

**SKRIPSI**

**PENAMBAHAN L-ARGININ DALAM PENGECER  
SUSU SKIM KUNING TELUR TERHADAP VIABILITAS  
DAN MOTILITAS SPERMATOZOA SAPI *LIMOUSIN*  
*POST THAWING* PADA SEMEN BEKU**



Oleh

**ISLAKHUL AILA**  
**NIM 061211132008**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

**PENAMBAHAN L-ARGININ DALAM PENGECER SUSU SKIM KUNING  
TELUR TERHADAP VIABILITAS DAN MOTILITAS SPERMATOZOA SAPI  
LIMOUSIN *POST THAWING* PADA SEMEN BEKU**

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

oleh  
**ISLAKHUL AILA**  
NIM 061211132008

Menyetujui  
Komisi Pembimbing,

**(Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L. drh., M.S.)**  
Pembimbing Utama

**(Dr. Erma Safitri, drh., M.Si.)**  
Pembimbing Serta

### PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Penambahan L-arginin pada Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin Post Thawing* Pada Semen Beku.**


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, 09 Februari 2016

METERAI  
TEMPEL

KECIBFADF795591568

6000  
RUBIAH

  
Islakhul Aila  
061211132008

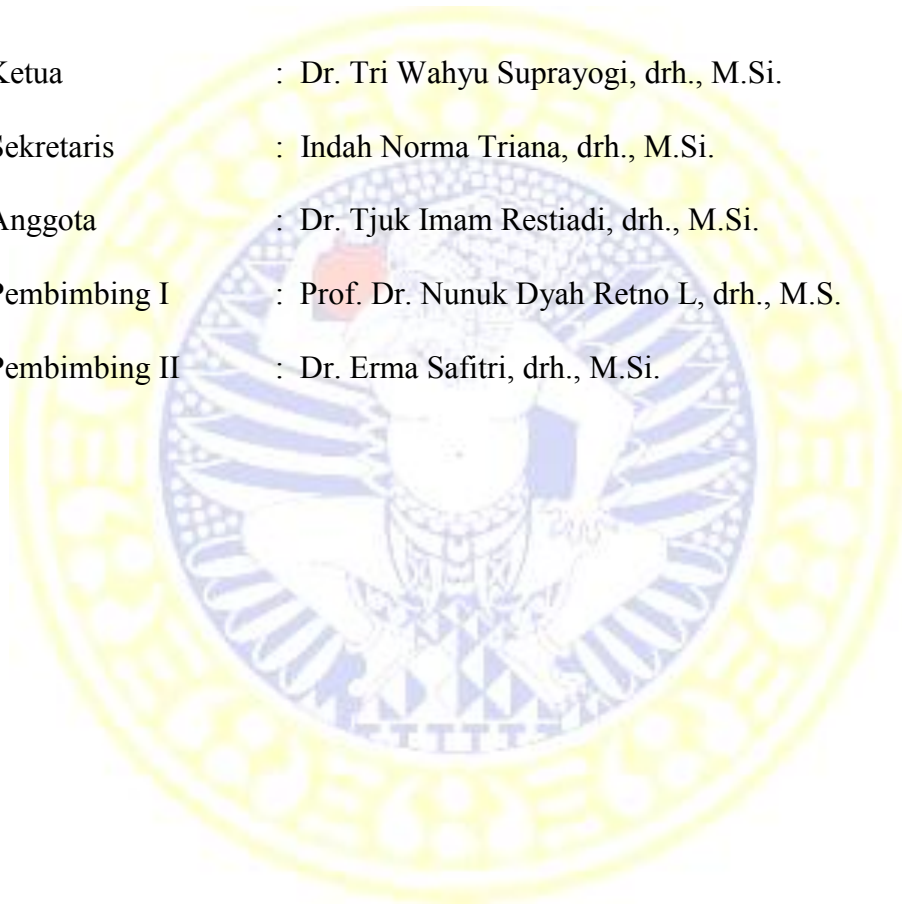
...

Telah dinilai pada seminar hasil penelitian

Tanggal: 26 Januari 2016

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

- Ketua : Dr. Tri Wahyu Suprayogi, drh., M.Si.  
Sekretaris : Indah Norma Triana, drh., M.Si.  
Anggota : Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si.  
Pembimbing I : Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L, drh., M.S.  
Pembimbing II : Dr. Erma Safitri, drh., M.Si.



Halaman Identitas

Telah diuji pada

Tanggal : 09 Februari 2016

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

Ketua : Dr. Tri Wahyu Suprayogi, drh., M.Si.  
Anggota : Indah Norma Triana, drh., M.Si.  
: Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si.  
: Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L, drh., M.S.  
: Dr. Erma Safitri, drh., M.Si.

Surabaya, 10 Februari 2016

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.

NIP. 195601051986011001

**ADDING L-ARGININ IN SKIM MILK-EGG YOLK EXTENDER OF VIABILITY AND MOTILITY LIMOUSIN BULL SPERM *POST THAWING'S* IN FROZEN SEMEN**

ISLAKHUL AILA

**ABSTRACT**

This research was aimed to determine of adding L-arginin in viability and motility limousin bull's sperm in post thawing examination in skim milk-egg yolk extender. This research used fresh samples of limousine bull's semen collected by using artificial vagina, then were devided into 4 treatments. The first treatment (P1) limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender and L-arginin 0,004 M, the second treatment (P2) limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender and L-arginin 0,005 M, the third treatment (P3) limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender and L-arginin 0,006 M and control treatment (P0) limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender without adding L-arginin. The experimental design that used was Complete Randomized Design (CRD). Analysis of the data using Analysis of Variant (ANOVA) One Way then proceed to the duncan to determine significant differences between treatments. Persentage viability showed significant differences between P3 to P0, P1 and P3, but P0 to P1 and P0 to P2 no real difference. Persentage motility showed significant differences between P3 to P0, P1 and P3, but between P0, P1 and P2, there no real difference. Results showed that adding L-arginin 0,006 M in skim milk-egg yolk extender as the best consentration to increase viability and motility limousin bull semen post thawing with significant ( $P < 0.05$ ) differences when compared with the control and consentration of L-arginin 0,004 and 0,005 M

**Key Words :** Motility, Viability, Limousin bull sperm, L-arginin, Skim milk-egg yolk extender.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur kehadirat Allah SWT atas nikmat dan karuniaNya yang diberikan, sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan bisa menyelesaikan makalah skripsi dengan judul **Penambahan L-arginin pada Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin Post Thawing* pada Semen Beku.**

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes. atas kesempatannya mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh., M.S selaku pembimbing pertama dan Dr. Erma Safitri, drh., M.Si selaku pembimbing ke dua atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini. Dr. Tri Wahyu Suprayogi, drh., M.Si selaku pembimbing penelitian sekaligus ketua penguji, Indah Norma Triana, drh., M.Si selaku sekretaris penguji dan Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh, M.Si selaku anggota penguji.

Dr. Tri Wahyu Suprayogi, drh., M.Si dan Trilas Sardjito, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing penelitian di lapangan atas segala arahan, bimbingan dan kesabaran selama penelitian. M. Gandul Atik Yuliati, drh., M.Kes selaku dosen wali atas bimbingan dan nasihat-nasihat yang membangun selama ini.

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

Kedua orangtua Kedua orang tua, Karyo Utomo dan Wasiati yang senantiasa memberikan nasehat, doa dan dukungan. Muhammad Naufal Taftazani yang juga selalu memberikan semangat dan dukungan.

Teman teman seperjuangan Cabelita, Mitha, Riza, Shelly, Wanda, Ainun, Sherly, Myrza, A'yuni, Faid, Bima, Bayu, Irfan, Bida dan April yang selalu menemani dan mendukung dari awal semester hingga saat ini, terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini. Teman-teman Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2012 dan semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan skripsi ini terima kasih atas kerjasama kalian.

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

Surabaya, Januari 2016

Penulis



## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL .....  | i       |
| HALAMAN PENGESAHAN .....                                       | ii      |
| HALAMAN PERNYATAAN .....                                       | iii     |
| HALAMAN IDENTITAS .....  | iv      |
| ABSTRACT .....   | vi      |
| UCAPAN TERIMA KASIH .....                                      | vii     |
| DAFTAR ISI .....   | ix      |
| DAFTAR TABEL .....   | xi      |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xii     |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xiii    |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xiv     |
| <br>   |         |
| BAB 1 PENDAHULUAN .....  | 1       |
| 1.1 Latar Belakang .....                                       | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                                      | 4       |
| 1.3 Landasan Teori .....                                       | 4       |
| 1.4 Tujuan Penelitian .....                                    | 7       |
| 1.5 Manfaat Hasil Penelitian .....                             | 7       |
| 1.6 Hipotesis .....  | 7       |
| <br>   |         |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....                                   | 8       |
| 2.1 L-arginin .....  | 8       |
| 2.1.1 Rumus Molekul L-arginin .....                            | 8       |
| 2.1.2 Mekanisme Kerja L-arginin .....                          | 9       |
| 2.2 Sapi Potong <i>Limousin</i> .....                          | 11      |
| 2.2.1 Karakteristik Sapi Potong <i>Limousin</i> .....          | 11      |
| 2.2.2 Klasifikasi Sapi Potong <i>Limousin</i> .....            | 12      |
| 2.3 Fisiologi Reproduksi Sapi Potong <i>Limousin</i> .....     | 13      |
| 2.4 Semen Sapi Potong <i>Limousin</i> .....                    | 13      |
| 2.4.1 Spermatozoa .....  | 13      |
| 2.4.2 Viabilitas Spermatozoa Sapi Potong <i>Limousin</i> ..... | 15      |
| 2.4.3 Motilitas Spermatozoa Sapi Potong <i>Limousin</i> .....  | 15      |
| 2.5 Pembuatan Semen Beku .....                                 | 17      |
| 2.6 Pengencer Semen Beku .....                                 | 18      |
| 2.6.1 Pengencer Susu Skim Kuning Telur .....                   | 19      |
| <br>   |         |
| BAB 3 MATERI DAN METODE .....                                  | 21      |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....                          | 21      |
| 3.2 Bahan dan Materi Penelitian .....                          | 21      |
| 3.2.1 Bahan Penelitian .....                                   | 21      |
| 3.2.2 Peralatan Penelitian .....                               | 21      |
| 3.3 Metode Penelitian .....                                    | 22      |

|  |    |
|--|----|
| 3.3.1 Penampungan Semen.....   | 22 |
| 3.3.2 Pembuatan Bahan Pengencer.....   | 22 |
| 3.3.2.1 Pengencer Susu Skim Kuning Telur.....  | 22 |
| 3.3.2.2 Pembuatan Semen Beku.....  | 22 |
| 3.4 Pengamatan Penelitian.....   | 23 |
| 3.4.1 Pemeriksaan Mikroskopis dan Makroskopis.....   | 23 |
| 3.4.2 Pemeriksaan Presentase Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> ..                                   | 24 |
| 3.4.3 Pemeriksaan Presentase Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> ..                                    | 24 |
| 3.5 Perlakuan Penelitian.....  | 25 |
| 3.6 Variabel Penelitian.....   | 25 |
| 3.6.1 Variabel Bebas.....  | 25 |
| 3.6.2 Variabel Tergantung.....   | 25 |
| 3.6.3 Variabel Kendali.....  | 25 |
| 3.7 Rancangan Penelitian.....  | 26 |
| 3.8 Analisis Data.....   | 26 |
| 3.9 Diagram Alur Penelitian.....   | 27 |
| <br>   |    |
| BAB 4 HASIL PENELITIAN.....  | 28 |
| 4.1 Pemeriksaan Awal Spermatozoa.....  | 28 |
| 4.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan<br><i>Post Thawing</i> .....                          | 29 |
| 4.3 Persentase Motilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan<br><i>Post Thawing</i> .....                           | 30 |
| 4.4 Perbandingan Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa<br>Spermatozoa Sapi <i>Limousin Post Thawing</i> ..... | 32 |
| <br>   |    |
| BAB 5 PEMBAHASAN.....  | 34 |
| 5.1 Pemeriksaan Awal Semen Sapi <i>Limousin</i> .....  | 34 |
| 5.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan<br><i>Post Thawing</i> .....                          | 35 |
| 5.3 Persentase Motilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan<br><i>Post Thawing</i> .....                           | 37 |
| 5.4 Perbandingan Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa<br>Spermatozoa Sapi <i>Limousin Post Thawing</i> ..... | 40 |
| <br>   |    |
| BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....  | 41 |
| 6.1 Kesimpulan.....  | 41 |
| 6.2 Saran.....   | 41 |
| <br>   |    |
| RINGKASAN.....   | 42 |
| <br>   |    |
| DAFTAR PUSATAKA.....   | 44 |
| <br>   |    |
| LAMPIRAN.....  | 47 |

## DAFTAR TABEL

| <b>Tabel</b>   | <b>Halaman</b> |
|--|----------------|
| 4.1. Hasil Pemeriksaan Semen Sapi <i>Limousin</i> secara Makroskopis .....                                   | 28             |
| 4.2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa<br>Sapi <i>Limousin Post Thawing</i> ..... | 29             |
| 4.3. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Spermatozoa<br>Sapi <i>Limousin Post Thawing</i> .....  | 31             |



