

**PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C DALAM MEDIA
PENGECER TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA SAPI PERAH
(*Bos taurus*) SETELAH *THAWING***

Devi Ayu Lestari¹, Desak Made Malini¹, Fifi Afiati²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Padjadjaran

²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Email: desak_malini@yahoo.com

ABSTRAK

Proses pembekuan dan *thawing* semen, dapat menyebabkan kematian spermatozoa dan spermatozoa yang bertahan hidup mempunyai fertilitas yang rendah. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan konsentrasi vitamin C yang optimum dalam media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap pola faktorial 3x4. Rancangan ini terdiri dari dua faktor yaitu pemisahan spermatozoa dan konsentrasi vitamin C. Faktor pemisahan spermatozoa yaitu spermatozoa tanpa *sexing* dan hasil *sexing* (X dan Y). Faktor konsentrasi vitamin C yaitu 0% (K), 0,25% (P₁), 0,50% (P₂) dan 0,75% (P₃). Data dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA) dan uji Jarak Berganda Duncan 95%. Konsentrasi vitamin C yang optimum dalam media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* setelah *thawing* adalah 0,25%. Sedangkan konsentrasi vitamin C yang optimum dalam media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) hasil *sexing*, baik spermatozoa X maupun spermatozoa Y setelah *thawing* adalah 0,50%. Penambahan vitamin C dalam media pengencer dapat meningkatkan kualitas spermatozoa tanpa *sexing* dan hasil *sexing* (spermatozoa X dan Y) pada sapi perah (*Bos taurus*) setelah *thawing*.

Kata kunci : Kualitas Spermatozoa Sapi Perah, *Bos taurus*, Vitamin C, *Sexing*, Media Pengencer, *Thawing*.

***EFFECT OF ADDITION OF VITAMIN C IN DILUENT MEDIUM FOR
QUALITY OF DAIRY COW (*Bos taurus*) SPERMATAOZOA AFTER
THAWING***

Devi Ayu Lestari¹, Desak Made Malini¹, Fifi Afiati²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Padjadjaran

²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Email: desak_malini@yahoo.com

ABSTRACT

Process of freezing and thawing of semen, could make spermatozoa death and live spermatozoa has low fertility. The purpose of this research is to get the optimum concentration of vitamin C in diluent medium to improve the quality of spermatozoa dairy cows (*Bos taurus*) without sexing and results of sexing after thawing. The method used was experimental method completely randomized design with 3x4 factorial. This design consists of two factors are the separation of spermatozoa and the concentration of vitamin C. Spermatozoa separation factor are non sexing spermatozoa and results of sexing (X and Y spermatozoa). Vitamin C concentrations factor are 0% (K), 0,25% (P₁), 0,50% (P₂) dan 0,75% (P₃). Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Duncan's Multiple Range Test 95%. The optimum concentration of vitamin C in diluent medium to improve the quality of spermatozoa dairy cows (*Bos taurus*) without sexing after thawing is 0.25%. While the optimum concentration of vitamin C in diluent medium to improve the quality of spermatozoa dairy cows (*Bos taurus*) sexing results, both X and Y spermatozoa after thawing is 0.50%. Addition of vitamin C in diluent medium could improve the quality of spermatozoa without sexing and results of sexing (X and Y spermatozoa) in dairy cows (*Bos taurus*) after thawing.

Keywords: *Quality of Spermatozoa Dairy Cow, Bos taurus, Vitamin C, Sexing, Diluents Medium , Thawing.*

KATA PENGANTAR



Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul “Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Media Pengencer Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Perah (*Bos taurus*) Setelah *Thawing*”.

Laporan ini disusun untuk memenuhi syarat akademik dalam kegiatan Skripsi. Hasil yang didapatkan akan memberikan berbagai informasi mengenai penggunaan vitamin C sebagai antioksidan yang ditambahkan dalam media pengencer sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*, sehingga memenuhi syarat untuk digunakan dalam program IB.

Dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih terdapat banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna, maka dari itu, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan laporan ini.

Semoga laporan ini dapat bermanfaat dan menjadikan suatu amal kebaikan serta Allah SWT akan melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua.

Jatinangor, September 2015

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam penulisan laporan penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan ini. Terima kasih pula kepada Dr. Desak Made Malini, M.Si., dan Fifi Afiati, M.Si., yang telah bersedia membimbing dan memberikan ilmu, nasehat, motivasi, waktu serta kesabaran selama pelaksanaan penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Budi Nurani R., MS., Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran.
2. Dr. M. Nurzaman, M.Si., Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran.
3. Dr. Teguh Husodo, M.Si., Koordinator Prodi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran.
4. Drs. Nining Ratningsih, M.IL., Madihah, S.Si., M.Si., dan Dr. Kartiawati Alipin, MS., yang telah membantu dan memberi masukan sehingga penulis menjadi lebih baik dari segi penulisan dari mulai tahap pembuatan proposal hingga hasil.
5. Prof. Dr. Ir. Baharuddin Tappa, Kepala Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, telah membantu dan memberikan

kesempatan kepada penulis untuk meneliti di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan.

6. Muhammad Gunawan, M.Si dan Dr. Ekayanti M. Kaiin, M.Si., yang telah banyak membantu dalam proses penelitian selama di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan, dan Kultur Sel Hewan, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
7. Keluarga penulis, Mama Rosmawati, Ayah Eddy Junaedi, Desi Ayu dan Dena Ayu yang paling penulis sayangi di dunia maupun di akhirat nanti yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doanya.
8. Partner dalam mengerjakan penelitian, Ghina Nafisah dan Raden Cindy Rusherdiannita (Trio Mencit) yang selalu ada menemani saat suka duka penelitian berlangsung dan turut membimbing penulis selama penelitian berlangsung.
9. Teman-teman terbaik yang Allah berikan, Andesita, Athena, Fatharani, Hana, Ismi Dwi, Maulvani, Septiani Abdul Aziz dan Ayu Aisyah (Arisaners) yang selalu menemani, menjadi “tim hore” dan memberikan dukungan serta motivasi selama penelitian berlangsung.
10. Teman-teman yang selalu ada, selalu menghibur, menemani, keluarga di Cibinong dan tentunya membantu penulis selama penulisan skripsi, Tuhfah, Annisa Amalia, Syahidah, Ghina, Cindy, Isna, Rahayu, Mba Mili dan Mba Vira (Kostmate Cibinong).
11. Teman-teman dari masa lalu yang akan menemani penulis masa kini dan masa yang akan datang yang selalu memberikan semangat serta doanya untuk

kelancaran dalam penulisan skripsi ini Aci Atikah, Rara Anindya dan Dhanu Prakoso.

12. Teman-teman yang selalu mendukung dan mendoakan, keluarga kecil di Desa Linggawangi, teman-teman KKN Desa Linggawangi
13. Teman-teman yang mebantu penulis selama proses penelitian di Lembaga Ilmu dan Pengetahuan Indonesia, Om Tulus, Mas Adhit, Pak Enjang, Om Bayu, Pak Ade, Mba Fitri, Mba Vani, Isti, Chandra, Ama, Wakhid, Angger, Ghina, Cindy, Devi Rahma, adik-adik PKL BIMA, Mas Dimas, Mba Senli dan Nurin.
14. Teman-teman Cygnus yang sudah sama – sama berjuang sampai saat ini, yang selalu memberikan dukungan dan yang selalu membantu.
15. Serta pihak lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu-satu, terimakasih semuanya, semoga Allah selalu memberikan berkah pada hidup kalian semua.
Amin.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii

BAB I PENDAHULUAN

1

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Kerangka Penelitian	4
1.6 Hipotesis	7
1.7 Metodologi Penelitian	7
1.8 Waktu dan Tempat Penelitian	8

