58,83 ± 6,88
P2 ^a	73,67 ± 3,67
P3 ^a	76,67 ± 7,45

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

4.3. Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Hasil dari pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa sapi *post thawing* setelah diberi penambahan vitamin C dapat dilihat pada Grafik 1. berikut ini :



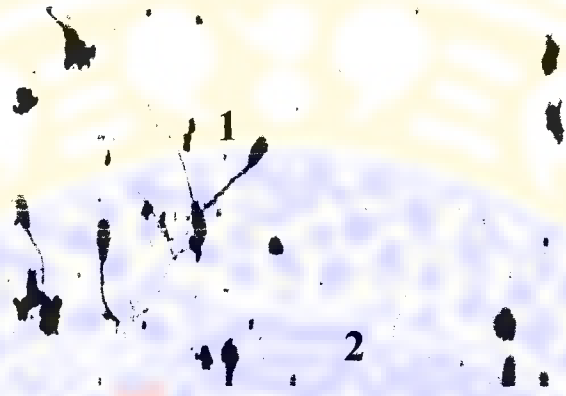
Grafik 1. Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Berdasarkan data analisa dengan uji Anova (Lampiran 15) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari masing-masing perlakuan ($p < 0,05$). Analisis dilanjutkan dengan uji BNJ 5% untuk menunjukkan perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan. Adanya perbedaan yang nyata antara P0 terhadap P2 dan P3, tapi pada P1 tidak berbeda nyata terhadap P0, P2 dan P3. Pada P2 tidak berbeda nyata dengan P3. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 3. berikut ini :

Tabel 3. Data Rataan dan Simpangan Baku Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Perlakuan	Rataan dan Simpangan Baku Motilitas Spermatozoa
P0 ^b	39,17± 11,14
P1 ^{ab}	47,50± 8,80
P2 ^a	60,83± 4,92
P3 ^a	61,67± 9,31

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



Gambar 5. Spermatozoa Hidup dan Mati

Keterangan : 1. Spermatozoa mati
2. Spermatozoa hidup

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Karakteristik Semen Segar

Volume semen segar yang dihasilkan oleh seekor sapi jantan dalam satu ejakulasi sangat bervariasi. Volume semen yang berbeda dipengaruhi antara lain oleh umur sapi, besar tubuh, status kesehatan, status reproduksi, kualitas makanan, dan frekuensi penampungan (Toelihere, 1993). Teknik dan metode penampungan serta persiapan alat penampungan juga akan mempengaruhi volume semen yang dihasilkan. Penelitian ini diperoleh volume semen rata-rata yaitu $6,8 \pm 2,1$. Hasil ini bisa dikatakan baik, karena sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (1993) bahwa volume yang diejakulasikan secara normal pada sapi berkisar antara 5-8 ml, sedangkan Salisbury dan VanDenmark (1985) juga menyatakan bahwa volume semen sapi jantan tiap ejakulasi antara 2-10 ml.

Warna dan konsistensi semen dapat dijadikan indikator untuk memprediksi konsentrasi spermatozoa yang berada dalam semen secara cepat. Kondisi normal dapat dikatakan bahwa semakin kental dan warna mendekati krem atau keruh, maka konsentrasi spermatozoa yang terkandung di dalam semen tersebut semakin tinggi. Warna semen yang diperoleh pada penelitian ini berkisar dari putih hingga krem, konsistensi sedang sampai kental. Baik warna dan konsistensi semen yang diperoleh pada penelitian ini masih tergolong baik, sejalan dengan yang dikemukakan Bearden dan Fuguay (1992), bahwa semen sapi dari ejakulasi normal adalah krem atau putih susu.

Hasil pemeriksaan kualitas semen segar menunjukkan pH yang normal yaitu 6-7. Menurut Toelihere (1993), pH semen sapi jantan berkisar antara 6,4-6,9 atau 6,4-7,8 (Garner dan Hafez, 1993). Semen yang berkualitas baik lebih kearah asam (pH rendah) daripada semen dengan pH yang cenderung basa (Foote, 1986).

Penilaian konsentrasi atau jumlah spermatozoa per milliliter semen sangat penting, karena faktor ini menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen. Konsentrasi semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah $1.110 \pm 168,6$ juta per ml semen. Konsentrasi semen ini masih dalam kisaran normal menurut Hafez (1993) yaitu antara 800-2000 juta spermatozoa per ml.