## DAFTAR GAMBAR

|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Rumus Bangun L-arginin .....  | 9       |
| 2.2 Mekanisme Kerja L-arginin.....  | 10      |
| 2.3 Pejantan Sapi <i>Limousin</i> .....   | 13      |
| 4.1 Diagram Batang Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi<br><i>Limousin</i> pada Pemeriksaan <i>Post Thawing</i> .....                           | 29      |
| 4.2 Pemeriksaan Mikroskop Hidup-Mati Spermatozoa dengan Pembesaran<br>400 kali .....  | 30      |
| 4.3 Diagram Batang Presentase Motilitas Spermatozoa Sapi <i>Limousin</i> pada Pemeriksaan<br><i>Post Thawing</i> .....                            | 31      |
| 4.4 Diagram Garis Perbandingan Persentase Viabilitas dan Motilitas<br>Spermatozoa Sapi <i>Limousin</i> pada Pemeriksaan <i>Post Thawing</i> ..... | 32      |



## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran  | Halaman |
|---|---------|
| 1 Prosedur Penampungan Semen Sapi <i>Limousin</i> .....   | 47      |
| 2 Pemeriksaan Semen Segar .....                           | 48      |
| 3 Komposisi Bahan Pengencer Susu Skim Kuning Telur .....  | 51      |
| 4 Cara Membuat Preparat Ulas Spermatozoa .....            | 52      |
| 5 Prosedur Pemeriksaan <i>Post Thawing Motility</i> ..... | 53      |
| 6 Data Statistik .....                                    | 54      |
| 7 Foto Penelitian .....                                   | 57      |



**SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG**

|                 |   |
|-----------------|---|
| ANOVA           | = Analisis of variant                               |
| ATP             | = Adenosin Tri Phosphate                            |
| BNT             | = Beda Nyata Terkecil                               |
| CPE             | = Corona Penetrating Enzyme                         |
| CO <sub>2</sub> | = Karbon Dioksida                                   |
| Ditjennak       | = Direktorat Jendral Produksi Peternakan            |
| eNOS            | = endothelial Nitric Oxide Synthase                 |
| gr              | = Gram  |
| H               | = Hidrogen  |
| IB              | = Inseminasi Buatan                                 |
| iNOS            | = inducible Nitric Oxide Synthase                   |
| IUPAC           | = International Union of Pure and Applied Chemistry |
| Kg              | = Kilogram  |
| M               | = Molar   |
| ml              | = milliliter  |
| Mr              | = Massa Molar                                       |
| NaCl            | = Natrium Chlorida                                  |
| NADPH           | = Nicotinamide Adenine Dinucleo Phospate            |
| NH <sub>2</sub> | = Nitrogen Hidroksida                               |
| NO              | = Nitric Oxide                                      |
| NOS             | = Nitric Oxide Synthase                             |
| nNOS            | = neuron Nitric Oxide Synthase                      |
| pH              | = power of Hidrogen                                 |
| RAL             | = Rancangan Acak Lengkap                            |
| SD              | = Standart Deviasi                                  |
| %               | = Persen  |
| °C              | = Derajat Celcius                                   |

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Seiring waktu penduduk Indonesia yang semakin meningkat, maka semakin meningkat pula kesadaran masyarakat terhadap pentingnya protein hewani. Hal ini tentu saja meningkatkan kebutuhan akan daging sapi secara nasional (Dwiyanto, 2008). Namun demikian, permintaan daging sapi yang meningkat tidak diimbangi peningkatan produksi daging sapi dalam negeri sehingga ketersediaan daging sapi secara nasional masih kurang, oleh karena itulah pemerintah melakukan impor sapi dan daging sapi sebesar 35% dari kebutuhan daging sapi secara nasional (Ditjennak, 2010<sup>a</sup>). Di sisi lain, pemerintah berkeinginan menyediakan kebutuhan konsumsi daging dari produksi peternakan sapi dalam negeri secara mandiri. Untuk itu salah satu kebijakan penting pemerintah, melalui Kementerian Pertanian adalah berupa swasembada daging sapi berbasis sumber daya domestik (Ditjennak, 2010<sup>b</sup>).

Kebijakan swasembada daging sapi diharapkan mengurangi ketergantungan impor sampai 10%, sehingga mampu meningkatkan potensi sapi dalam negeri. Berbagai program dilakukan pemerintah untuk meningkatkan populasi sapi lokal sehingga menjadi sumber daging sapi yang utama antara lain : 1). Pengurangan pemotongan sapi lokal yang masih produktif dan 2). Memperluas jangkauan program kawin silang sapi betina lokal dengan inseminasi buatan (Ditjennak, 2010<sup>c</sup>).

Peningkatan reproduktivitas ternak sapi telah dilakukan melalui berbagai upaya, salah satunya adalah teknologi inseminasi buatan. Melalui teknologi inseminasi buatan akan dapat memperbaiki mutu genetik ternak sapi dengan cara membuat semen beku

yang berasal dari pejantan unggul. Inseminasi buatan merupakan suatu cara atau teknik memasukkan semen yang telah dicairkan dan telah diproses terlebih dahulu. Semen yang didapat berasal dari ternak jantan unggul yang bebas dari penyakit dan dimasukkan ke dalam saluran alat kelamin betina dengan menggunakan alat *insemination gun*. Teknologi Inseminasi buatan diharapkan mampu mengoptimalkan penggunaan semen karena semen dari seekor pejantan yang unggul dapat digunakan untuk membuahi sel telur pada banyak betina. Inseminasi buatan merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez, 2000).

Namun demikian, proses pembekuan dan pencairan semen beku dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa, sehingga menyebabkan kualitas dan daya fertilitas menurun, oleh karena itulah spermatozoa harus tetap terjaga kualitasnya agar dapat menembus sel telur sehingga fertilisasi dapat terjadi. Akrosom merupakan bagian penting yang terdapat pada kepala spermatozoa. Di bagian akrosom terdapat enzim spesifik yaitu *hyaluronidase*, *corona penetrating enzyme (CPE)*, dan akrosin (Hardijanto, 2010). Fertilisasi selalu melibatkan reaksi akrosom pada spermatozoa. Reaksi akrosom adalah reaksi pelepasan enzim-enzim dari akrosom untuk menembus lapisan-lapisan oosit dengan diinduksi oleh protein-protein zona. Reaksi akrosom hanya terjadi pada spermatozoa berkualitas dengan membran yang masih utuh pada saat penetrasi pada zona pelusida (Griveau *et al.*, 1995).

Standar minimal semen beku yang layak digunakan untuk inseminasi buatan adalah yang mempunyai motilitas 40 % dan kecepatan ++ (Susilowati dkk., 2010). Berbagai upaya untuk menjaga kualitas semen beku sampai saat ini terus dilakukan melalui penambahan berbagai zat ke dalam pengencer semen. L-arginin merupakan



salah satu zat tambahan yang bisa meningkatkan motilitas spermatozoa lebih tinggi dari standar yang ada. L-arginin adalah asam amino semi esensial yang berperan dalam sistem ketahanan tubuh berupa imunitas seluler dalam proses pembentukan spermatozoa. Senyawa ini dapat memblokir inhibitor glikolisis pada proses metabolisme sel sperma sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas metabolik hingga delapan kali lipat. Proses tersebut akan meningkatkan ketersediaan energi spermatozoa (Srivastava *et al.*, 2006).

Mekanisme lain dari L-arginin adalah meningkatkan produksi NO (Nitrogen Oksida). Nitrogen oksida adalah senyawa yang dapat melindungi sel sperma dari kerusakan membran yang diakibatkan oleh lipid peroksidase. Suatu penelitian mengemukakan bahwa pemberian L-arginin pada penderita oligospermia dan asthenospermia menunjukkan peningkatan viabilitas dan motilitas spermatozoa tanpa menimbulkan efek samping. Sebaliknya, kekurangan L-arginin dapat membuat metabolisme spermatozoa terganggu sehingga mengakibatkan penurunan motilitas dan gangguan pembentukan spermatozoa (Srivastava *et al.*, 2006)

Di pasaran Indonesia, sapi jenis *limousin* merupakan salah satu sapi primadona untuk penggemukan. Sapi *limousin* memiliki presentase karkas yang besar dan mudah beradaptasi di iklim tropis seperti negara Indonesia. Selain itu, karakteristik sapi *limousin* adalah penambahan badan yang cepat sekitar 1,1 kg perharinya, sehingga sangat cocok untuk penggemukan dan di ternakkan di Indonesia (Sugeng, 1998).

Perlu dilakukan penelitian dengan pemberian L-arginin sebagai upaya peningkatan persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa dari sapi *limousin*. Penelitian ini juga untuk menentukan konsentrasi L-arginin terbaik yang dapat

memberikan stimulasi terbaik pada spermatozoa sapi *limousin* melalui peningkatan kualitas spermatozoa, sehingga dalam jangka panjang bisa membantu mewujudkan swasembada daging dengan jalan peningkatan kualitas semen beku.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah penambahan L-arginin pada pengencer susu skim kuning telur dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing*?
2. Apakah penambahan L-arginin pada pengencer susu skim kuning telur dapat meningkatkan motilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing*?

## 1.3 Landasan Teori

Semen beku adalah semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku, yaitu  $-79^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan bahan *dry ice* seperti  $\text{CO}_2$  padat atau es kering, atau menggunakan nitrogen cair pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Kualitas semen beku akan menurun jika penyimpanan tidak ditambah dengan pengencer yang tepat (Hafez, 2000). Pengenceran semen ditujukan untuk meningkatkan volume semen dan sebagai upaya mempertahankan kesuburan meskipun semen disimpan dalam waktu yang lama. Bahan pengencer yang dipakai untuk semen beku antara lain kuning telur sitrat, air susu murni yang dimasak dan susu skim kuning telur.

Air mani yang dipakai untuk semen beku harus sesegar mungkin dengan kualitas yang baik. Dosis mani beku dari sapi harus mengandung minimal 10 juta spermatozoa hidup dan motil, sehingga sebelum dibekukan harus mengandung konsentrasi sebesar 25 juta spermatozoa yang hidup dan motil. Hal itu disebabkan

arena dalam proses pembekuan akan mengalami kematian sebesar antara 40 –60% (Susilowati dkk., 2010).

Proses *freezing* dan *thawing* semen beku dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa, sehingga mutu dan daya fertilitasnya akan menurun. Sebagai upaya untuk meningkatkan kualitas semen beku sapi *limousin*, dalam pengencer susu skim kuning telur perlu ditambahkan L-arginin. L-arginine adalah asam amino semi essensial yang berperan dalam sistem ketahanan tubuh berupa imunitas seluler dalam proses pembentukan spermatozoa. L-arginin berfungsi sebagai prekursor molekul NO (Nitrogen Oksida) yang menghasilkan sinyal antar sel untuk terjadinya metabolisme. Nitrogen oksida (NO) adalah senyawa yang dapat melindungi sel sperma dari kerusakan membran yang diakibatkan oleh lipid peroksidase. Konversi L-arginin menjadi NO dikatalisis oleh enzim NO sintase (NOS) yang terdapat di akrosom sel spermatozoa (Srivastava *et al.*, 2006). NO dapat meningkatkan atau menurunkan motilitas spermatozoa tergantung dari konsentrasinya. Enzim NOS dapat disintesa dari L-arginin menggunakan oksigen dan NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleo Phospate*). Enzim ini dapat ditemukan di akrosom dan daerah ekor dengan konsentrasi yang rendah (O'Flaherty *et al.*, 2004).

Mekanisme nitrogen oksida sesuai dengan mekanisme antioksidan dalam melindungi sel dari radikal bebas. Nitrogen oksida dapat menginaktivasi superoksida yang dihasilkan oleh spermatozoa selama proses metabolisme berlangsung. Keberadaan superoksida dalam jumlah berlebih akan menyebabkan peroksidase pada membrane fosfolipid spermatozoa. Hal tersebut menimbulkan kerusakan secara fungsional. L-arginin mampu mencegah peroksidase lipid pada

membrane spermatozoa melalui peningkatan produksi nitrogen oksida. L-arginin dapat menahan agen-agen yang mencegah pemecahan gula pada metabolisme spermatozoa. Mekanisme ini dapat memperbesar aktivitas metabolisme dan meningkatkan ketersediaan energi spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa dapat terjaga (Srivastava *et al.*, 2006).

Penambahan L-arginin dengan konsentrasi sebesar 0,005 M dalam proses semen beku pada sapi *friesian holstein* terbukti dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Penambahan L-arginin juga mampu menurunkan kematian, abnormalitas dan kerusakan akrosom spermatozoa (Al-Ebady *et al.*, 2012)

Perhitungan konsentrasi L-arginin menurut Nelson *and* Cox (2008) bisa dilakukan dengan perhitungan molaritas (M), sehingga didapatkan rumus sebagai berikut :

$$M = \frac{\text{gr zat terlarut}}{Mr} \times \frac{1000}{\text{ml larutan}}$$

Keterangan :

M = Molaritas  
 gr zat terlarut = Berat L-arginin yang dilarutkan dalam satuan gram  
 ml larutan = Volume pelarut dalam satuan mili liter  
 Mr = Massa molar L-arginin yaitu 174,2 g/mol

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Membuktikan bahwa penambahan L-arginin pada pengencer susu skim kuning telur dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing*.

2. Membuktikan bahwa penambahan L-arginin pada pengencer susu skim kuning telur dapat meningkatkan motilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing*.

### 1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pemanfaatan L-arginin sebagai upaya peningkatan viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin* sehingga didapatkan kualitas semen beku yang lebih baik dan pada akhirnya terjadi peningkatan *performance* reproduksi sapi *limousin*.