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

9

2.1 Karakteristik Spermatozoa	9
2.2 Kualitas Semen.....	10
2.2.1 Warna	11
2.2.2 Bau	12
2.2.3 Volume	12
2.2.4 Derajat Keasaman	13

2.2.5	Konsistensi	13
2.2.6	Konsentrasi	13
2.2.7	Gerakan Massa	14
2.2.8	Motilitas	14
2.2.9	Viabilitas	15
2.2.10	Abnormalitas	15
2.2.11	Membran Plasma.....	16
2.2.12	Inti Spermatozoa.....	16
2.3	Deskripsi dan Klasifikasi Sapi Perah	17
2.4	Organ Reproduksi Jantan	18
2.5	Proses <i>Sexing</i> Spermatozoa.....	19
2.6	<i>Thawing</i>	20
2.7	Vitamin C	21
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN		24
3.1	Alat dan Bahan Penelitian	24
3.2	Rancangan Penelitian	24
3.3	Prosedur Penelitian.....	25
3.3.1	Pengambilan Semen Sapi	25
3.3.2	Parameter Pengamatan Makroskopis Semen	26
3.3.3	Parameter Pengamatan Mikroskopis Spermatozoa	27
3.3.4	Proses <i>Sexing</i> Spermatozoa	30
3.3.5	Pengenceran dan Penambahan Vitamin C dalam Media Pengencer	31
3.3.6	Pengemasan, Ekuilibrasi, Pembekuan dan <i>Thawing</i>	32
3.3.7	Pengukuran dan Pengamatan Parameter Mikroskopis	32

3.4	Analisa Data	33
3.5	Diagram Alir	34
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN		35
4.1	Hasil Penelitian	35
4.1.1	Kualitas Semen Segar	35
4.1.2	Kualitas Spermatozoa Hasil <i>Sexing</i>	35
4.1.3	Kualitas Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i>	36
4.2	Pembahasan	41
4.2.1	Kualitas Semen Segar dan Spermatozoa Hasil <i>Sexing</i>	41
4.2.2	Kualitas Spermatozoa Setelah <i>Thawing</i>	42
BAB V PENUTUP		50
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran	50
DAFTAR PUSTAKA		51
LAMPIRAN		58

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik Komponen Kimia Semen Sapi	11
Tabel 3.1 Matrik Pemberian Perlakuan Vitamin C pada Media Pengencer	25
Tabel 3.2 Kategori Konsistensi Semen	27
Tabel 3.3 Kategori Gerakan Massa	28
Tabel 4.1 Kualitas Semen Sapi Segar	35
Tabel 4.2 Kualitas Spermatozoa Hasil <i>Sexing</i>	35
Tabel 4.3 Motilitas Spermatozoa Sapi Perah Setelah <i>Thawing</i>	36
Tabel 4.4 Viabilitas Spermatozoa Sapi Perah Setelah <i>Thawing</i>	37
Tabel 4.5 Abnormalitas Spermatozoa Sapi Perah Setelah <i>Thawing</i>	38
Tabel 4.6 Integritas Membran Plasma Spermatozoa Sapi Perah Setelah <i>Thawing</i>	39
Tabel 4.7 Integritas Inti Spermatozoa Sapi Perah Setelah <i>Thawing</i>	41
Tabel 4.8 Persyaratan Kualitas Spermatozoa Sebelum Pembekuan	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi Spermatozoa Sapi	10
Gambar 2.2. Sapi Perah (<i>Bos taurus</i>) Jantan	18
Gambar 2.3. Rumus Bangun Vitamin C	21
Gambar 4.1. Viabilitas Spermatozoa Sapi Perah	44
Gambar 4.2. Abnormalitas Spermatozoa Sapi Perah	45
Gambar 4.3. Integritas Membran Plasma Spermatozoa Sapi Perah	46
Gambar 4.4. Integritas Inti Spermatozoa Sapi Perah	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Banyaknya Pengulangan	58
Lampiran 2. Pembuatan Larutan	59
Lampiran 3. Hasil Uji Analisis Variansi (ANAVA) (<i>SPSS 13.0 for Windows</i>)	61

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jumlah penduduk Indonesia yang bertambah setiap tahunnya, harus diimbangi dengan peningkatan taraf hidup, kesejahteraan masyarakat dan peningkatan kesadaran akan pentingnya kesehatan dan nilai gizi. Salah satu upaya untuk memenuhi nilai gizi masyarakat yaitu dengan mengonsumsi susu sapi. Namun demikian, produksi susu sapi perah belum dapat memenuhi kebutuhan susu dalam negeri karena populasi sapi perah yang belum mencukupi. Menurut Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, populasi sapi perah pada tahun 2015 sekitar 525.170 ekor. Jumlah tersebut hanya dapat mencukupi sekitar 30% kebutuhan susu dalam negeri, sedangkan 60-70% masih harus mengimpor (Utomo dan Miranti, 2010).

Peningkatan populasi sapi perah salah satunya dapat dilakukan dengan cara melakukan Inseminasi Buatan (IB) dan pemanfaatan proses *sexing* atau pemisahan spermatozoa X dan Y untuk mendukung peran IB dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan, karena dengan proses *sexing* dapat diperoleh jenis sapi yang diinginkan.

Pada saat ini, pelaksanaan IB sebagian besar menggunakan semen beku karena semen beku dapat digunakan dalam jangka waktu lama. Namun, semen beku memiliki kelemahan yaitu proses pembekuan yang dilakukan dapat menyebabkan kematian spermatozoa hingga 50% dan spermatozoa yang bertahan

hidup mempunyai fertilitas yang rendah (Lessard *et al.*, 2000). Untuk dapat mengaplikasikan semen beku, semen harus melewati proses *thawing*. *Thawing* merupakan proses mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu. Proses ini dapat menimbulkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran plasma yang berdampak pada kualitas spermatozoa (Salim, dkk., 2012). Pada proses *sexing* juga dapat menginduksi terjadinya kerusakan membran plasma, akrosom, selubung mitokondria, pelepasan berbagai enzim, penurunan kadar lipoprotein dan asam amino, aglutinasi kepala spermatozoa sehingga dapat mengakibatkan penurunan motilitas, fertilitas spermatozoa dan bahkan kematian spermatozoa (Yuliani, 2009).

Menurut Winarto (2010), terjadinya kerusakan pada spermatozoa disebabkan oleh stress oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak, sedangkan spermatozoa yang masih hidup sangat sensitif terhadap lingkungan luar (Yuliani dan Lukman, 2013). Perubahan suhu yang terjadi dan osmolaritas yang ekstrim selama proses IB, dapat memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Nebel, 2007; Moore *et al.*, 2005 dalam Sukmawati dkk., 2014). Menurut Sugiarti dkk., (2001), kualitas spermatozoa dapat ditingkatkan setelah mengalami proses pembekuan dengan penambahan vitamin C dalam media pengencer, karena vitamin C merupakan antioksidan yang berperan untuk menurunkan kepekaan membran plasma spermatozoa terhadap peroksidasi lipid yang terjadi akibat terbentuknya ROS.

Penelitian mengenai penambahan antioksidan sudah banyak dilakukan, tetapi penelitian tentang penambahan vitamin C dalam media pengencer untuk mendapatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* yang baik setelah *thawing* masih jarang dilakukan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh penambahan vitamin C dalam media pengencer terhadap kualitas spermatozoa sapi perah tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.

1.2 Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diidentifikasi masalah sebagai berikut:

1. Apakah penambahan vitamin C dalam media pengencer dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.
2. Berapakah konsentrasi vitamin C yang optimum dalam media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam media pengencer terhadap kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan konsentrasi vitamin C yang optimum dalam

media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang penggunaan vitamin C sebagai antioksidan yang ditambahkan dalam media pengencer sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*, sehingga memenuhi syarat untuk digunakan dalam program IB.

