



**KUALITAS SEMEN BEKU SAPI LIMOUSIN HASIL
SEXING MENGGUNAKAN ALBUMEN TELUR ITIK
DENGAN PENAMBAHAN LEVEL KAFEIN
YANG BERBEDA**

SKRIPSI

OLEH :

**MUSDALIFAH
I 111 01 026**



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	29-8-2006
Asal Gari	Fak. Peternakan
Banyaknya	1 (satu) PKS
Harga	-
No. Inventaris	068/29-8-2006
No. Klas	34207

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006**

Judul : KUALITAS SEMEN BEKU SAPI LIMOUSIN HASIL SEXING MENGGUNAKAN ALBUMEN TELUR ITIK DENGAN PENAMBAHAN LEVEL KAFEIN YANG BERBEDA

Bidang yang diteliti : Reproduksi Ternak

Peneliti

Nama : Musdalifah

Nomor Pokok : I 111 01 026

Jurusan : Produksi Ternak

Skripsi ini Telah Diperiksa dan Disetujui Oleh :

Prof. Dr. Ir. Henry Sonjaya, DEA
Pembimbing Utama

Prof. Dr Ir. H. Abd Latif Toleng M, Sc
Pembimbing Anggota

Mengetahui,

Prof. Dr. Ir. H. Basit Wello, M.Sc
Dekan Fakultas Peternakan

Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc
Ketua Jurusan Produksi Ternak

Tanggal Lulus :

ABSTRAK

Penggunaan medium pemisah albumen telur itik untuk sexing spermatozoa dengan penambahan level kafein informasinya masih sangat terbatas. Oleh karena itu peneliti ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian level kafein yang berbeda terhadap kualitas semen beku sapi limousin setelah pemisahan spermatozoa X dan spermatozoa Y yang menggunakan albumen telur itik sebagai medium pemisah. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial ($2 \times 3 \times 6$) untuk motilitas dan pola ($2 \times 3 \times 3$) untuk persentase hidup dengan 4 kali ulangan, dan salah satu faktor untuk pengukuran yang berulang. Faktor pertama (A) adalah peningkatan konsentrasi medium pemisah albumen telur (10% dan 30%), faktor kedua (B) adalah penambahan level kafein pada level yang berbeda (0, 10 dan 20 mM/ml) dan faktor ketiga (C) adalah lama pengamatan (0, 3, 6 jam setelah dibekukan). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 1) Penambahan kafein dapat mengurangi laju penurunan motilitas spermatozoa sebelum proses pembekuan tetapi laju penurunannya sama setelah pembekuan. 2) Laju penurunan motilitas adalah sama antara antara 10 mM dan 20 mM selama 6 jam inkubasi tetapi laju penurunan persentase hidup spermatozoa sama pada 3 perlakuan. Disimpulkan bahwa penambahan kafein hanya meningkatkan motilitas spermatozoa setelah pembekuan.

ABSTRACT

Information of the utilization of separation medium of duck egg albumen for sexing spermatozoa by adding caffeine level is still limited. Therefore, this research aim to know the influence of addition different caffeine level to medium on the quality of bull freezing semen after separation of X and Y spermatozoa. This research use Complete Random Design (CRD) with factorial pattern ($2 \times 3 \times 6$) for motility and ($2 \times 3 \times 3$) for live percentage with four replication wick one factor is repeated measurement. The first factor (A) is the concentration of medium of egg albumen, second faktor (B) is addition caffeine level at different level (0, 10 end 20 mM/ml) and third factor (C) is the duration of observation (0, 3, 6 hours of incubation). The result showed that 1) The addition of caffeine can reduced the decreasing rate of spermatozoa motility before freezing proces, however it was similar after freezing. 2) The decreasing rate of spermatozoa motility were similar between 10 mM and 20 mM levels for 6 hours incubation, but the decreasing rate of live spermatozoa percentage were similar both three treatments. Its concluded that the addition of caffeine only increased of spermatozoa motility before freezing.

RINGKASAN

Musdalifah. Kualitas Semen Beku Sapi Limousion Hasil Sexing dengan Menggunakan Albumen Telur Itik Pada Penambahan Level Kafein yang Berbeda. (Di bawah bimbingan **Herry Sonjaya** sebagai Pembimbing Utama dan **Abd. Latif Toleng** sebagai Pembimbing Anggota)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian level kafein yang berbeda terhadap kualitas semen beku sapi limousin setelah pemisahan spermatozoa kromosom X dan spermatozoa kromosom Y yang menggunakan albumen telur itik sebagai medium pemisah.

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Mei 2006, di mana penampungan semen, *sexing* dilaksanakan di Unit Pengembangan Ternak Daerah – Inseminasi Buatan (UPTD-IB) Jongaya Makassar dan pengamatan spermatozoa dilakukan di Laboratorium Fisiologi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Materi yang digunakan adalah semen sapi Limousin Unit Pengembangan Ternak Daerah-Inseminasi Buatan (UPTD-IB) Jongaya, Makassar dan media pemisah albumen telur itik. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial (2 x 3 x 6) untuk motilitas, dan pola (2 x 3 x 3) untuk persentase hidup dengan 4 kali ulangan untuk pengukuran yang berulang, faktor pertama (A) adalah peningkatan konsentrasi medium pemisah albumen telur (10% dan 30%), faktor kedua (B) adalah penambahan level kafein pada level yang berbeda (0, 10 dan 20 mM/ml) dan faktor ketiga (C) adalah lama pengamatan (0, 3, 6 jam). Prosedur Kerja dimulai dengan

penampungan semen kemudian dilakukan pengamatan secara makroskopis. Menyiapkan medium pemisah (30% dan 10%) sehari sebelum penampungan kemudian melakukan pemisahan spermatozoa setelah itu ditambahkan larutan pengencer lalu semen dikemas dan dikuilibrasi, setelah dibekukan selama ± 2 hari kemudian dithawing dan diamati kualitas dari semen beku.

Karakteristik semen yang digunakan pada penelitian adalah volume; 4,37, warna putih susu, konsistensi sedang, pH; 5,7, motilitas massa; 2-3, motilitas individu; 70%, konsentrasi; 758,25 juta/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 1) Penambahan kafein dapat mengurangi laju penurunan motilitas spermatozoa sebelum proses pembekuan tetapi laju penurunannya sama setelah pembekuan. 2) Laju penurunan motilitas adalah sama antara antara 10 mM dan 20 mM selama 6 jam inkubasi tetapi laju penurunan persentase hidup spermatozoa sama pada 3 perlakuan. Disimpulkan bahwa penambahan kafein hanya meningkatkan motilitas spermatozoa setelah pembekuan.

Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan kafein 20 mM memiliki laju penurunan motilitasnya rendah setelah pembekuan.

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan segala nikmat, dan hidayah-Nya yang telah diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini meskipun dengan segala kekurangan dan keterbatasan dan kemampuan.

Penulis menyadari bahwa pada tulisan yang sederhana ini masih banyak kekurangan baik dari segi materi, teknik penulisan maupun susunan katanya.

Melalui kesempatan ini, dengan rasa rendah hati, penulis menyampaikan terima kasih kepada **Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya,DEA, DES** selaku pembimbing I dan **Prof. Dr. Ir. H. Abd Latif Toleng, M.Sc** selaku pembimbing II yang telah menuangkan waktunya untuk memberikan arahan, bimbingan, serta petunjuk kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang istimewa dengan segenap cinta dan hormat ananda haturkan kepada Ayahanda tercinta **H. Rusdi** dan Ibunda tercinta **Hj. Fatahna**, atas segala pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis, baik tenaga, materi, dorongan dan doanya. Demikian juga kepada saudara-saudaraku **Edy, Hana, Busrah, Abd. Halim, Ahmad** yang juga memberikan peranan yang sangat berarti selama penulis mengikuti program S1 di Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

Selain itu bantuan dari berbagai pihak yang memberikan motivasi baik moril maupun materil dalam penyelesaian skripsi ini. Untuk itu penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. **Prof. Dr. Ir. Idrus Paturusi**, selaku Rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. Ir. H. Basit Wello, M.Sc** selaku Dekan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, **Dr. Ir. Lellah Rahim, M.Sc** selaku Ketua Jurusan dan **Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc** selaku Wakil Ketua Jurusan Produksi Ternak Universitas Hasanuddin Makassar.
2. **Dr. Ir. Djoni Prawira Rahardja, M.Sc** selaku penasehat akademik beserta Bapak dan Ibu dosen Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin Makassar, yang telah mengajar dan mendidik penulis dari semester awal hingga penulis dapat menyelesaikan studi di perguruan tinggi ini
3. Tak lupa pula ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada pegawai UPTD – IB Jongaya Makassar, khususnya **Pak Aqsha, Pak Syarif, Ibu Hidayah, Ibu Matilda dan Pak Gunadi** yang memberikan bantuan kepada penulis selama penelitian. Akhirnya, kepada semua pihak yang telah membantu proses penyusunan skripsi ini, tetapi tidak disebutkan namanya, penulis menghaturkan yang tulus. Semoga Allah SWT meridhoi segala pengorbanannya. Amin.
4. Terkhusus untuk Kakak **Mukhtar Mustakim, Amd** atas kasih sayang, nasehat-nasehatnya serta bantuannya selama penulis menyelesaikan skripsi ini.
5. **Hasbi, S.Pt** yang banyak memberikan bimbingan dan dukungan serta **M. Fauzi T, A. Hamdana, Bunga Intan** sebagai team penelitian yang banyak

memberikan dukungan serta bantuan selama penelitian sampai penulis menyelesaikan studi

6. **Ema, Bulan, Yarnida, Cute, Ammi, Nia, Adinda Eka 03, Iwan (Buton), Baddu**, sebagai sahabat yang telah banyak memberikan bantuan dan nasehat yang sangat berguna bagi penulis.
7. Rekan-rekan mahasiswa khususnya Angkatan 2001 (**Tanduk 01**) atas kebersamaan dan kekompakannya
8. **Darli, Adi, Conex, Iwan, Erwin, Udin, Husair, Coet, Bum-Bum, Asnur, Amir, Syarif, Dullah, Rini, Sani, Nita, Pipin, Yuni, Acha, Siti, Ija**, sebagai rekan-rekan Pondok Nurafikah Makassar