### 1.6 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini yaitu penambahan L-arginin pada pengencer susu skim kuning telur mampu meningkatkan viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing*.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 L-arginin

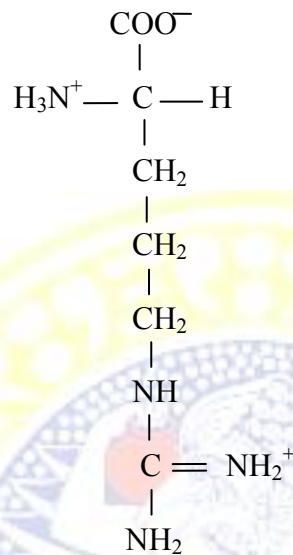
#### 2.1.1 Rumus Molekul L-arginin

Rumus molekul L-arginin adalah  $C_6H_{14}N_4O_2$ . Tata nama IUPAC dari senyawa ini adalah 2-amino-5-(diaminometilidin-amino) asam pentanoat. Massa molekul L-arginin adalah  $174,2g\ mol^{-1}$ . L-arginin termasuk asam amino semi essensial yang berperan dalam sistem ketahanan tubuh, imunitas seluler, dan proses pembentukan spermatozoa. L-arginin merupakan salah satu zat tambahan yang bisa mengurangi efek kerusakan spermatozoa akibat proses pembekuan dan pencairan semen beku (Al-Ebady *et al.*, 2012).

L-arginin termasuk asam amino alfa. Disebut asam amino alfa karena L-arginin terikat pada atom karbon pertama ( $C_2$ ) pada rantai molekulnya. Atom  $C_2$  merupakan atom C asimetrik, oleh karena itu asam amino alfa mempunyai stereoisomer D dan L. Cara sederhana untuk mengidentifikasi isomer ini dari gambaran dua dimensi adalah dengan mendorong atom H kebelakang pembaca (menjauhi pembaca). Jika hasilnya searah dengan perputaran jarum jam (ke kanan) terjadi urutan karboksil residu amina, maka ini tergolong isomer tipe D. Sebaliknya, jika berlawanan dengan arah jarum jam (ke kiri) maka termasuk isomer tipe L (Nelson *and* Cox, 2008)

Asam amino merupakan molekul organik yang memiliki struktur molekul  $H_2N-CH-R-COOH$ . Struktur asam amino secara umum adalah satu atom C yang mengikat empat gugus yaitu, gugus amina ( $NH_2$ ), gugus karboksil ( $COOH$ ), atom hidrogen (H), dan satu gugus R atau yang disebut sebagai rantai samping yang menjadi pembeda antar

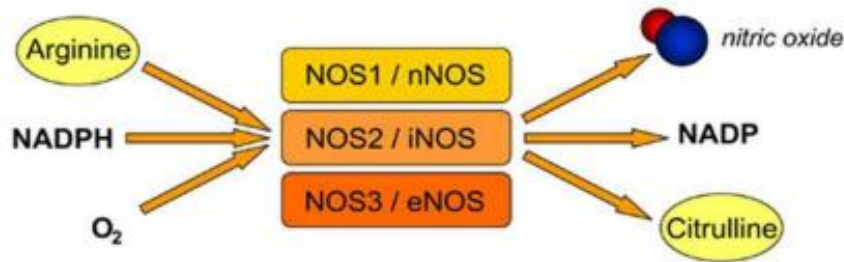
asam amino. Gugus R pada asam amino merupakan gugus alkil yang mengandung atau mengikat gugus lain. Asam amino termasuk senyawa yang bersifat amfoter karena bisa mengandung gugus asam atau gugus basa (Nelson *and* Cox, 2008).



Gambar 2.1 Rumus Bangun L-arginin (Nelson *and* Cox, 2008)

### 2.1.2 Mekanisme Kerja L-arginin

L-arginin diperlukan spermatozoa untuk menjaga kualitas spermatozoa terutama melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat peroksidasi lipid dengan meningkatkan produksi nitrogen oksida. Sebab, saat proses *freezing* dan *thawing* dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa, sehingga dibutuhkan zat tambahan seperti L-arginin agar daya fertilitasnya tidak menurun setelah pembekuan (Al-Ebady *et al.*, 2012). L-arginin berfungsi sebagai prekursor molekul NO (Nitrogen Oksida) yang menghasilkan sinyal antar sel untuk terjadinya metabolisme. Konversi L-arginin menjadi NO dikatalisis oleh enzim nitrogen oksida sintase (NOS) yang terdapat di akrosom sel spermatozoa (Srivastava *et al.*, 2006).



Gambar 2.2 Mekanisme Kerja L-arginin (Nelson *and* Cox, 2008)

Nitrogen oksida adalah senyawa yang berumur pendek dan berupa molekul gas. Nitrogen oksida diproduksi oleh inducible nitrogen oksida sintase (iNOS). Enzim NOS dapat disintesa dari L-arginin menggunakan oksigen dan NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleo Phosphate*). Nitrogen oksida dapat dengan mudah berdifusi bebas melintasi membran sel yang berada di dekatnya untuk mengikat radikal bebas (Nelson *and* Cox, 2008).

Mekanisme nitrogen oksida ini sama dengan mekanisme antioksidan yang dapat melindungi sel dari radikal bebas. Nitrogen oksida menginaktivasi superoksida yang dihasilkan oleh spermatozoa selama proses metabolisme. Keberadaan superoksida dalam jumlah berlebih akan menyebabkan peroksidase pada membrane fosfolipid spermatozoa sehingga menimbulkan kerusakan secara fungsional (Srivastava *et al.*, 2006).

Peroksidasi lipid pada membrane spermatozoa dapat dicegah oleh asam amino arginin dengan meningkatkan produksi nitrogen oksida. Asam amino arginin dapat memblok dan menahan agen-agen yang mencegah pemecahan glukosa pada spermatozoa. Faktor ini dapat memperbesar aktivitas metabolisme dan meningkatkan ketersediaan energi spermatozoa. Penambahan eksogen NO juga dapat meningkatkan



fosforilasi protein sehingga bisa meningkatkan motilitas spermatozoa (O'Flaherty *et al.*, 2004).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sel dari bahaya radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital teluarnya. Untuk mencapai kestabilan radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung secara terus menerus di dalam sel, sehingga apabila dibiarkan terus menerus akan menimbulkan kerusakan dan kematian sel. Antioksidan bekerja dengan memberikan elektron pada radikal bebas, sehingga senyawa menjadi stabil dan dapat mencegah radikal bebas (Nelson *and* Cox, 2008).

## **2.2 Sapi *Limousin***

### **2.2.1 Karakteristik Sapi *Limousin***

Sapi *limousine* adalah keturunan sapi Eropa yang berkembang di Perancis, tepatnya di daerah Limousin dan Marche. Sapi *limousin* (*Bos Taurus*) termasuk tipe sapi pedaging. Karakteristik sapi *limousin* adalah penambahan badan yang cepat sekitar 1,1 kg perharinya. Bobot sapi betina dewasa dapat mencapai 575 kg dan pejantan dewasa dapat mencapai berat 1100 kg. Sapi *limousin* mempunyai ukuran tubuh yang besar dan panjang, tingginya mencapai 1,5 meter, berbulu tebal yang menutupi seluruh tubuh. Warna bulu merah cokelat, namun pada sekeliling mata dan kaki berwarna agak terang. Tanduk pada sapi jantan tumbuh mengarah keluar dan agak melengkung, tubuh berukuran besar dan mempunyai tingkat produksi yang baik (Sugeng, 1998).

Angka fertilitas sapi *limousin* betina cukup tinggi, mudah melahirkan, mampu menyusui dan mengasuh anak dengan baik. Secara genetik, sapi *limousin* adalah sapi yang berasal dari wilayah beriklim dingin, dengan bentuk tubuh besar, panjang, padat dan kompak. Sapi *limousin* mempunyai volume rumen yang besar, *voluntary intake* (kemampuan menambah konsumsi di luar kebutuhan yang sebenarnya) yang tinggi, dan *metabolic rate* yang cepat. Di pasaran Indonesia, sapi jenis *limousin* merupakan salah satu sapi primadona untuk penggemukan (Sugeng, 1998)

### 2.2.2 Klasifikasi Sapi *Limousin*

Taksonomi sapi *limousin* adalah :

Kingdom : Animalia  
Sub Kingdom : Metazoo  
Phylum : Chordata  
Sub Phylum : Vertebrata  
Kelas : Mammalia  
Ordo : Artioactyla  
Sub Ordo : Ruminansia  
Familia : Bovidae  
Genus : Bos  
Spesies : *Bos taurus*



Gambar 2.3 Pejantan Sapi *Limousin*  
(Sumber : Koleksi Pribadi, 2015)

### 2.3 Fisiologi Reproduksi Sapi *Limousin*

Susunan anatomi alat kelamin pada sapi *limousin* jantan terdiri dari : 1). Alat kelamin utama yaitu gonad atau testes, 2). Saluran alat kelamin yang terdiri dari epididimis, vas deferens, ampula dan urethra, juga didukung kelenjar asesoris yaitu vesikularis, prostata dan bulbourethralis, 3). Alat kelamin luar yaitu penis, prepuarium dan srotum (Ismudiono dkk., 2010).

Penis sapi *limousin* masuk ke dalam tipe fibro elastis. Pada penis tipe ini, selalu dalam keadaan agak kaku dan kenyal walaupun dalam keadaan tidak ereksi. Terdapat lengkungan menyerupai huruf S di belakang skrotum penis yang disebut flexura sigmoideus. Saat ereksi berlangsung penis akan menegang, sehingga flexura sigmoideus akan menjadi lurus (Feradis, 2010).

### 2.4 Semen Sapi *Limousin*

#### 2.4.1 Spermatozoa

Sel sperma adalah sel yang unik dengan dua bagian utama yaitu kepala dan ekor yang berperan penting dalam proses pembuahan. Ekor sperma berfungsi untuk

pergerakan sperma sedangkan kepala berfungsi pada reaksi akrosom dan fusi membran (Garner dan Hafez, 2000). Ukuran dan bentuk spermatozoa pada berbagai jenis hewan berbeda, namun tetap memiliki struktur morfologi yang sama. Sel sperma dihasilkan di dalam tubulus seminiferus testis, oleh sel yang berasal dari germinal epithelium yang disebut spermatogonium dan bersifat spermatogenik (Poernomo dkk., 2005).

Secara umum, spermatozoa terdiri dari 3 bagian yaitu kepala, leher dan ekor. Bagian kepala terdiri dari inti dan akrosom. Akrosom dilindungi oleh sebuah lapisan tipis dan transparan yang disebut *galea capitis*. Lapisan ini berperan penting dalam proses fertilisasi. Leher spermatozoa mempunyai panjang sekitar 0,5 mikron. Ekor spermatozoa berbentuk seperti cambuk, berfungsi untuk mendorong spermatozoa agar bisa bergerak maju (Feradis, 2010).

Spermatozoa mempunyai kemampuan pada proses fertilisasi, sehingga mempunyai fungsi kapasitasi, migrasi, pengikatan, penetrasi dan fusi dengan oosit. Proses fertilisasi tercapai bila spermatozoa dapat menembus tiga lapisan sel telur. Tiga lapisan itu yakni kumulus oophorus, korona radiata, dan zona pelusida (Hardijanto dkk., 2010).

Sapi jantan normal menghasilkan 12 – 17 juta spermatozoa per gram testis per harinya. Hal itu disebabkan karena waktu spermatogenesis yang relatif singkat dan banyaknya spermatozoa yang dihasilkan oleh sel spermatogonia. Jumlah spermatozoa mempunyai korelasi yang erat dengan berat dan ukuran testis (Feradis, 2010).

Sapi jantan dalam satu kali ejakulasi mengandung semen dengan volume 6 – 10 ml dengan konsentrasi 1000 – 2000 juta spermatozoa. Setiap ml semen mengandung

$1,8 \times 10^9$  spermatozoa dengan morfologi normal antara 70 – 95 % (Garner and Hafez, 2000).

#### 2.4.2 Viabilitas Spermatozoa Sapi *Limousin*

Salah satu indikator penting lainnya dalam menentukan kualitas semen selain motilitas adalah pemeriksaan hidup spermatozoa (viabilitas). Besarnya presentase hidup spermatozoa menunjukkan tingginya daya hidup spermatozoa.

Pemeriksaan presentase spermatozoa hidup dan mati menggunakan zat warna eosin negrosin. Spermatozoa yang tidak menyerap zat warna dinyatakan spermatozoa yang hidup. Sebaliknya, spermatozoa yang menyerap zat warna eosin negrosin dinyatakan sebagai spermatozoa yang mati. Spermatozoa hidup memiliki membran yang baik sehingga zat warna akan kesulitan menembus membran spermatozoa, hal tersebut membuat spermatozoa tetap berwarna jernih (Susilowati dkk., 2010).

Penentuan presentase spermatozoa hidup dapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

#### 2.4.3 Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin*

Motilitas adalah gerakan spermatozoa maju ke depan secara progresif. Penilaian terhadap motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara subyektif (visual) yakni dengan membandingkan jumlah spermatozoa yang bergerak progresif dengan dengan yang tidak bergerak secara progresif pada pemeriksaan dengan mikroskop dan dinyatakan dalam persen. Gerakan progresif inilah yang mempunyai peran penting dalam keberhasilan fertilisasi (Kostaman dan Sutana, 2006).

