

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Salah satu tantangan dalam sektor peternakan di Indonesia adalah produktivitas dan mutu genetik sapi yang masih rendah, sehingga kebutuhan daging nasional masih harus dipenuhi melalui impor sapi dari Australia. Salah satu pendekatan untuk meningkatkan produktivitas ternak lokal Indonesia adalah melalui teknologi pemuliaan dengan mengawinkan ternak lokal dengan ternak unggul impor, yang dikenal dengan program Inseminasi Buatan (IB). Salah satu program IB yang umum dilakukan adalah IB pada sapi Simental (Sudarmanto et al., 2015).

Inseminasi Buatan (IB) merupakan metode mengawinkan ternak secara buatan yang melibatkan prosedur kompleks dan dilakukan oleh petugas terlatih. Tujuan inseminasi buatan meliputi perbaikan kualitas genetik, pencegahan penyakit menular, pencatatan yang lebih akurat, penghematan biaya, serta mengurangi risiko kecelakaan dan penularan penyakit yang dapat disebabkan oleh pejantan. Keberhasilan inseminasi buatan dapat diukur dari terjadinya kebuntingan pada sapi induk yang diinseminasi. Keberhasilan program IB sangat dipengaruhi oleh kualitas semen beku sapi. Oleh karena itu, penting untuk menjaga kualitas semen beku agar fertilitasnya tetap optimal. Semen beku yang berkualitas tinggi ditandai dengan persentase motilitas dan jumlah spermatozoa hidup yang tinggi (Putri et al., 2020).

Sapi Simental di Indonesia dapat dijadikan sebagai sapi potong dan perah karena selain memiliki daging yang banyak juga dapat dijadikan sebagai indukan yang dapat dimanfaatkan susunya. Kualitas semen dari pejantan unggul berperan penting dalam inseminasi buatan, hal ini dikarenakan faktor keberhasilan dari teknologi IB. Upaya untuk meningkatkan kualitas sapi Simental perlu dilakukan, salah satunya dengan meningkatkan mutu genetik dan populasinya. Penentuan jenis kelamin pedet memiliki peran penting untuk memperoleh bibit, jenis dan genetik yang baik. Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efisiensi usaha peternakan (Priyanto et al., 2022).

Berbagai teknik dan metode *sexing* spermatozoa telah diterapkan pada hewan ternak, salah satunya adalah sedimentasi putih telur. Metode ini memanfaatkan perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y, di mana spermatozoa Y, yang lebih kecil dan lebih ringan, bergerak lebih cepat dan memiliki daya penetrasi yang tinggi dalam larutan putih telur (albumin). Teknik ini mudah diterapkan di lapangan karena putih telur mudah diperoleh dan harganya ekonomis (Akhdiat et al., 2012). Selain pengaruh medium, hasil *sexing* spermatozoa juga dipengaruhi oleh waktu sentrifugasi (Susilawati, 2014).

Metode *sexing* spermatozoa dengan sentrifugasi lebih efektif dan efisien, namun



pembatas dalam keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y kerusakan membran spermatozoa akibat gaya mekanis yang sentrifugasi dan pencucian spermatozoa yang berdampak pada spermatozoa. Kecepatan dan lama sentrifugasi yang tidak tepat sahan spermatozoa juga dapat menyebabkan daya hidup dan a menurun. Penurunan kualitas spermatozoa, selain disebabkan sahan spermatozoa, juga disebabkan oleh masalah klasik yaitu

proses pembekuan. Pembentukan kristal es dan *hypertonic shock* dapat menjadi faktor menurunkan motilitas spermatozoa dan proporsi x dan y spermatozoa. Oleh karena itu, penting untuk mempelajari bagaimana lama sentrifugasi mempengaruhi proporsi kromosom X dan Y sebelum dan setelah pembekuan semen pada sapi Simental, yang diharapkan dapat memberikan informasi penting untuk meningkatkan hasil *sexing* spermatozoa dan efisiensi produksi ternak (Rasad et al., 2019).