Makassar, Juni 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	
KATA PENGANTAR	
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Karakteristik Sapi Limousin	3
Karakteristik Semen	3
<i>Sexing</i> Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Kromosom Y	7
Pemisahan Spermatozoa Menggunakan Albumen.....	9
Pengenceran Semen	11
Proses Pembekuan Semen	12
Penambahan Kafein	16
METODE PENELITIAN	
Waktu dan Tempat Penelitian	18
Materi Penelitian	18
Prosedur Penelitian	18
Analisa Data	23
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Kualitas Semen Segar Sapi Limousin	24
Pengaruh Penggunaan Medium Pemisah terhadap Motilitas Spermatozoa.....	26
Pengaruh Penggunaan Medium Pemisah dan Penambahan Level Kafein terhadap Persentase Hidup	29

KESIMPULAN DAN SARAN	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN-LAMPIRAN	36

DAFTAR TABEL

No	teks	Halaman
1.	Kelebihan dan Kekurangan Semen Cair dan Semen Beku	15
2.	Karakteristik Semen Segar Sapi Limousin yang Digunakan pada Penelitian.....	24

DAFTAR GAMBAR

No	teks	Halaman
1.	Rumus Kimia Kafein	16
2.	Alur Penelitian	22
3.	Interaksi Medium Pemisah terhadap Motilitas Spermatozoa.....	27
4.	Interaksi Medium Pemisah terhadap Level Motilitas Spermatozoa X dan Y	28
5.	Interaksi Level Kafein dengan Lama Pengamatan terhadap Persentase Hidup Spermatozoa	30

DAFTAR LAMPIRAN

No	teks	Halaman
1.	Data Penilaian Makroskopis dan Mikroskopis Semen Segar Sapi Limousin Penelitian Selama Empat Kali Penampungan	36
2.	Rataan Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing Kromosom X dan Y	36
3.	Rataan Persentase Hidup Hasil Sexing Kromosom X dan Y	36
4.	Data Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing Menggunakan Albumen Telur Itik dengan Penambahan Kafein pada Level yang Berbeda	37
5.	Data Persentase Hidup Spermatozoa Hasil Sexing Menggunakan Albumen Telur Itik dengan Penambahan Kafein pada Level yang Berbeda	38
6.	Hasil Analisis Ragam Motilitas Spermatozoa	39
7.	Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Interaksi Medium Pemisah dengan Periode Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa	40
8.	Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Interaksi Level Kafein dengan Periode Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa	40
9.	Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Periode Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa	41
10.	Hasil Analisis Ragam Persentase Hidup	42
11.	Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Periode Pengamatan terhadap Persentase Hidup Spermatozoa	42

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu bioteknologi di bidang reproduksi yang bertujuan untuk meningkatkan mutu genetik ternak. Teknologi di sub sektor peternakan ini mudah sekali diterapkan di lapangan, karena selain biayanya yang relatif murah, juga akan dihasilkan keturunan yang berkualitas baik. Teknologi IB akan berdaya guna apabila menggunakan program *sexing* yang menghasilkan keturunan berjenis kelamin tertentu sesuai dengan pengembangan peternakan tersebut.

Salah satu upaya untuk menghasilkan keturunan dengan jenis kelamin yang sesuai harapan adalah dengan pemisahan spermatozoa sebelum inseminasi. Terdapat beberapa metode pemisahan spermatozoa yang telah digunakan oleh beberapa peneliti, salah satunya adalah metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumen.

Metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumen didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan spermatozoa Y. Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi akan mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat. Pada proses pemisahan spermatozoa X dan Y membutuhkan medium pengencer semen yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa.

Pengencer yang digunakan untuk mengencerkan semen harus memiliki sifat-sifat yang dapat mempertahankan kualitas semen segar atau dengan kata lain

pengencer semen memiliki sifat utama antara lain adalah meningkatkan volume semen, bersifat sebagai larutan penyangga, sebagai sumber nutrisi dan enersi bagi spermatozoa serta dapat melindungi sperma gangguan mikroorganisme. Oleh karena itu salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut, perlu ditambahkan satu zat yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa.

Penambahan kafein pada medium pemisah diharapkan dapat mempertahankan motilitas dan persentase daya hidup spermatozoa sapi setelah pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y. Hal ini disebabkan karena kafein diduga dapat meningkatkan pergerakan ke depan dan merangsang motilitas pada spermatozoa baik yang motil maupun yang tidak motil. Oleh karena itu perlu adanya kajian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pengencer albumen telur itik pada proses pemisahan spermatozoa sapi Limousin dengan penambahan kafein selama proses pembekuan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kafein yang berbeda terhadap kualitas semen beku sapi limousin setelah pemisahan spermatozoa kromozom X dan spermatozoa kromozom Y yang menggunakan albumen telur itik sebagai medium pemisah. Kegunaan penelitian ini adalah sebagai bahan informasi ilmiah bahwa dengan penambahan kafein dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

TINJAUAN PUSTAKA

Karakteristik Sapi Limousin

Limousin adalah sapi pedaging lokal di Prancis dan beradaptasi pada kondisi yang kritis di musim dingin dan mudah dipelihara. Seperti pada sapi pedaging lainnya. Sapi limousin termasuk sapi berbadan besar, tinggi 1,5 m, dengan berat bervariasi antara 500 – 750 kg, bulunya cukup tebal dan kompak menutupi seluruh tubuhnya.

Bangsa sapi limousin berasal dari sebuah propinsi di Prancis yang banyak berbukit batu. Warnanya mulai dari kuning sampai merah keemasan. Bobot lahirnya tergolong kecil sampai medium yang berkembang menjadi golongan besar pada saat dewasa. Betina dewasa dapat mencapai 575 kg sedangkan pejantan dewasa mencapai berat 1100 kg. Fertilitasnya cukup tinggi, mudah melahirkan, mampu menyusui dan mengasuh anak dengan baik serta pertumbuhannya cepat (Blakely, 1994)

Karakteristik Semen

Toelihere (1993) menyatakan bahwa karakteristik semen pada sapi memiliki volume 5 – 8 ml, konsentrasi sperma 1000 – 2000 juta/ml, jumlah sperma/ejakulat 4,8 milyar, pH 6,8 dengan sperma motil 65% dan sperma morfologik normal 85%.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa setelah penampungan dilakukan pemeriksaan semen baik secara makroskopis (Volume, warna, konsistensi, pH) dan secara mikroskopis (Gerakan massa, gerakan individu dan mati-hidup).

1. Volume

Volume semen yang tertampung dapat langsung terbaca pada tabung penampung yang berskala. Setiap jenis ternak mempunyai batas-batas volume tertentu. Toelihere (1993) menyatakan bahwa volume semen sapi bervariasi antara 1,0 sampai 15,0 ml. Volume rendah tidak merugikan, tetapi bila disertai dengan konsentrasi sperma yang rendah akan membatasi jumlah spermatozoa yang tersedia.

2. Warna

Partodihardjo (1980) menyatakan bahwa pada umumnya semen sapi berwarna krem keputih-putihan atau hampir seputih susu. Derajat kekeruhannya atau keputih-putihannya sebagian besar tergantung pada konsentrasi sel spermanya. Semakin keruh biasanya jumlah sperma per-ml semen itu semakin banyak. Toelihere (1993) menyatakan bahwa semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi sperma. Kirakira 10 % sapi-sapi jantan menghasilkan semen yang normal berwarna kekuning-kuningan.

3. Derajat Keasaman

Derajat keasaman dapat diukur dengan pH meter atau kertas lakmus. Derajat keasaman dipengaruhi oleh daya tahan hidup sperma. Derajat keasaman atau pH semen pada sapi sekitar 6,8 (Toelihere, 1993)

4. Konsistensi

Konsistensi atau derajat kekentalan dapat diperiksa dengan menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan-lahan. Toelihere (1993) menyatakan bahwa



pada sapi, semen dengan konsistensi seperti susu kental mempunyai konsentrasi 1000 juta sampai 2000 juta atau lebih sel per ml; suatu konsistensi seperti susu-encer memiliki konsentrasi 500 sampai 600 juta sel per ml; semen yang cair berawan atau hanya sedikit kekeruhan konsentrasi sekitar 100 juta sel per ml dan yang jernih seperti air kurang dari 50 juta sel per ml.

5. Motilitas

Motilitas atau pergerakan spermatozoa merupakan salah satu penentu kualitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh proses pengenceran semen yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma dan menurunkan motilitas (Maxwell dan Wason, 1996). Kerusakan akrosom akan menurunkan metabolisme sel, dan dehidrasi sehingga mengakibatkan turunnya persentase hidup spermatozoa. Motilitas atau daya gerak spermatozoa yang dinilai segera sesudah penampungan semen umumnya dapat digunakan sebagai ukuran kesanggupan membuahi suatu contoh semen (Toelihere dan Yusuf, 1976).

Gerakan massa spermatozoa mempunyai nilai (++) dinyatakan baik karena terlihat gelombang dan gerakan gelombangnya cukup aktif dalam pengamatan mikroskopis. Syarat semen untuk dibekukan harus mempunyai motilitas massa 2+ (Anonim, 1997). Gerakan massa ditetapkan dengan kriteria sebagai berikut (BIB Lembang, 1992) :

- 0 : Tidak ada gerakan sperma maupun gerakan gelombang
- 1 : Terlihat gerakan beberapa sperma tetapi tidak ada gerakan gelombang
- 1⁺ : Terlihat gerakan gelombang lemah (hampir tidak terlihat)

- 2 : Terlihat gerak gelombang tipis
- 2⁺ : Terlihat gelombang sedang tipis
- 3 : Terlihat gelombang cepat seperti awan abu-abu
- 3⁺ : Terlihat gelombang tebal hitam abu-abu cepat sekali

Semen yang berkualitas baik mempunyai gerakan individu minimal 70 % (Anonim, 1997). Gerakan individu dinilai dengan angka 0 – 5 yang didasarkan persentase spermatozoa yang bergerak (Yani, dkk.,2001) dengan klasifikasi sebagai berikut :

- 0 : Spermatozoa yang bergerak kurang dari 10%
- 1 : Spermatozoa yang bergerak 10 – 20%
- 2 : Spermatozoa yang bergerak 21 – 40%
- 3 : Spermatozoa yang bergerak 41 – 60%
- 4 : Spermatozoa yang bergerak 61 – 80%
- 5 : Spermatozoa yang bergerak 81 – 100%

6. Persentase Hidup

Penentuan persentase hidup dapat dilakukan dengan zat pewarna eosin, di mana sel sperma yang mati akan menghisap warna sehingga kepalanya nampak berwarna merah, sedangkan yang tidak menghisap warna adalah sperma hidup yang memiliki warna putih (Toelihere, 1993). Perbedaan aktifitas antara sel sperma yang mati dan hidup kemungkinan untuk menafsirkan jumlah sperma yang hidup didalamnya (Partodihardjo, 1992).