1.5 Kerangka Penelitian

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu cara yang digunakan untuk mendapatkan kualitas genetik yang baik (Herdis dan Rizal, 2008), sehingga dapat meningkatkan populasi dan produksi hewan ternak. Indonesia sudah melakukan IB sejak tahun 1975, namun keberhasilan dari teknologi tersebut masih tergolong rendah akibat dari rendahnya kualitas dari semen beku yang digunakan. Pada proses pembekuan, penurunan suhu yang rendah menyebabkan spermatozoa mengalami *cold shock* dan terjadi pembentukan kristal es. Menurut Goldman *et al.* (1991), spermatozoa yang dibekukan pada temperatur -196°C akan mengalami penurunan kualitas yaitu 30% spermatozoa akan mati selama proses pembekuan tersebut.

Prosedur *sexing* ikut berperan dalam menginduksi terjadinya kerusakan pada spermatozoa yang dapat mengakibatkan penurunan motilitas dan kematian

spermatozoa, sehingga menyebabkan penurunan fertilitas (Yuliani, 2009). Selain itu, *thawing* semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan. Hal ini dikarenakan prosedur *thawing* yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen (Evans dan Maxwell, 1976). Menurut Waluyo (2006) proses *thawing* dapat menyebabkan peroksidasi lipid, karena pada proses tersebut spermatozoa rentan terhadap oksidasi yang menyebabkan terjadinya radikal bebas terutama dalam bentuk radikal hidroksil (OH^\cdot). Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi berantai dengan asam lemak tak jenuh ganda pada membran plasma spermatozoa, sehingga proses *thawing* yang terlalu lama akan menyebabkan peroksidasi lipid yang semakin banyak.

Herdis (2005) juga menyatakan bahwa penurunan kualitas semen selama pengolahan, disebabkan oleh rusaknya membran plasma spermatozoa akibat peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid adalah proses oksidasi asam lemak tidak jenuh berantai ganda pada membran sel yang menghasilkan radikal bebas, dan akan merangsang terjadinya reaksi autokatalitik yang akan merusak ikatan ganda lipid penyusun membran sel. Hal ini menunjukkan bahwa membran sperma adalah target utama dari radikal bebas (Sanocka & Kurpisz, 2004 dalam Sukmawati, 2014). Peroksidasi lipid yang terjadi secara terus-menerus akan merusak struktur matriks lipid dan menyebabkan membran sel tidak stabil, mengubah fungsi membran sel serta menurunkan integritas membran plasma (Hayati dkk., 2006). Kerusakan sel spermatozoa akibat peroksidasi lipid dapat dilihat dari menurunnya motilitas, kemampuan fertilisasi, kerusakan enzim intraseluler serta kerusakan struktur membran plasma (Guthrie & Welch 2012).

Menurut Hariyatmi (2004), penurunan kualitas spermatozoa dapat diatasi dengan penambahan antioksidan untuk menetralkan stress oksidatif dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan radikal bebas terhadap sel normal. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron pada radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas.

Vitamin C merupakan antioksidan yang berperan untuk menurunkan kepekaan membran plasma spermatozoa terhadap peroksidasi lipid (Padayatty, 2003). Vitamin C larut dalam air karena mempunyai potensial redoks rendah, namun efektif dalam menghambat peroksidasi lipid karena berperan sebagai penangkal radikal bebas. Menurut Sugiarti dkk. (2001), penambahan antioksidan berupa vitamin C pada media pengencer sebanyak 0,88 mg/ml dapat mengurangi penurunan kualitas spermatozoa setelah *thawing*. Selain itu Amin dkk. (1998), menyatakan bahwa kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) setelah *thawing* dapat ditingkatkan dengan mengganti plasma semen kerbau lumpur dengan plasma semen sapi yang mengandung vitamin C. Menurut Aslam dkk. (2014), penambahan vitamin C sebesar 0,50 g/100 ml dalam media pengencer dapat meningkatkan motilitas dan ketahanan membran plasma setelah *thawing* dibandingkan dengan kontrol.

Berdasarkan uraian di atas, diharapkan peningkatan populasi sapi perah dapat dilakukan dengan aplikasi teknik reproduksi IB menggunakan spermatozoa tanpa sexing dan hasil sexing yang berkualitas baik, sedangkan untuk mendapatkan kualitas spermatozoa tanpa sexing dan hasil sexing setelah *thawing*

dapat dilakukan dengan penambahan vitamin C dalam media pengencernya. Dengan teknik tersebut diharapkan mampu meningkatkan produktivitas populasi sapi perah dengan kualitas genetika yang lebih baik, dan juga dapat mengoptimalkan fungsi seekor pejantan sapi perah.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan uraian pada kerangka pemikiran dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Penambahan vitamin C dalam media pengencer dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.
2. Terdapat konsentrasi vitamin C yang optimum dalam media pengencer untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi perah (*Bos taurus*) tanpa *sexing* dan hasil *sexing* setelah *thawing*.

1.7 Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental di Laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah pemisahan sperma, yaitu spermatozoa tanpa *sexing* serta spermatozoa X dan Y hasil *sexing*. Faktor kedua adalah konsentrasi vitamin C yang ditambahkan dalam media pengencer yaitu 0% (K), 0,25% (P₁), 0,50% (P₂) dan 0,75% (P₃). Pengulangan perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali dengan waktu penampungan semen sebagai ulangnya.

Sampel penelitian adalah sperma sapi perah yang dikoleksi menggunakan vagina buatan. Setelah semen ditampung, lalu kualitas semen diamati secara makroskopis (warna, bau, volume, derajat keasaman (pH), dan konsistensi) dan mikroskopis (konsentrasi, gerakan massa, motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran plasma dan integritas inti). Semen kemudian dibagi menjadi 1/3 bagian untuk perlakuan tanpa *sexing* dan 2/3 bagian untuk *sexing* yang dipisahkan dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) didasarkan atas perbedaan motilitas sperma X dan Y. Semen tanpa *sexing* dan hasil *sexing*, selanjutnya diberi pengencer Tris-Sitrat buffer dan vitamin C dengan konsentrasi sesuai perlakuan. Semen selanjutnya dikemas dalam *straw* dan diekuilibrasikan, kemudian dibekukan. Setelah mengalami pembekuan selama 24 jam, semen dicairkan kembali (*thawing*) untuk dilakukan pengamatan secara mikroskopis. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variansi (ANOVA), bila berbeda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan dengan taraf kepercayaan 95% pada *software* SPSS (13.0).

1.8 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2015 sampai dengan Juli 2015 di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong dan analisis data dilakukan di Laboratorium Struktur, Fungsi dan Perkembangan Hewan, Program Studi Biologi, Universitas Padjadjaran.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

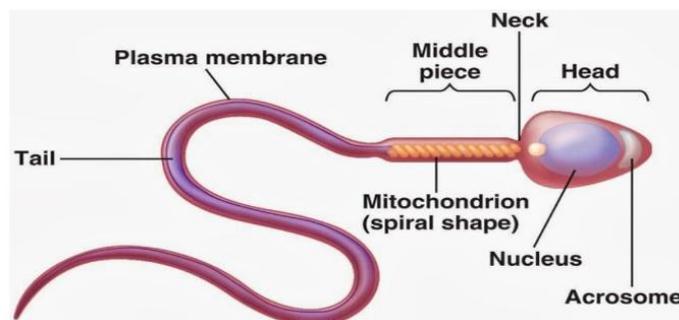
2.1 Karakteristik Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel haploid yang dibentuk di dalam testis melalui proses yang disebut spermatogenesis dan mengalami pematangan lebih lanjut di dalam epididimis, tempat spermatozoa disimpan sampai terjadinya ejakulasi. Spermatozoa dibentuk dalam tubuli seminiferi yang berada di dalam testis. Tubulus ini berisi rangkaian sel yang komplek yaitu perkembangan atau pembelahan sel dari germinal sampai dengan terbentuknya spermatozoa atau gamet jantan (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang normal memiliki bagian-bagian yang terdiri atas kepala, bagian penghubung (leher) dan ekor (Hayati, 2011).