## 1.2 Tujuan dan Manfaat

### 1.2.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh lama sentrifugasi terhadap proporsi kromosom x dan y sebelum dan setelah pembekuan semen sapi Simental (*Bos taurus*) di UPT PIBS PUCAK MAROS, yang dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan teknik reproduksi dan pemuliaan yang lebih efisien di industri peternakan.

### 1.2.2 Manfaat Penelitian

#### a. Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat pengembangan ilmu dari penelitian ini adalah memungkinkan penyempurnaan metode pemrosesan sperma untuk hasil yang lebih konsisten dan berkualitas tinggi dan Mendorong pengembangan teknologi baru dalam bidang reproduksi hewan yang lebih efisien dan efektif.

#### b. Manfaat Aplikasi

Manfaat Aplikasi dari Penelitian ini adalah dapat memberikan panduan praktis untuk sentrifugasi dan metode sedimentasi yang dapat mengurangi biaya dan waktu dalam proses pemrosesan spermatozoa.

## 1.3 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah bahwa lama sentrifugasi pada proses sexing sperma sapi Simental (*Bos taurus*) mempengaruhi proporsi kromosom X dan Y pada sperma, baik sebelum maupun setelah proses pembekuan semen. Hipotesis utama yang diajukan adalah terdapat pengaruh yang signifikan antara lama sentrifugasi terhadap proporsi kromosom X dan Y dalam sperma sapi Simental, sedangkan hipotesis nol menyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji apakah variasi dalam waktu sentrifugasi dapat memengaruhi distribusi kromosom X dan Y, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi kualitas dan keberhasilan pemisahan jenis kelamin sperma dalam pembekuan semen sapi Simental.

## 1.4 Kajian Pustaka

### 1.4.1 Taksonomi dan Karakteristik Sapi Simental

Sapi Simental berasal dari daerah *simme*, *Switzerland*, dan sudah berkembang



Amerika. Karakteristik sapi Simental yaitu memiliki bulu berwarna gian lutut dan kepala berwarna putih. Bobot sapi Simental jantan iai sekitar 1150 kg dan bobot sapi betina dewasa sekitar 800 kg. asuk sapi tipe pedaging dan tipe perah, terkadang juga nya dalam dunia pertanian (Ekowati et al., 2023).

merupakan ternak sapi yang memiliki keunggulan dengan tingkat rga jual yang tinggi. Produksi dan kualitas semen yang dihasilkan

dari pejantan unggul mempunyai peranan yang penting dalam Inseminasi Buatan, karena faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB sangat dipengaruhi oleh kualitas semen yang digunakan dari pejantan yang memiliki produksi dan kualitas semen yang baik (Khairi et al., 2016).

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

*Phylum* : *Chordata*  
*Sub Phylum* : *Vertebrata*  
*Class* : *Mamalia*  
*Ordo* : *Artiodactyla*  
*Sub Ordo* : *Ruminantia*  
*Famili* : *Bovidae*  
*Genus* : *Bos*  
*Spesies* : *Bos Taurus*



Gambar. 1 Morfologi Sapi Simental

**Source** : Agriflo, T. P. 2012. *Sapi*. Agriflo:Depok.

#### 1.4.2 Sexing Spermatozoa

Metode sexing yang umum digunakan untuk memisahkan spermatozoa X dan Y saat ini adalah dengan menggunakan *gradien densitas percoll*, yang didasarkan pada perbedaan berat jenis antara spermatozoa X dan Y yang dipisahkan melalui proses sentrifugasi. Penggunaan pengencer dalam proses sexing sangat penting untuk mencegah kerusakan pada membran spermatozoa setelah sentrifugasi, sehingga kualitas spermatozoa tetap terjaga (Fatahillah et al., 2016).