Rata-rata pemeriksaan persentase hidup semen segar sebesar $88,25 \pm 1,28$. Rata-rata di atas memenuhi syarat sebagai semen yang baik, karena menurut Toelihere (1993) bahwa semen yang baik adalah semen yang setelah dilakukan penafsiran mikroskopis berdasarkan perbedaan afinitas menghisap zat warna *eosin-negrosin* oleh spermatozoa mempunyai persentase hidup minimum 50%. Perbedaan afinitas menghisap zat warna *eosin negrosin* oleh spermatozoa menurut Partodiharjo (1992), spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna dan yang hidup tidak menyerap zat warna, sehingga di bawah mikroskop terlihat jelas perbedaan yang kontras antara yang mati (gelap) dan yang hidup (jernih) dapat dilihat pada gambar 5.

Morfologi spermatozoa juga merupakan penentuan kualitas semen, menilai morfologi spermatozoa dapat diketahui dari tingkat abnormalitas spermatozoa tersebut. Penyebab abnormalitas tersebut bisa karena gangguan pada

sistem reproduksi pejantan (abnormalitas primer) atau juga karena perlakuan setelah semen diejakulasikan (abnormalitas sekunder). Abnormalitas pada spermatozoa meliputi kepala yang terlalu besar atau kecil, ekor dan kepala ganda, pembekokan badan dan ekor, dan pelepasan di bagian kepala (Lindsay dkk, 1982). Semen jika mempunyai tingkat abnormalitas 20% atau lebih, maka kualitasnya dianggap jelek (Partodiharjo, 1992). Rata-rata tingkat abnormalitas semen segar yang digunakan dalam penelitian adalah $5\pm 1,31$, maka jika dilihat dari tingkat abnormalitas spermatozoanya, dapat disimpulkan semen segar yang digunakan dalam penelitian termasuk dalam kualitas yang baik.

Pengamatan pada tingkat motilitas semen segar menunjukkan bahwa semen tersebut mempunyai kualitas yang baik karena gerak individu progresif dengan motilitas rata-rata $76,25\pm 2,31$ dan gerak massa baik (+++). Penilaian motilitas yang progresif sangat penting untuk menunjukkan kualitas individu ternak. Partodiharjo (1992) menyatakan bahwa kualitas semen tergolong sangat baik jika gerakan massa spermatozoa mempunyai nilai (+++) artinya aktif sekali, sedangkan semen yang berkualitas baik (++) , serta semen yang tergolong kurang baik jika gerakan massa mempunyai nilai (+). Semen yang berkualitas sangat baik mempunyai ciri-ciri terlihat gelombang-gelombang besar dengan gerakan yang cepat, gelap, tebal, dan banyak. Semen yang berkualitas baik mempunyai ciri-ciri terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang dan bergerak agak lambat. Semen yang berkualitas kurang baik mempunyai ciri-ciri gelombang tidak jelas, walaupun terlihat memerlukan pengamatan yang sungguh-sungguh dan pergerakan gelombang tidak tampak (Toelihere, 1993).

5.2. Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Data hasil pengaruh penambahan vitamin C menunjukkan angka rata-rata dan simpangan baku persentase hidup spermatozoa berturut-turut adalah P0 sebesar $53,50 \pm 8,43$; P1 sebesar $58,83 \pm 6,88$; P2 sebesar $73,67 \pm 3,67$; P3 sebesar $76,67 \pm 7,45$. Data di atas menunjukkan perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan ($p < 0,05$). Rataan dan simpangan baku tertinggi pada kelompok P3, hal ini menunjukkan bahwa penggunaan vitamin C $0,2 \text{ mg/ml}$ paling optimal untuk meningkatkan persentase hidup spermatozoa sapi *post thawing*.

Penilaian jumlah sel spermatozoa hidup berdasarkan banyaknya jumlah sel spermatozoa yang tidak menyerap zat warna eosin negrosin. Spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, terutama pada daerah *post nuclear caps* sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna *eosin negrosin*. Sedangkan sel spermatozoa yang hidup mempunyai kondisi membran yang baik sehingga zat warna kesulitan menembus membran, akibatnya sel spermatozoa tetap berwarna jernih (Hardijanto dkk., 2002).