Kepala spermatozoa secara umum berbentuk bulat memanjang atau oval. Bagian kepala spermatozoa sebagian besar berisi inti sel yang mengandung materi genetik (DNA dan RNA). Dua pertiga bagian depan inti spermatozoa ditutupi oleh akrosom. Letak akrosom terdapat pada bagian ujung kepala di antara membran inti dan membran sel. Di antara kedua membran tersebut terdapat matriks akrosom. Di dalam matriks terdapat berbagai enzim hidrolitik antara lain enzim hialuronidase dan akrosin. Enzim tersebut akan dikeluarkan dalam rangkaian reaksi akrosom yaitu reaksi pelepasan anzim-enzim dari akrosom untuk menembus lapisan-lapisan pada oosit. Kepala dan ekor dihubungkan oleh bagian

leher yang merupakan potongan penghubung (*connecting piece*) (Albert *et al.*, 1994).

Berdasarkan letak, struktur dan fungsinya, ekor spermatozoa dapat dibagi atas tiga bagian yaitu bagian tengah (*middle piece*), bagian utama (*principle piece*) dan bagian akhir (*end piece*). Pada ekor spermatozoa terdapat mitokondria yang berbentuk spiral dan dilindungi oleh membran sel. Mitokondria merupakan tempat untuk sintesis energi dalam bentuk ATP (*adenosin triphosphate*) yang digunakan spermatozoa untuk bergerak. Sebagian besar sitoplasma penyusun spermatozoa telah diarsorpsi oleh sel Sertoli di tubulus seminiferus pada saat spermiogenesis (Albert *et al.*, 1994). Secara umum, morfologi spermatozoa sapi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Morfologi Spermatozoa Sapi (Nalbandov, 1990)

2.2 Kualitas Semen

Semen atau cairan mani adalah hasil sekresi kelamin jantan yang terdiri dari spermatozoa dan plasma semen (Garner dan Hafez, 2000). Spermatozoa merupakan sel kelamin jantan, sedangkan plasma semen adalah cairan atau medium semi-gelatinus bagi spermatozoa. Plasma semen merupakan campuran

sekret yang dibuat oleh epididimis, kelenjar vesikula dan prostat yang berfungsi sebagai sumber energi untuk gerak dan metabolisme sel spermatozoa. Plasma semen berguna sebagai buffer dan medium bagi spermatozoa agar dapat bertahan lama setelah ejakulasi. Plasma semen mempunyai pH sekitar 7,0 dan tekanan osmotik sama dengan darah dan NaCl 0,9 % atau NaCl fisiologis (Toelihere, 1993). Menurut Hafez dan Hafez (2000), semen sapi memiliki karakteristik komponen kimia seperti pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Karakteristik Komponen Kimia Semen Sapi

Komponen	Semen Sapi
Protein (g/100ml)	65 – 95
Derajat Keasaman (pH)	6,4 – 7,8
Fruktosa (mg/100ml)	460 – 600
Sorbitol (mg/100ml)	10 – 140
Asam Sitrat (mg/100ml)	620 – 806
Inositol (mg/100ml)	25 – 46
<i>Glyceryl Phosphoryl Choline (GPC)</i> (mg/100ml)	100 – 500
Sodium (mg/100ml)	225 – 250
Potassium (mg/100ml)	140 – 155
Kalsium (mg/100ml)	40 – 50
Magnesium (mg/100ml)	8 – 10
Khloride (mg/100ml)	174 – 320

Pemeriksaan terhadap kualitas semen dan spermatozoa dapat dilakukan dengan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis, seperti berikut:

2.2.1 Warna

Menurut Garner dan Hafez (2000) ejakulat normal spermatozoa sapi berwarna krem sampai putih susu, sedangkan spermatozoa dengan konsentrasi

yang rendah akan terlihat bening dan tembus cahaya. Semakin banyak konsentrasi spermatozoa dalam semen akan mengakibatkan semen menjadi lebih kental dan warna menjadi lebih pekat. Sekitar 10% sapi-sapi jantan menghasilkan semen yang normal berwarna kekuning-kuningan yang disebabkan oleh pigmen *riboflavin* yang dibawa oleh satu gen autosom resesif dan tidak mempunyai pengaruh terhadap fertilitas. Selain itu, semen yang berwarna merah gelap sampai merah muda menandakan adanya darah segar yang berasal dari saluran kelamin uretra atau penis. Warna kecoklatan atau kehijauan menunjukkan kemungkinan kontaminasi dengan *faeces* (Toelihere, 1993).

2.2.2 Bau

Variabel pemeriksaan bau pada semen jarang dilakukan karena tidak berhubungan dengan kualitas spermatozoa. Umumnya bau semen dikategorikan sebagai bau khas (Herdis dan Rizal, 2008). Menurut Subrata (1999), bau tersebut berasal dari oksidasi spermin yang dihasilkan kelenjar prostat. Jika tidak ada bau khas mani, berarti prostat tidak aktif. Namun jika tercium bau busuk atau bau amis menandakan terdapatnya infeksi pada prostat.

2.2.3 Volume

Volume merupakan salah satu standar minimum untuk evaluasi kualitas semen yang akan digunakan untuk IB (Garner dan Hafez, 2000). Menurut Toelihere (1993), volume semen setiap ejakulat berbeda tergantung pada genus, umur, berat badan, tingkatan makanan, dan frekuensi penampungan. Menurut Feradis (2010), penurunan volume ejakulasi disebabkan karena frekuensi ejakulasi. Volume semen yang rendah bila disertai dengan konsistensi semen yang

rendah maka jumlah spermatozoa rendah. Hafez dan Hafez (2000) menyatakan bahwa volume semen sapi berkisar antara 5 – 8 ml/ejakulasi.

2.2.4 Derajat Keasaman

Feradis (2010) menyatakan bahwa setiap genus sapi memiliki nilai derajat keasaman yang berbeda. Nilai derajat keasaman (pH) dapat dilihat dengan cara mencocokkan warna dari kertas lakmus yang telah ditetesi semen dengan warna pada indikator pH kertas lakmus (Garner dan Hafez, 2000). Menurut Garner dan Hafez (2000), pada umumnya sperma dapat bertahan hidup lama pada pH 7,0 karena pH semen segar berkisar antara 6,4 – 7,8.

2.2.5 Konsistensi

Konsistensi berkaitan dengan jumlah spermatozoa dalam semen. Menurut Toelihere (1993), semen sapi dengan konsistensi kental memiliki konsentrasi lebih dari 1500×10^6 sel spermatozoa per ml. Konsistensi sedang memiliki konsentrasi $1000-1500 \times 10^6$ sel spermatozoa per ml. Konsistensi encer memiliki konsentrasi kurang dari 1000×10^6 sel spermatozoa per ml, serta yang jernih seperti air kurang dari 50×10^6 sel spermatozoa per ml per ml.

2.2.6 Konsentrasi

Konsentrasi atau jumlah spermatozoa untuk setiap jenis hewan berbeda-beda. Jumlah spermatozoa yang diejakulasi tidak terpengaruh oleh ukuran badan pejantan. Penentuan kriteria kualitas semen salah satunya dengan menentukan penilaian konsentrasi atau jumlah spermatozoa permililiter semen. Penilaian konsentrasi semen dapat menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai (Toelihere, 1993). Jumlah sel spermatozoa setiap unit volume semen sapi

bervariasi dari $0-3000 \times 10^6$ sel spermatozoa setiap ml atau dari keadaan azoospermia sampai yang sangat padat. Konsentrasi spermatozoa yang berderajat tinggi biasanya berkisar dari antara $800 - 2000 \times 10^6$ spermatozoa/ml (Hafez dan Hafez 2000).

