

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permintaan daging sapi di Indonesia berdasarkan Badan Pusat Statistik terus mengalami peningkatan hingga saat ini, namun tidak diimbangi dengan suplai daging sapi yang mencukupi. Kondisi ini memberikan peluang bagi peternak sapi untuk menerapkan teknologi reproduksi. Untuk meningkatkan populasi ternak sapi perlu usaha peningkatan efisiensi reproduksi dan fertilitas ternak, dengan itu pemanfaatan teknologi modern untuk mendorong produksi hewan yang berkelanjutan merupakan hal yang sangat penting untuk mendukung efisiensi reproduksi ternak (Prakash et al., 2014; Muada et al., 2017).

Salah satu upaya untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak yaitu dengan pemanfaatan semen untuk menghasilkan genetik yang unggul. Penggunaan semen berdasarkan jenis kelamin mempercepat kemajuan genetik dan memungkinkan pengelola peternakan untuk meningkatkan secara selektif produktivitas sapi dara atau sapi pejantan berdasarkan kebutuhan peternakan. Inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi yang telah banyak digunakan untuk meningkatkan produktivitas sapi dan kualitas genetik ternak. Salah satu ras sapi eksotis di Indonesia yang banyak digunakan untuk kebutuhan IB ialah sapi Simmental. Sapi ini sering digunakan untuk kawin silang dari berbagai jenis sapi lokal di Indonesia seperti sapi bali, sapi Madura dan sapi persilangan Ongole (Satrio et al., 2022).

Sapi Simmental sering kali digunakan untuk dalam bioteknologi reproduksi salah satunya *sexing* spermatozoa. Teknologi *sexing* melibatkan pemisahan spermatozoa kromosom X dan Y merupakan pilihan yang paling tepat untuk mendukung peran IB dalam meningkatkan produktivitas dan efisiensi usaha peternakan. *Sexing* spermatozoa membantu pelaku usaha peternakan dalam mendapatkan pedet dengan jenis kelamin yang diharapkan. Sapi pejantan menghasilkan dua jenis spermatozoa yaitu X dan Y, apabila spermatozoa mengandung kromosom X membuahi sel telur maka akan terbentuk embrio betina dan bila sel telur dibuahi oleh sperma yang mengandung kromosom Y maka akan menghasilkan embrio jantan (Prakash et al., 2014).

Penerapan bioteknologi *sexing* spermatozoa dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan salah satunya dengan sedimentasi albumin menggunakan putih telur (Priyanto et al., 2023). *Sexing* spermatozoa menggunakan albumin telur merupakan salah satu metode *sexing* yang relatif mudah dilakukan dan dianggap efektif karena dapat meningkatkan proporsi motilitas sperma dan memperbaiki tingkat abnormalitas sperma pada saat proses *sexing*. Prinsip *sexing* spermatozoa albumin yaitu berdasarkan pada kemampuan pergerakan (motilitas) antara spermatozoa X dan Y dengan membuat medium yang selektif (Ratnawati et al., 2020). Salah satu albumin telur yang dapat digunakan sebagai media pemisah spermatozoa X dan Y adalah albumin telur bebek. Albumin telur memiliki kandungan protein, vitamin, lemak dan kolesterol yang tinggi. Putih telur ayam yang biasanya digunakan dalam *sexing*



spermatozoa (Manur et al., 2024). Kandungan kadar lemak dan kolesterol yang ada pada kuning telur berperan penting dan efektif dalam melindungi spermatozoa dari *cold shock* dari suhu tubuh ke suhu ruang kemudian penyimpanan suhu dingin (Wulansari dan Ducha, 2019). Selain itu kandungan lipoprotein dan lesitin pada kuning telur membantu dalam penyedia sumber energi, serta melindungi dan menjaga bentuk lapisan protein pada membran sel spermatozoa pada saat proses *sexing* (Rahmatia et al., 2024).

Proses *sexing* spermatozoa diantaranya ialah sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan sperma motil dan non motil, serta memisahkan komponen plasma semen yang dapat mempengaruhi kualitas sperma. Salah satu penyebab sentrifugasi mempengaruhi kualitas sperma ialah lama waktu yang digunakan pada saat proses *sexing* (Susilowati, 2010). Maka dari itu, perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan lama waktu yang tepat saat sentrifugasi pada *sexing* spermatozoa dengan media albumin telur bebek terhadap motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa pada sapi Simmental.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1.2.1 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh lama sentrifugasi pada *sexing* spermatozoa terhadap motilitas, viabilitas dan morfologi semen sapi Simmental.
2. Mengetahui motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen sapi Simmental hasil *sexing* spermatozoa dengan metode sedimentasi menggunakan media putih telur bebek.