Semua sel terbungkus oleh suatu membran sel, sel eukariotik juga mengandung membran intrasel yang mengelilingi organel subsel. Membran terdiri dari sebuah lapis-ganda lemak (lipid bilayer) dengan protein terbenam di dalamnya. Lapis ganda tersebut terutama terdiri dari fosfolipid, yang tersusun dengan kepala hidrofiliknya menghadap lingkungan cair di kedua sisi membran dan ekor asil lemak membentuk bagian tengah membran yang hidrofobik. Membran membentuk sawar hidrofobik mengelilingi sel atau organel sel yang mencegah bahan polar masuk atau keluar. Namun, untuk bertahan hidup, sel dan

organel harus berinteraksi dengan lingkungan yang terus-menerus berubah, menyerap bahan eksternal dan mengeluarkan bahan internal.

Mekanisme ini terdiri dari difusi sederhana, termasuk lewatnya bahan, baik secara langsung melalui membran atau melalui pori atau saluran membran, dan difusi dengan fasilitasi, yang melibatkan protein pembawa (*carier*) yang dikenal sebagai transporter. Difusi sederhana dan fasilitasi adalah contoh transport pasif. Pertahanan sel terhadap toksisitas oksigen masuk dalam kategori enzim antioksidan untuk mengeluarkan spesies oksigen reaktif, vitamin dan *scavenger* (penyapu, pencari) radikal bebas antioksidan, kompartementasi sel, dan perbaikan.

Aktivitas oksidan dapat diredam oleh antioksidan. Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor) dalam pengertian kimia, tetapi dalam arti biologis, pengertian antioksidan lebih luas, yaitu semua senyawa yang dapat meredam aktivitas oksidan (Suryohudoyo, 1997). Vitamin C disebut juga vitamin antioksidan, dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas (Marks, 2000). Vitamin C (asam askorbat) dapat bereaksi langsung dengan radikal bebas yang sangat reaktif dan larut dalam air, seperti radikal hidroksil dan radikal peroksil. Asam askorbat memberikan satu elektronnya, sehingga radikal bebas yang berbahaya tadi akan dijinakkan, sedangkan asam askorbat sendiri akan berubah menjadi radikal bebas askorbit yang kurang reaktif dan kemudian dapat direduksi kembali menjadi asam askorbat atau dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat (Martini, 1995). Hasil pemeriksaan semen beku post thawing menunjukkan pH yang normal yaitu 6-7, sehingga semen masih dapat dianggap berkualitas baik.

Subratha (1998) mengatakan bahwa pemberian antioksidan dapat meningkatkan persentase hidup spermatozoa. Pemberian antioksidan menghambat peroksidasi asam lemak tak jenuh majemuk sehingga lipid membran meningkat. Adanya lipid membran yang meningkat mengakibatkan integritas struktural dan integritas fungsional membran spermatozoa juga meningkat.

5.3. Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Data hasil pengaruh penambahan vitamin C menunjukkan angka rata-rata dan simpangan baku persentase motilitas spermatozoa berturut-turut adalah P0 sebesar $39,17 \pm 11,14$; P1 sebesar $47,50 \pm 8,80$; P2 sebesar $60,83 \pm 4,92$; P3 sebesar $61,67 \pm 9,31$. Data di atas menunjukkan perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan ($p < 0,05$), rata-rata dan simpangan baku tertinggi pada kelompok P3, hal ini menunjukkan bahwa penggunaan vitamin C 0,2 mg/ml paling optimal untuk meningkatkan persentase motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

Motilitas yang dilihat dalam hal ini adalah motilitas progresif spermatozoa. Hasil analisa tersebut sesuai dengan penelitian Subratha (1998) bahwa pemberian antioksidan dapat meningkatkan motilitas progresif spermatozoa. Pemberian antioksidan dapat mencegah peroksidasi asam lemak sehingga lipid membran meningkat. Adanya lipid membran yang meningkat akan meningkatkan integritas struktural dan integritas fungsional membran spermatozoa, mekanisme ini akan meningkatkan motilitas progresif spermatozoa karena terjadi peningkatan absorpsi substrat.