Sexing Spermatozoa Pembawa kromosom X dan kromosom Y

Sexing Spermatozoa Pembawa kromosom X dan kromosom Y

Sexing adalah suatu cara pemisahan spermatozoa X dan Y, yang dapat dilakukan dengan cara dan bahan yang bermacam-macam. (Isnaini, 1994). Tandean, dkk., (1980) menyatakan bahwa spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak dikepalanya, sehingga mengakibatkan ukuran kepala spermatozoa X lebih besar. Spermatozoa Y yang biasanya lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak, serta kemungkinan materi genetik dan DNA yang dikandung spermatozoa Y lebih sedikit daripada spermatozoa X yang menyebabkan perbedaan densitas antara keduanya (Syafei. 1988). Morruzi (1979) pertama kali mengemukakan bahwa DNA mungkin dapat digunakan sebagai faktor pembeda dari kromosom kelamin dan menjadi dasar pemisahan sperma yang mengandung kromosom X dan Y. Kebanyakan kromosom X pada mamalia membawa DNA yang lebih banyak dibanding dengan kromosom Y. Kromosom Y lebih kecil dan membawa DNA lebih sedikit dibanding kromosom X.

Perkembangan metode pemisah lebih banyak diarahkan untuk mengidentifikasi parameter yang berhubungan dengan karakteristik sperma X dan Y yang menjadi dasar pemisahannya. Terlepas dari besarnya perbedaan dari karakteristik aktual sperma X dan Y, ragam biologis yang menjadi karakteristik dari kedua populasi tidak dapat dijadikan sebagai kriteria untuk pemisahan .

Metode pemisahan dengan menggunakan albumen telur didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y. Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi (Y) akan mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat, sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada pada medium yang mempunyai konsentrasi rendah (Susilawati, dkk., 2002).

Albumen (putih telur) dapat dijadikan bahan pengganti *Bovine Serum Albumen* (BSA). Metode ini mudah sekali diterapkan dilapangan, mudah diperoleh dan terjangkau. Selain itu, medium ini juga dapat berfungsi efektif terhadap upaya perubahan rasio alamiah spermatozoa X dan Y serta dapat mempertahankan kualitas dan kuantitas spermatozoa selama proses pemisahan. Kombinasi medium pemisah yang digunakan adalah konsentrasi 10 % pada lapisan atas dan 30 % pada lapisan bawah. Hasil ini mampu mengubah proporsi perolehan spermatozoa dari kondisi normal (Saili, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Pancahasta (1999) bahwa pemisahan spermatozoa dengan putih telur diperoleh rata-rata persentase spermatozoa Y pada lapisan atas adalah $36,80 \pm 8,05$ % dan untuk lapisan bawah yaitu $77,20 \pm 4,09$ %.

Proses pemisahan spermatozoa X dan Y membutuhkan medium pengencer semen yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa (Susilawati, dkk, 2002). Media pengencer sangat mempengaruhi keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y, untuk itu penambahan zat dalam media pengencer sangat diperlukan untuk menunjang proses kapasitas spermatozoa selama proses pemisahan.

Pemisahan Spermatozoa Menggunakan Albumen

Putih telur yang biasa digunakan disebut albumen merupakan bagian dari telur yang berfungsi sebagai anti bakteri dan buffer untuk mempertahankan sifat fisik dan kimia telur. Putih telur terdiri dari tiga lapisan materian yaitu "*inner thin albumen*" berbentuk cairan agak kental yang terletak pada bagian yang paling dalam dari dalam telur, "*thick albumen*" tengah dan bersifat kental, serta lapisan "*outher thin albumen*" berbentuk cairan encer yang terletak pada bagian paling luar putih telur (McWilliams, 1997).

Menurut Anonim (2002), kandungan protein, lemak dan karbohidrat pada albumen telur itik masing-masing adalah 13,3 %, 14,5 %, dan 0,7 %. Komponen pokok yang terkandung dalam putih telur adalah sebagai berikut : protein 12,0 %; lemak 0,3 %; garam 0,3 %; dan air 87 %. Albumen telur itik dapat dijadikan sebagai media pemisah spermatozoa X dan spermatozoa Y karena disamping memiliki viskositas yang tinggi sehingga dapat membentuk lapisan juga harganya murah dibandingkan dengan Bovine Serum Albumin (BSA) dan mudah didapatkan, tetapi albumen telur itik ini juga memiliki kekurangan yaitu harganya mahal dibandingkan dengan telur ayam ras dan cepat rusak. Putih telur terdiri dari bermacam-macam protein, enzim, inhibitor, anti baktteri, vitamin, dan mineral. Protein merupakan bagian terbanyak bahan organik yang menyusun putih telur yang terdiri atas ovoalbumen, ovotransferin, ovomuein, *lysozyme*, avadin, globulin. Sebagai komponen utamanya (Hazelwood, 1983 dan Williams, 1997) persentase protein yang terdapat pada putih telur.

Sifat dan fungsi beberapa komponen penyusun putih telur (Hazelwood, 1983 dan Williams, 1997) yaitu :

1. Ovoalbumen merupakan protein yang terdapat dalam putih telur yang berlimpah kurang kurang lebih 45 % dan bersifat *phosphoglycoprotein*.
2. Ovotransverin sering disebut conalbumin yang mengikat Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , dan Ni^{2+}
3. Ovomuroid merupakan kekuatan pelindung proteolisis, pelindung tripsin, dan pelindung spesies spesifik serta mengandung 22 % karbohidrat.
4. Ovomucin sebagai cadangan karbohidrat luar biasa tinggi yang tidak dapat dipecahkan, merupakan serat protein dan berfungsi menjaga viskositas putih telur.
5. *Lysozyme* menghidrolisis ikatan, β (1 – 4) *glycosidic* dalam dinding sel bakteri *peptidoglycan*, membantu pembentukan *oligosaccharides* dari dinding sel bakteri *tetrasacharide* oleh *transglycosylation*.
6. Globulin sebagai stabilisator
7. Ovoinhibitor sebagai pelindung *proteolytic* bermacam enzim misalnya tripsin, *chymotripsin*, papain dan ficin.
8. Ficin (cystatin) inhibitor : melindungi thioprotease.
9. *Ovoglycoprotein* sebagai sialoprotein.
10. *Ovomacroglobulin* sebagai antigenik kuat.
11. *Avidin* sebagai agen anti bakteri dan mengikat biotin.

Pemisahan dengan menggunakan albumen merupakan metode yang cukup fleksibel dan mudah diterapkan dilapangan. Metode ini didasarkan atas perbedaan motilitas spermatozoa X dan spermatozoa Y sebagai implikasi dari perbedaan massa dan ukuran. Massa dan ukuran spermatozoa Y yang lebih kecil dari spermatozoa X menyebabkan spermatozoa tersebut mampu bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan (Jaswandi, 1996).

Proses pemisahan spermatozoa X dan spermatozoa Y membutuhkan medium pengencer semen yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa, di samping itu medium pengencer sangat mempengaruhi keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan spermatozoa Y.

Pengenceran Semen

Syarat-syarat pengencer adalah murah, mudah dan praktis dibuat, tidak boleh mengandung zat toksik baik terhadap spermatozoa maupun saluran reproduksi betina, mengandung unsur-unsur sama dengan sifat fisik dan kimiawi spermatozoa, memberi kemungkinan penilaian sperma sesuai dengan pengenceran, dan tidak boleh membatasi daya fertilitas spermatozoa (BIB Lembang, 1992).

Fungsi pengenceran adalah untuk memperbanyak volume semen, melindungi spermatozoa dari cold shock (cekaman dingin) selama pembekuan, menyediakan zat makanan, menyediakan buffer sebagai penetralisasi asam laktat yang diproduksi oleh aktifitas metabolisme spermatozoa dan mencegah kemungkinan pertumbuhan

kuman. Pengencer harus isotonis dengan spermatozoa (Bearden dan Fuquay, 1984; Toelihere 1993)

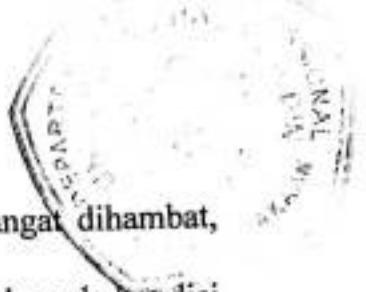
Motilitas atau pergerakan spermatozoa merupakan salah satu penentu kualitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh proses pengenceran semen yang dapat menyebabkan rusaknya membran plasma dan menurunkan motilitas (Maxwell dan Wason, 1996), kerusakan akrosom akan menurunkan metabolisme sel, dehidrasi sehingga mengakibatkan turunnya persentase hidup spermatozoa.

Proses Pembekuan Semen

Toelihere (1993) menyatakan bahwa pembekuan adalah suatu fenomena pengeringan fisik. Apabila suatu larutan dibekukan, maka pelarut yaitu air, membeku menjadi kristal-kristal es, dan bahan terlarut tidak bersatu dengan kristal-kristal tersebut melainkan berakumulasi dan makin pekat. Pada pembekuan semen dimana terbentuk kristal-kristal es, terjadi penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya didalam larutan atau didalam sel-sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Partodiahardjo (1980) yang menyatakan bahwa mani beku ialah mani yang telah diencerkan menurut prosedur biasa, lalu dibekukan jauh dibawah titik beku air.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas semen antara lain :

Makanan : Pada umumnya, apabila reproduksi terganggu pada hewan dewasa karena kekurangan makanan, mudah diperbaiki dengan memberi makanan yang layak dan cukup baik kualitas dan kuantitasnya. Tetapi apabila pertumbuhan hewan tersebut



sudah terhalang dan perkembangan alat-alat reproduksinya sudah sangat dihambat, maka akan sukar sekali untuk mengembalikan alat-alat reproduksinya kepada kondisi fungsionalnya yang baik dengan pemberian makanan yang cukup. Pejantan harus dipertahankan pada kondisi fisik yang baik dan tidak boleh menjadi gemuk.