Kecepatan bergerak spermatozoa dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan suhu. Jika dalam lingkungan dan suhu yang optimal, spermatozoa memiliki performans yang bagus. Pada suhu 37°C kecepatannya mencapai 100 mikron perdetik dalam inseminasi buatan. Pergerakan spermatozoa bisa dijadikan sebagai indikator spermatozoa dalam kemampuannya membuahi sel telur (Poernomo dkk., 2005).

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa yang motil pada beberapa lapangan pandang. Data yang diperoleh kemudian di rata – rata. Kecepatan gerak spermatozoa terbagi menjadi 5 tingkatan yaitu : angka 0 bila tidak ada spermatozoa yang bergerak/sedikit, angka 1 bila gerakan spermatozoa pelan/lambat, angka 2 bila gerakan spermatozoa sedang, angka 3 bila gerakan spermatozoa cepat, angka 4 bila gerakan spermatozoa sangat cepat. Sedangkan arah gerak spermatozoa terbagi menjadi 5 golongan yaitu : Gerakan maju/progresif (P), gerakan berputar/*oscilatory* (O), gerakan melingkar/*circular* (C), gerakan mundur/reserve (R), tidak ada gerakan/nekrospermia (N) (Susilowati dkk., 2010).

Penentuan presentase motilitas spermatozoa dapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ motilitas spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa progresif}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

## 2.5 Pembuatan Semen Beku

Dalam proses pembuatan semen beku terdapat berbagai tahapan, diantaranya Gliserolisasi, *equilibrasi*, *filling*, *sealing*, *pre freezing* dan *freezing*. Gliserolisasi adalah proses penambahan gliserol pada air mani secara bertahap dan perlahan-lahan dengan konsentrasi tertentu pada suhu 5°C selama 1 jam (Susilawati dkk, 2010).

Penambahan gliserol ke dalam semen dan cairan pengencer dapat memperendah titik beku cairan. Hal ini berfungsi untuk mencegah terjadinya kristal-kristal es dan menghindari tertimbunnya elektrolit intraseluler di dalam spermatozoa. Daya pembuahan dapat dipertahankan dengan menghambat secara fisis dan kimiawi semua aktivitas hidup, kecuali yang minimal dibutuhkan oleh sel. Proses metabolisme spermatozoa dapat ditekan dengan penurunan suhu dan proses tersebut mudah dipulihkan kembali dengan mengembalikannya pada suhu normal (*thawing*), karena sifat-sifat tersebut maka pengendalian suhu merupakan perlakuan yang sering digunakan untuk mengawetkan spermatozoa pada saat sekarang ini (Feradis, 2010).

*Equilibrasi* adalah waktu yang digunakan spermatozoa untuk beradaptasi dalam menyeimbangkan cairan intraseluler dengan lingkungan yang baru (diluter yang mengandung gliserol) pada suhu 5°C selama 2-6 jam. *Filling* adalah proses pengisian semen yang sudah diencerkan ke dalam *straw* sebanyak 0,25ml/*straw*. Proses selanjutnya adalah *sealing* atau penyegelan *straw*, agar isi semen tidak tumpah saat di simpan dalam *container* (Susilawati dkk, 2010).

Proses *pre freezing* dimulai dengan memasukkan *straw* ke dalam *canister*. *Canister* dimasukkan ke dalam *container* sampai dasar *canister* menyentuh permukaan nitrogen cair selama 3 menit. Proses itu akan membuat nitrogen cair mengeluarkan asapnya. Tenggelamkan *canister* ke dalam nitrogen cair yang menandakan dimulailah proses pembekuan (*freezing*). Kecepatan penurunan suhu dari 5°C sampai -15°C adalah 45°C/menit. Sedangkan kecepatan penurunan suhu dari -15°C sampai -196°C adalah 65°C/menit, sehingga proses pembekuan hingga tercapai suhu -196°C membutuhkan waktu tidak lebih dari 3 menit (Hardijanto dkk., 2010).

Keunggulan semen beku yaitu semen dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama, namun kelemahannya yaitu kualitas semen setelah pembekuan dapat menurun. Penurunan kualitas yang tinggi sekitar 50% sperma akan mati selama pembekuan. Sedangkan sperma yang bisa bertahan hidup umumnya mempunyai fertilitas yang rendah. Hal ini terjadi karena selama proses pembekuan dan *thawing*, sperma melewati berbagai perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim dan memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS) ( Lessard *et al.*, 2000).

## 2.6 Pengencer Semen Beku

Setelah tahap penampungan semen, maka semen perlu diencerkan dengan bahan pengencer sebelum pembekuan semen. Hal tersebut ditujukan agar kualitas semen dapat terjaga. Syarat penting yang harus dimiliki setiap pengencer adalah mempunyai daya preservasi tinggi, mengandung unsur dan sifat kimiawi yang hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat yang bersifat racun bagi spermatozoa dan saluran kelamin betina, tetap dapat mempertahankan daya fertilitas spermatozoa, tidak terlalu kental sehingga tidak menghambat fertilisasi (Susilawati, 2011).

Proses pembekuan dan pencairan semen beku dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa, sehingga mutu dan daya fertilitasnya akan menurun. *Cold shock* dan *reactive oxygen spesies* (ROS) merupakan beberapa contoh efek saat pengolahan semen beku. *Cold shock* menyebabkan perubahan susunan membran lipid akibat terjadinya perubahan fluiditas membran. Oleh karena itu di dalam pengencer semen beku perlu ditambahkan bahan lain sebagai pelindung ekstraseluler selama penyimpanan semen tersebut (Hafez, 2000).



### 2.6.1 Pengencer Susu Skim Kuning telur

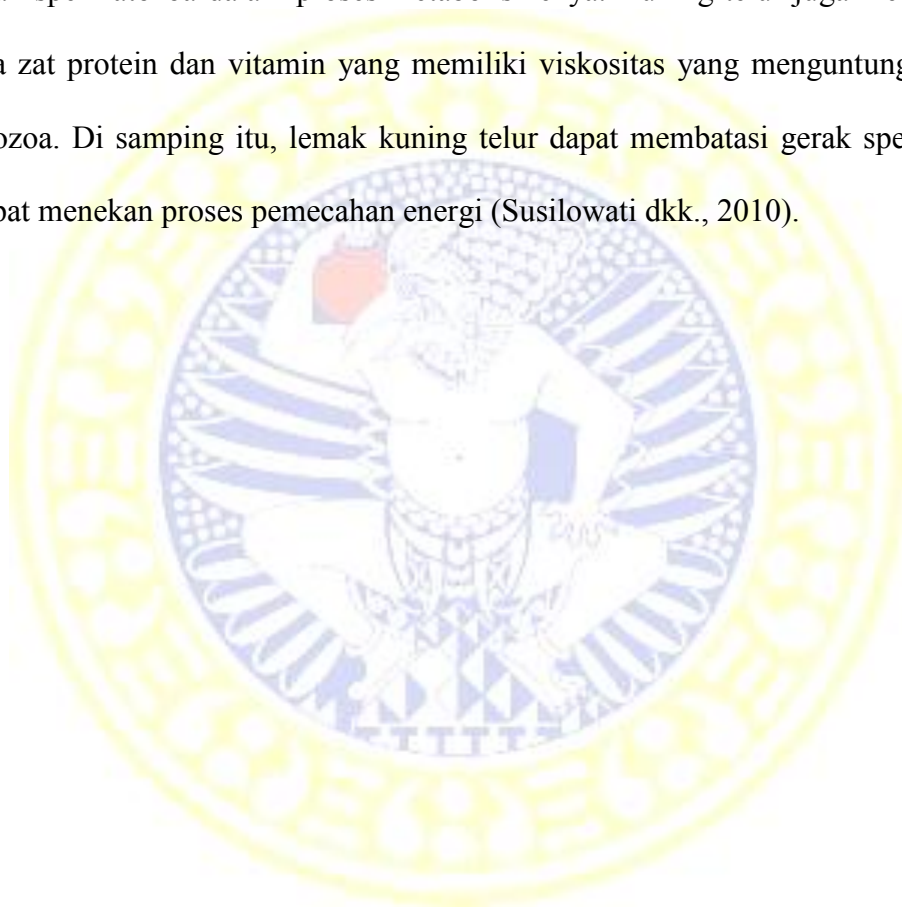
Menurut definisinya, susu skim merupakan susu yang tidak mengandung lemak. Susu skim mengandung semua kandungan yang dimiliki susu pada umumnya kecuali lemak dan vitamin yang larut dalam lemak. Kandungan lemak pada susu skim kurang lebih hanya sebanyak 1%. Pengencer susu mengandung lesitin untuk melindungi spermatozoa terhadap cekaman dingin selama proses pembekuan. Susu skim lebih disukai karena mempunyai sedikit butir-butir lemak yang bisa menghambat pergerakan spermatozoa (Feradis, 2010).

Susu skim dibuat dengan cara memasak susu murni. Setelah mendidih, bagian atas yang berbentuk krim diambil dengan teknik penyendokan (*skimming*). Susu yang tersisa disebut dengan susu skim sedangkan proses pembuatannya disebut *skimming* (Saleh, 2004). Pemanasan susu di atas 80°C akan melepaskan gugus sulfhydryl (-SH) sebagai zat reduktif yang dapat menetralkan pengaruh toksik laktenin. Di samping itu, pemanasan susu ditujukan untuk mematikan mikroorganisme. Pada pemakaian susu skim perbandingan pemakaian susu skim berkisar antara 8 -10% dari jumlah pelarut (Susilowati dkk., 2010)

Salah satu upaya untuk memperoleh semen dengan kualitas baik, diperlukan medium pengencer yang mampu memberikan nutrisi optimum bagi spermatozoa. Bahan yang dapat ditambahkan dalam pengencer antara lain protein lemak yang terdapat dalam kuning telur (Ihsan, 2011). Kuning telur merupakan salah satu bahan pengencer semen yang sudah lazim digunakan. Kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein untuk

melindungi spermatozoa dari *cold shock* saat pembekuan. Kuning telur terbukti dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa sapi (Moce *and* Graham, 2006).

Kuning telur mengandung komposisi nutrisi yang lengkap yaitu, air 48%, protein 16,6%, lemak 32,6%, karbohidrat 1,0% dan mineral 1,1%. Karbohidrat dari kuning telur berupa glukosa, galaktosa dan manosa yang menghasilkan energi untuk digunakan spermatozoa dalam proses metabolismenya. Kuning telur juga mengandung beberapa zat protein dan vitamin yang memiliki viskositas yang menguntungkan bagi spermatozoa. Di samping itu, lemak kuning telur dapat membatasi gerak spermatozoa yang dapat menekan proses pemecahan energi (Susilowati dkk., 2010).



## BAB 3 MATERI DAN METODE

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian dilaksanakan pada bulan September – November 2015.

### 3.2 Bahan dan Materi Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi : semen sapi *limousin* segar, pengencer semen (susu skim kuning telur, aquabides, *streptomysin*, penisilin), pewarna eosin-negrosin, NaCl 3%, L-arginin, nitrogen cair, vaselin, alkohol 70%, dan aquabidest).

#### 3.2.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: satu set vagina buatan sapi, kontainer, mikroskop, termometer, termos, gelas obyek dan penutup, tabung *eppendorf*, labu erlenmeyer, *beaker glass*, *hand tally counter*, gelas ukur, timbangan analitik, lemari es, pengaduk, kertas saring, kertas lakmus, pipet hisap, pipet ukur, dan tabung reaksi.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Penampungan Semen

Sapi yang akan diambil semennya adalah sapi *limousin* dewasa yang sehat. Pengambilan semen sapi dilakukan di *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Semua prosedur koleksi dan evaluasi semen dilakukan secara legartis. Pengambilan semen dilakukan sebanyak 2 kali dalam seminggu. Prosedur penampungan semen domba terdapat pada lampiran 1.

#### 3.3.2 Pembuatan Bahan Pengencer

##### 3.3.2.1 Pengencer Susu Skim Kuning Telur

Pengencer susu skim kuning telur dibuat dengan cara membuat 2 macam diluter yaitu A dan B. diluter A terdiri dari susu skim 10%, kuning Telur 5%, fruktosa 1%, vitamin C 20 mg/100 ml, antibiotika *streptomycin* 1 mg/ml, antibiotika *penicyllin* 1000 IU/ml, L-arginin, semen sapi *limousin* segar yang telah memenuhi syarat, dicampur dengan perbandingan 1 : 10. Sedangkan diluter B terdiri dari glukosa 2%, diluter A + gliserol sebanyak 16% dari total volume larutan.

##### 3.3.2.2 Pembuatan Semen Beku

Masukkan diluter A dan B ke dalam *cool top* sampai suhu 3 – 5 °C. Lakukanlah proses gliserolisasi dalam suhu 5°C selama 1 jam. Gliserolisasi adalah proses penambahan gliserol pada air mani secara bertahap dan perlahan-lahan dengan konsentrasi tertentu pada suhu 5°C selama 1 jam untuk mencegah terjadinya kristal-kristal es dan menghindari tertimbunnya elektrolit intraseluler di dalam spermatozoa. Dilanjutkan proses *equilibrasi* pada suhu 5°C selama 1 jam. *Equilibrasi* adalah waktu

yang digunakan spermatozoa untuk beradaptasi dalam menyeimbangkan cairan intraseluler dengan lingkungan yang baru (diluter yang mengandung gliserol).