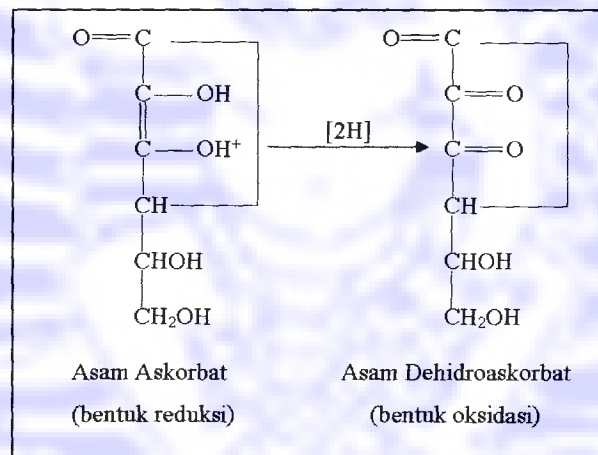
Mitokondria adalah organel yang menghasilkan sebagian besar energi kimia yang diperlukan oleh sel eukariotik. Setiap mitokondria dibungkus oleh

sebuah selubung yang terdiri dari sebuah membran bagian luar dan sebuah membran bagian dalam. Tahap akhir oksidasi bahan bakar dan sebagian besar perubahan energi bahan bakar menjadi ATP berlangsung di mitokondria. Enzim siklus asam trikarboksilat, yang bertanggung jawab untuk tahap akhir oksidasi bahan bakar, hanya ditemukan di mitokondria, dan komponen rantai transpor elektron terdapat di dalam membran mitokondria bagian dalam. Sintesis ATP bergantung pada integritas struktural membran mitokondria bagian dalam. Mitokondria mengelilingi bagian tengah ekor spermatozoa, mitokondria yang berbentuk spiral menyesuaikan diri dengan gerakan memecut seperti gelombang dari ekor sperma sewaktu ekor tersebut mendorong sperma (Marks, 2000).

Peran vitamin C antara lain untuk transport elektron (redoks sistem) dalam proses hidrosilasi prolin dan lisin pada pembentukan kolagen, membantu pembentukan jaringan feritin, meningkatkan peranan vitamin B kompleks, bersama-sama dengan ATP dan $MgCl_2$ merupakan ko-faktor dalam menghambat *adipose tissue lipase*, memacu hidrolitik deaminasi dari peptida atau protein, serta mempertahankan integritas sel (Kurnyawan, 1994). Vitamin C juga dapat menghambat oksidasi lemak dan protein (Decker *et al.*, 2000).

Menurut Philips di dalam setiap 100 ml semen yang cukup subur akan mengandung 3-8 mg asam ascorbin. Bila kadar asam ascorbin setiap 100 ml semen < 3 mg, maka semen tersebut dianggap rendah kesuburannya (Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1997). Kandungan vitamin C 0,03-0,08 mg/ml dalam semen sapi dengan penambahan vitamin C 0,2 mg/ml diluter masih belum mengganggu sistem mekanisme dan pembekuan.

Banyak sekali faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa baik yang bersifat endogen maupun eksogen. Faktor endogen merupakan keadaan individu spermatozoa itu sendiri yang erat kaitannya dengan umur spermatozoa, tingkat maturasi spermatozoa meliputi morfologi, faali dan sifat-sifat biokimia, juga faktor-faktor yang menyangkut pengadaan energi misalnya transport melalui membran spermatozoa. Faktor eksogen adalah faktor lingkungan yang berada di luar membran spermatozoa, antara lain faktor biofisika dan faali meliputi viskositas, pH, temperatur dan komposisi ion dalam media yang ada disekelilingnya (Hernawati, 1998).



Gambar 6. Reaksi Oksidasi Asam Askorbat (Murray *et al*, 1999)

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Penambahan vitamin C 0,2 mg/ml dalam diluter merupakan perlakuan yang optimal dalam meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi FH *post thawing*.

6.2. Saran

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang pengaruh waktu penambahan vitamin C dalam diluter untuk melihat waktu penambahan vitamin C yang terbaik.
2. Perlu adanya penelitian tentang kelebihan dan kekurangan antara penambahan vitamin C dalam diluter dibandingkan dengan penambahan antioksidan yang lain.
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang perbandingan penambahan vitamin C dengan penggunaan diluter selain diluter susu skim dan kuning telur.
4. Perlu adanya penelitian lebih lanjut sampai ke tahap fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo*.

RINGKASAN

Nunik Muslikhah Sofiyanti. Pengaruh Penambahan Vitamin C Dalam Diluter Terhadap Persentase Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Sapi FH *Post Thawing*, dibawah Bimbingan Bapak Tri Wahyu Suprayogi, M.Si, Drh. dan Bapak Djoko Legowo, M.Kes., Drh.