Salah satu medium *sexing* spermatozoa ialah dengan menggunakan albumin yang cukup fleksibel dan mudah diterapkan di lapangan. medium ini didasarkan atas perbedaan motilitas sperma X dan Y sebagai implikasi dari perbedaan massa dan ukuran. Massa dan ukuran sperma Y yang lebih kecil dari sperma X menyebabkan sperma tersebut mampu bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan (Susilawati, 2014).

#### 1.4.3 Telur Bebek

Telur bebek sangat kaya akan kalsium, besi, magnesium, fosfor, sodium, seng, *copper*, selenium, kaya akan folat. Kadar kolesterol telur bebek dan burung puyuh kira-kira hampir dua kali lipat jika dibandingkan dengan telur ayam dan juga telur bebek



yang lebih baik dibandingkan telur puyuh dan ayam (Bebas dan Jonen utama yang sering digunakan sebagai *sexing* spermatozoa in Kuning Telur (Susilawati, 2014). Putih telur, yang juga dikenal berfungsi sebagai agen antibakteri dan penyangga untuk menjaga telur. Putih telur terdiri dari tiga lapisan: *inner thin* albumin yang cair dan kental di bagian terdalam, *thick* albumin yang berada di bagian tengah, dan *outer thin* albumin yang merupakan lapisan

albumin paling luar. Komponen utama dari putih telur meliputi: protein 12%, glukosa 0,4%, lemak 0,3%, garam 0,3%, dan air 87%. Putih telur mengandung berbagai jenis protein, enzim inhibitor, agen antibakteri, vitamin yang terikat, serta mineral yang terikat. Protein merupakan komponen terbesar dalam putih telur, yang terdiri dari *ovalbumin*, *ovotransferrin*, *ovomucin*, *lysozyme*, dan *avidin* (Susilawati, 2014). Kuning telur mengandung lesitin, lipoprotein, kolesterol, gliserin dan asam lemak. Lesitin dan lipoprotein merupakan protein berberat molekul tinggi yang akan menyelubungi spermatozoa sehingga dapat mengurangi *cold shock* pada waktu pembekuan. Gliserida merupakan komponen tertinggi penyusun lemak kuning telur. Gliserol merupakan krioprotektan yang paling umum pada simpan beku semen. Kolesterol yang terdapat pada kuning telur dapat mempertahankan fluiditas membran sel sehingga mencegah kerusakan sel akibat penurunan suhu pada saat pembekuan (Sari et al., 2019)

#### 1.4.4 Semen Beku

Semen beku merupakan sperma yang telah mengalami proses pengenceran dengan bahan pengencer, kemudian ditambahkan gliserol dalam proses pembekuannya. Pembekuan sperma dapat dilakukan secara bertahap atau secara langsung (vitrifikasi), pembekuan sperma dengan menggunakan medium nitrogen cair (N<sub>2</sub> cair) dengan suhu (-196°C). Spermatozoa yang telah dibekukan akan mampu bertahan hidup dalam kurun waktu yang lama, bahkan setelah 30 tahun baru akan mengalami penurunan kualitasnya (Isamaya et al, 2014).

Pembekuan semen merupakan proses yang menghentikan sementara aktivitas hidup sel spermatozoa tanpa merusak fungsi dan metabolisme sel. Dalam kondisi ini, spermatozoa yang tidak bergerak akan menurunkan kecepatan metabolisme, sehingga mengurangi konsumsi energi, memungkinkan proses hidup untuk dilanjutkan setelah pembekuan dihentikan. Secara umum, masalah yang sering terjadi dalam pembekuan semen terkait dengan dua hal utama, yaitu dampak *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler yang disebabkan oleh pengeluaran air, yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel serta penurunan kualitas semen (Sari et al., 2019).