2.2.7 Gerakan Massa

Gerakan massa adalah kecenderungan spermatozoa untuk bergerak bersama-sama kesatu arah, sehingga membentuk gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat. Gerakan massa yang terbentuk, tergantung pada konsentrasi spermatozoa yang hidup di dalamnya (Toelihere, 1993).

2.2.8 Motilitas

Motilitas umumnya digunakan sebagai parameter kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Menurut Cancel *et al.*, (2000), kecepatan motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh faktor umur dan bahan kimia. Terjadinya peningkatan abnormalitas pada bagian ekor akan mempengaruhi motilitas organisme yang sudah tua. Sesuai dengan bentuk morfologinya, spermatozoa hidup dapat mendorong dirinya sendiri maju ke depan di dalam lingkungan zat cair. Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme spermatozoa yang didukung oleh lingkungan yaitu suhu dan komponen-komponen di dalam medium pengencer (Toelihere, 1993).

Menurut Toelihere (1993), pemeriksaan motilitas spermatozoa merupakan satu-satunya cara penentuan kualitas semen sesudah pengenceran. Penilaian motilitas spermatozoa yang baik, dapat dilihat pola pergerakan progresif atau gerakan aktif maju ke depan. Gerakan melingkar atau gerakan mundur merupakan

tanda bahwa spermatozoa mengalami *cold shock*. Gerakan spermatozoa yang berayun dan berputar-putar di tempat biasanya menandakan semen sudah tua dan apabila kebanyakan spermatozoa berhenti bergerak dianggap mati. Menurut Direktorat Jenderal Peternakan (2007), motilitas spermatozoa pada pemeriksaan mikroskopis sebelum pengenceran minimal 70% dan syarat minimal spermatozoa yang motil progresif setelah pengenceran adalah 55%. Kemudian pada pengujian setelah *thawing*, spermatozoa yang motil progresif minimal 40%.

2.2.9 Viabilitas

Salisbury dan vanDemark (1985) menyatakan bahwa persentase hidup spermatozoa dapat dihitung dengan melihat reaksi spermatozoa terhadap zat warna tertentu. Menurut Partodihardjo (1992), sel-sel spermatozoa yang hidup akan sedikit sekali menyerap warna atau bahkan tidak menyerap zat warna karena membran plasma sperma masih utuh dan tidak mengalami kerusakan. Sedangkan sel-sel yang mati akan menyerap warna karena permeabilitas dinding sel menjadi lebih tinggi. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi viabilitas spermatozoa seperti pengaruh pH, tekanan osmotik, elektrolit dan non elektrolis, media pengenceran serta pengaruh suhu (Toelihere, 1993).

2.2.10 Abnormalitas

Menurut Toelihere (1993) spermatozoa yang berbentuk abnormal tidak dapat membuahi ovum. Bentuk abnormal dapat dibedakan antara bentuk abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer merupakan ketidaknormalan morfologi yang terjadi selama proses spermatogenesis, sedangkan abnormalitas sekunder merupakan ketidaknormalan morfologi yang

terjadi selama spermatozoa melewati saluran reproduksi atau karena perlakuan setelah ejakulasi. Abnormalitas primer meliputi kepala yang besar (*macrocephalic*), kepala yang kecil (*microcephalic*), kepala pendek melebar, kepala pipih memanjang, kepala rangkap, ekor ganda, ekor melingkar, bagian tengah spermatozoa melipat, membengkok, melebar, filiformis. Abnormalitas sekunder meliputi ekor yang putus, kepala tanpa ekor dan bagian tengah yang melipat. Berdasarkan kriteria tersebut, abnormalitas primer lebih berbahaya karena sebagian bersifat genetik (Rauge, 2003). Apabila sperma sapi mengalami abnormalitas berkisar 30 sampai 35% menunjukkan bahwa adanya infertilitas atau ketidaksuburan pada pejantan tersebut (Toelihere, 1993).

2.2.11 Membran Plasma

Membran plasma adalah bagian sel yang membatasi bagian dalam sel dengan lingkungan di sekitarnya (Partodihardjo, 1992). Integritas membran plasma yang baik merupakan hal yang harus dimiliki spermatozoa, karena membran plasma memegang peranan dalam mengatur seluruh proses biokimia dalam sel. Selain berfungsi menjaga organel-organel sel secara fisik, membran plasma juga berperan dalam mengatur lalu lintas keluar masuk senyawa biokimia ke dalam sel yang dibutuhkan selama proses biokimia berlangsung (Rizal, 2002).

2.2.12 Inti Spermatozoa

Inti spermatozoa terletak pada bagian kepala. Pada bagian inti spermatozoa mengandung kromatin yang tersusun atas DNA dan protein-protein dasar seperti protamin yang banyak mengandung asam amino arginina dan sisteina yang berfungsi sebagai pelindung kromatin (Curry dan Watson, 1995).

dalam Sali dkk, 2006). DNA atau asam deoksiribonukleat (*deoxyribonucleic acid*) merupakan biomolekul yang berupa rangkaian asam nukleat yang terdapat dalam inti sel (*nucleus*) pada sel eukariotik sedangkan pada sel prokariotik DNA tersebut berada di sitoplasma. DNA merupakan komponen penting dalam proses fertilisasi untuk menyampaikan seluruh informasi genetik paternal yang akan diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya (Campbell dkk., 2004).

Menurut Sali dkk, (2006), salah satu proses penyimpanan spermatozoa yaitu proses pengeringbekuan dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan akrosom spermatozoa bahkan berpotensi dapat mengubah integritas kromatin dan DNA spermatozoa. Integritas DNA sangat penting bagi spermatozoa untuk berperan dalam proses pembentukan pronukleus pada peristiwa fertilisasi. Pada proses penyimpanan semen beku, *sexing* hingga *thwaing* juga berpotensi mengubah integritas kromatin dan DNA spermatozoa (Goldman et al., 1991; Yuliani, 2009).

2.3 Deskripsi dan Klasifikasi Sapi Perah

Sapi Friesian Holstein (FH) merupakan jenis sapi yang berasal dari Belanda. Sapi FH berukuran besar dengan total-totol warna hitam dan putih pada tubuhnya. Sapi jenis ini mempunyai beberapa keunggulan, yaitu jinak dan mudah menyesuaikan diri dengan keadaan lingkungan (Sudono dkk.,2003). Ciri-ciri sapi perah jantan menurut Blakely dan Bade (1998), yaitu memiliki kepala yang lebar, leher besar, pinggang lebar dan punggung yang kuat. Selain itu, dadanya lebar,

badan panjang, lingkaran dada dan lingkaran perut besar, berumur 4-5 tahun, memiliki kesuburan tinggi, berasal dari induk yang baik dan besar badannya sesuai dengan umur. Sapi jantan jenis ini dapat mencapai berat badan 1.000 kg dan berat badan ideal betina adalah 635 kg. Morfologi sapi perah jantan dapat dilihat pada Gambar 2.2. Menurut Blakely dan Bade (1998), sapi FH memiliki taksonomi sebagai berikut:



<i>Kingdom</i>	Animalia
<i>Phylum</i>	Chordata
<i>Class</i>	Mammalia
<i>Ordo</i>	Artiodactyla
<i>Famili</i>	Bovidae
<i>Genus</i>	<i>Bos</i>
<i>Spesies</i>	<i>B. Taurus</i>

Gambar 2.2 Sapi Perah (*Bos taurus*) Jantan

Sumber : LIC International

Sapi FH adalah sapi perah yang produksi susunya lebih tinggi dibandingkan jenis sapi perah lainnya dengan kadar lemak susu yang rendah rata-rata 3,7%. Di Indonesia sapi jenis ini dapat menghasilkan susu mencapai 20 liter/hari, dengan rata-rata produksi 10 liter/hari atau 3.050 kg susu dalam 1 kali masa laktasi. Di Amerika sapi ini dapat memproduksi lebih dari 7.000 kg susu dalam 1 kali masa laktasi (Sudono dkk.,2003).