Suhu dan Musim : Suhu lingkungan yang terlampau rendah atau terlampau tinggi dapat mempengaruhi reproduksi hewan jantan. Fungsi thermoregulatoris scrotum dapat terganggu dengan akibat-akibat buruk terhadap spermatogenesis. Peninggian suhu testes karena testes yang tersembunyi, penyakit-penyakit kulit atau luka lokal, demam yang tak kunjung mereda karena penyakit, penyakit menular dan peninggian suhu udara karena kelembaban yang tinggi dapat menyebabkan kegagalan pembentukan dan penurunan produksi spermatozoa. Musim mempengaruhi pula kualitas dan kuantitas semen, terutama pada hewan-hewan liar.

Frekuensi ejakulasi : Produksi spermatozoa adalah suatu proses yang kontinyu dan tidak dipengaruhi oleh frekuensi ejakulasi, secara teoritik seharusnya tidak ada batas pemakaian pejantan. Namun demikian, jumlah pemakaian pejantan dalam satu satuan waktu perlu dibatasi mengingat hasil-hasil pengamatan bahwa frekuensi ejakulasi yang terlampau sering dalam satuan waktu yang relatif pendek cenderung untuk menurunkan libido, volume semen dan jumlah spermatozoa per ejakulasi

Umur : Spermatogenesis dimulai sewaktu hewan mencapai masa pubertas yaitu pada umur 8 – 12 bulan pada sapi perah, 11 – 15 bulan pada sapi pedaging. Walaupun perkawinan yang fertil dapat terjadi pada waktu pubertas, testes terus

berkembang dan menghasilkan lebih banyak sperma, sudah menjadi kebiasaan untuk membatasi pemakaian pejuantan muda.

Vishwanath and Shannon (2000) menyatakan bahwa stres yang berhubungan dengan pembekuan lebih banyak berhubungan dengan perubahan temperatur yang terjadi pada spermatozoa selama proses pendinginan, pengaruh pengrusakan oleh komponen media dan cryoprotektan itu sendiri dan pada akhirnya pengaruh dari *thawing*. Tujuan dari ekuilibrisasi adalah untuk memudahkan terjadinya transportasi air sehingga mengurangi pengaruh buruk dari kristal es selama pembekuan dan selama *thawing*. Waktu ekuilibrisasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Toelihere, 1993).

Toelihere (1993) menyatakan bahwa yang banyak digunakan untuk keperluan inseminasi buatan adalah mani beku dalam mini straw atau straw plastik. Mula-mula dibuat mini straw dengan ukuran volume 0,5cc, tetapi setelah diketahui lebih baik atau sama dengan yang bervolume 0,25cc maka kini tersedia dua macam mani beku dalam straw, yaitu 0,5cc dan 0,25cc ukuran 0,25cc pada umumnya disebut mini straw

Kelebihan dan kekurangan pada penggunaan semen di lapangan baik dalam bentuk cair maupun beku dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Kelebihan dan Kekurangan Semen Cair dan Semen Beku

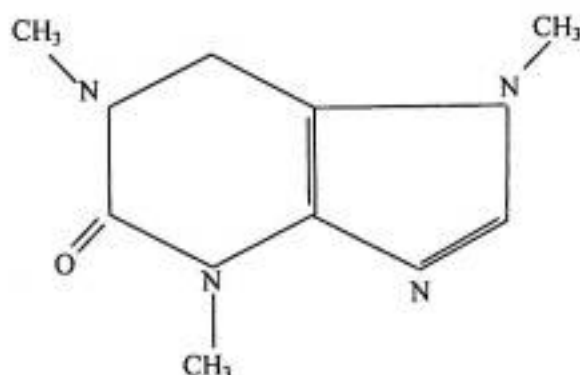
Semen Cair	Semen Beku
<ul style="list-style-type: none"> ● Kelebihan <ul style="list-style-type: none"> - Jumlah sperma rendah - Daya guna jantan lebih tinggi - Biaya lebih murah - Mudah digunakan di lapangan ● Kekurangan <ul style="list-style-type: none"> - Daya hidup terbatas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Kelebihan <ul style="list-style-type: none"> - Daya simpan lebih lama - Fleksibel dalam penggunaannya ● Kekurangan <ul style="list-style-type: none"> - Jumlah sperma lebih banyak - lebih mahal

Sumber : Vishwanath and Shannon. 2000.

Proses pembekuan hasilnya akan berbeda dibandingkan semen cair. Hal ini menunjukkan bahwa kegagalan ini muncul dari kombinasi hilangnya viabilitas spermatozoa dan hilangnya kemampuan berfungsi dari sejumlah spermatozoa. Keadaan seperti ini dibutuhkan untuk mencari langkah yang lebih tepat untuk memajukan hasil yang telah dicapai. Kita perlu menekankan bahwa bukan hanya jumlah yang dapat bertahan hidup, yang perlu diperhatikan pada pembekuan semen, akan tetapi juga kemampuan fungsional dari spermatozoa yang dapat bertahan hidup (Maxwell, 1996)

Penambahan Kafein

Kafein dengan nama kimia 1,3,7-trimetil-3,7-dihidropurin (gambar 1) memiliki bentuk seperti bubuk, tidak berbau, dapat larut dalam air dan alkohol, yang diperoleh dari kopi, teh, guarana dan kacang mete. Pada mamalia kafein dapat merangsang sistem saraf pusat khususnya serebrum, kafein juga mempunyai efek diuretik terhadap ginjal, merangsang otot lurik, kafein juga digunakan untuk merangsang motilitas semen dan juga pada sistem kardiovaskular (Dorland, 1996).



Gambar 1. Rumus Kimia Kafein

Kafein mampu mempengaruhi motilitas pada spermatozoa yang motil maupun tidak motil, seperti yang terdapat pada testes karena kafein berfungsi sebagai penghambat siklus nukleotida fosfodiesterase. Oleh karena itu kafein mempengaruhi level intraselular dari siklus AMP yang terlibat dalam motilitas spermatozoa jantan yang diobservasi. Namun pemberian senyawa yang dengan konsentrasi yang lebih tinggi akan berpengaruh negatif terhadap motilitas sperma (El-Gaafary, Daader and Ziedan, 1990). Hal ini didukung oleh Niwa and Ohgoda (1998) yang menyatakan bahwa kafein menghambat nukleotida fosfodiesterase yang

bertanggung jawab atas penurunan cAMP. Oleh sebab itu pemberian kafein menyebabkan meningkatnya konsentrasi cAMP intraselular.

Dewi (2005), menyatakan bahwa motilitas spermatozoa kambing Boer selama enam hari penyimpanan yang diberikan level kafein 2 mM/ml terlihat lebih tinggi dibandingkan level 3 dan 4 mM/ml. Menurut Kim, Ellington dan Foote (1990) yang dilaporkan oleh Susilawati dkk (1999) menyatakan bahwa kafein juga dapat ditambahkan ke dalam fertilisasi *in vitro*, sebab kafein dan heparin bekerja secara sinergis mempercepat kapasitas dan reaksi akrosom. Lebih lanjut dinyatakan oleh Nakao dan Nakatsuji (1990), bahwa sebagai teknik persiapan spermatozoa yang baik diawali dengan pencucian spermatozoa dalam media Brackett dan Oliphant (BO) tanpa Bovine Serum Albumin (BSA), tetapi mengandung 10 mM/ml kafein

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Mei 2006, di mana penampungan semen, *sexing* dilaksanakan di Unit Pengembangan Ternak Daerah – Inseminasi Buatan (UPTD-IB) Jongaya Makassar dan pengamatan spermatozoa dilakukan di Laboratorium Fisiologi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Materi Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah vagina buatan, tabung reaksi, gelas ukur, pipet volume, sentrifuge, labu Erlenmeyer, spoit, saringan, kapas, tissue, objek glass, deck glass, alumunium foil dan kertas label.

Bahan-bahan yang digunakan adalah semen sapi, albumen telur ayam itik sebagai media pemisah, alkohol, larutan pengencer (Andromed), dan kafein dengan level 0 (sebagai control) 10 dan 20 mM/ml

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial ($2 \times 3 \times 6$) untuk motilitas, dan pola ($2 \times 3 \times 3$) untuk persentase hidup dengan 4 kali ulangan untuk pengukuran yang berulang, faktor pertama (A) adalah peningkatan konsentrasi medium pemisah albumen telur (10% dan 30%), faktor kedua (B) adalah penambahan level kafein

pada level yang berbeda (0, 10 dan 20 mM/ml) dan faktor ketiga (C) adalah lama pengamatan (0, 3, 6 jam).

Prosedur penelitian yang akan dilakukan terdiri atas beberapa tahap yaitu :

a. Penyiapan Semen

Semen sapi ditampung sekali dalam seminggu dan dilakukan evaluasi semen segar, yakni sebelum penambahan larutan pengencer baik secara makroskopis (volume, warna, pH dan konsistensi) maupun mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, persentase hidup dan konsentrasi sperma).

b. Pembuatan Media Pemisah

Pembuatan medium pemisah dengan konsentrasi 30% menggunakan albumen telur sebanyak 30 ml yang dimasukkan ke dalam 70 ml NaCl 0,9% dan medium pemisah dengan konsentrasi 10% menggunakan albumen telur sebanyak 10 ml yang dimasukkan ke dalam 90 ml NaCl 0,9% kemudian dihomogenkan selama 20 menit. Setelah medium pemisah tersedia kemudian disimpan pada temperatur 5°C.

c. Pemisahan Spermatozoa

Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi media pemisah masing-masing 1 ml dan dibiarkan mengendap selama \pm 20 menit. Berdasarkan media pemisah setiap fraksi semen disedot dengan menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung reaksi kemudian semen disentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Kemudian sampel ditambahkan larutan pengencer untuk mendapatkan endapan spermatozoa yang bersih dari medium pemisah. Setelah itu sampel semen disimpan pada suhu 37°C.

d. Penambahan Larutan Pengencer

Selanjutnya endapan spermatozoa diencerkan dengan bahan pengencer. Pengencer tersebut ditempatkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan kafein masing-masing dengan konsentrasi 0, 10 dan 20 mM/ml

e. Pengemasan Semen dan Ekuilibrasi

Pengemasan kedalam mini straw, dilakukan didalam ruangan dingin setelah itu dilakukan ekuilibrasi yaitu proses penyesuaian spermatozoa terhadap pengencer agar sewaktu pembekuan kematian sperma yang berlebihan dapat dicegah. Setelah dilakukan ekuilibrasi maka straw yang telah diatur di atas rak kemudian dimasukkan kedalam uap N₂ cair (dileher container) selama 20 menit, setelah itu *straw* direndam dalam N₂ cair selama ± 2 hari.

f. Thawing dan Pemeriksaan Setelah Pembekuan.