#### 1.4.4 Pengaruh Lama Sentrifugasi Pada Spermatozoa

Sentrifugasi *Gradien Densitas Percoll* (SGDP) merupakan salah satu teknik atau metode yang biasa dipakai dalam pemisahan spermatozoa yang didasari pada perbedaan spermatozoa X dan Y. Metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* memang sudah banyak sekali digunakan dan terbukti efisien, namun terdapat faktor-faktor yang menjadi pembatas dalam keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y di antaranya adalah kerusakan membran spermatozoa akibat gaya mekanis yang terjadi saat proses sentrifugasi dan pencucian berdampak pada penurunan kualitas spermatozoa. Kecepatan sentrifugasi yang tidak tepat selama proses pemisahan spermatozoa dapat menurunkan viabilitas dan motilitas spermatozoa menurun (Setiono et al.,



fugasi yang lama dapat menyebabkan energi spermatozoa Y spermatozoa X motilitasnya tetap stabil karena masih memiliki energi semakin lama waktu sentrifugasi dapat mengakibatkan total

spermatozoa motil mengalami penurunan dan populasi spermatozoa juga semakin banyak turun ke lapisan bawah. Kualitas spermatozoa sangat ditentukan oleh jumlah total spermatozoa yang hidup dan mampu bergerak aktif ke depan (Fatahillah *et al.*, 2016). Sentrifugasi menyebabkan membrane rusak sehingga lalu lintas ion-ion terganggu. Kolesterol dan fosfolipid merupakan komponen lipid membrane yang sangat penting dalam mempertahankan integritas membran. Gaya sentrifugasi yang umum digunakan untuk memproses spermatozoa biasanya rendah yaitu 400xg (1500 rpm) hingga 650xg (1800 rpm). Hasil Penelitian Susilowati (2010) yang menunjukkan adanya penurunan kualitas spermatozoa setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit maupun selama 10 menit.

#### 1.4.5. Identifikasi Spermatozoa X dan Y

Perbedaan utama antara kromosom X dan Y, spermatozoa X memiliki ukuran yang lebih besar dengan pergerakan lambat hanya dapat berpindah sampai ke medium lapisan atas, sedangkan spermatozoa Y memiliki ukuran kepala yang lebih kecil dengan kecepatan yang lebih tinggi daripada spermatozoa X sehingga lebih mampu bergerak melalui dan menembus medium pemisah hingga ke lapisan paling bawah yang konsentrasinya lebih tinggi dan dapat meningkatkan proses metabolisme dari spermatozoa. spermatozoa Y akan bergerak ke bawah sedangkan spermatozoa X tetap berada pada lapisan atas, karena spermatozoa pembawa kromosom Y memiliki motilitas lebih tinggi dibanding spermatozoa pembawa kromosom X. Hal ini terjadi akibat adanya zat toksin yang bersumber dari spermatozoa yang mati maupun dari proses sentrifugasi sehingga diduga dapat terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari sisa hasil metabolisme spermatozoa karena proses sentrifugasi yang belum berjalan baik (Priyanto *et al.*, 2022).

Ukuran dari spermatozoa berbagai hewan bervariasi baik dari ukuran panjang dan lebar spermatozoa, meskipun secara umum memiliki struktur yang hampir sama. Panjang dan lebar kepala spermatozoa sapi, domba dan babi berkisar antara 8.0 – 10.0  $\mu\text{m}$  dan 4.0 – 4.5  $\mu\text{m}$ , tebal kepala sekitar 0.5 – 1.5  $\mu\text{m}$ . Bagian *mid piece* spermatozoa memiliki panjang sekitar 1.5 – 2 kali panjang kepala. Panjang ekor spermatozoa sekitar 35 – 45  $\mu\text{m}$ , secara keseluruhan panjang spermatozoa hewan berkisar antara 50 – 70  $\mu\text{m}$  (Susilawati, 2014).