Proses selanjutnya adalah pemeriksaan *pre freezing*, meliputi pemeriksaan viabilitas dan motilitas. Kemudian dilakukan pengisian semen yang sudah diencerkan (*filling*) ke dalam *straw* sebanyak 0,25ml/*straw*. Dilanjutkan dengan *sealing* atau penyegelan *straw*, agar isi semen tidak tumpah saat di simpan dalam *container*. *Straw* yang telah disegel, kemudian dibekukan dalam N<sub>2</sub> cair pada suhu -196°C.

### **3.4 Pengamatan Penelitian**

#### **3.4.1 Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis**

Semen segar yang telah ditampung harus segera diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis dilakukan dengan melihat dan mencatat volume semen yang didapat, warna semen (susu, krem dan kuning), kekentalan semen (encer, sedang dan kental), bau semen, derajat keasaman/pH (rata-rata pH = 6 - 7).

Pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, motilitas, kecepatan dan konsentrasi spermatozoa. Pada pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokular untuk melihat gerakan massa spermatozoa (gerakan massa minimal ++ ) dan motilitas spermatozoa (minimal 70% spermatozoa bergerak aktif ke depan). Sedangkan untuk pemeriksaan konsentrasi spermatozoa digunakan alat spektrofotometer. Hasil pemeriksaan menggunakan spektrofotometer berupa print out yang berisi data mengenai kondisi spermatozoa.

#### **3.4.2 Pemeriksaan Persentase Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing***

Jumlah spermatozoa yang hidup dihitung dengan cara meneteskan setetes kecil semen yang telah diencerkan pada objek glass yang bersih lalu dicampur dengan setetes besar zat warna *eosin negrosin*. Buat preparat ulas dengan cara slide dan kemudian difiksasi diatas api. Pengamatan spermatozoa yang hidup dan mati dilakukan dengan perhitungan minimal 100 spermatozoa dengan perbesaran 400x. Pada spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna, sehingga tidak terwarnai. Sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna, sehingga akan terwarnai (Susilowati dkk., 2010).

### **3.4.3 Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa *Post Thawing***

Motilitas spermatozoa diperiksa dengan cara menempatkan satu tetes semen yang telah diencerkan pada gelas objek yang ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 atau 400 kali (Susilowati dkk., 2010).

Penilaian dilakukan berdasarkan kecepatan gerak spermatozoa dan arah gerak spermatozoa tersebut. Dalam penelitian ini spermatozoa yang dinyatakan memenuhi syarat dan layak untuk dibekukan adalah spermatozoa yang bergerak maju (progresif) dengan kecepatan minimal 3 (Susilowati dkk., 2010).

### **3.5 Perlakuan Penelitian**

Dalam penelitian ini ada 4 perlakuan yang dibandingkan dengan kontrol, yaitu :

- a) Perlakuan kontrol (P0) : Semen sapi *limousin* + pengencer susu skim kuning telur, tanpa penambahan L-arginin
- b) Perlakuan 1 (P1) : Semen sapi *limousin* + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,004 M.

- c) Perlakuan 2 (P2) : Semen sapi *limousin* + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,005 M.
- d) Perlakuan 3 (P3) : Semen sapi *limousin* + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,006 M.

### 3.6 Variabel Penelitian

#### 3.6.1 Variabel bebas (Independent Variabel)

Variabel bebas yang diamati adalah dosis L-arginin terhadap semen sapi *limousin*.

#### 3.6.2 Variabel Tergantung (Dependent Variabel)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah presentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing* setelah penambahan L-arginin.

#### 3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali meliputi spesies hewan, jenis kelamin, umur pejantan, suhu ruang percobaan, cara pengambilan semen, bahan pengencer, proses pengolahan dan pembekuan semen.

### 3.7 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian ini akan diberikan tiga perlakuan yang dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan 1 (P1) semen sapi dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,004 M, Perlakuan 2 (P2) semen sapi dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,005 M,

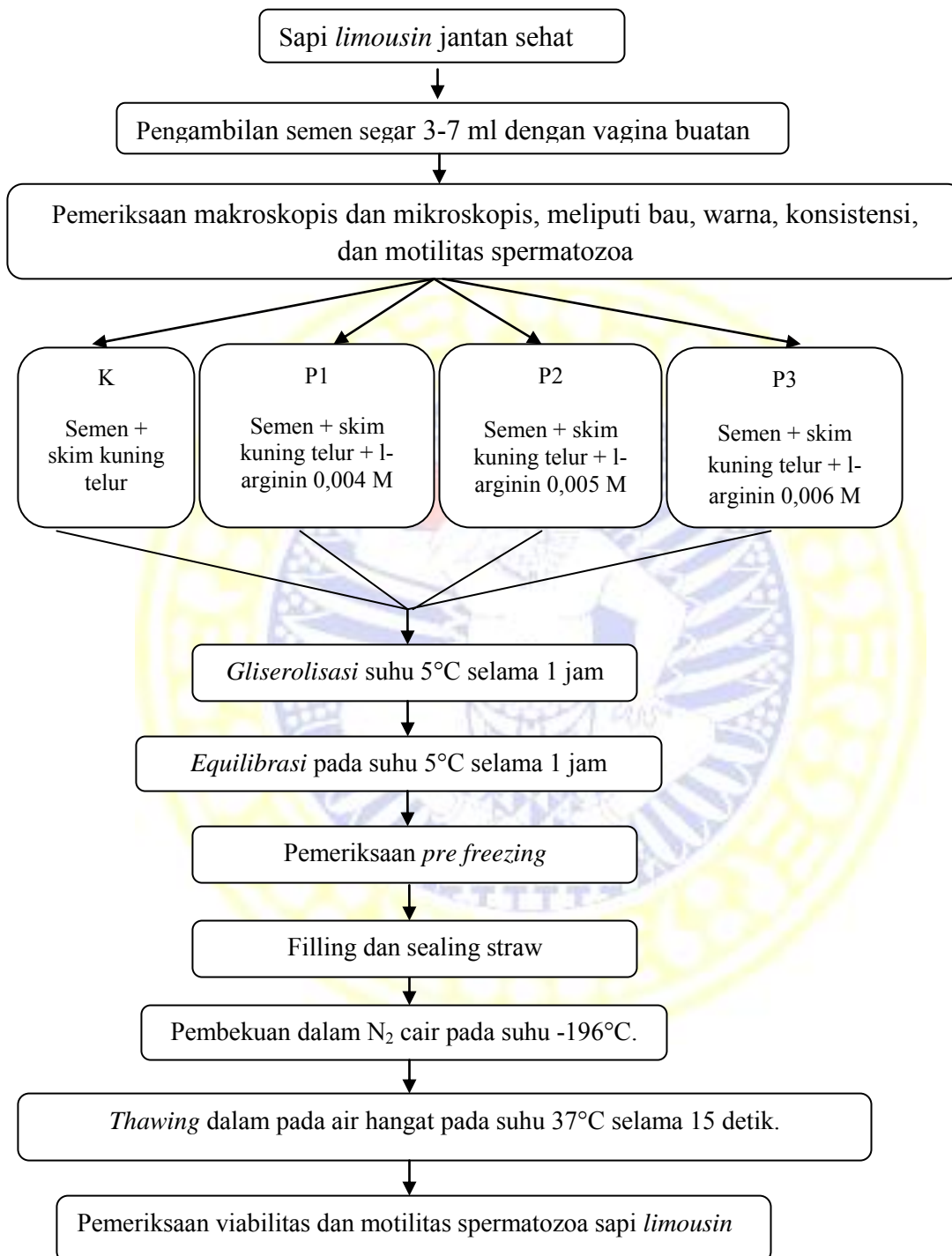
Perlakuan 3 (P3) semen sapi dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,006 M yang dibandingkan dengan kontrol (P0) semen sapi dengan pengencer susu skim kuning telur tanpa penambahan L-arginin. Pada penelitian ini, tiap perlakuan diberikan 6 ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan perhitungan  $t(n-1) \geq 15$ , t adalah perlakuan dan n adalah ulangan (Kusriningrum, 2008).

### 3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya perbedaan motilitas dan viabilitas dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variant (ANOVA) One Way* kemudian dilanjutkan dengan uji jarak Duncan untuk mengetahui perbedaan yang nyata antar perlakuan (Kusriningrum, 2008).



### 3.9 Diagram Alur Penelitian



## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Pemeriksaan Awal Spermatozoa

Setelah pengambilan semen sapi *limousin*, dilakukan pemeriksaan dan evaluasi semen. Pemeriksaan semen dilakukan di laboratorium baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Pemeriksaan penting dilakukan untuk mengetahui semen sapi *limousin* tersebut layak atau tidak untuk diencerkan dan diproses lebih lanjut. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan volume, konsistensi, bau, warna, dan derajat keasaman semen. Sedangkan untuk pemeriksaan mikroskopis semen meliputi gerakan massa, gerakan individu, motilitas, kecepatan dan konsentrasi spermatozoa (Susilowati dkk., 2010).

Hasil pemeriksaan semen sapi *limousin* sebelum perlakuan secara makroskopis dan mikroskopis terlihat pada tabel 4.1:

Tabel 4.1. Hasil Pemeriksaan Semen Sapi *Limousin* secara Makroskopis

| n | Vol (ml) | K      | Bau  | Warna | pH  | Kt (juta/ml) | GM  | GI   |
|---|----------|--------|------|-------|-----|--------------|-----|------|
| 1 | 12,2     | Kental | Khas | Putih | 6-7 | 1035         | ++  | 80/3 |
| 2 | 7,5      | Kental | Khas | Putih | 6-7 | 951          | +++ | 85/3 |
| 3 | 8,3      | Sedang | Khas | Putih | 6-7 | 912          | ++  | 75/3 |
| 4 | 7,7      | Sedang | Khas | Putih | 6-7 | 981          | ++  | 85/3 |
| 5 | 8,5      | Kental | Khas | Putih | 6-7 | 1036         | ++  | 80/3 |
| 6 | 6        | Kental | Khas | Putih | 6-7 | 1283         | +++ | 85/3 |

Keterangan Tabel 4.1 :

- n = Ulangan
- Vol = Volume
- K = Konsistensi
- pH = Derajat Keasaman
- Kt = Konsentrasi
- GM = Gerakan Massa
- GI = Gerakan Individu

#### 4.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Data persentase viabilitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* setelah diberi perlakuan berbagai macam konsentrasi pengencer dengan empat perlakuan yang tercantum dalam tabel 4.2.

Tabel 4.2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa Sapi *Limousin* pada Pemeriksaan *Post Thawing*

| Perlakuan | Ulangan (n) | Viabilitas Spermatozoa (%)<br>(rerata ± standar deviasi) |
|-----------|-------------|--|
| P0        | 6           | 44,26 <sup>bc</sup> ± 2,105                              |
| P1        | 6           | 41,87 <sup>c</sup> ± 2,567                               |
| P2        | 6           | 45,80 <sup>b</sup> ± 2,616                               |
| P3        | 6           | 52,41 <sup>a</sup> ± 3,107                               |

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

Keterangan :

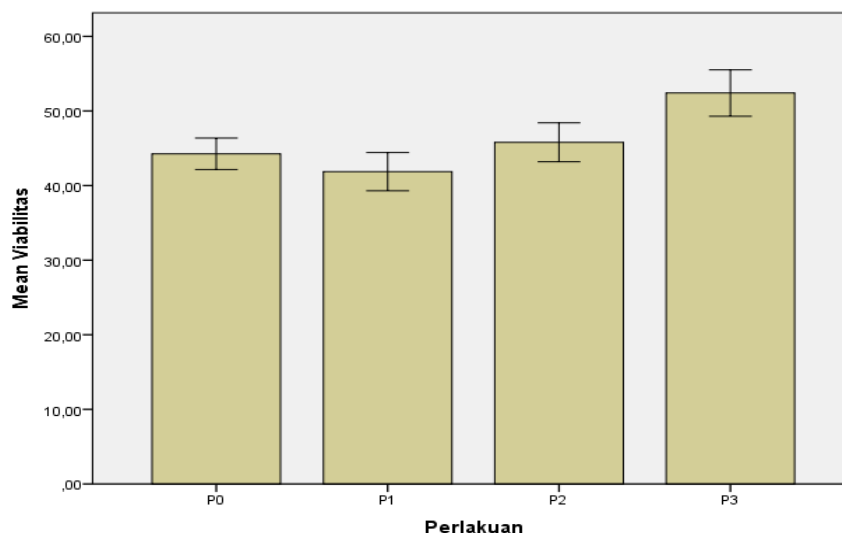
P0 = perlakuan kontrol (semen + pengencer susu skim kuning telur)

P1 = perlakuan 1 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,004M)

P2 = perlakuan 2 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,005M)

P3 = perlakuan 3 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,006M)

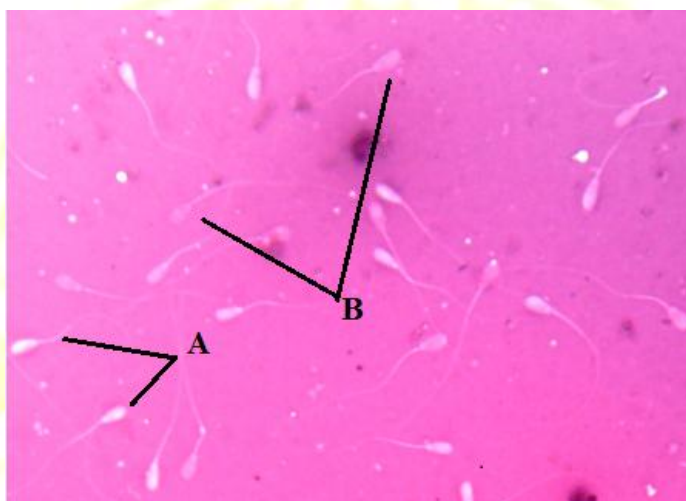
Nilai persentase dari ketiga perlakuan disajikan dalam diagram batang untuk menentukan perbedaan antara empat perlakuan tersebut pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Diagram Batang Viabilitas Spermatozoa Spermatozoa Sapi *Limousin* pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan ANOVA yang diteruskan dengan uji duncan terhadap rataan persentase hidup spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada P3 terhadap P0, P1 dan P2. Sedangkan perbedaan yang tidak nyata ( $p > 0,05$ ) terdapat pada P0 terhadap P1 dan P0 terhadap P2.