1.2.2 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Pengembangan Ilmu
Manfaat Pengembangan Ilmu pada penelitian ini adalah dapat menciptakan inovasi baru dalam *sexing* spermatozoa dengan metode sedimentasi menggunakan albumin (putih) telur bebek.
2. Manfaat aplikasi
Manfaat aplikasi penelitian ini agar dapat digunakan sebagai referensi dalam menambah ilmu pengetahuan dan rujukan untuk mengembangkan penelitian selanjutnya di bidang ilmu reproduksi sehingga mampu meningkatkan produktivitas ternak sapi Simmental.

1.3 Hipotesis Penelitian

Lama sentrifugasi pada *sexing* spermatozoa dengan metode sedimentasi albumin telur bebek mempengaruhi motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen sapi Simmental.

1.4 Keaslian Penelitian

Studi tentang pengaruh lama sentrifugasi pada *sexing* spermatozoa dengan metode sedimentasi albumin telur bebek terhadap kualitas semen sapi Simmental masih sangat jarang. Terdapat beberapa penelitian yang memiliki tema yang serupa namun berbeda seperti yang dilakukan oleh Priyanto et al. (2022), dengan judul "Pengaruh Lama Sentrifugasi pada *Sexing* Spermatozoa dengan Media *Bovine Serum Albumin* (BSA) Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa X-Y Sapi Simmental". Penelitian yang dilakukan oleh Rahmat (2020), "Pengaruh Lama



Sentrifugasi Pada Sexing Spermatozoa Dengan Metode Sedimentasi Putih Telur Terhadap Kualitas Semen dan Rasio spermatozoa X dan Y Pada Sapi Bali (*Bos sondaicus*)” dengan hasil bahwa tidak adanya pengaruh pada konsentrasi dan viabilitas spermatozoa. Sedangkan pada persentase motilitas adanya pengaruh yang signifikan antara semen segar dengan perlakuan sentrifugasi.

1.5 Kajian Pustaka

1.5.1 Sapi Simmental

1.5.1.1 Karakteristik Sapi Simmental

Sapi Simmental adalah sapi dari bangsa *Bos Taurus* yang berasal dari daerah Simme negara Switzerland, namun sekarang berkembang lebih cepat di benua Amerika, Eropa, australia dan Selandia Baru. Sapi ini merupakan tipe sapi perah dan pedaging. Sapi Simmental merupakan sapi berukuran besar, baik itu pada saat kelahiran, penyapihan maupun saat mencapai dewasa. Bobot sapi Simmental pejantan dewasa mampu mencapai berat 1.150 kg, sedangkan sapi betina mampu mencapai berat 800 kg (Hasnudi et al., 2019).

Sapi Simmental adalah hewan berotot, panjang dan tubuh yang kokoh. Sapi ini memiliki warna yang bervariasi dari coklat kemerahan hingga coklat keemasan. Sapi ini memiliki ciri khas yaitu terdapat pola berwarna putih pada bagian kepala, perut dan kaki yang membedakannya dengan jenis sapi lain. Saat ini di Indonesia banyak ditemukan peternakan rakyat yang memelihara sapi silangan Simmental. Salah satunya yaitu silangan sapi Simmental dengan peranakan Ongole (SIMPO) dan juga silangan sapi Simmental dengan sapi bali (SIMBAL). Banyak dari peternak melakukan kawin silang dengan sapi Simmental karena mempunyai keunggulan pada bobot berat sapi Simmental yang dapat menguntungkan peternak (Hasnudi et al., 2019).



Gambar 1. Morfologi Sapi Simmental

Source: Badan Standarisasi Nasional. 2020. Bibit Sapi Potong Bagian 8: Simmental Indonesia. BSN: Jakarta.