Setelah proses sexing melalui sentrifugasi, proporsi spermatozoa X diperoleh dari dua lapisan materi, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah. Spermatozoa X terkonsentrasi di lapisan bawah karena memiliki ukuran dan berat yang lebih besar, sehingga lebih cepat mengendap. (Fatahillah *et al.*, 2016). Setelah dibekukan, dari hasil penelitian Jalius *et al.* (2023) menunjukkan bahwa morfometri spermatozoa sapi simental panjang kepala (9,46  $\mu\text{m}$ ), lebar kepala (5,11  $\mu\text{m}$ ), luas kepala (41,96  $\mu\text{m}$ ), panjang *middle piece* (13,77  $\mu\text{m}$ ), panjang ekor (47,68  $\mu\text{m}$ ) dan panjang tubuh (m).



enis spermatozoa X dan Y dilakukan melalui uji morfometri yang ran panjang dan lebar kepala spermatozoa, di mana hasil kemudian dihitung untuk mendapatkan rata-ratanya. Jika ukuran yang diukur sama dengan atau lebih besar dari rata-rata yang a spermatozoa tersebut akan dikategorikan sebagai spermatozoa atozoa Y memiliki karakteristik yang berbeda, yaitu kepala yang

lebih kecil, lebih ringan, dan lebih pendek, yang berkontribusi pada kemampuannya untuk bergerak lebih cepat dibandingkan dengan spermatozoa X. Selain itu, spermatozoa Y mengandung lebih sedikit DNA, yang berimplikasi pada perbedaan dalam struktur dan fungsi. Sementara itu, spermatozoa X memiliki kandungan kromatin yang lebih banyak, yang menyebabkan ukuran kepala spermatozoa X menjadi lebih besar. Karena spermatozoa Y bergerak lebih cepat, mereka juga cenderung mengalami kematian lebih cepat dibandingkan dengan spermatozoa X. Sebaliknya, spermatozoa X memiliki daya tahan hidup yang lebih baik karena lebih efisien dalam menggunakan energi, sehingga dapat bertahan lebih lama dalam lingkungan yang menantang. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan morfologi dan komposisi genetik antara spermatozoa X dan Y tidak hanya memengaruhi kemampuan motilitas, tetapi juga kelangsungan hidup mereka dalam proses reproduksi (Situmorang et al., 2014).



## BAB II METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Oktober 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 Lama Sentrifugasi Pada Sexing Spermatozoa Terhadap Proporsi Kromosom X Dan Y Sebelum Dan Setelah Pembekuan Semen Sapi Simental (*Bos Taurus*)

### 2.3 Materi Penelitian

#### 2.3.1 Alat

Alat penelitian yang digunakan yaitu peralatan yang digunakan CASA (*Computer assisted sperm analysis*), *cover glass* (M-glas®), *drying and sterilization oven* (Memmert®), *elenmeyer* 1000 mL (Pyrex®), gelas ukur 100 mL (Pyrex®), gelas beker 250 mL (Pyrex®), mikroskop (Olympus), *object glass* (Onemed®), pipet mikro (Onemed®), pipet tetes (Onemed®), pH meter (MQuant®), *sentrifuge* (oregon), tabung skala (Onemed®), tabung reaksi (Onemed®), tips mikropipet (Onemed®), vagina buatan dan *waterbath* (Memmert®).

#### 2.3.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan yaitu *aquades* (Onemed®), air hangat, *aluminium foil* (Klin pak), asam sitrat (Cap gajah), *eosin-negrosin* (indo reagen®), *glyserol* (Emsure®), fruktosa (Rose brand®), NaCl 0.9% (Mbj pharma), *benzyl penicillin* (Cooper®), *streptomycin sulfate* (Meiji®), semen segar, *Tris aminomethan* (Merck®), telur bebek dan pelumas (vaseline®). N2 cair untuk membekukan semen, *straw* untuk mengemas semen dan tisu sebagai pembersih peralatan

### 2.4 Metode Penelitian

#### 2.4.1 Pengelompokan dan Perlakuan Semen

Sampel yang digunakan dibagi kedalam 3 kelompok perlakuan, setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali pengulangan.