Semen yang telah dibekukan selama ± 2 hari kemudian diangkat dari nitrogen cair dan dimasukkan kedalam air hangat (37° C) selama 15 – 30 detik. Straw digunakan pada bagian tengah untuk mengeluarkan semen kemudian dilakukan pemeriksaan mikroskopis.

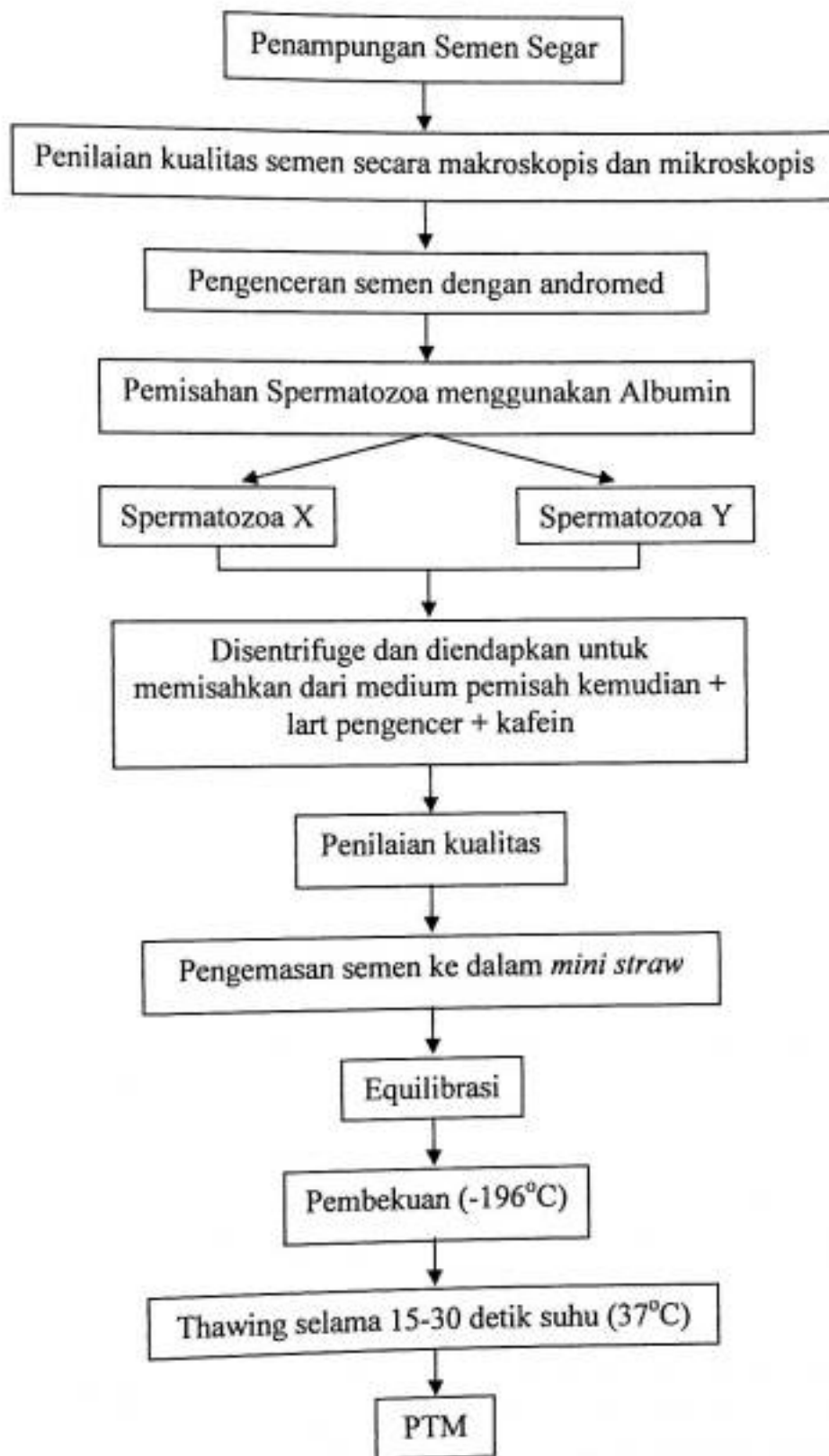
Parameter yang diukur pada semen segar pH, warna, volume, gerakan massa, dan konsistensi. Sebelum pembekuan parameter yang diukur gerakan individu, konsentrasi. Setelah pembekuan (*thawing*) parameter yang diukur adalah persentase daya hidup dan persentase motilitas selam 0 jam, kemudian semen beku disimpan dalam inkubator dan dilakukan pemeriksaan setelah 3 dan 6 jam.

g. Penilaian Motilitas.

Semen ditetaskan pada *object glass* dan ditutup dengan *deck glass* kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Penilaian gerakan massa ditetapkan dengan skor 0; 1; 1⁺; 2; 2⁺; 3; 3⁺; sedangkan penilaian motilitas individu ditetapkan dengan skor 0; 1; 2; 3; 4; 5 (Wahjuningsih, dkk.,1998).

h. Perhitungan Persentase Hidup

Perhitungan persentase hidup menggunakan preparat ulas yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Preparat ulas dibuat dengan meneteskan setetes semen pada *object glass* ditambah setetes pewarna eosin dan dihomogenkan. Setelah itu diulas dengan menggunakan *deck glass* kemudian dikeringkan dan dievaluasi. Spermatozoa yang berwarna merah terhitung mati dan spermatozoa yang tidak menyerap warna atau sedikit menyerap warna terhitung hidup. Prosedur penelitian yang akan dilaksanakan dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Alur Penelitian

Analisa Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini dianalisis berdasarkan analisis ragam dengan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial untuk analisis Motilitas (2 x 3 x 6) dan Persentase Hidup (2 x 3 x 3) dengan 4 ulangan, menggunakan program SPSS 10,0 for Windows metode pengukuran berulang (Repeated Measurement).

Model matematika rancangan percobaan yang digunakan adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \eta_{ijl} + C_k + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

- i = 1, 2 (Medium pemisah)
j = 1, 2, 3, 4 (Level Kafein dengan perlakuan kontrol (0), 10 mM/ml dan 20 mM/ml)
k = Analisis Motilitas 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Periode pengamatan, 1 = pengamatan semen segar, 2 = pengamatan setelah sexing, 3 = pengamatan setelah penambahan heparin, 4 = pengamatan pada nol jam, 5 = pengamatan pada 3 jam, 6 = pengamatan pada 6 jam). Untuk analisis Persentase hidup 1, 2, 3 (Periode pengamatan pada 0 jam, 3 jam dan 6 jam)
l = 1, 2, 3, 4 (Ulangan)

Keterangan:

- Y_{ijkl} = Nilai pengamatan (respon) dari kelompok ke-l yang memperoleh taraf ke-i dari faktor A, taraf ke-j dari faktor B dan taraf ke-k dari faktor C.
 μ = Nilai rata-rata yang sesungguhnya
 A_i = Pengaruh aditif dari taraf ke-i faktor A
 B_j = Pengaruh aditif dari taraf ke-j faktor B
 $(AB)_{ij}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-i faktor A dan taraf ke-j faktor B
 η_{ijl} = Pengaruh galat percobaan pada kelompok ke-l yang memperoleh taraf ke-i faktor A, taraf ke-j faktor B
 C_k = Pengaruh aditif dari taraf ke-k faktor C
 $(AC)_{ik}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-i faktor A dan taraf ke-k faktor C
 $(BC)_{jk}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-j faktor B dan taraf ke-k faktor C
 $(ABC)_{ijk}$ = Pengaruh interaksi taraf ke-i faktor A, taraf ke-j faktor B dan taraf ke-k faktor C
 ϵ_{ijkl} = Pengaruh galat percobaan pada kelompok ke-l yang memperoleh taraf ke-i faktor A, taraf ke-j faktor B dan taraf ke-k faktor C

HASIL DAN PEMBAHASAN



Kualitas Semen Segar Sapi Limousin

Penilaian makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Karakteristik Semen Segar Sapi Limousin yang Digunakan pada Penelitian

Parameter	Nilai
A. Makroskopis	
Volume (cc)	4,37
Warna	Putih Susu
Konsistensi	Sedang
pH	5,7
B. Makroskopis	
Motilitas Massa	(++) sampai (+++)
Motilitas Individu	70%
Konsentrasi (Juta / ml)	758,25

Semen segar sapi Limousin penelitian yang dinilai secara makroskopis dan mikroskopis memenuhi syarat untuk diberikan perlakuan selanjutnya

Rata-rata volume semen segar sapi Limousin penelitian adalah 4,37 cc, walaupun volume ini berada dibawah standar untuk semen sapi, yakni 5 – 8 cc Toelihere (1993), namun volume rendah ini tidak merugikan karena mempunyai konsentrasi sperma yang tinggi

Semen segar sapi Limousin pada penelitian yang telah dilakukan berwarna putih susu, hal ini sesuai dengan pendapat Partodihardjo (1980) menyatakan bahwa pada umumnya semen sapi berwarna krem keputih-putihan atau hampir seputih susu. Derajat kekeruhannya atau keputih-putihannya sebagian besar tergantung pada konsentrasi sel spermanya. Semakin keruh biasanya jumlah sperma per-ml semen itu semakin banyak. Toelihere (1993) menyatakan bahwa semen sapi normal berwarna

seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi sperma. Kira-kira 10 % sapi-sapi jantan menghasilkan semen yang normal berwarna kekuning-kuningan.