1.5.1.2 Taksonomi Sapi Simmental

Menurut Talib dan Siregar (1999), klasifikasi taksonomi sapi Simmental yaitu:

Phylum Chordata
 Kingdom Animalia
 Class Mammalia
 Order Artiodactyla
 Family Bovidae
 Genus Bos
 Species *Bos Taurus*



1.5.2 Semen

Semen berperan penting untuk dalam menentukan keturunan (gender) yang diinginkan (Susilawati et al., 2014). Semen merupakan hasil sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan dari saluran reproduksi jantan ke saluran reproduksi betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat juga ditampung untuk keperluan untuk teknologi reproduksi. Semen terdiri dari spermatozoa dan plasma semen. Spermatozoa atau sel kelamin jantan yang bersuspensi dalam suatu cairan yang disebut plasma semen. Spermatozoa dihasilkan oleh testis sedangkan plasma semen merupakan campuran sekresi yang dihasilkan oleh epididimis dan kelenjar aksesori jantan (Yendraliza et al., 2015).

Sapi Simmental khususnya pejantan mempunyai peranan penting dalam meningkatkan kualitas keturunan yang dihasilkan. Kontribusi sapi jantan terhadap kualitas keturunannya diwariskan secara genetik melalui spermatozoa. Oleh karena itu, kualitas semen merupakan faktor penting dalam meningkatkan keberhasilan teknologi reproduksi. Kualitas semen dapat dipengaruhi oleh ras, umur, pakan, iklim, kesehatan hewan, jenis pakan yang dikonsumsi, ras dan lingkungan (Permana et al., 2024).

Perubahan kualitas semen juga berhubungan dengan perubahan fisiologis seperti peningkatan massa tubuh yang sekaligus mempengaruhi perkembangan testis dan kelenjar aksesori sapi jantan. Perubahan kualitas semen juga dipengaruhi oleh perubahan aktivitas *hipotalamus-hipofisis* testis dalam memproduksi hormon reproduksi. Hal ini dapat mempengaruhi proses spermatogenesis pada testis yang berdampak pada produktivitas sapi jantan. Selain itu, umur pejantan dapat mempengaruhi produktivitas karena adanya perubahan kapasitas produksi sperma, kapasitas penyimpanan pada *cauda epididymis*, dan jumlah sel sperma yang dikeluarkan (Satrio et al., 2022).

1.5.3 Evaluasi Mikroskopis Semen

1.5.3.1 Motilitas

Motilitas sperma adalah penilaian jumlah spermatozoa yang bergerak. Spermatozoa dan aktivitas pergerakannya dinilai berdasarkan gelombang gerak sperma. Penilaian sperma dinilai sangat baik (+++) apabila sperma bergerak dengan cepat dan aktif, keadaan ini diperkirakan mengandung 80-100% spermatozoa motil progresif, baik (++) apabila sperma bergerak dengan lambat dan jarang, keadaan ini diperkirakan mengandung 60-79% spermatozoa motil progresif, sedang (+) apabila sperma hanya sedikit yang bergerak, tidak bergerak, adanya gerakan individu, keadaan ini diperkirakan mengandung 30-59% spermatozoa motil progresif dan buruk apabila sperma tidak ada yang bergerak atau dikatakan mati, kurang 30% sperma yang motil (Nirwana dan Suparman, 2017).



merupakan penilaian persentase hidup spermatozoa. Spermatozoa mempunyai ciri-ciri membran plasma utuh, sehingga *caput* dapat menyerap warna. Kerusakan membran plasma dapat mempengaruhi metabolisme spermatozoa terganggu, sehingga kematian spermatozoa. Penilaian viabilitas spermatozoa dapat

dijadikan sebagai parameter struktur membran spermatozoa. Viabilitas saling berhubungan dengan motilitas yang ditentukan oleh kekuatan membran plasma spermatozoa (Tethool et al., 2022).