Tabel 1. 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



#### Spermatozoa

yang layak digunakan diencerkan menggunakan TKT dengan antara semen dan pengencer putih telur. Semen yang telah ini dimasukkan kedalam masing-masing tabung, P1, P2, P3 dibiarkan disuhu ruang selama 30 menit. Setelah itu, fraksi atas dan fraksi bawah 30% pada masing-masing tabung dengan cara

menyedot menggunakan pipet tetes. Fraksi yang dipisah ditampung pada tabung dan di lakukan *sentrifuse* (sesuai waktu perlakuan). Supernatan yang dihasilkan yaitu 2-3 ml dari *sentrifuse* dibuang dan endapan yang tersisa ditambahkan kembali pengencer TKT (Susilawati, 2014).

### 2.4.3 Identifikasi Spermatozoa X dan Y

Identifikasi spermatozoa X dan Y dilakukan untuk melihat hasil sexing spermatozoa pada fraksi dengan konsentrasi 30% ditemukan mayoritas spermatozoa X dan fraksi dengan konsentrasi 10% ditemukan mayoritas spermatozoa Y. Identifikasi spermatozoa X dan Y dilakukan dengan cara morfometrik yaitu dengan melihat panjang dan lebar kepala spermatozoa yang diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x, kemudian dilakukan pengambilan gambar (pemotretan). Spermatozoa yang telah di potret diukur panjang dan lebar kepalanya menggunakan mikrometer pada aperangkat mikroskop. Perhitungan ukuran luas kepala spermatozoa (LKS) dihitung menggunakan rumus (Permana et al., 2023):

$$\text{LKS: } (0,8988 \times P \times L) - 1,63$$

Ketereangan :

0,8988 = faktor koreksi luas kepala spermatozoa

P = Panjang kepala spermatozoa

L = lebar kepala spermatozoa

1,63 = nilai konstanta regresi

Ukuran kepala spermatozoa yang lebih besar dari rerata LKS diidentifikasi sebagai spermatozoa X, sedangkan ukuran kepala yang lebih kecil dari rerata LKS diidentifikasi sebagai spermatozoa Y. Proporsi spermatozoa X:Y dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Proporsi spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa X atau Y}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

### 2.4.4 Pembekuan Semen

- Semen yang telah melalui proses *sexing* dibekukan mengikuti protokol pembekuan yang umum digunakan.
- Straw* berisi semen didinginkan perlahan dari suhu kamar hingga mencapai 4°C dalam waktu 2-4 jam.
- Setelah pendinginan, *straw* ditempatkan sekitar 3-4 cm di atas permukaan nitrogen cair (-120°C) selama beberapa menit.
- Proses ini merupakan pembekuan lambat yang dirancang untuk mengurangi kerusakan akibat pembentukan kristal es besar.
- Setelah pembekuan lambat, *straw* dicelupkan langsung ke dalam nitrogen cair pada suhu -196°C.
- Straw* disimpan dalam tangki penyimpanan nitrogen cair hingga saat akan digunakan.



### 2.4.6 Identifikasi Spermatozoa X dan Y

Identifikasi spermatozoa X dan Y dilakukan untuk melihat hasil *sexing* spermatozoa pada fraksi dengan konsentrasi 30% ditemukan mayoritas spermatozoa X dan fraksi dengan konsentrasi 10% ditemukan mayoritas spermatozoa Y. Identifikasi spermatozoa X dan Y dilakukan dengan cara morfometrik yaitu dengan melihat panjang dan lebar kepala spermatozoa yang diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x, kemudian dilakukan pengambilan gambar (pemotretan). Spermatozoa yang telah di potret diukur panjang dan lebar kepalanya menggunakan mikrometer pada aperangkat mikroskop. Spermatozoa X diidentifikasi dengan luas kepala yang lebih besar daripada spermatozoa Y.