Gambaran spermatozoa hidup dan mati dapat dilihat pada gambar 4.2 di bawah ini :



Gambar 4.2. Pemeriksaan Mikroskop Viabilitas Spermatozoa dengan Metode Preparat Ulas Pembesaran 400 kali

**Keterangan :**

A : Spermatozoa hidup (tidak terwarna)

B : Spermatozoa mati (terwarna)

#### 4.3 Persentase Motilitas Progresif Spermatozoa pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Data persentase motilitas progresif spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* setelah diberi perlakuan berbagai macam konsentrasi pengencer dengan empat perlakuan yang tercantum dalam tabel 4.3.

Tabel 4.3. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Progresif Spermatozoa Sapi *Limousin Post Thawing*

| Perlakuan | Ulangan (n) | Motilitas Spermatozoa (%)<br>(rerata ± standar deviasi) |
|-----------|-------------|---|
| P0        | 6           | 38,33 <sup>b</sup> ± 2,582                              |
| P1        | 6           | 36,67 <sup>b</sup> ± 2,582                              |
| P2        | 6           | 38,33 <sup>b</sup> ± 2,582                              |
| P3        | 6           | 45,00 <sup>a</sup> ± 3,162                              |

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

Keterangan :

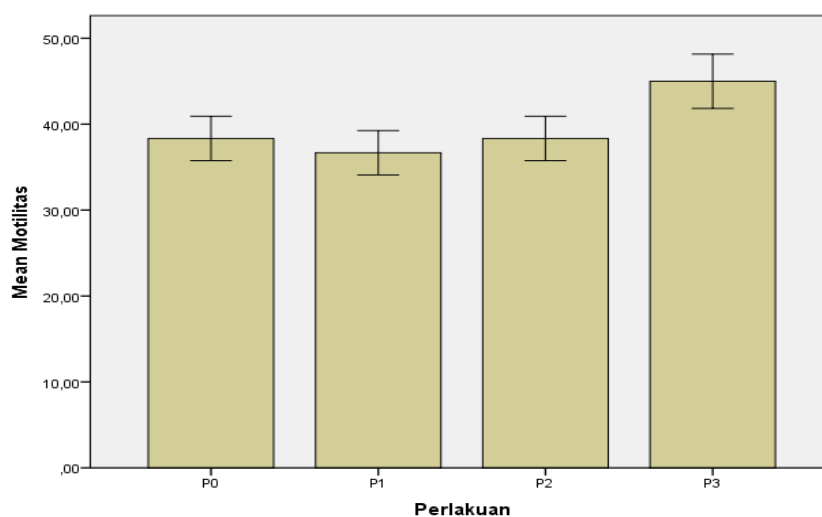
P0 = perlakuan kontrol (semen + pengencer susu skim kuning telur)

P1 = perlakuan 1 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,004M)

P2 = perlakuan 2 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,005M)

P3 = perlakuan 3 (semen + pengencer susu skim kuning telur + L-arginin 0,006M)

Berdasarkan tabel di atas, diagram batang rerata persentase motilitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



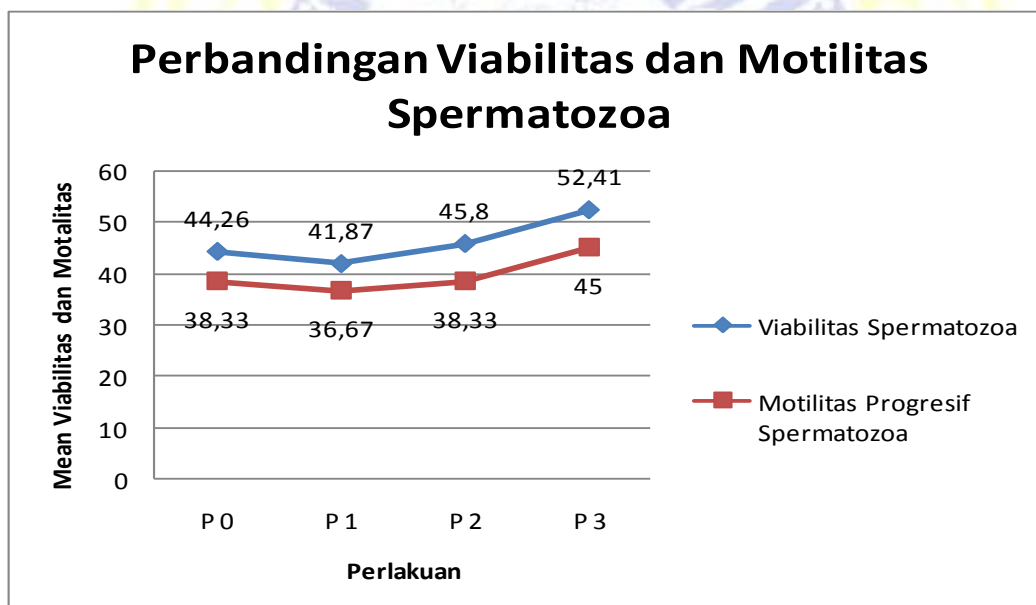
Gambar 4.3 Diagram Batang Persentase Motilitas Progresif Spermatozoa Sapi *Limousin* pada Pemeriksaan *Post Thawing*.

Berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan ANOVA yang diteruskan dengan uji Duncan terhadap rataan persentase motilitas progresif spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada P3 terhadap P0, P1 dan P2. Sedangkan perbedaan yang tidak nyata ( $p > 0,05$ ) terdapat antara P0, P1 dan P2.

#### 4.4 Perbandingan Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin Post Thawing*

Viabilitas dan Motilitas merupakan parameter yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi fertilitas spermatozoa. Pengujian viabilitas spermatozoa digunakan sebagai indikator integritas struktur membran. Pengujian motilitas atau daya gerak spermatozoa dapat digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Motilitas sperma dapat terjadi jika sperma mempunyai membran yang berfungsi dengan baik untuk menghasilkan energi gerak (Garner *and* Hafez,2000).

Perbandingan persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* setelah diberi perlakuan berbagai macam konsentrasi pengencer dengan empat perlakuan yang tercantum dalam gambar 4.4.



Gambar 4.4 Diagram Garis Perbandingan Persentase Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin* pada Pemeriksaan *Post Thawing*.

Pada diagram garis menunjukkan keselarasan antara viabilitas dan motilitas spermatozoa. Berdasarkan uji korelasi antara viabilitas dan motilitas, ditemukan koefisien korelasi sebesar 0,957. Hal tersebut menunjukkan adanya keterkaitan yang tinggi dan hubungan positif antara viabilitas dan motilitas. Semakin meningkat daya

hidup spermatozoa, makin meningkat pula pergerakan progresif spermatozoa. Sebaliknya, semakin menurun daya hidup spermatozoa, maka semakin menurun pula pergerakan progresif spermatozoa. Untuk dapat membuahi sel telur dalam alat kelamin betina, dibutuhkan spermatozoa yang memiliki viabilitas dan motilitas yang baik. Spermatozoa yang hidup, belum tentu dapat bergerak progresif. Namun, spermatozoa yang bergerak progresif dapat dipastikan merupakan spermatozoa yang hidup.



## BAB 5 PEMBAHASAN

### 5.1 Pemeriksaan Awal Semen Sapi *Limousin*

Motilitas spermatozoa diperiksa dengan melihat gerakan massa dan gerakan individu dari spermatozoa tersebut. Gerakan massa adalah gerakan dari beberapa sel spermatozoa bersama-sama sehingga membentuk suatu gelombang. Gerakan massa mencerminkan daya gerak dan konsentrasi spermatozoa. Pemeriksaan dilakukan pada suhu 37°C agar diperoleh gerakan spermatozoa yang optimal. Gerakan massa merupakan salah satu faktor penting dan kriteria paling utama untuk mengindikasikan bahwa semen tersebut dapat diproses lebih lanjut atau tidak (Susilowati dkk., 2010).

Semen sapi *limousin* yang digunakan sampel pada penelitian ini bervolume antara 6-12 ml, berwarna putih, konsistensi kental atau sedang dan memiliki pH antara 6-7. Sapi jantan yang sehat memiliki semen dengan konsentrasi 1000 – 2000 juta spermatozoa per ml. Setiap ml semen rata-rata mengandung  $1,8 \times 10^9$  spermatozoa dengan morfologi normal antara 70 – 95 % (Garner *and* Hafez, 2000).

Gerakan massa semen sapi *limousin* segar yang diperoleh dari penelitian ini adalah sangat baik (+++) dan baik (++) artinya semen membentuk gelombang-gelombang yang besar dan banyak serta cepat. Hal ini memberikan gambaran yang jelas bahwa semen tersebut mengandung spermatozoa hidup yang banyak dan aktif. Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan massa minimal ++ (Ditjennak, 2010).



## 5.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan *Post Thawing*

Pemeriksaan presentase spermatozoa hidup dan mati menggunakan zat warna eosin negrosin. Spermatozoa yang tidak menyerap zat warna dinyatakan spermatozoa yang hidup. Sebaliknya, spermatozoa yang menyerap zat warna eosin negrosin dinyatakan sebagai spermatozoa yang mati. Penilaian jumlah spermatozoa hidup berdasarkan banyaknya jumlah spermatozoa yang tidak menyerap zat warna eosin negrosin, spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya menurun, sehingga terwarnai eosin negrosin (Hardijanto dkk., 2010).

Hasil pemeriksaan persentase viabilitas spermatozoa sapi *limousin* pada pemeriksaan *post thawing* setelah diberi perlakuan seperti pada tabel 4.2 menunjukkan angka rerata dan standar deviasi paling baik pada P3 yaitu pada penambahan L-arginin konsentrasi 0,006 M. Sedangkan angka rerata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada P1 yaitu pada penambahan L-arginin konsentrasi 0,004 M. Data hasil persentase hidup spermatozoa pada tiap kelompok perlakuan menunjukkan angka rata-rata persentase hidup dan simpangan baku berturut-turut adalah P0 sebesar  $44,26 \pm 2,106$ , P1 sebesar  $41,87 \pm 2,567$ , P2 sebesar  $45,80 \pm 2,616$ , P3 sebesar  $52,41 \pm 3,107$ .

Proses oksidasi dalam metabolisme sel akan melepaskan radikal bebas yang memiliki efek merusak sel. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai keadaan yang stabil radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung secara terus menerus di dalam sel, sehingga apabila dibiarkan terus menerus akan menimbulkan kerusakan dan kematian sel (Nelson *and* Cox, 2008).

Kerusakan membran spermatozoa terjadi karena terbentuknya peroksida lipid pada membran spermatozoa. Peroksida lipid berasal dari reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh jamak yang banyak terdapat pada membran spermatozoa. Kerusakan membran spermatozoa tersebut akan menyebabkan kegagalan interaksi antara membran sperma dengan ovum pada proses fertilisasi (O'Flaherty *et al.*, 2004).

Penambahan L-arginin dengan konsentrasi yang sesuai dapat mencegah kerusakan spermatozoa. Mekanisme kerja L-arginin mempunyai prinsip yang sama dengan mekanisme antioksidan. Antioksidan bekerja dengan memberikan elektron pada radikal bebas, sehingga senyawa menjadi stabil dan dapat mencegah radikal bebas (Srivastava *et al.*, 2006).

Hasil menunjukkan P3 yang paling baik diantara perlakuan lainnya. Ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi L-arginin dalam pengencer mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Pemeriksaan persentase hidup spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* adalah dengan menghitung jumlah sel spermatozoa yang hidup dari sediaan ulas, dengan syarat didapatkan minimal 100 spermatozoa yang di hitung di setiap perlakuan dan ulangan.

Pada P1 menunjukkan viabilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan P0, walaupun tidak berbeda nyata. Dosis antioksidan yang diberikan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi rendah, aktivitas antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Sel akan menyesuaikan ketidakseimbangan ini dengan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan kadarnya dengan

antioksidan. Hal ini menimbulkan elektron tidak berpasangan semakin banyak, sehingga tidak mampu menstabilkan radikal bebas, dan kematian spermatozoa tetap terjadi.

Pada P2 menunjukkan viabilitas yang lebih tinggi dari perlakuan kontrol. Hal ini terjadi karena konsentrasi L-arginin 0,005 M mampu mempertahankan membran sel spermatozoa agar tetap utuh akibat lipid peroksidase. Namun, viabilitas tertinggi ditunjukkan pada penambahan L-arginin sebanyak 0,006M (P3). Terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) antara P3 terhadap P0, P1 dan P2. Konsentrasi 0,006 M arginin sesuai untuk menetralkan radikal bebas yang dihasilkan oleh metabolisme spermatozoa.