1.5.3.3 Abnormalitas

Morfologi spermatozoa merupakan salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa, karena struktur sel yang abnormal dapat menyebabkan gangguan saat fertilisasi dan menyebabkan ternak gagal bunting. Morfologi spermatozoa dapat dilakukan dengan menilai normalitas dan abnormalitas sperma yang dilihat dari bentuk kepala dan ekor sperma. Bentuk sperma yang normal meliputi bentuk kepala lonjong dengan ujung terminal menutupi sepertiga kepala sperma. Panjang kepala sperma 3-5 mikron, dan jumlah kepala sperma sebaiknya kurang dari setengah hingga sepertiga. Bentuk tubuhnya kurang dari lebar kepala, dua kali panjang kepala dan sejajar sumbu kepala (Aliyah et al., 2022). Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu abnormalitas primer yang disebabkan oleh kegagalan spermatogenesis dan spermiogenesis, faktor genetik, penyakit dan kondisi lingkungan ataupun kelainan fisik spermatozoa yang terjadi pada saat proses pematangan spermatozoa dalam tubulus seminiferus, serta proses perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan. Terdapat 13 jenis kelainan atau abnormalitas spermatozoa primer yaitu *pear shape*, *narrow at the base*, *narrow (tapered head)*, *abnormal contour*, *undeveloped*, *round head*, *variable size*, (*macrocephalus/microcephalus*), *double head*, *abaxial*, *knobbed acrosome defect*, *detached head*, dan *diadem*. Abnormalitas sekunder yaitu spermatozoa yang mengalami kelainan setelah melewati *tubulus seminiferus* yang ditandai dengan putus ekor, kepala pecah dan kepala tanpa ekor. Abnormalitas tersier ditandai dengan ekor putus, ekor melingkar dan kepala membesar yang disebabkan oleh faktor lingkungan (Rahmiati et al., 2015).

1.5.4 Sexing Spermatozoa

Sexing spermatozoa merupakan salah satu teknologi reproduksi yang berperan dalam pemisahan sel spermatozoa yang mengandung kromosom X dan Y dari sapi pejantan. Pejantan menghasilkan dua jenis sel spermatozoa yaitu kromosom X dan Y, apabila spermatozoa yang mengandung kromosom X membuahi sel telur maka akan menghasilkan embrio betina, sedangkan apabila spermatozoa yang mengandung kromosom Y membuahi sel telur maka akan menghasilkan embrio jantan (Prakash et al., 2014).

Perbedaan utama antara spermatozoa kromosom X dan Y adalah kandungan DNA, jumlah DNA pada kromosom X yang dibawa spermatozoa lebih tinggi dibandingkan pada kromosom Y. Perbedaan lainnya ialah ukuran spermatozoa X lebih besar dari spermatozoa Y, serta motilitas spermatozoa kromosom Y lebih tinggi dari spermatozoa kromosom X (Prakash et al., 2014).



ek

memiliki kandungan protein, vitamin, lemak dan kolesterol yang tinggi. Putih telur ayam yang biasanya digunakan dalam *sexing* telur (Prakash et al., 2024). Komponen telur yang biasa digunakan dalam *sexing* telur adalah putih telur (albumin) dan kuning telur. Putih telur

merupakan bagian telur yang berfungsi sebagai antibakteri dan *buffer* untuk menjaga sifat fisik dan kimia telur. Putih telur terdiri dari tiga lapisan zat yaitu *inner thin albumin* berupa cairan agak kental yang terletak di bagian dalam putih telur, *thick albumin* yaitu lapisan tengah yang kental, dan *outer thin albumin* yaitu kantong albumin yang terletak di bagian luar putih telur (Ama et al., 2017). Kuning telur terdapat kandungan Lipoprotein yang terdiri dari 85% lemak dan 15% protein. Lipid lipoprotein terdiri dari 20% fosfolipid (lesitin, fosfatidilserin), 60% lipid netral (trigliserida) dan 5% kolesterol. Kuning telur mengandung komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat menjaga dan melindungi keutuhan selubung lipoprotein sel spermatozoa, serta mengandung fraksi *low-density lipoprotein* (LDL) yang dapat menjaga dan melindungi spermatozoa dari stres dan *cold shock*. Kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler bertindak sebagai suplai nutrisi, sumber energi, dan pelindung ekstraseluler sperma dari kejutan dingin selama pembekuan (Widiastuti et al., 2018).

1.5.6 Pengaruh Lama Sentrifugasi Spermatozoa

Sentrifugasi adalah metode yang biasa digunakan untuk mencuci sperma dalam proses teknologi reproduksi salah satunya *sexing* spermatozoa. Sentrifugasi menimbulkan gaya sentrifugal yang menyebabkan semen terpisah antara bagian padat (pelet) dan bagian cair (plasma). Semakin tinggi gaya sentrifugal yang digunakan pada proses pencucian sperma maka akan menurunkan angka resistensi dan kelayakan kondisi yang meliputi persentase motilitas (pergerakan progresif) dan jumlah spermatozoa hidup. Tekanan gaya sentrifugal yang paling besar biasanya pada bagian ekor. Semakin besar kecepatan dan waktu sentrifugasi maka semakin tinggi gesekan spermatozoa. Akibatnya, ikatan protein dan lipid membran menjadi tidak stabil sehingga mengganggu permeabilitas membran spermatozoa (Solihati et al., 2017).