Keberhasilan pelaksanaan Inseminasi Buatan (IB) ditentukan salah satunya oleh kualitas semen yang digunakan. Sebelum digunakan semen perlu diencerkan dahulu. Kemampuan fertilisasi spermatozoa ditentukan antara lain oleh spermatozoa yang hidup dan mempunyai motilitas progresif, sebab kemungkinan untuk mencapai sel telur (ovum) akan menjadi lebih besar. Selain itu juga ditentukan oleh integritas atau keutuhan membran spermatozoa.

Peranan vitamin C sebagai antioksidan ternyata dapat mempertahankan integritas sel. Keutuhan membran spermatozoa yang meningkatkan juga akan mempengaruhi motilitas spermatozoa yang turut menunjang dan menentukan kemampuan spermatozoa untuk membuahi ovum, karena terjadinya peningkatan absorpsi substrat dalam diluter. Penggunaan semen beku memungkinkan perkawinan yang selektif dimana saja dan setiap waktu dengan kemungkinan memilih diantara semen beku, biaya transport rendah, dapat mencegah penyakit kelamin menular pada hewan betina.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam diluter susu skim terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*. Penelitian ini menggunakan sampel semen dari seekor sapi jantan dengan libido baik. Setiap sampel dibagi menjadi empat kelompok

perlakuan yaitu kontrol tanpa ditambah vitamin C, vitamin C 0,05 mg/ml diluter, vitamin C 0,1 mg/ml diluter dan vitamin C 0,2 mg/ml diluter. Masing-masing kelompok perlakuan diproses dan disimpan dalam bentuk semen beku, dilanjutkan dengan pemeriksaan post thawing terhadap persentase hidup dan motilitas spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji Anova Satu Arah yang kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dalam diluter dapat meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi, terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Analisis data menunjukkan peningkatan persentase hidup spermatozoa tertinggi pada kelompok P3 (vitamin C 0,2 mg/ml) dengan rata-rata dan simpangan baku $76,67 \pm 7,45$; sedangkan persentase motilitas spermatozoa sapi tertinggi pada kelompok P3 (vitamin C 0,2 mg/ml) dengan rata-rata dan simpangan baku $61,67 \pm 9,31$. Kesimpulan dari data di atas bahwa penambahan vitamin C 0,2 mg/ml efektif untuk meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa sapi *post thawing*.

DAFTAR PUSAKA

- Bearder, H.J., and J.W. Fuguay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3rd Edition Prentice Hall, Inc. A. Simon and Schuster Company. Englewood Cliffs. New Jersey. P : 136-192.
- Decker, E.A., C. Faustman and C.J. Lopez-Bote. 2000. *Antioxidants in Muscle Foods*. John Willey and Sons, Inc. Canada.
- Donald's, M. 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th Edition. Mauricio, H. P. Michael, P. D. A Blackweel Publishing Company. United State of America. 267.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artifisial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths Pty Limited. Sidney.
- Foote, R.H. 1986. *Functional Anatomy of Male Reproduction*. In E.S.E. Hafez. *Reproduction in Farm Animal*. 4th Edition. Lea and Febiger. Philadelphia. 498-500.
- Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak* . Edisi 4. Diterjemahkan oleh B. Srigandono. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Garner, D.L.B, B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. lake, D. Stephenson, MA. Van Dilla and L.A. Johnson. 1983. *Quantification of The X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flowcytometry*. *Biology of Reproduction*. 312-321.
- Girindra, A. 1990. *Biokimia I*. PT. Gramedia. Jakarta. 146-147.
- Goodman, S. 2000. *Ester-C Vitamin Generasi III Mengubah Pandangan Kita Tentang Vitamin C*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In : *Reproduction in Farm Animal*, 6th ed. Lea and Febinger. Philadelphia. 65-87.
- Hardijanto dan S. Hardjopranto. 1997. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto, T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati dan T.W. Suprayogi. 2002. *Petunjuk Praktikum Teknik Reproduksi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