### **5.3 Persentase Motilitas Spermatozoa pada Pemeriksaan *Post Thawing***

Motilitas spermatozoa merupakan indikator penting yang digunakan untuk menentukan kualitas semen. Motilitas adalah gerakan maju secara progresif dari spermatozoa. Daya gerak yang progresif ini mempunyai peran yang penting dalam keberhasilan pembuahan (Kostaman dan Sutana, 2006). Proses respirasi pada metabolisme spermatozoa menghasilkan asam laktat. Semakin lama proses respirasi semakin banyak asam laktat yang dihasilkan. Asam laktat berpengaruh menurunkan kehidupan dan motilitas spermatozoa (Dirjennak, 2000).

Motilitas spermatozoa tergantung pada fungsi mitokondria. *Adenosine Tri Phosphate* (ATP) dihasilkan oleh proses fosforilasi oksidatif di dalam membran mitokondria dan ditransfer ke mikrotubulus sebagai energi untuk motilitas, oleh karena itu penurunan motilitas sperma akibat pembekuan diyakini terkait dengan kerusakan mitokondria. Motilitas sperma dapat terjadi jika sperma mempunyai membran yang

berfungsi dengan baik untuk menghasilkan energi gerak. Selama pembekuan terjadi perubahan suhu dan osmolalitas yang ekstrim sehingga akan merusak komposisi lipid membran plasma yang berdampak pada menurunnya motilitas sperma (Januskauskas and Zillinskas, 2002). Syarat minimal motilitas individu semen *post thawing* agar semen dapat dipergunakan dalam inseminasi buatan adalah 40 % (Garner dan Hafez, 1993).

Hasil pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa sapi *limousin* pada pemeriksaan *post thawing* setelah diberi perlakuan seperti pada tabel 4.3 menunjukkan angka rerata dan standar deviasi paling baik pada P3 yaitu pada penambahan L-arginin konsentrasi 0,006 M. Sedangkan angka rerata dan standar deviasi paling rendah terdapat pada P1 yaitu pada penambahan L-arginin konsentrasi 0,004 M. Data hasil motilitas spermatozoa setelah diencerkan menunjukkan angka rata-rata dan simpangan baku berturut-turut adalah P0 sebesar  $38,33 \pm 2,581$ , P1 sebesar  $36,67 \pm 2,581$ , P2 sebesar  $38,33 \pm 2,581$ , P3 sebesar  $45,00 \pm 3,162$ .

L-arginin melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat proses peroksidasi lipid di dalam sel. L-arginin dapat meningkatkan motilitas spermatozoa dengan meningkatkan NO (Nitrogen Oksida) melalui mekanisme NOS (Nitrogen Oksida Sintase). NO dapat meningkatkan atau menurunkan motilitas spermatozoa tergantung dari konsentrasinya. Enzim NOS dapat disintesa dari L-arginin menggunakan oksigen dan NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleo Phosphate*). Enzim ini dapat ditemukan di akrosom dan daerah ekor dengan konsentrasi yang rendah (O'Flaherty *et al.*, 2004).

Hiperaktifitas dari motilitas spermatozoa didukung dengan penambahan NO secara eksogen yang dapat meningkatkan fosforilasi pada ekor spermatozoa, sehingga

gerakan spermatozoa akan semakin cepat. Hiperaktivasi ini sangat penting bagi spermatozoa agar bisa penetrasi ke dalam zona pellusida (Gagnon and de Lamirande, 2006).

Proses oksidasi akan melepaskan radikal bebas yang memiliki efek merusak sel. Radikal bebas adalah sekelompok zat kimia yang memiliki elektron tidak berpasangan karena kehilangan atau mendapatkan elektron, sehingga menjadi senyawa yang tidak stabil. Agar menjadi stabil, radikal bebas akan mengambil elektron dari molekul atau sel lain, sehingga akan terjadi kerusakan sel. Mekanisme kerja NO adalah sama dengan mekanisme antioksidan. Antioksidan bekerja dengan memberikan elektron pada radikal bebas, sehingga senyawa menjadi stabil dan dapat mencegah radikal bebas (Nelson and Cox, 2008).

Dibutuhkan jumlah antioksidan (L-arginin) dengan konsentrasi yang sesuai agar bisa menstabilkan radikal bebas hasil metabolisme yang tidak stabil. Untuk penambahan L-arginin sebanyak 0,004 M sedikit menurunkan motilitas karena dosis itu tidak mencukupi untuk menetralkan senyawa radikal bebas yang tidak stabil, atau bahkan penambahan yang tidak sesuai ini malah akan menambah elektron yang tidak berpasangan. Sel akan menyesuaikan ketidakseimbangan ini dengan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan kadarnya dengan antioksidan, sehingga elektron tidak berpasangan semakin banyak. L-arginin tidak mampu melindungi spermatozoa dari radikal bebas dan kerusakan spermatozoa tetap terjadi.

Pada perlakuan P2 dengan penambahan L-arginin 0,005 M, terjadi peningkatan motilitas, walaupun tidak berbeda nyata. Hal itu disebabkan konsentrasi 0,005 M belum mampu menetralkan semua senyawa radikal bebas. Sedangkan dalam konsentrasi yang

sesuai, pada P3 dengan konsentrasi penambahan L-arginin 0,006 M terjadi peningkatan spermatozoa. Perlakuan 3 dibanding perlakuan lainnya menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Hal ini membuktikan bahwa penambahan L-arginin 0,006 M dapat menetralkan senyawa radikal bebas, sehingga meningkatkan motilitas spermatozoa sapi *limousin*.

#### **5.4 Perbandingan Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi *Limousin Post Thawing***

Dari hasil data statistik, diperoleh keterkaitan yang tinggi dan hubungan positif antara viabilitas dan motilitas. Semakin meningkat daya hidup spermatozoa, makin meningkat pula pergerakan progresif spermatozoa. Sebaliknya, semakin menurun daya hidup spermatozoa, maka semakin menurun pula pergerakan progresif spermatozoa. Untuk dapat membuahi sel telur dalam alat kelamin betina, dibutuhkan spermatozoa yang memiliki viabilitas dan motilitas yang baik. Spermatozoa yang hidup, belum tentu dapat bergerak progresif. Namun, spermatozoa yang bergerak progresif dapat dipastikan merupakan spermatozoa yang hidup.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Penambahan L-arginin 0,006 M dalam pengencer susu skim kuning telur menghasilkan persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing* paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol maupun konsentrasi 0,004 M dan 0,005 M.
2. Semakin meningkat daya hidup spermatozoa, semakin meningkat pula pergerakan progresif spermatozoa. Sebaliknya, semakin menurun daya hidup spermatozoa, maka semakin menurun pula pergerakan progresif spermatozoa.

### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis maksimum L-arginin terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin* pada semen beku.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme kerja L-arginin sebagai antioksidan pada semen beku.

## RINGKASAN

Islakhul Aila. Penambahan L-arginin dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin post thawing* pada semen beku, dengan Prof. Dr. Nunuk Dyah Retno L. drh., M.S. selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Erma Safitri, drh., M.Si. selaku dosen pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan L-arginin dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin* pada pemeriksaan *post thawing*. Sampel yang digunakan adalah semen segar sapi *limousin*. Semen ditampung menggunakan vagina buatan dan dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis untuk mengetahui kelayakannya supaya dapat diproses. Kemudian penelitian ini akan diberikan tiga perlakuan yang dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan 1 (P1) semen sapi *limousin* dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,004 M, perlakuan 2 (P2) semen sapi *limousin* dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,005 M, perlakuan 3 (P3) semen sapi *limousin* dengan pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan L-arginin 0,006 M yang dibandingkan dengan kontrol (P0) semen sapi *limousin* dengan pengencer susu skim kuning telur tanpa penambahan L-arginin. Masing-masing perlakuan dengan 6 ulangan. Kemudian dilakukan pemeriksaan *post thawing*. Persentase hidup spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing* menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada P3 terhadap P0, P1 dan P2. Sedangkan perbedaan yang tidak nyata ( $p > 0,05$ ) terdapat pada P0 terhadap P1 dan P0 terhadap P2. Persentase motilitas progresif spermatozoa pada pemeriksaan *post thawing*



menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada P3 terhadap P0, P1 dan P2. Sedangkan perbedaan yang tidak nyata ( $p > 0,05$ ) terdapat antara P0, P1 dan P2.

Hal ini disebabkan karena L-arginin melindungi dari lipid peroksidasi di dalam sel. L-arginin dapat meningkatkan viabilitas dan motilitas spermatozoa dengan meningkatkan NO (Nitrogen Oksida) melalui mekanisme NOS (Nitrogen Oksida Sintase). Mekanisme nitrogen oksida sesuai dengan mekanisme antioksidan dalam melindungi sel dari radikal bebas. Nitrogen oksida dapat menginaktivasi superoksida yang dihasilkan oleh spermatozoa selama proses metabolisme berlangsung.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan L-arginin 0,006 M dalam pengencer susu skim kuning telur menghasilkan persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi *limousin* pada pemeriksaan *post thawing* paling tinggi dibandingkan dengan kontrol dan konsentrasi L-arginin 0,004 M dan 0,005 M.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Al-Ebady, A.S., S.O. Hussain., K.I. Al-Badry and F.F. Ibrahim. 2012. Effect of Adding L-arginine on Some Parameters of Bull Sperms After Freezing in Liquid Nitrogen (-196°C). *Al-Qadisiya Journal of Veterinary Medical Science*. 11(02): 156-161.
- Ditjennak, Direktorat Budidaya Peternakan. 2000. Pedoman Teknis Produksi Peternakan Sapi Potong. Bagian Proyek Pembinaan Budidaya Ternak Pusat. Jakarta. 12.
- Ditjennak. 2010a. Pedoman Umum Program Swasembada Daging Sapi 2014. Direktorat Jenderal Peternakan Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Ditjennak. 2010b. Blue Print Program Swasembada Daging Sapi 2014. Direktorat Jenderal Peternakan Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Ditjennak. 2010c. Pedoman Teknis Kegiatan Operasional PSDS 2014. Direktorat Jenderal Peternakan Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Dwiyanto, K. 2008. Pemanfaatan Sumber Daya Lokal dan Inovasi Teknologi dalam Mendukung Pengembangan Sapi Potong di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. I(3): 173-188.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung. 30-73.
- Gagnon, C. and E. de Lamirande. 2006. Control of Sperm Motility. The sperm cells: Production, Maturation, Fertilization and Regeneration. Cambridge University Press. Cambridge UK. 108-133.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> ed. Lea and Febringer. Philadelphia. 97 – 109.
- Griveau, J.F., E. Dumont., P. Renard., J.P. Callegari and D. Le Lannou. 1995. Reactive Oxygen Species Lipid Peroxidation and Enzymatic Defense System in Human Spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*. 103: 17-26.
- Hafez, E.S.E. 2000. Preservation and Cryopreservation of Gamet Embryo. In: *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> ed. Lea & Febinger. Philadelphia. 165-168.

- Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito dan T.W. Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 39-53.
- Ihsan, N.M. 2011. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Universitas Brawijaya. Malang. 38.
- Ismudiono., H. Anwar., P. Srianto., S.P. Madyawati., A. Samik dan E. Safitri. 2010. Buku Ajar Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 11-38.
- Januskauskas A. and H. Zillinskas. 2002. Bull Semen Evaluation Post-thaw and Relation of Semen Characteristics to Bull's Fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*. 17:1392-2130.
- Kostaman, T. dan I.K. Sutana. 2006. Studi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer pada Pengencer Tris Sitrat Fruktosa. *Jurnal Sains Veteriner*. 24 (1) : 58-62.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. 84-86.
- Lessard C., S. Parent., P. Leclerc., J.L. Bailey and R. Sullivan. 2000. Cryopreservation Alters the Levels of The Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Andrology* 21:700-707.
- Moce, E. and J.K. Graham. 2006. Cholesterol-loaded Cyclodextrins Added to Fresh Bull Ejaculate Improve Sperm Cyrosurvival. *Journal Animal Science*. 84 (4) : 826-833.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2008. Principles of Biochemistry. WH Freeman and Company. New York. 105-115.
- O'Flaherty, C., P. Rodriguez and S. Srivastava. 2004. L-Arginine promotes Capacitation and Acrosome Reaction in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674: 215– 221.
- Poernomo, B., M. Mafruchati., Widjiati., E.M. Luqman., E.D. Masithah dan A.T. Mukti. 2005. Penuntun Embriologi. Pustaka Melati. Surabaya. 35-38.
- Saleh, E. 2004. Teknologi Pangan Susu dan Hasil Ikutan Ternak. USU Digital Library. Sumatera Utara. 4-7.
- Srivastava, S., P. Desai., E. Coutinho and G. Govil. 2006. Mechanism of Action of L-arginine on The Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. *Biology of Reproduction*. 74(5): 954-958.

Sugeng, B. 1998. Sapi Potong. Penebar Swadaya. Jakarta. 60-64.

Susilawati, T. 2011. Spermatology. UB Press. Universitas Brawijaya. Malang. 30.

Susilowati, S., Hardijanto., T.W. Suprayogi., T. Sardjito dan T. Hernawati. 2010. Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 8-18.