Meskipun secara luas sering digunakan dalam proses *sexing* spermatozoa, sentrifugasi dianggap berbahaya bagi sel spermatozoa karena dapat menyebabkan kerusakan struktural dan mengakibatkan penurunan motilitas sperma (Goncalves et al., 2018). Efek tersebut biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor ini termasuk kecepatan dan waktu sentrifugasi. Akibatnya, kecepatan sentrifugasi yang umum digunakan untuk memproses spermatozoa biasanya rendah yaitu 1500 rpm hingga 1800 rpm (Len, 2008).



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2024 sampai dengan Desember 2024 di Laboratorium UPT Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen (PIBS) Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Pucak Maros.

2.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu penelitian eksperimental laboratoris untuk melihat pengaruh waktu sentrifugasi terhadap semen sapi Simmental hasil *sexing* spermatozoa dengan metode sedimentasi albumin menggunakan telur bebek.

2.3 Materi Penelitian

2.3.1 Alat

Alat yang digunakan adalah, *drying and sterilization oven* (Memmert®), *elenmeyer* 1000 mL (Pyrex®), gelas ukur 100 mL (Pyrex®), gelas beker 250 mL (Pyrex®), mikroskop (Olympus), pipetmikro (Onemed®), pipet tetes (Onemed®), pH meter (MQuant®), *sentrifuge* (oregon), semen *analyzer*, tabung skala (Onemed®), tabung reaksi (Onemed®), vagina buatan dan *waterbath* (Memmert®).

2.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah aquades (Onemed®), air hangat, *aluminium foil* (Klin pak), asam sitrat (Cap gajah), *cover glass* (M-glas®), *eosin-negrosin* (indo reagen®), *glyserol* (Emsure®), fruktosa (Rose brand®), NaCl 0.9% (Mbj pharma), *object glass* (Onemed®), *benzyl penicillin* (Cooper®), *streptomycin sulfate* (Meiji®), semen segar, *Tris aminomethan* (Merck®), tips mikropipet (Onemed®), telur bebek dan pelumas (*vaseline*®).

2.4 Metode Penelitian

2.4.1 Pengelompokan dan Perlakuan Semen

Metode penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan (waktu sentrifugasi) dan 5 kali pengulangan pada setiap perlakuan.

Tabel 2. Kelompok Perlakuan Waktu Sentrifugasi Sexing Spermatozoa

Kelompok	Perlakuan
Perlakuan 1 (P1)	Semen <i>sexing</i> + lama sentrifugasi 5 menit
Perlakuan 2 (P2)	Semen <i>sexing</i> + lama sentrifugasi 10 menit
Perlakuan 3 (P3)	Semen <i>sexing</i> + lama sentrifugasi 15 menit



in Pengencer Tris-Kuning Telur (TKT)

pengencer dilakukan satu hari sebelum penampungan semen. encer Tris-Kuning Telur (TKT) terlebih dahulu dengan menyiapkan encer seperti *Hydroxymethyl aminomethane*, asam sitrat, fruktosa, ; kuning telur bebek sesuai dengan komposisi yang ada pada

Tabel 3. Komposisi Pengencer Tris-Kuning Telur (TKT)

Bahan	Komposisi
<i>Hydroxymethyl aminomethane</i>	3,634 gr
Asam sitrat	1,7 gr
Fruktosa	1.25 gr
Gliserol	6 ml
Aquabidest	100 ml
Kuning telur	20 ml

Source: Yendraliza et al., 2023. Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental pada Pengencer TRIS dengan Kuning Telur dan Waktu Equilibrasi yang Berbeda. <https://jurnal.usk.ac.id/agripet/article/view/26381>

Setelah bahan disiapkan, kuning telur yang telah dipisahkan dari putih telur kemudian diletakkan di kertas saring untuk menyerap sisa putih telur yang masih menempel. Pecahkan membran vitelinnya, kemudian masukkan kedalam gelas beker. Larutan *buffer tris* dibuat dengan mencampurkan *tris aminomethan*, asam sitrat, laktosa, fruktosa, gliserol ke dalam 80 ml *aquabidest* kemudian homogenkan. Kemudian dibuat larutan antibiotik dengan komposisi 1 gr *penicillin* dan 1 gr *streptomycin* ke dalam 10 ml *aquabidest*. Larutan *Buffer tris* dan Larutan antibiotik dicampur hingga homogen, kemudian ditambahkan 20 ml kuning telur. Larutan pengencer diaduk hingga homogen sempurna dan ditutup menggunakan *aluminium foil* dan disimpan di *refrigatory*.