- Herliantien, 1999. *Petunjuk Penampungan Produksi Distribusi Dan Evaluasi Semen Beku*. BIB Singosari, Malang.
- Hernawati, T. 1998. *Peranan Heparin, Hipotaurin dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa dan Pembuahan Invitro pada Sapi Perah*. Tesis Universitas Airlangga.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB. Bandung. 152-154.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Edisi 2. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Juliana, 2004. *Pengaruh Penambahan Vitamin C Dalam Diluter Susu Skim Terhadap Motilitas, Persentase Hidup dan Keutuhan Membran*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kurnyawan, R. 1994. *Pengaruh Pemberian Konsentrat dan Vitamin C Terhadap Kualitas dan Kuantitas Semen Kambing Kacang Jantan*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kusriningrum, R.1990. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Lindsay, K.W. Entwistle dan A. Winantea. 1982. *Reproduksi Ternak Indonesia*. Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Brawijaya Malang. 9-11.
- Margono, 2004. *Sapi Perah (Bos sp.)*. <http://warintek.progressio.or.id/- by rans>.
- Margono, Suryati, Hartinah, 2005. *Buku Panduan Teknologi Pangan*. Pusat Informasi Wanita Dalam Pembangunan, PDII, LIPI, Jakarta.
- Marks, Dawn B, 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Cetakan Pertama. Penerbit EGC, Jakarta.
- Martini, T. 1995. *Pengaruh Asap Tembakau Terhadap Status Vitamin C dalam Darah Pada Cavia*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Murray, Graner, Mayes, Rodwell. 1999. *Biokimia Harper*. Edisi 24. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Papas, A.M. 1999. *Antioxidants Status, Diet, Nutrition and Health*. CRC Press. Boca Raton. London. New York. Washington D.C. 14-15, 44, 162-163.
- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Edisi Ketiga. Penerbit Mutiara, Jakarta 530-560.

- Salisbury, G.W. and N.L. Van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Diterjemahkan oleh R. Djanuar. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Singh, R.S., N.S. Tomar, K.C. Sharma and K.B. Sharma. 1992. *Studies on Acrosomal Abnormalities of Cattle and Buffalo in Relation to Other Semen Characteristics and Fertility*. Indian Vet J.
- Subratha, I.M. 1998. *Pemberian Fosfolipid Esensial dan Antioksidan (Vitamin E) Meningkatkan Integritas Membran Spermatozoa*. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sugeng, 2003. *Sapi Potong*. Cetakan XI. Penerbit Penebar Swadaya.
- Suryohudoyo, P. 1997. *Oksidan dan Antioksidan Pada Diabetes Mellitus*. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya. 27-35.
- Syarif, dkk, 2003. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4 (Cetak Ulang). Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Cetakan III. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Widjaja, S, 1997. *Antioksidan : Pertahanan Tubuh Terhadap Efek Oksidan Dan Radikal Bebas*. Majalah Ilmiah Fakultas Kedokteran. Universitas Trisakti. 1660-1669.

Lampiran 1. Pembuatan Diluter Untuk Setiap Perlakuan.

Pembuatan diluter semen untuk empat kelompok perlakuan dilakukan dengan cara sebagai berikut (Hardijanto dkk, 2002) :

1. Susu skim 10 gram dimasukkan ke dalam gelas beker lalu ditambah aquadest sampai dengan 100 ml kemudian diaduk dengan rata.
2. Campuran susu skim dan aquadest dipanaskan sampai suhu $(92-95)^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit sambil diaduk.
3. Air susu didinginkan perlahan-lahan hingga suhu kamar $(20-27)^{\circ}\text{C}$ sampai 32°C .
4. Penambahan kuning telur 5 gram ke dalam diluter dan diaduk sampai rata.
5. Penambahan antibiotika Penicillin 1000 IU dan Streptomisin 1 mg ke dalam setiap mili-liter diluter, selanjutnya diaduk hingga rata.
6. Vitamin C 50 mg dilarutkan dalam 5 ml aquadest sehingga konsentrasi menjadi 10 mg/ml vitamin C.
7. Diluter yang sudah siap dibagi menjadi 4, kemudian ditambahkan vitamin C untuk masing-masing perlakuan dengan konsentrasi sebagai berikut : tanpa vitamin C untuk kontrol; 0,05 mg/ml untuk P1; 0,1 mg/ml untuk P2; 0,2 mg/ml untuk P3, masing-masing perlakuan didiamkan 30 menit untuk memberi waktu vitamin C beradaptasi dalam diluter.
8. Keempat diluter dibagi menjadi 2 masing-masing diluter A dan diluter B, pada diluter B ditambahkan fruktosa 2 gram, glukosa 2 gram dan glyserol 16 ml.