2.4 Organ Reproduksi Jantan

Organ reproduksi jantan terdiri atas organ kelamin primer dan sekunder (Hayati, 2011). Organ kelamin primer yaitu testis yang berjumlah dua buah dan terdapat di dalam suatu kantong pelindung yang disebut skrotum. Testis berfungsi

menghasilkan gamet jantan atau spermatozoa (Saputro, 2008). Di dalam skrotum, testis dibungkus oleh lapisan jaringan ikat yang disebut tunika vaginalis dan tunika albuginea. Tunika vaginalis merupakan selaput membran yang tersusun oleh jaringan ikat yang terletak di bagian luar, sedangkan tunika albuginea terletak dibagian dalam. Di dalam testis terdapat tubulus seminiferus yang berperan sebagai unit fungsional untuk proses spermatogenesis (Hayati, 2011).

Organ kelamin sekunder meliputi tubulus rektus, rete testis, vas eferen, epididimis, vas deferens, uretra, penis dan beberapa kelenjar asesoris seperti vesikularis, prostat dan Cowper (bulbouretralis). Epididimis merupakan tempat untuk pematangan spermatozoa yang berdasarkan posisinya dibedakan atas tiga bagian yaitu epididimis bagian kepala (kaput), badan (korpus) dan ekor (kauda). Pada ketiga bagian tersebut, spermatozoa yang matang paling banyak dijumpai pada bagian kauda. Kelenjar asesoris berfungsi menghasilkan cairan sebagai media atau salah satu komponen semen selain spermatozoa. Seluruh organ kelamin tersebut berpangkal pada testis dan tersambung ke uretra dan penis yang merupakan organ keluarnya urine, sekresi kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap dan sel-sel kelamin jantan (Toelihere, 1993).

2.5 Proses Sexing Spermatozoa

Sexing atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan salah satu cara untuk mendapatkan jenis kelamin keturunan yang diinginkan, dalam rangka mendukung Inseminasi Buatan (IB). Menurut Hafez dan Hafez (2000), berbagai metode *sexing* yang telah dilakukan antara lain metode sedimentasi, *albumin*

column, sentrifugasi gradien densitas *percoll*, *electrophoresis*, *H-Y antigen*, *flow cytometry*, dan filtrasi dengan *sephadex column*. Metode yang sering digunakan dan memenuhi standar untuk produksi dan aplikasi pemisahan spermatozoa X dan spermatozoa Y pada sapi adalah teknik pemisahan dengan kolom albumin.

Penggunaan metode pemisahan dengan kolom albumin menghasilkan pemisahan terbaik untuk spermatozoa mamalia karena memiliki tingkat keberhasilan mencapai 75-85% (Hafez dan Hafez, 2000). Namun, keberhasilan teknik albumin tergantung dari spesies, motilitas spermatozoa, penanganan semen saat pemisahan, konsentrasi albumin dan perbedaan tingkat konsentrasi albumin (Meistrich, 1982 *dalam* Kaiin dkk., 2003).

Albumin telur dapat memisahkan spermatozoa berkromosom X dan Y, berdasarkan pada perbedaan motilitas. Massa dan ukuran kepala spermatozoa Y lebih kecil dibandingkan dengan spermatozoa X, hal ini dapat menyebabkan spermatozoa Y lebih mampu bergerak cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki kolom albumin yang lebih pekat (Afiati, 2004).

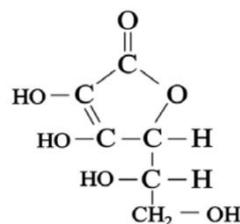
2.6 Thawing

Thawing adalah proses pencairan kembali semen yang telah dibekukan di dalam *straw*. Proses *thawing* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu air dan waktu *thawing* (Adikarta dan Listianawati, 2001). Proses *thawing* dapat mempengaruhi stabilitas dan fungsi membran sel spermatozoa (Bor *et al.*, (1997). Menurut Evans dan Maxwell (1976) metode *thawing* yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitasnya.

Direktorat Jenderal Peternakan membuat standarisasi metode *thawing* yaitu penggunaan air suhu 37° C selama 30 detik. Namun, pelaksanaan di lapangan terdapat beberapa metode *thawing* antara lain penggunaan air es, air sumur, dan pelepah pisang. Faktor kemudahan pelaksanaan menjadi pertimbangan inseminator dalam pelaksanaan *thawing*, karena semen yang sudah dicairkan atau *thawing* harus diinseminasikan dalam waktu kurang dari 5 menit (Toelihere, 1993).

2.7 Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat memiliki bentuk kristal berwarna putih agak kuning, tidak berbau, mudah larut dalam air, asam, dan mudah mencair antara suhu 190° C sampai dengan 192° C. Selain itu, vitamin C mudah rusak oleh oksidasi yang dipercepat pada suhu tinggi, pemanasan yang terlalu lama, pengeringan dan lama penyimpanan. Vitamin C terdapat dalam bentuk asam askorbat (tereduksi) maupun dehidroaskorbat (teroksidasi) (Lavoiser, 1998). Vitamin C memiliki struktur yang sama dengan glukosa. Rumus molekul vitamin C adalah $C_6H_8O_6$ dan berat molekulnya adalah 176,13.



Gambar 2.3. Rumus Bangun Vitamin C (Douglas, 2005)

Vitamin C berperan sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari molekul lainnya. Reaksi oksidasi adalah reaksi kimia yang

melepaskan elektron dari substansi ke agen oksidan. Reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Oksigen merupakan molekul yang sangat reaktif dengan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan radikal bebas. Radikal bebas menyerang membran dan merusak sel, sehingga sel tersebut membutuhkan sistem kekebalan untuk melawannya. Antioksidan bekerja dengan melindungi lipid dari proses peroksidasi yang dihasilkan radikal bebas. Ketika radikal bebas mendapat elektron dari antioksidan, maka radikal bebas tersebut tidak lagi menyerang sel dan reaksi rantai oksidasi akan terputus (Abramson dan Vaccarino, 2002).

Menurut Padayatty (2003), oksidasi dapat terjadi karena adanya reaksi antara oksigen dengan lipid, protein dan DNA. Reaksi oksidasi yang terjadi antara oksigen dan lipid yaitu menguraikan asam lemak tidak jenuh menjadi aldehida (MDA). Lipid yang bereaksi dengan oksigen akan membentuk peroksidasi lipid. Hasil peroksida lipid dalam kadar tinggi akan menyebabkan toksik bagi membran sel (Padayatty, 2003).

Pada protein juga dapat terjadi proses oksidasi yaitu dengan proses pelepasan elektron yang terjadi pada senyawa protein. Oksidasi protein diawali dengan bereaksinya molekul protein dengan OH, O₂ atau keduanya. Proses oksidasi protein dapat terjadi dengan adanya ROS. Senyawa ROS dapat mengubah struktur dan fungsi suatu protein menjadi abnormal yang diduga karena terjadinya hambatan selama proses transkripsi dan translasi (Berlett dan Earl, 1997). Menurut Berlett dan Earl (1997), pada spermatozoa, terdapat inti yang membawa materi genetik dari parental. Materi genetik tersebut tersimpan dalam

bentuk DNA. Reaksi antara oksigen dengan DNA akan menyebabkan gangguan pada sintesis DNA yang mengakibatkan menurunnya kualitas spermatozoa. Penyebab kerusakan DNA karena oksidasi diantaranya adalah stress oksidasi yang disebabkan oleh mikroba patogen, bahan kimia yang bersifat toksik dan tingginya kadar ROS.