Derajat keasaman (pH) sangat menentukan keberadaan hidup spermatozoa dalam semen. Derajat keasaman yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan menggunakan pH meter atau kertas lakmus adalah 5,7 dan condong kearah asam, hal ini tidak sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa derajat keasaman atau pH semen pada sapi sekitar 6,8.

Konsistensi dan konsentrasi semen segar sapi Limousin pada penelitian adalah konsistensi sedang dengan konsentrasi 758,25 juta. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) menyatakan bahwa pada sapi, semen dengan konsistensi seperti susu kental mempunyai konsentrasi 1000 juta sampai 2000 juta atau lebih sel per ml; suatu konsistensi seperti susu encer memiliki konsentrasi 500 sampai 600 juta sel per ml; semen yang cair berawan atau hanya sedikit kekeruhan konsentrasi sekitar 100 juta sel per ml dan yang jernih seperti air kurang dari 50 juta sel per ml.

Motilitas massa semen segar sapi Limousin penelitian adalah 2+ sampai 3 hasil yang diperoleh ini dalam kisaran normal. Hal ini sesuai dengan pendapat Anonim (1997) menyatakan bahwa gerakan massa spermatozoa mempunyai nilai (++) dinyatakan baik karena terlihat gelombang dan gerakan gelombangnya cukup aktif dalam pengamatan mikroskopis. Syarat semen untuk dibekukan harus mempunyai motilitas massa 2+. Hal ini sesuai dengan pendapat BIB Lembang (1992), bahwa motilitas massa bernilai 3+, terlihat gelombang tebal hitam abu-abu

dan cepat sekali. Motilitas massa yang bernilai 2 sampai 3 dapat diproses untuk perlakuan selanjutnya.

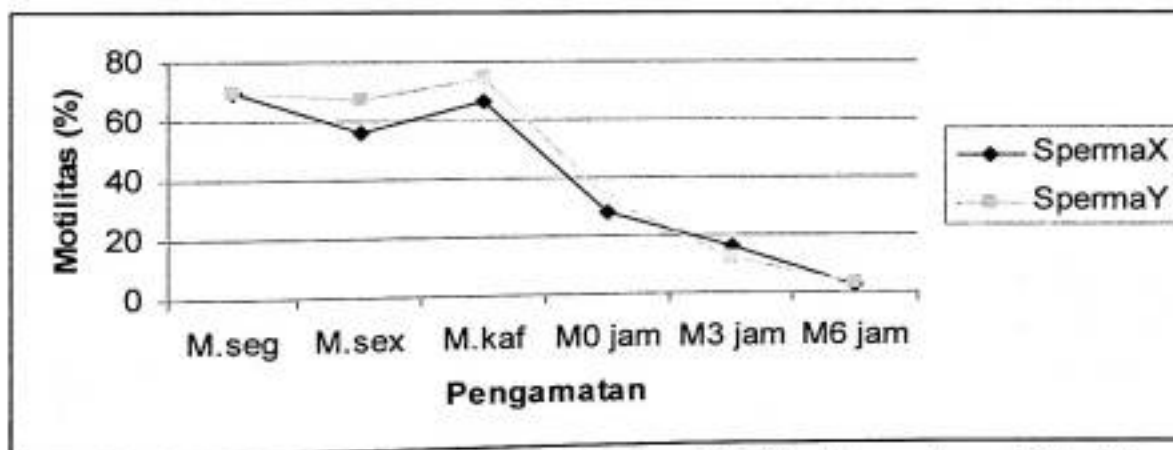
Pengaruh Penggunaan Medium Pemisah Terhadap Motilitas Spermatozoa.

Berdasarkan hasil analisis ragam selama penelitian (Lampiran 6) menunjukkan bahwa perlakuan medium pemisah dan level kafein, berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa, tetapi interaksi antara medium dan level kafein tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa medium pemisah dapat membedakan motilitas spermatozoa pembawa kromosom X dan kromosom Y

Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) (Lampiran 7) motilitas spermatozoa pada medium pemisah fraksi bawah (30%) nyata lebih tinggi ($P < 0,01$) dibandingkan medium pemisah fraksi atas (10%). Hal ini disebabkan karena spermatozoa Y memiliki ukuran kepala yang lebih kecil, ringan, sehingga pergerakannya lebih cepat dan mampu menembus sampai konsentrasi yang lebih pekat pada medium pemisah fraksi bawah (30%) dibandingkan spermatozoa X yang memiliki ukuran kepala yang lebih besar tidak mampu menembus konsentrasi 30%, sehingga hanya berada pada konsentrasi rendah (10%). Hal ini didukung oleh pendapat Syafei (1988) bahwa spermatozoa Y yang biasanya yang lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak.

Hasil analisis ragam pada pengamatan motilitas dengan level kafein terhadap motilitas spermatozoa setelah thawing (Lampiran 6) menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$). Demikian pula interaksi periode pengamatan dengan penambahan level kafein berpengaruh nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa.

Motilitas spermatozoa pada periode pengamatan dengan medium, periode pengamatan dengan level berpengaruh nyata ($P < 0,05$) sedangkan interaksi antara medium dan level tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas. Hal ini menunjukkan bahwa selama periode pengamatan dari semen segar sampai setelah di thawing terjadi penurunan drastis dan terdapat laju penurunan antara spermatozoa X dan Y (Gambar 3) dan pemberian kafein (Gambar 4).

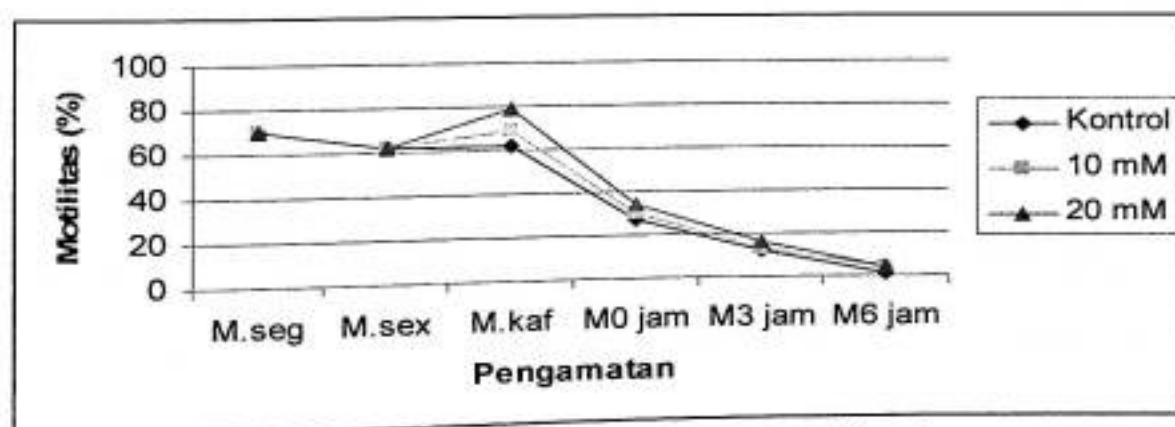


Gambar 3. Interaksi Medium Pemisah Terhadap Motilitas Spermatozoa X dan Y

Terlihat motilitas semen segar antara spermatozoa X dan Y relatif sama akan tetapi motilitas setelah *sexing* mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena medium pemisah albumen telur (10% dan 30%) mempengaruhi motilitas spermatozoa hasil *sexing* kromosom X dan Y, dimana kedua spermatozoa hasil

sexing sama-sama mengalami penurunan. Namun demikian, motilitas spermatozoa pada medium pemisah albumen telur itik fraksi bawah (30%) yang merupakan spermatozoa pembawa kromosom Y lebih baik dibandingkan motilitas pada medium pemisah albumen telur fraksi atas (10%) dengan spermatozoa pembawa kromosom X.

Setelah penambahan kafein terjadi peningkatan motilitas. Hal ini disebabkan karena kafein mampu mempengaruhi motilitas semen yang motil maupun non motil. Pada saat setelah thawing (pengenceran kembali) motilitas spermatozoa X dan Y sama-sama mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena terjadinya penurunan motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh proses metabolisme spermatozoa yang berjalan dengan cepat sehingga persediaan energi semakin berkurang. Hal ini sesuai dengan pendapat Bearden dan Fuquay (1984) bahwa bila proses metabolisme berjalan dengan cepat akan mengakibatkan persediaan energi berkurang yang mengakibatkan motilitas spermatozoa semakin lama semakin menurun.



Gambar 4. Interaksi Medium Pemisah Terhadap Level Motilitas Spermatozoa X dan Y.

Secara statistik pengaruh interaksi selama pembekuan dengan penambahan level kafein berpengaruh nyata, dengan adanya penambahan kafein menunjukkan laju

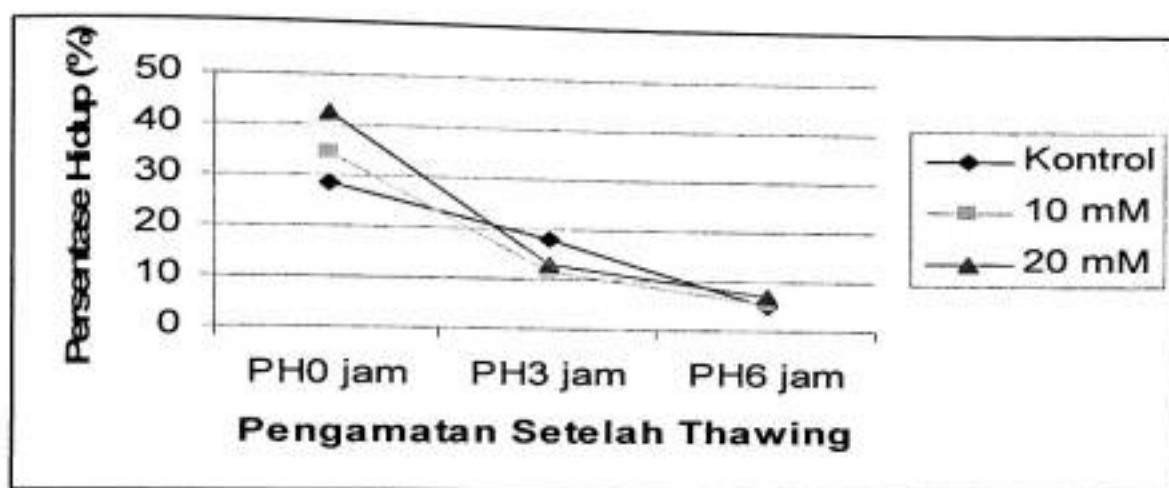
penurunan motilitas yang lebih rendah dibanding dengan kontrol. Pada penambahan kafein, penurunan motilitas tertinggi terjadi pada level 2 (10 mM) dan terendah terjadi penurunan motilitas pada level 3 (20 mM) (Lampiran 8). Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan level kafein 20 mM dapat mengurangi laju penurunan motilitas spermatozoa selama pembekuan.