### **Lampiran 1. Prosedur Penampungan Semen Sapi *Limousin***

Penampungan semen sapi dilakukan minimal dua orang operator. Satu orang bertugas untuk mengendalikan pejantan dan yang lain sebagai operator penampung semen. Kemudian menyiapkan betina pemancing dan diikat pada kandang jepit tempat penampungan semen. Pejantan didekatkan pada betina pemancing namun dicegah agar tidak menaikinya. Pejantan didekatkan dan dijauhkan dari pemancing 2 – 3 kali agar merangsang libido lebih besar dan volume semen semakin banyak.

Operator memeriksa suhu dalam vagina buatan antara 42 – 45 °C. Selanjutnya operator mengambil posisi belakang sebelah kanan dari pemancing. Tangan operator memegang vagina buatan dengan posisi miring ke atas 45°. Preputium pejantan dipegang tepat di pangkal penis dengan tangan kiri dan arahkan masuk ke dalam vagina buatan saat pejantan naik dan melakukan gerakan ejakulasi. Setelah semen tertampung maka lepaskan tabung gelas penampung dari corong karet vagina batan. Periksa semen segar tersebut di laboratorium.

Sumber : Susilowati, dkk (2010)

## Lampiran 2. Pemeriksaan Semen Segar

### 1. Secara Makroskopis

Melihat dan mencatat :

- a. Volume semen (rata-rata sapi 3-7 ml)
- b. Warna semen (putih)
- c. Kekentalan semen (encer, sedang dan kental)
- d. Derajat keasaman/pH (6-7)

### 2. Secara Mikroskopis

#### a. Gerak massa

Menggunakan mikroskop dengan perbesaran 4 x 10 atau mikroskop dengan perbesaran 10 x 10

- Menyiapkan peralatan mikroskop
- Menyiapkan air hangat dalam beaker glass, stick glass, object glass, cover glass dan tissue
- Meletakkan object glass, di atas slide warmer dengan menggunakan stick glass/ose, ambil 1 (satu) tetes semen letakkan pada object glass tanpa ditutupi cover glass
- Melihat dibawah mikroskop sambil mengatur jarak lensa dengan objek yang dilihat sehingga terlihat gerakan massa semen, dengan penilaian sebagai berikut :

0 : Tidak ada gerakan spermatozoa maupun gerak massa sperma

+ : Gerakan massa sperma lemah

++ : Gerakan massa sperma berupa gelombang-gelombang tipis, jarang dan sedang

+++ : Gerakan massa sperma berupa gelombang-gelombang tebal, gelap, cepat, dan berpindah-pindah tempat

++++ : Gerakan massa sperma berupa gelombang-gelombang tebal, gelap, dan sangat cepat

Semen segar yang diproses adalah semen dengan nilai gerakan massa minimal ++

b. Gerak individu

Menggunakan mikroskop pembesaran 40 x 10 :

- Menyiapkan peralatan mikroskop
- Menyiapkan air hangat dalam beaker glass, stick glass, object glass, cover glass dan tissue
- Meletakkan object glass, cover glass di atas slide warmer dengan menggunakan stick glass/ose, ambil 1 (satu) tetes semen letakkan pada object glass dan cover glass
- Melihat di bawah mikroskop sambil mengatur focus yang dilihat sehingga terlihat gerak individu, dengan penilaian minimal 70% spermatozoa bergerak aktif ke depan (progresif) yang dilihat dari 5 lapang pandang, dengan penilaian sebagai berikut :

1. Kecepatan gerak spermatozoa :

- Nol (0) = tidak ada gerakan individu spermatozoa
- Satu (1) = gerakan individu spermatozoa lamban

- Dua (2) = gerakan individu spermatozoa sedang
- Tiga (3) = gerakan individu spermatozoa cepat
- Empat (4) = gerakan individu spermatozoa sangat cepat

## 2. Arah gerak spermatozoa :

- P (progresif) = gerakan maju
- O (oscilatory), V (vibratoris) = gerakan berputar, bergetar
- C (circular) = gerakan melingkar
- R (reverse) = gerakan mundur
- N (nekrospermia) = spermatozoa tidak ada gerakan

Sumber : Ditjennak (2000)



### Lampiran 3. Komposisi Bahan Pengencer Susu Skim Kuning Telur

Bahan pengencer Susu Skim Kuning Telur terdiri dari :

#### 1. Diluter A

- Susu Skim 10%
- Kuning Telur 5%
- Fruktosa 1%
- Vitamin C 20 mg/ 100 ml
- Antibiotika *Streptomycin* 1 mg/ml
- Antibiotika *Penicyllin* 1000 IU/ml
- L-arginin dengan ukuran seperti pada perlakuan
- Semen *Limousin* segar yang telah memenuhi syarat.

#### 2. Diluter B

- Glukosa 2%
- Diluter A + Gliserol 16%

Sumber : Susilowati, dkk (2010)

#### Lampiran 4. Cara Membuat Preparat Ulas Spermatozoa

1. Menyiapkan *obyek glass* bersih.
2. Pada *obyek glass* diberikan satu tetes kecil semen dan satu tetes besar larutan eosin-negrosin di sampingnya.
3. Mencampurkan zat warna itu dengan semen sampai homogen.
4. Membuat preparat ulas tipis dan keringkan di atas nyala api (proses ini harus selesai maksimal 15 detik).
5. Melihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 400X.
6. Menghitung jumlah spermatozoa yang hidup, dengan minimal perhitungan 100 spermatozoa.
7. Penentuan presentase spermatozoa hidup dapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Sumber : Susilowati dkk., (2010).

### Lampiran 5. Prosedur Pemeriksaan *Post Thawing Motility*

- Siapkan air hangat dalam *waterbath* dengan suhu 35 - 37°C
- Ambil *straw* dengan acak, *thawing* pada suhu 37°C selama 15 detik.
- *Straw* yang telah di *thawing* kemudian dikeringkan dengan *tissue paper*.
- Gunting sedikit pada bagian tengah *straw* namun tidak sampai putus kemudian kedua ujungnya ditekuk. Gunting salah satu ujung *straw* sampai cairan semen keluar dari *straw*
- Teteskan semen pada gelas objek bersih, kemudian tutup dengan gelas penutup agar tidak cepat mengering
- Periksa semen tersebut dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x (lensa objektif 10 x lensa okuler 10)
- Menghitung presentase spermatozoa progresif dengan penilaian antara 0-70% dari minimal 5 lapangan pandang. Standar minimum motilitas semen beku yang digunakan adalah 40%
- Melihat gerakan individu (kecepatan) spermatozoa dengan nilai yaitu :
  - 0 = tidak ada gerakan
  - 1 = gerakan lambat
  - 2 = gerakan sedang
  - 3 = gerakan cepat
  - 4 = gerakan sangat cepat

Sumber : Susilowati dkk., (2010).

## Lampiran 6. Data Statistik

### Summarize

[DataSet1] D:\SPSS\Data Lengkap.sav

#### Case Processing Summary<sup>a</sup>

|                        | Cases    |         |          |         |       |         |
|------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
|                        | Included |         | Excluded |         | Total |         |
|                        | N        | Percent | N        | Percent | N     | Percent |
| Motilitas * Perlakuan  | 24       | 100,0%  | 0        | 0,0%    | 24    | 100,0%  |
| Viabilitas * Perlakuan | 24       | 100,0%  | 0        | 0,0%    | 24    | 100,0%  |

a. Limited to first 100 cases.

|           |         |       | Motilitas | Viabilitas |
|-----------|---------|-------|-----------|------------|
| Perlakuan | Kontrol | 1     | 35,00     | 41,67      |
|           |         | 2     | 40,00     | 46,15      |
|           |         | 3     | 35,00     | 42,24      |
|           |         | 4     | 40,00     | 44,11      |
|           |         | 5     | 40,00     | 44,34      |
|           |         | 6     | 40,00     | 47,05      |
|           |         | Total | N         | 6          |
| 0,004 M   |         | 1     | 35,00     | 40,35      |
|           |         | 2     | 35,00     | 40,25      |
|           |         | 3     | 35,00     | 39,82      |
|           |         | 4     | 35,00     | 40,48      |
|           |         | 5     | 40,00     | 44,77      |
|           |         | 6     | 40,00     | 45,54      |
|           |         | Total | N         | 6          |
| 0,005 M   |         | 1     | 40,00     | 47,29      |
|           |         | 2     | 40,00     | 44,78      |
|           |         | 3     | 40,00     | 48,54      |
|           |         | 4     | 35,00     | 42,37      |
|           |         | 5     | 35,00     | 43,50      |
|           |         | 6     | 40,00     | 48,33      |
|           |         | Total | N         | 6          |
| 0,006 M   |         | 1     | 45,00     | 51,49      |
|           |         | 2     | 50,00     | 57,14      |
|           |         | 3     | 45,00     | 53,27      |
|           |         | 4     | 40,00     | 47,50      |
|           |         | 5     | 45,00     | 52,83      |
|           |         | 6     | 45,00     | 52,25      |
|           |         | Total | N         | 6          |
| Total     | N       | 24    | 24        |            |

## Oneway

[DataSet1] D:\SPSS\Data Lengkap.sav

### Descriptives

|            |         | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|------------|---------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|            |         |    |         |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| Motilitas  | Kontrol | 6  | 38,3333 | 2,58199        | 1,05409    | 35,6237                          | 41,0430     | 35,00   | 40,00   |
|            | 0,004 M | 6  | 36,6667 | 2,58199        | 1,05409    | 33,9570                          | 39,3763     | 35,00   | 40,00   |
|            | 0,005 M | 6  | 38,3333 | 2,58199        | 1,05409    | 35,6237                          | 41,0430     | 35,00   | 40,00   |
|            | 0,006 M | 6  | 45,0000 | 3,16228        | 1,29099    | 41,6814                          | 48,3186     | 40,00   | 50,00   |
|            | Total   | 24 | 39,5833 | 4,14851        | ,84681     | 37,8316                          | 41,3351     | 35,00   | 50,00   |
| Viabilitas | Kontrol | 6  | 44,2600 | 2,10588        | ,85972     | 42,0500                          | 46,4700     | 41,67   | 47,05   |
|            | 0,004 M | 6  | 41,8683 | 2,56703        | 1,04799    | 39,1744                          | 44,5623     | 39,82   | 45,54   |
|            | 0,005 M | 6  | 45,8017 | 2,61625        | 1,06808    | 43,0561                          | 48,5473     | 42,37   | 48,54   |
|            | 0,006 M | 6  | 52,4133 | 3,10705        | 1,26845    | 49,1527                          | 55,6740     | 47,50   | 57,14   |
|            | Total   | 24 | 46,0858 | 4,68600        | ,95653     | 44,1071                          | 48,0646     | 39,82   | 57,14   |

### ANOVA

|            |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Motilitas  | Between Groups | 245,833        | 3  | 81,944      | 10,926 | ,000 |
|            | Within Groups  | 150,000        | 20 | 7,500       |        |      |
|            | Total          | 395,833        | 23 |             |        |      |
| Viabilitas | Between Groups | 367,434        | 3  | 122,478     | 17,800 | ,000 |
|            | Within Groups  | 137,615        | 20 | 6,881       |        |      |
|            | Total          | 505,049        | 23 |             |        |      |

## Post Hoc Tests

### Homogeneous Subsets

#### Motilitas

Duncan<sup>a</sup>

| Perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |         |
|-----------|---|-------------------------|---------|
|           |   | 1                       | 2       |
| 0,004 M   | 6 | 36,6667                 |         |
| Kontrol   | 6 | 38,3333                 |         |
| 0,005 M   | 6 | 38,3333                 |         |
| 0,006 M   | 6 |                         | 45,0000 |
| Sig.      |   | ,331                    | 1,000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size =

#### Viabilitas

Duncan<sup>a</sup>

| Perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |
|-----------|---|-------------------------|---------|---------|
|           |   | 1                       | 2       | 3       |
| 0,004 M   | 6 | 41,8683                 |         |         |
| Kontrol   | 6 | 44,2600                 | 44,2600 |         |
| 0,005 M   | 6 |                         | 45,8017 |         |
| 0,006 M   | 6 |                         |         | 52,4133 |
| Sig.      |   | ,130                    | ,321    | 1,000   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

#### Correlations

|            |                     | Motilitas | Viabilitas |
|------------|---------------------|-----------|------------|
| Motilitas  | Pearson Correlation | 1         | ,957**     |
|            | Sig. (2-tailed)     |           | ,000       |
|            | N                   | 24        | 24         |
| Viabilitas | Pearson Correlation | ,957**    | 1          |
|            | Sig. (2-tailed)     | ,000      |            |
|            | N                   | 24        | 24         |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Lampiran 7. Foto Penelitian

Pejantan *Limousin*

Alat pembuatan diluter



Spektrofotometer



Timbangan



Proses pembuatan diluter



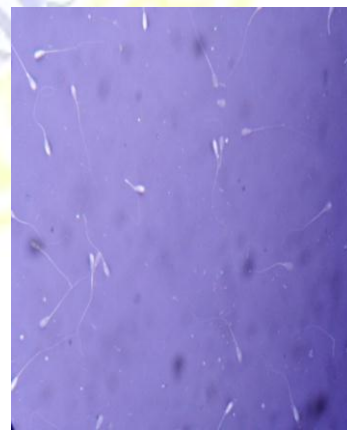
Waterbath



Diluter dalam cooler



Container



Preparat ulas spermatozoa