Vitamin C dalam bentuk asam askorbat adalah bahan yang memiliki kemampuan dalam mereduksi dan bertindak sebagai antioksidan dalam berbagai reaksi hidroksilasi. Sebagai penangkal radikal bebas, vitamin C dapat langsung bereaksi dengan superoksida dan anion hidroksil, serta berbagai hidroperoksida lipid. Vitamin C merupakan suatu donor elektron dan agen pereduksi. Dengan mendonorkan elektronnya, vitamin ini mencegah senyawa-senyawa lain agar tidak teroksidasi (Frei *et al.*, 1990). Dalam hal ini, vitamin C bertindak sebagai antioksidan dan akan bereaksi dengan oksigen sehingga tidak terjadi proses oksidasi lipid, oksidasi protein dan oksidasi DNA (Berlett dan Earl, 1997).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat *filling, sealing* dan *printing straw* (Minitube), aplikasi SPSS (13.0) *for windows*, *Axio Cam MR3* (Zeiss), *freezer* (Ing Climas), *hot plate-magnetic stirrer* (Minitube), kaca objek (Sail brand), kaca penutup (Cover Glass), kertas lakmus (Merck), *laminar flow* (Telstar BH-100), mikro pipet (Eppendorf), mikroskop cahaya (Olympus), neraca listrik (Vibra), *refrigerator* (Ing Climas), sentrifugator (Hettich EBA 20), *stopwatch*, *straw* midi (0,5 ml), tabung gelas (Pyrex), tabung nitrogen cair, tabung penampung (Corning), termometer, vagina buatan, *warm plate* (Minitube), *waterbath* (Memmert).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *acridine orange*, asam asetat, asam askorbat (vitamin C) (Sigma), aquabidestilata (Ikhaparmindo), *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Probumin), DPBS 1000x, etanol, larutan *Brackett-Oliphant* (BO), larutan HOS, larutan *Tris-Citrat Buffer* (Sigma), nitrogen cair, methanol, pewarna eosin nigrosin (Merck) dan sperma sapi perah.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental di Laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial (3x4) dengan 3 kali ulangan. Rancangan ini terdiri dari dua faktor yaitu pemisahan spermatozoa dan

penambahan vitamin C dalam media pengencer. Faktor pertama adalah pemisahan spermatozoa, yaitu spermatozoa tanpa *sexing* serta spermatozoa X dan Y hasil *sexing*, sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi vitamin C yang ditambahkan dalam media pengencer yaitu 0% (K), 0,25% (P₁), 0,50% (P₂) dan 0,75% (P₃). Pengulangan perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali dengan waktu penampungan semen sebagai ulangnya. Adapun perlakuan yang diberikan seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Matrik Pemberian Perlakuan Penambahan Vitamin C pada Media Pengencer

Konsentrasi Vitamin C	Jenis Spermatozoa		
	Tanpa <i>Sexing</i> (S _{XY})	Spermatozoa X (S _X)	Spermatozoa Y (S _Y)
Kontrol Konsentrasi vitamin C 0%	KS _{XY}	KS _X	KS _Y
P ₁ Konsentrasi vitamin C 0,25%	P ₁ S _{XY}	P ₁ S _X	P ₁ S _Y
P ₂ Konsentrasi vitamin C 0,50%	P ₂ S _{XY}	P ₂ S _X	P ₂ S _Y
P ₃ Konsentrasi vitamin C 0,75%	P ₃ S _{XY}	P ₃ S _X	P ₃ S _Y

Keterangan :

- K : Kontrol
- P : Perlakuan yang diberikan
- S : Jenis spermatozoa yang digunakan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel Semen

Semen ditampung dari sapi perah dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan

disiapkan dengan memasang kedua selubung pada alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air. Waktu penampungan semen dilakukan setiap 7 hari sekali, semen yang diperoleh pada hari ke 7, 14, dan 21 digunakan sebagai ulangan. Setelah semen ditampung, secepatnya kualitas semen tersebut diamati secara makroskopis (warna, bau, volume, pH dan konsistensi) dan mikroskopis (konsentrasi, gerakan massa, motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran plasma utuh dan integritas inti). Hanya semen yang memiliki gerakan massa minimal dalam kategori baik (gelombang – gelombang tipis, jarang dan lambat) dan motilitas $\geq 70\%$, abnormalitas $< 20\%$ dan konsentrasi $> 1.000 \times 10^6$ ml yang digunakan dalam penelitian (Arifyantini, 2012).

3.3.2 Parameter Pengamatan Makroskopis Semen

Pemeriksaan makroskopis semen meliputi beberapa parameter yaitu:

1) Warna

Pengamatan warna semen dilakukan dengan cara melihat langsung pada semen yang sudah ditampung di dalam tabung penampungan dengan latar belakang putih. Menurut Garner dan Hafez (2000) ejakulat normal semen sapi berwarna krem sampai putih susu, sedangkan spermatozoa dengan konsentrasi yang rendah akan terlihat bening dan tembus cahaya.

2) Bau

Pemeriksaan bau semen dilakukan dengan cara menghirup langsung dari tempat tabung penampungan semen. Bau semen yang normal sangat khas seperti bau kaporit atau seperti bau bunga akasia (Subrata, 1999).

3) Volume

Volume semen diukur dengan membaca skala yang terdapat pada tabung penampungan. Menurut Hafez dan Hafez (2000), volume ejakulasi normal sapi 5 – 8 ml.

4) Derajat Keasaman (pH)

Pemeriksaan pH semen dilakukan dengan cara kertas lakmus ditetesi semen hingga terdapat perubahan warna. Perubahan warna tersebut dicocokkan dengan indikator pH atau pH meter. Menurut Hafez dan Hafez (2000), pH semen sapi yang normal 6,4 – 7,8.

5) Konsistensi

Konsistensi diperiksa berdasarkan atas konsentrasi semen yang sebelumnya telah dihitung dengan menggunakan *spectrophotometer*. Menurut Toelihere (1993), kategori konsistensi semen dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Kategori Konsistensi Semen

Konsentrasi	Kategori
< 1000 x 10 ⁶ ml	Encer
1000-1500 x 10 ⁶ ml	Sedang
> 1500 x 10 ⁶ ml	Kental

3.3.3 Parameter Pengamatan Mikroskopis Spermatozoa

Pemeriksaan mikroskopis spermatozoa meliputi beberapa parameter yaitu:

1) Konsentrasi

Pemeriksaan konsentrasi semen dilakukan dengan menggunakan alat *spectrophotometer*. Sebanyak 350 µl semen dicampur dengan 3,5 ml NaCl 0,9% dan selanjutnya dihomogenkan. Setelah homogen dimasukkan ke dalam *spectrophotometer*, kemudian dimasukkan data volume dan motilitas yang sudah

didapat sebagai data pendukung. Setelah itu jumlah konsentrasi semen dapat dilihat dan juga didapatkan banyaknya volume pengencer yang akan digunakan.

2) Gerakan Masa

Pengamatan gerakan masa dapat dilakukan dengan meletakkan 10 μ l semen diatas kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup. Kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Menurut Toelihere (1993) kategori untuk gerakkan masa sperma dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Kategori Gerakan Masa

Kategori	Tanda	Keterangan	Nilai
Sangat baik	+++	Gelombang-gelombang besar dengan jumlah banyak, tebal dan gelap dengan gerakan cepat	4
Baik	++	Gelombang-gelombang tipis, jarang dan lambat	3
Cukup	+	Tidak terdapat gelombang, tetapi terlihat gerakan sperma sendiri-sendiri	2
Buruk	0	Hanya sedikit atau tidak ada gerakan sama sekali	1

3) Motilitas

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan kaca objek yang ditetesi 10 μ l semen dan tutup dengan kaca penutup. Kemudian diperiksa dengan pembesaran 200 kali menggunakan mikroskop cahaya yang dihubungkan dengan layar monitor. Spermatozoa yang motil akan nampak bergerak maju ke depan, kemudian dihitung dengan *software spermvision* dan dinyatakan dalam persen (%). Pengamatan dilakukan sebanyak 5 lapangan pandang atau jumlah total spermatozoa minimal 100-200 spermatozoa.