Lampiran 2. Proses Pembekuan Semen Sapi.

Proses pembekuan semen dilanjutkan setelah semen, diluter A dan diluter B siap, dengan cara sebagai berikut (Hardijanto dkk, 2002) :

1. Semen ditambah diluter A dengan perbandingan 1: 4 kemudian dimasukkan cooltop berikut diluter B.
2. Penambahan diluter B secara bertahap dengan selang waktu 15 menit, sehingga perbandingan akhir semen, diluter A, diluter B adalah 1: 4: 5.
3. Equilibrase kurang lebih 1 jam pada suhu 5⁰C.
4. Pemeriksaan motilitas minimal 55% untuk mengetahui layak tidaknya semen yang akan dibekukan.
5. Filling straw sebanyak 0,25 ml semen dilanjutkan dengan sealing straw.
6. Prae Freezing semen di atas permukaan container pada suhu -140⁰C selama 9-12 menit.
7. Freezing semen dalam container pada suhu -196⁰C selama penyimpanan.
8. Penyimpanan dalam container yang berisi nitrogen cair.

Lampiran 3. Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa *Post Thawing*.

1. Straw yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam gelas beker pada suhu (37-38)⁰C selama 10 detik.
2. Straw digunting pada ujung dan tengahnya, teteskan ke atas obyek gelas kemudian tutup dengan cover gelas.
3. Pemeriksaan dan perhitungan motilitas spermatozoa dengan perbesaran 400x, diamati dari lima lapang pandang.

4. Penilaian spermatozoa diamati dari motilitas progresif sel sperma (Agustinus, 1999) :

- Nilai $\geq 40\%$: layak untuk diinseminasikan.
- Nilai $< 40\%$: dipertimbangkan.

Lampiran 4. Pemeriksaan Persentase Hidup Spermatozoa *Post Thawing*

1. Letakkan satu tetes semen dan satu tetes *eosin negrosin* diatas gelas obyek yang sudah dibersihkan.
2. Kedua larutan tersebut dicampur hingga homogen dan dibuat preparat ulas setipis mungkin dan dipanaskan diatas bunsen maksimal 15 detik.
3. Pemeriksaan dan perhitungan spermatozoa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x, diamati dari lima lapang pandang minimal 100 sel spermatozoa.
4. Penilaian persentase spermatozoa hidup berdasarkan perbandingan sel yang tidak menyerap zat warna (hidup) dan yang menyerap zat warna (mati), semen dengan nilai fertilitas yang baik dan layak untuk dinseminasikan harus mengandung minimal 55% spermatozoa hidup (Hardijanto, 2002).

Lampiran 5. Komposisi Susu Skim Tropicana Slim

Takaran saji (serving size) 22,5 gram

Σ sajian / kemasan (amount / serving)

Energi (Calories) 80 kal

Energi dari lemak (Calorie from fat) 0 gram

	% AKG
Lemak total (Total fat) 0 gram	0 %
Protein 8 gram	16 %
Total Karbohidrat (Total Karbohidrat) 11 gram	3 %
Gula (Sugar) 0 gram	0 %
Sodium 135 mg	6 %
Vitamin A 1250 IU	60 %
Vitamin B1 (Thiamin) 0,4 mg	30 %
Vitamin B2 (Riboflavin) 0,45 mg	35 %
Niasin (Niacin) 5,0 mg	30 %
Vitamin B6 0,5 mg	40 %
Vitamin B12 1,5 mcg	60 %
Vitamin C 115 mg	25 %
Vitamin D 100 IU	50 %
Vitamin E 5,0 mg	50 %
Asam Folat (Folac Acid) 100 mcg	25 %
Kalsium (Calcium) 432 mg	60 %
Fosfor (Phosporus) 134,2 mg	20 %
Zat Besi (Iron) 1,8 mg	6 %
Phytosterol 201 mcg	

- % AKG berdasarkan kebutuhan Energi 2000 kalori kebutuhan Energi anda mungkin lebih tinggi atau lebih rendah.