Penurunan motilitas spermatozoa yang konstan selama 6 jam pada perlakuan 10 mM dan 20 mM, kemungkinan juga dipengaruhi oleh kandungan kafein yang diduga dapat menghambat siklus nukleotida fosfodiesterase yang bertanggung jawab terhadap penurunan cAMP. Hal ini sesuai dengan pendapat El-Gaafary, Daader dan Ziedan (1990) bahwa kafein mampu memenuhi motilitas pada spermatozoa yang tidak motil seperti yang terdapat pada testes, dimana kafein dapat menghambat siklus nukleotida fosfodiesterase.

Pengaruh Penggunaan Medium Pemisah dan Penambahan Level Kafein Terhadap Persentase Hidup.

Hasil analisis ragam pada periode pengamatan persentase hidup setelah pembekuan (Lampiran 10) menunjukkan bahwa perlakuan medium, level dan interaksi antara ketiga faktor tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase hidup, tetapi pada periode pengamatan persentase hidup berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase hidup. Hal ini disebabkan karena medium pemisah albumen telur berperan penting dalam proses perubahan rasio spermatozoa X dan Y serta dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Selain itu, albumen telur memiliki kandungan protein (albumin) yang mampu melindungi spermatozoa dari

mikroorganisme. Hal ini didukung oleh pendapat Susilawati, dkk., (2002) bahwa dalam albumin terdapat zat yang disebut lysozyme yang mengandung antibiotika yang dapat menghancurkan beberapa bakteri dalam hal ini zat yang dapat membunuh spermatozoa hasil *sexing*.



Gambar 5. Interaksi Level Kafein dengan Lama Pengamatan terhadap Persentase Hidup Spermatozoa.

Gambar 6 menunjukkan bahwa tingkat persentase daya tahan hidup paling tinggi setelah pembekuan terjadi pada level 3 (20mM) dan yang terendah terjadi pada level 1 (kontrol) pada 0 jam, sedangkan setelah pembekuan pada 3 jam tingkat persentase daya tahan hidup paling tinggi terjadi pada level 1 (kontrol) dan yang terendah terjadi pada level 2 (10 mM) dan tingkat persentase daya tahan hidup pada 6 jam hampir sama pada level 1, 2, dan 3 mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kafein pada level 3 (20mM) lebih efektif untuk mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa.

Penurunan daya tahan hidup sangat dipengaruhi oleh ketersediaan energi. Energi yang dibutuhkan untuk mempertahankan kondisi fisiologisnya selama

penyimpanan bersumber dari bahan pengencer. Adanya proses metabolisme spermatozoa menyebabkan persediaan energi semakin berkurang sehingga daya tahan hidup spermatozoa semakin lama semakin menurun.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka diperoleh kesimpulan bahwa penambahan kafein 20 mM memiliki laju penurunan motilitasnya rendah setelah pembekuan.

Saran

Penggunaan semen beku untuk inseminasi buatan sebaiknya menggunakan spermatozoa kromosom Y (lapisan bawah) dengan penambahan kafein pada level 10 mM dan 20 mM.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1997. Inseminasi Buatan pada Kambing. Balai Inseminasi Buatan Singosari, Malang.
- . 1992. Prosedur dan Tatacara Kerja Distribusi Semen Beku. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian. BIB Lembang, Bandung.
- . 2002. Intensifikasi Beternak Itik. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1984. Applied Animal Reproduction. 2nd Edition. Reston Publishing Company. Inc. A Prentice – Hall Company. Reston, Virginia.
- BIB Lembang. 1992. Prosedur dan Tatacara Kerja Distribusi Semen Beku. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian. BIB Lembang, Bandung.
- Blakely. J. D. 1994. Ilmu Peternakan. Edisi Keempat. Gadjah Mada University Press.
- Dorland. 1996. Kamus Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- El – Gaafary, M.N, A.D. Daader. And A. Ziedan. 1990. Effect of Cafein on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. Animal Reproduction Science. 23 : 13-90.
- Haselwood RI. 1983. Adaption of Metabolism to various Conditions : Egg Production in Fowl. In Dynamic biochemistry os Animan Production. Word Animal Science A3. Riis, PM (Editors). Elsevier science publisher BV. Amsterdam.
- Isnaini, N. 1994. Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Fries Holland dengan menggunakan gradien densitas percoll. Jurnal University Brawijaya Vol. 6 No. 2 : 70-74. <http://diglib.Brawijaya.ac.ai>.
- Jaswandi. 1996. Penggunaan Lapisan Suspensi Bovine Serum Albumen 6 dan 10 Persen dalam Kolum Untuk Memisahkan Sperma Sapi Pembawa Kromosom X dan Y Guna Mengatur Rasio Sex pada Pedet. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Julmiati, R. Gazi, Akhnaniyanti, Basri dan Y. Kahar. 2000. Usaha Peningkatan Produksi Ternak Kambing Melalui Inseminasi Buatan (IB) dengan

Spermatozoa yang diduga Pembawa Kromosom X dan Y. Program Kreativitas Mahasiswa. Universitas Hasanuddin. Makassar.

Maxwell, W.M.C and Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Research and Practice 13th International Congress on Animal Reproduction. Stone and Evan (Editor), Elsevier, Sydney, Australia.

McWilliams. 1997. Food Experimental Perspectives. Third Edition. Prentice Hall. Inc. New Jersey

Moruzzi, J.F. 1979. Selecting a mamalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 57, 319-323.

Niwa, K and Ohgoda. 1998. Synergistic effect of caffen and heparin on in vitro fertilization of cattle ocytes natured in culture. Theriogenology 30:733-742.

Pancahasta, H. 1999. Upaya merubah sex rasio spermatozoa dengan melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan putih telur pada sapi Bali. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.

Partodihardjo, S. 1980. Ilmu Reproduksi Hewan Cetakan kedua. Penerbit Angkasa, Bandung.

_____. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara, Jakarta

Saili, T. 1999. Efektivitas Penggunaan Albumen Sebagai Medium Separasi dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis Pasca Sarjana IPB, Bogor.

Sri, W. 2005. Pengaruh Penambahan Kafein Pada Level Berbeda Terhadap Peningkatan Motilitas Semen Cair Kambing Boer Hasil Sexing. Penelitian Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Susilawati, T, Hermanto, P.Srianto, E. Yuliani. 2002. Pemisahan Spermatozoa X dan Y Pada Sapi Brahman Menggunakan Gradien Putih Telur Pada Pengencer dan Tris Kuning Telur. Jurnal Ilmu-ilmu hayati vol. 14-No. 2:176-181. <http://diglib.Brawijaya.ac.ai>.

Syafei, S. 1988. Pemisahan Sperma X dan Y dengan memakai percoll dalam Jamal, A.A. dari Hati sampai ke Mata. Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang.

Tandean, O.S., S.A. Pangkajila, D. Sudjono, A. Hinting, A. Adimouldjo. 1980. Head size measurement of Spermatozoa for the identification of X and Y

Spermatozoa after filtration through a sephadex gel column. Paper Presented in Lab of Biomedic. Fac. of Medicine. Airlangga University, Surabaya.

Toelihere, M.R dan T.L. Yusuf. 1976. Pengantar Praktikum Inseminasi Buatan, Edisi 4. Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor

_____. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa, Bandung.

Vishanath, R. and Shannon. 2000. Storage of Bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62 : 23-53.

Wahjuningsih, S., T. Susilawati., G. Ciptadi. 1998. Pengaruh Pemberian PMSG dan kombinasi PMSG-HCG terhadap kualitas air mani kambing PE. Jurnal ilmu-ilmu hayati Vol. 10 – No. 2 : 52 – 57. <http://diglib.Brawijaya.ac.id>

Yani, A., Nuryadi, Pratiwi, T. 2001. Pengaruh tingkat substitusi santan kelapa pada pengencer tris dan waktu penyimpanan terhadap kualitas semen kambing Peranakan Ettawa (PE). Biosain, Vol. 1 No. 1 : 25-29.

Lampiran 1. Data Penilaian Makroskopis dan Mikroskopis Semen Segar Sapi Limousin Penelitian Selama Empat Kali Penampungan

Penampungan	Tanggal	Volume (cc)	Warna	Konsistensi	pH	Motil Massa	Motil individu	% hidup
I	25/04/06	5	Putih susu	Sedang	5,8	3	70%	88,1
II	28/04/06	5	Putih susu	Sedang	5,8	2+	70%	68,6
III	05/05/06	4,5	Putih susu	Sedang	5,8	2+	70%	57,6
IV	09/05/06	3	Putih susu	sedang	5,4	2+	70%	89
Rataan		4,37			5,7		70	75,825

Sumber : Data Hasil Penelitian 2006

Lampiran 2 : Rataan Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing Kromosom X dan Y

Motilitas Spermatozoa	Medium Pemisah	
	Fraksi (X)	Fraksi (Y)
Semen Segar	70.00 ± 00	70.00 ± 00
Sexing	56.25 ± 6.78	67.50 ± 2.61
Penambahan Kafein	66.25 ± 10.02	74.16 ± 7.01
Motilitas 0 Jam	28.38 ± 7.58	32.48 ± 11.04
Motilitas 3 Jam	15.73 ± 9.26	11.65 ± 3.95
Motilitas 6 Jam	2.71 ± 2.13	3.11 ± 2.97

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

Lampiran 3 : Rataan Persentase Hidup Hasil Sexing Kromosom X dan Y

Persentase Hidup	Level Kafein	
	Fraksi (X)	Fraksi (Y)
0 Jam	34.63 ± 15.72	35.75 ± 11.77
3 Jam	14.24 ± 12.18	14.00 ± 4.97
6 Jam	5.31 ± 2.78	6.29 ± 3.25

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

Lampiran 4: Data Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing Menggunakan Albumen Telur Itik dengan Penambahan Kafein pada Level yang Berbeda.