4) Viabilitas

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan cara 10 μ l sampel ditambahkan dengan 20 μ l pewarna eosin negrosin, kemudian dibuat preparat

ulas. Selanjutnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali terhadap 100 spermatozoa dan diulangi sebanyak 3 kali. Nilai viabilitas spermatozoa diperoleh dari rata-rata sperma yang masih hidup. Spermatozoa yang mati akan terwarnai, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak terwarnai (Toelihere, 1993).

5) Abnormalitas

Morfologi spermatozoa diamati dari sediaan apusan spermatozoa yang digunakan untuk viabilitas. Pengamatan morfologi dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 terhadap 100 spermatozoa dan diulangi sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan dirata-ratakan dan dinyatakan dalam persen. Pemeriksaan morfologi dihitung dari jumlah persentase spermatozoa normal, spermatozoa yang mengalami abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder (Toelihere, 1993).

6) Integritas Membran Plasma

Pengamatan integritas membran plasma dilakukan dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling (HOS) Test* (Fonseca *et al.* 2005 dalam Sukmawati dkk., 2014) (Lampiran 2B). Sebanyak 20 μ L semen dimasukkan dalam 200 μ L larutan HOS, lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit. Setelah diinkubasi, 10 μ L suspensi kemudian diteteskan pada gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 terhadap 100 spermatozoa dan diulangi sebanyak 3 kali. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma yang

baik ditandai oleh ekor melingkar atau menggebu, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

7) Integritas Inti

Pengamatan integritas inti dilakukan dengan menggunakan *acridine orange test* (Kazerooni *et al.*, 2009). Preparat ulas dibuat pada kaca objek, kemudian dikering-udarkan. Selanjutnya preparat direndam di dalam larutan asam asetat : methanol (1:3) selama 2 jam. Setelah itu, preparat dikering-udarkan kembali dan direndam dalam larutan *acridine orange* selama 1 malam. Kemudian preparat dibilas dengan menggunakan aquades dan dikering-udarkan. Setelah kering, preparat ditutup kaca penutup yang direkatkan dengan kutek bening. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan *Axio Cam MR3* dengan perbesaran 400 kali menggunakan panjang gelombang 488 nm yang dilakukan terhadap 100 spermatozoa dan diulangi sebanyak 3 kali. Pengamatan integritas inti dilakukan terhadap spermatozoa berwarna hijau, berwarna kuning dan berwarna merah (Adiansyah, 2014).

3.3.4 Proses Sexing Spermatozoa

Semen dan spermatozoa yang sudah memenuhi kriteria baik, selanjutnya dilakukan *sexing* atau pemisahan spermatozoa. Sampel dipisahkan menjadi 1/3 bagian untuk spermatozoa tanpa *sexing* dan 2/3 bagian untuk spermatozoa *sexing*. Dua petiga bagian semen yang akan disexing, diencerkan terlebih dahulu dengan larutan *Brackett-Oliphant* (BO) (Lampiran 2C). Banyaknya volume larutan BO, berdasarkan volume dan konsentrasi semen yang digunakan. Setelah semen diencerkan, dilakukan pemisahan spermatozoa dengan metode albumin

bertingkat dengan media *Bovine Serum Albumin* (BSA 5 % untuk kolom atas dan BSA 10 % untuk kolom bawah). Sebanyak 2 ml larutan BSA 10% dimasukkan dalam tabung reaksi terlebih dahulu, kemudian larutan BSA 5% dimasukkan secara perlahan hingga terlihat perbedaan kolom antara larutan BSA 10% dan 5%. Setelah itu, sebanyak 1 ml semen dimasukkan secara perlahan dan didiamkan selama 60 menit diatas kolom albumin bertingkat tersebut.

Selanjutnya setiap kolom dikoleksi dengan cara membuang 1 ml bagian teratas (semen), 2 ml lapisan tengah sebagai hasil pemisahan kolom atas (BSA 5%) dan 2 ml lapisan bawah sebagai hasil pemisahan kolom bawah (BSA 10%) kemudian ditampung dalam tabung sentrifugasi. Satu tabung sentrifugasi (volume 20 ml) dapat digunakan untuk menampung 4 tabung sampel dari masing-masing kolom. Masing-masing sampel yang sudah ditampung, kemudian dicuci dengan larutan BO. Larutan BO ditambahkan pada tabung sentrifugasi dengan perbandingan 1:1 dengan sampel. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Kolom albumin atas (BSA 5%) diprediksi sebagai spermatozoa X dan kolom albumin bawah (BSA 10%) sebagai spermatozoa Y (Kaiin, dkk., 2005).

3.3.5 Pengenceran dan Penambahan Vitamin C dalam Media Pengencer

Spermatozoa tanpa *sexing* dan hasil *sexing* (spermatozoa X dan spermatozoa Y) selanjutnya diencerkan dengan pengencer Tris-Sitrat buffer (Lampiran 2A). Jarak waktu antara penampungan semen sampai pengenceran dilakukan tidak lebih dari 15 menit. Penambahan konsentrasi vitamin C pada media pengencer disesuaikan dengan perlakuan yang diberikan (Tabel 3.1).

3.3.6 Pengemasan, Ekuilibrasi, Pembekuan dan *Thawing*

Pada proses pengemasan, *straw* dengan ukuran 0,5 ml diberi label terlebih dahulu dengan menggunakan alat *printing*. Semen yang akan dibekukan, dimasukkan kedalam *straw* tersebut dengan menggunakan alat *filling*. Kemudian *straw* disegel dengan menggunakan alat *sealing*. Setelah *straw* disegel, kemudian disusun pada rak pendingin dan diekuilibrasi. Ekuilibrasi dilakukan dengan cara menempatkan semen pada suhu 5° C selama empat jam sebelum proses pembekuan. Selanjutnya proses pembekuan dilakukan di dalam uap nitrogen dengan cara meletakkan rak yang berisi *straw* berjarak 10 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 15 menit (suhu sekitar -130° C), kemudian *straw* dimasukkan kedalam nitrogen cair dengan suhu -196° C (Sugiarti dkk., 2001). *Thawing* atau pencairan semen beku akan dilakukan setelah disimpan selama 24 jam, semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37° C selama 30 detik (Pratiwi, 2011). Selanjutnya untuk pemeriksaan kualitas spermatozoa dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis.

3.3.7 Pengukuran dan Pengamatan Parameter Mikroskopis

Pemeriksaan parameter mikroskopis spermatozoa setelah *thawing* meliputi gerakan masa, motilitas, viabilitas, abnormalitas, integritas membran plasma dan integritas inti spermatozoa. Prosedur pemeriksaan mikroskopis dilakukan seperti pada Subbab 3.3.3.

3.4 Analisa Data

Data yang diperoleh dari pengukuran dan pengamatan parameter mikroskopis, kemudian dianalisis dengan analisis variansi (ANAVA) pada taraf kepercayaan 95% dengan hipotesis sebagai berikut:

H_0 : tidak ada pengaruh antara masing-masing perlakuan terhadap kualitas spermatozoa

H_1 : ada pengaruh antara masing-masing perlakuan terhadap kualitas spermatozoa

Kriteria uji H_0 ditolak jika $F_{hitung} > F_{tabel}$, yaitu berarti perlakuan akan berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%. Sebaliknya, H_0 diterima jika $F_{hitung} < F_{tabel}$, yang berarti tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%. Jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan dilakukan uji lanjutan, yaitu uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing perlakuan.

3.5 Diagram Alir