2.4.3 Penampungan Semen

Sampel semen diambil secara acak pada satu sapi Simmental di Peternakan UPT-PIBS Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan di Pucak Maros. Sebelum penampungan semen pejantan dan *teaser* (pemancing) dimandikan dan dibersihkan rambut pada daerah preputium untuk mencegah kontaminasi bakteri. Setelah itu, sapi *teaser* dimasukkan ke kandang jepit dan sapi pejantan didekatkan untuk meningkatkan libido pejantan. Penampungan dilakukan oleh teknisi yang berpengalaman (*master bull*). Semen ditampung dengan metode vagina buatan yang terdiri dari tabung reaksi sebagai wadah, jaket air, selongsong lateks yang tipis dan fleksibel, kerucut lateks yang menghubungkan ujung vagina dengan tabung pengumpul dan selubung silinder karet dengan katup untuk mengalirkan semen dan mengeluarkan udara. Vagina buatan yang sudah dirakit diisi dengan air hangat dan pada tabung diberikan pelumas *vaseline* agar tidak melukai penis pejantan. Apabila pejantan menaiki *taeser*, penis sapi diarahkan ke vagina buatan untuk menampung semen yang akan diejakulasikan. Selanjutnya semen yang tertampung dibawa ke laboratorium UPT PIBS untuk dievaluasi makroskopis dan mikroskopis sebelum ermatozoa.



in Medium Sexing

digunakan untuk membuat medium *sexing* spermatozoa adalah ar bebek. Putih telur dicampur dengan pengencer TKT untuk um *sexing* konsentrasi 10% dan 30%. Putih telur yang telah er TKT dimasukkan ke dalam tabung *sexing* dengan konsentrasi

30% sebagai lapisan bawah sebanyak 2 ml dan konsentrasi 10% pada lapisan atas sebanyak 2 ml (Takdir *et al.*, 2017). Medium siap digunakan.

2.4.5 Sexing Spermatozoa

Semen yang memenuhi standar diencerkan menggunakan pengencer TKT dengan perbandingan 1 : 1 antara semen dan pengencer TKT, kemudian diinkubasi di dalam *waterbath* selama 20 menit. Semen yang telah diencerkan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam medium *sexing* yang telah dibuat dan di inkubasi kembali di dalam *waterbath* selama 30 menit. Setelah itu medium *sexing* lapisan atas dipisahkan dengan lapisan bawah dengan cara menyedot menggunakan mikropipet. Medium yang dipisah ditampung pada tabung dan dilakukan *sentrifuse* dengan kecepatan 1500 rpm (sesuai waktu perlakuan). Supernatan yang dihasilkan dari *sentrifuse* dibuang dan endapan yang tersisa ditambahkan kembali pengencer TKT (Takdir *et al.*, 2017). Pengamatan motilitas, viabilitas dan abnormalitas dapat dilakukan.

2.4.7 Variabel Yang Diamati

2.4.7.1 Motilitas Spermatozoa

Penilaian motilitas semen didasarkan pada jumlah spermatozoa yang bergerak, persentase hidup dan aktivitas pergerakannya. Penilaian motilitas dengan sangat baik (+++), baik (++) dan sedang (+) dan buruk (n). Penilaian motilitas dilakukan secara subjektif oleh tim laboratorium UPT PIBS dan dibantu dengan alat semen *analyzer* sesuai standar operasional laboratorium UPT PIBS.

2.4.7.2 Viabilitas Spermatozoa

Penilaian viabilitas semen dilakukan dengan meneteskan pewarnaan *eosin-negrosin* di atas *object glass* yang terdapat semen lalu dicampur merata dan di *slide* sehingga menjadi ulas tipis. Setelah kering diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 100x dan dihitung spermatozoa. Spermatozoa hidup tidak menyerap warna, sedangkan yang mati menyerap warna (Nirwana dan suparman, 2017).