Medium	Level	Frekuensi	Motil1	Motil2	Motil3	Motil4	Motil5	Motil6
1	1	1	70	60	60	21.88	15	3.13
1	1	2	70	50	50	23.13	23.13	0
1	1	3	70	50	50	34.36	6.88	2
1	1	4	70	65	65	33.13	13.13	2.5
1	2	1	70	60	70	24.36	24.38	0
1	2	2	70	50	60	11.88	11.86	0
1	2	3	70	50	65	38.75	10.63	6.25
1	2	4	70	65	70	28.75	8.13	3.75
1	3	1	70	60	80	25	25	1.25
1	3	2	70	50	70	35.63	35.63	5
1	3	3	70	50	75	35	10	5
1	3	4	70	65	80	28.75	5	3.75
2	1	1	70	65	65	25	9.38	0
2	1	2	70	70	70	17.5	3.75	0
2	1	3	70	65	65	40	16.88	0.25
2	1	4	70	70	70	17.5	11.25	3.75
2	2	1	70	65	70	28.75	11.88	4.38
2	2	2	70	70	75	25	12.5	3.75
2	2	3	70	65	70	42.5	13.13	5.63
2	2	4	70	70	75	43.13	12.5	4.38
2	3	1	70	65	85	41.86	12.5	1.25
2	3	2	70	70	80	32.5	6.13	0.25
2	3	3	70	65	80	51.25	18.13	10
2	3	4	70	70	85	24.88	11.88	3.75

Keterangan : Medium : 1 (X) ; 2 (Y)
 Level : 1 (Kontrol); 2 (10mM); 3 (20mM)
 Frekuensi : 1, 2, 3, 4 adalah ulangan
 Motil1 : Motilitas segar
 Motil2 : Motilitas setelah sexing
 Motil3 : Motilitas setelah penambahan Kafein
 Motil4 : Motilitas 0 jam
 Motil5 : Motilitas 3 jam
 Motil6 : Motilitas 6 jam

Lampiran 5. Data Persentase Hidup Spermatozoa Hasil Sexing Menggunakan Albumen Telur Itik dengan Penambahan Level Kafein yang Berbeda.

Medium	Level	Frekuensi	Ph0	Ph3	Ph6
1	1	1	23.05	12.46	4.11
1	1	2	23.67	50.81	3.06
1	1	3	38.48	9.78	5.47
1	1	4	35.35	18.32	6.85
1	2	1	25.85	9.02	0.89
1	2	2	13.04	3.24	2.16
1	2	3	40.25	15.18	10.3
1	2	4	38.95	14.07	5.24
1	3	1	26.58	8.61	3.14
1	3	2	40.73	10.62	8.31
1	3	3	76.51	12.06	8.07
1	3	4	33.17	6.72	6.14
2	1	1	26.09	10.42	2.53
2	1	2	20.83	4.83	1.51
2	1	3	41.44	20.76	9.52
2	1	4	19.86	14.8	5.5
2	2	1	31.05	12.37	5.13
2	2	2	27.13	7.48	5.73
2	2	3	50.88	15.05	7.18
2	2	4	49.23	17	7.98
2	3	1	41.47	12.96	3.58
2	3	2	36.58	13.58	8.81
2	3	3	54.49	22.05	13.2
2	3	4	30.05	16.79	4.9

Keterangan : Medium : 1 (X) ; 2 (Y)
 Level : 1(Kontrol) ; 2 (10 mM) ; 3 (20 mM)
 Frekuensi : 1, 2, 3, 4 adalah ulangan
 Ph : Persentase Hidup 0, 3, 6 jam

Lampiran 6 : Hasil Analisis Ragam Motilitas spermatozoa

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hit	Sig
Luar Subjek					
Medium	1	383.997	383.997	10.782	.004*
Level	2	631.100	315.550	8.860	.002*
Medium * Level	2	30.489	15.245	.428	.658
Error	18	641.065	35.615		
Dalam Subyek					
Priode pengamatan terhadap motilitas					
- Linier	1	92610.095	92610.095	3697.879	.000*
- Quadratic	1	3684.806	3684.806	217.212	.000*
- Cubic	1	3453.236	3453.236	62.700	.000*
- Order 4	1	1933.793	1933.793	58.555	.000*
- Order 5	1	4774.188	4774.188	121.964	.000*
Priode pengamatan* Medium					
- Linier	1	195.796	195.796	7.818	.012*
- Quadratic	1	202.756	202.756	11.952	.003*
- Cubic	1	516.551	516.551	9.379	.007*
- Order 4	1	1.806	1.806	.055	.818
- Order 5	1	35.992	35.992	.919	.350
Priode pengamatan* Level					
- Linier	2	7.987	3.993	.159	.854
- Quadratic	2	416.000	208.000	12.261	.000*
- Cubic	2	19.274	9.637	.175	.841
- Order 4	2	271.615	135.808	4.112	.034*
- Order 5	2	199.038	99.519	2.542	.107
Priode pengamatan* Medium * Level					
- Linier	2	24.971	12.486	.499	.616
- Quadratic	2	3.348	1.674	.099	.907
- Cubic	2	30.624	15.312	.278	.760
- Order 4	2	11.422	5.711	.173	.843
- Order 5	2	134.247	67.124	1.725	.208
Error					
- Linier	18	450.794	25.044		
- Quadratic	18	305.354	16.964		
- Cubic	18	991.362	55.076		
- Order 4	18	594.456	33.025		
- Order 5	18	704.594	39.144		

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

Lampiran 7 : Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Interaksi Medium Pemisah dengan Priode Pengamatan Terhadap Motilitas Spermatozoa.

Variabel Bebas	(I) FAK A	(J) FAK A	Selisih (I-J)	Std. Error	Sig
Medium Pemisah	Fraksi atas (X)	Fraksi bawah (Y)	-3.266*	995	004
	Fraksi bawah (Y)	Fraksi atas (X)	3.266*	995	004

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

* Berpengaruh Nyata pada Taraf 0.05

Lampiran 8 : Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Interaksi Level Kafein dengan Periode Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa

Variabel Bebas	(I) FAK B	(J) FAK B	Selisih (I-J)	Std. Error	Sig ^a
Level	1	2	- 2.349	1.218	.070
		3	- 5.122*	1.218	.001
	2	1	2.349	1.218	.070
		3	- 2.773*	1.218	.035
	3	1	5.122*	1.218	.001
		2	2.773*	1.218	.035

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

* Berpengaruh Nyata pada Taraf 0.05

Lampiran 9 : Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Periode Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa

Variabel Bebas	(I) FAK C	(J) FAK C	Selisih (I-J)	Std. Error	Sig ^a
Periode Pengamatan	1	2	8.125*	1.160	.000
		3	-.208	.939	.827
		4	39.563*	1.906	.000
		5	56.305*	1.554	.000
		6	67.083*	.510	.000
	2	1	-8.125*	1.160	.000
		3	-8.333*	.589	.000
		4	31.438*	2.458	.000
		5	48.180*	2.167	.000
		6	58.958*	1.311	.000
	3	1	.208	.939	.827
		2	8.333*	.589	.000
		4	39.771*	2.232	.000
		5	56.513*	1.977	.000
		6	67.291*	1.070	.000
	4	1	-39.563*	1.906	.000
		2	-31.438*	2.458	.000
		3	-39.771*	2.232	.000
		5	16.742*	2.307	.000
		6	27.520*	1.715	.000
	5	1	-56.305*	1.554	.000
		2	-48.180*	2.167	.000
		3	-56.513*	1.977	.000
		4	-16.742*	2.307	.000
6		10.777*	1.635	.000	
6	1	-67.083*	.510	.000	
	2	-58.958*	1.311	.000	
	3	-67.291*	1.070	.000	
	4	-27.520*	1.715	.000	
	5	-10.777*	1.635	.000	

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0
 * Berpengaruh Nyata pada Taraf 0.05

Lampiran 10 : Hasil Analisis Ragam Persentase Hidup

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hit	Sig
Luar Subjek					
Medium	1	7.031	7.031	.054	.818
Level	2	211.573	105.786	.816	.458
Medium * Level	2	264.893	132.447	1.022	.380
Error	18	2332.393	129.577		
Dalam Subyek					
Periode pengamatan terhadap Persentase hidup	1	10367.029	10367.029	153.167	.000*
- Linier	1	650.590	650.590	9.094	.007*
- Quadratic					
Periode pengamatan terhadap Persentase hidup * Medium	1	5.603E-02	5.603E-02	.001	.997
- Linier	1	6.631	6.631	.093	.764
- Quadratic					
Periode pengamatan terhadap Persentase hidup * Level	2	272.568	136.284	2.014	.162
- Linier	2	474.286	237.143	3.315	.059
- Quadratic					
Periode pengamatan terhadap Persentase hidup * Medium * Level	2	99.024	49.512	.732	.495
- Linier	2	191.907	95.953	1.341	.286
- Quadratic					
Error	18	1218.321	67.685		
- Linier	18	1287.728	71.540		
- Quadratic					

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0

Lampiran 11 : Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Periode Pengamatan terhadap Persentase Hidup Spermatozoa

Variabel Bebas	(I) FAK C	(J) FAK C	Selisih (I-J)	Std. Error	Sig ^a
Periode pengamatan	1	2	21.073*	2.939	.000
		3	29.392*	2.375	.000
	2	1	-21.073*	2.939	.000
		3	8.320*	1.768	.000
	3	1	-29.392*	2.375	.000
		2	-8.320*	1.768	.000

Keterangan : # Menggunakan Paket Program Komputer SPSS For Windows 10.0
* Berpengaruh Nyata pada Taraf 0.05