- Tidak merupakan sumber lemak dan gula yang berarti
- Mengandung 201 mcg Phytosterol Persaji
- 3 sendok (22,5 gram) ad 200ml

Netto 275 gram, Informasi Nilai Gizi (Nutrition Fact)

Diproduksi oleh :
 PT. Nutrifood Indonesia
 Bogor 16720-Indonesia
 Kode Produksi P092809
 BPOM RI MD 806710227007

Lampiran 6. Hasil Analisis Data Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Data Persentase Hidup Spermatozoa Sapi *Post Thawing*

Ulangan	P0	P1	P2	P3
1	58	61	73	76
2	67	52	74	80
3	45	69	78	74
4	55	51	75	80
5	51	57	76	64
6	45	63	75	86

Oneway

Descriptives

Persentase Hidup Spermatozoa akibat penambahan Vit C

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	53.50	8.43	3.44	44.65	62.35	45	67
1	6	58.83	6.88	2.81	51.61	66.06	51	69
2	6	73.67	3.67	1.50	69.82	77.52	67	78
3	6	76.67	7.45	3.04	68.85	84.48	64	86
Total	24	65.67	11.82	2.41	60.67	70.66	45	86

ANOVA

Persentase Hidup Spermatozoa akibat penambahan Vit C

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2278.333	3	759.444	16.210	.000
Within Groups	937.000	20	46.850		
Total	3215.333	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase Hidup Spermatozoa akibat penambahan Vit C
Tukey HSD

(I) Penambahan Vitamin C	(J) Penambahan Vitamin C	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-5.33	3.95	.544	-16.39	5.73
	2	-20.17*	3.95	.000	-31.23	-9.11
	3	-23.17*	3.95	.000	-34.23	-12.11
1	0	5.33	3.95	.544	-5.73	16.39
	2	-14.83*	3.95	.006	-25.89	-3.77
	3	-17.83*	3.95	.001	-28.89	-6.77
2	0	20.17*	3.95	.000	9.11	31.23
	1	14.83*	3.95	.006	3.77	25.89
	3	-3.00	3.95	.872	-14.06	8.06
3	0	23.17*	3.95	.000	12.11	34.23
	1	17.83*	3.95	.001	6.77	28.89
	2	3.00	3.95	.872	-8.06	14.06

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

Homogeneous Subsets

Persentase Hidup Spermatozoa akibat penambahan Vit C

Tukey HSD^a

Penambahan Vitamin C	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
0	6	53.50	
1	6	58.83	
2	6		73.67
3	6		76.67
Sig.		.544	.872

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 7. Hasil Analisis Data Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Post Thawing

Data Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Post Thawing

Ulangan	P0	P1	P2	P3
1	40	55	60	60
2	60	40	60	65
3	40	60	70	60
4	35	40	60	70
5	30	40	55	45
6	30	50	60	70

Oneway

Descriptives

Persentase Motilitas Spermatozoa akibat penambahan Vit C

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	39.17	11.14	4.55	27.47	50.86	30	60
1	6	47.50	8.80	3.59	38.26	56.74	40	60
2	6	60.83	4.92	2.01	55.67	65.99	55	70
3	6	61.67	9.31	3.80	51.90	71.44	45	70
Total	24	52.29	12.68	2.59	46.94	57.65	30	70

ANOVA

Persentase Motilitas Spermatozoa akibat penambahan Vit C

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2136.458	3	712.153	9.116	.001
Within Groups	1562.500	20	78.125		
Total	3698.958	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase Motilitas Spermatozoa akibat penambahan Vit C

Tukey HSD

(I) Penambahan Vitamin C	(J) Penambahan Vitamin C	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	-8.33	5.10	.384	-22.62	5.95
	2	-21.67*	5.10	.002	-35.95	-7.38
	3	-22.50*	5.10	.001	-36.78	-8.22
1	0	8.33	5.10	.384	-5.95	22.62
	2	-13.33	5.10	.073	-27.62	.95
	3	-14.17	5.10	.052	-28.45	.12
2	0	21.67*	5.10	.002	7.38	35.95
	1	13.33	5.10	.073	-.95	27.62
	3	-.83	5.10	.998	-15.12	13.45
3	0	22.50*	5.10	.001	8.22	36.78
	1	14.17	5.10	.052	-.12	28.45
	2	.83	5.10	.998	-13.45	15.12

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

Homogeneous Subsets

Persentase Motilitas Spermatozoa akibat penambahan Vit C

Tukey HSD^a

Penambahan Vitamin C	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
0	6	39.17	
1	6	47.50	47.50
2	6		60.83
3	6		61.67
Sig.		.384	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.