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Total Spermatozoa Hidup}}{\text{Total Spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

2.4.7.3 Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa dinilai dari bentuk kepala, leher dan ekor spermatozoa yang ada kelainan atau abnormalitas. Abnormalitas spermatozoa meliputi kepala besar, ekor bercabang, ekor putus, kepala kecil, ataupun ekor yang melingkar (Aliyah *et al.*, 2022). Untuk menilai abnormalitas individu dilakukan dengan meneteskan pewarnaan *eosin-negrosin* di atas *object glass* yang terdapat semen lalu dicampur merata dan di *slide* sehingga menjadi ulas tipis. Setelah kering kemudian diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x.



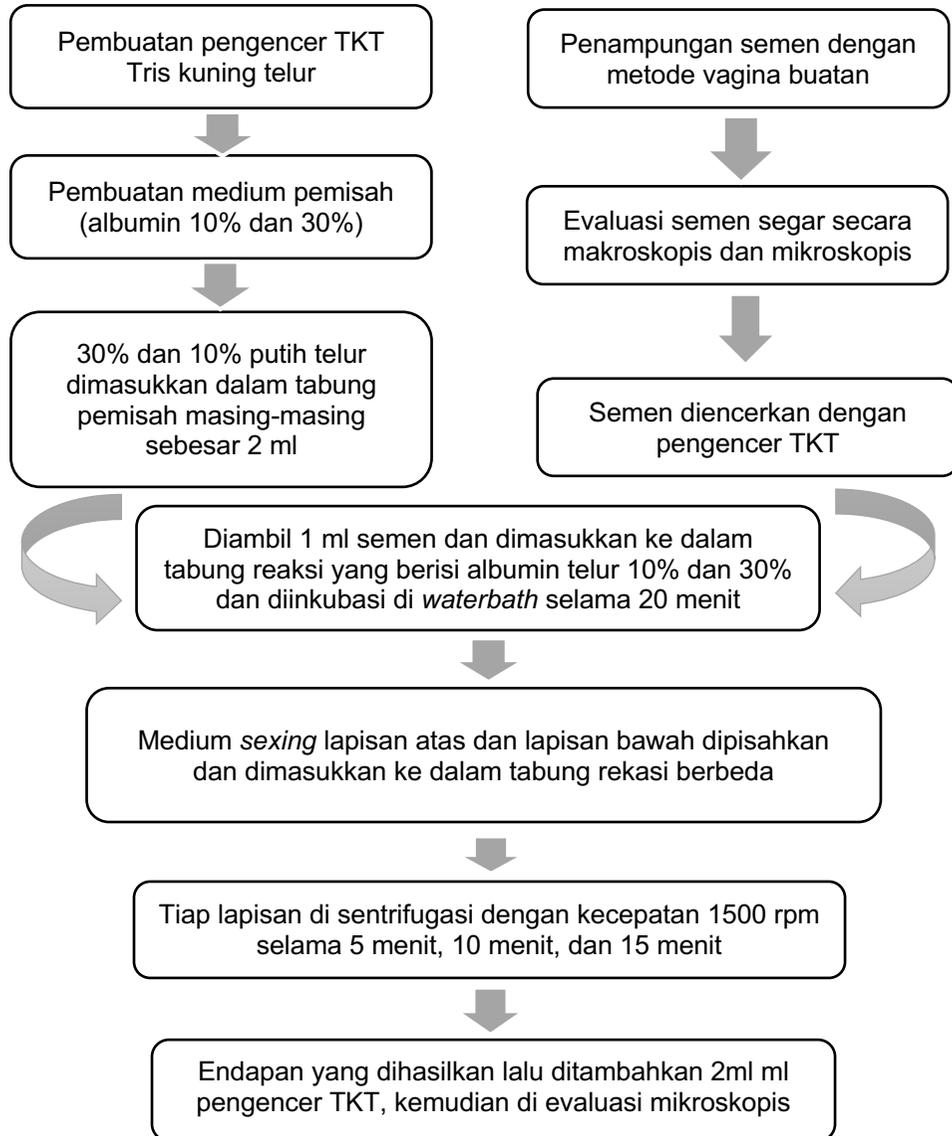
$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah Abnormalitas spermatozoa}}{\text{T. Spermatozoa Hidup yang dihitung}} \times 100\%$$

Data

diperoleh dari pemeriksaan motilitas, viabilitas dan abnormalitas *sexing* kemudian dianalisis menggunakan analisis sidik ragam sesuai dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Apabila dari hasil

perlakuan didapatkan berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

2.6 Alur Penelitian



Gambar 2. Bagan Alur Penelitian