Total hasil pengukuran (panjang x lebar) digunakan untuk mengetahui hubungan antara ukuran panjang dan lebar kepala dengan luas kepala spermatozoa (LKS). Ukuran kepala spermatozoa yang lebih besar dari rerata diidentifikasi sebagai spermatozoa X, sedangkan ukuran kepala yang lebih kecil dari rerata diidentifikasi sebagai spermatozoa Y. Perhitungan ukuran luas kepala spermatozoa (LKS) dihitung menggunakan rumus (Permana et al., 2023):

$$\text{LKS: } (0,8988 \times P \times L) - 1,63$$

Ketereangan :

0,8988 = faktor koreksi luas kepala spermatozoa

P = Panjang kepala spermatozoa

L = lebar kepala spermatozoa

1,63 = nilai konstanta regresi

Ukuran kepala spermatozoa yang lebih besar dari rerata LKS diidentifikasi sebagai spermatozoa X, sedangkan ukuran kepala yang lebih kecil dari rerata LKS diidentifikasi sebagai spermatozoa Y. Proporsi spermatozoa X:Y dihitung dengan menggunakan rumus:

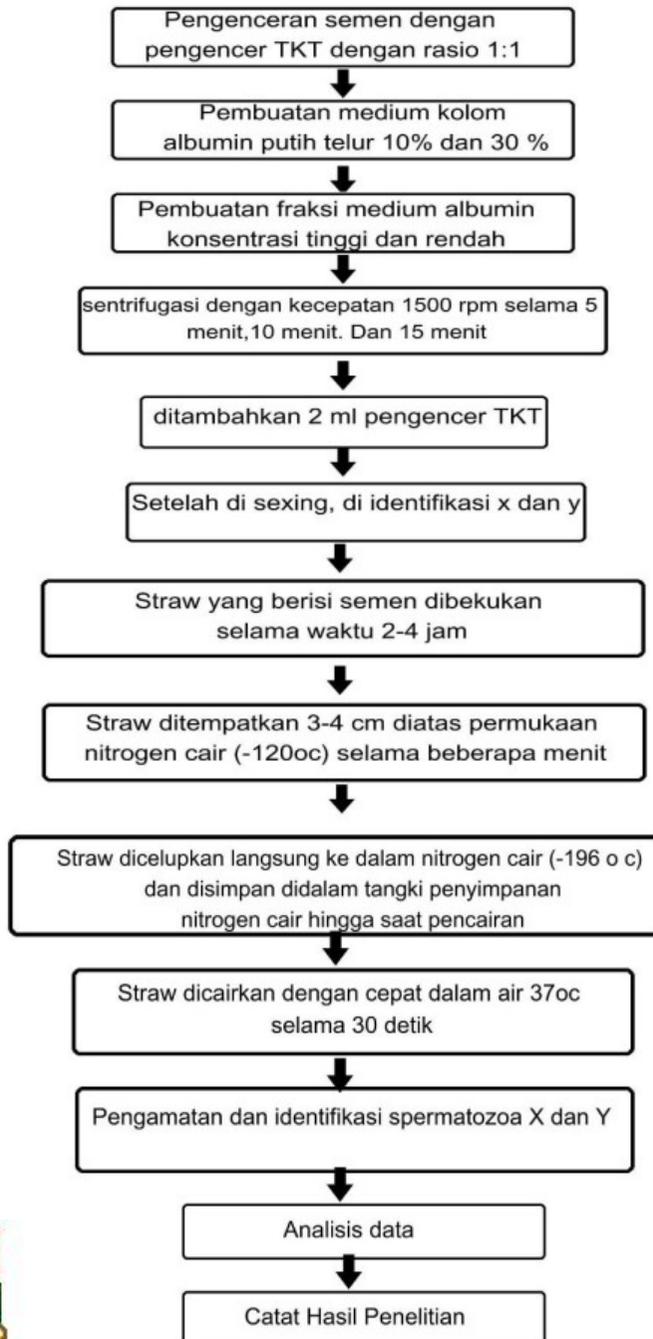
$$\text{Proporsi spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa X atau Y}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

## 2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari identifikasi X dan Y spermatozoa yang sebelum dan sesudah dibekukan kemudian dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA). Apabila dari hasil perlakuan didapatkan berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).



## 2.6 Alur Penelitian



Gambar. 2 Bagan Alur Penelitian

