

BAB 1

PENDAHULUAN

Latar belakang

Kambing saanen merupakan ternak ruminansia yang memiliki potensi untuk menjadi penghasil susu segar untuk memenuhi kebutuhan susu di Indonesia. Potensi tersebut salah satunya disebabkan karena nilai gizi dan daya serap susu kambing dapat bersaing dengan susu sapi. Kambing Saanen ialah kambing perah yang berasal dari lembah Saanen di Swiss (Eropa) dan saat ini sudah menyebar di berbagai negara termasuk Indonesia (Akbar dkk., 2019).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi ternak kambing adalah melalui inseminasi buatan (IB). Tujuan IB itu sendiri adalah sebagai salah satu alat yang ampuh untuk meningkatkan populasi dan reproduksi ternak secara kuantitatif dan kualitatif. Bioteknologi IB diharapkan mampu mengoptimalkan penggunaan semen serta dapat meningkatkan produktivitas ternak (Lukman dkk., 2022).

Salah satu faktor pendukung keberhasilan IB yaitu tersedianya semen beku sesuai kriteria. Permasalahan yang umum terjadi pada pembekuan semen adalah penurunan kualitas semen beku akibat dari pembentukan radikal bebas. Pada saat koleksi dan pengolahan spermatozoa sebelum dikemas di dalam *straw*, terjadi kontak antara spermatozoa dan udara luar yang mengandung oksigen. Hal ini mengakibatkan meningkatnya aktivitas metabolisme oksidatif yang juga berarti meningkatnya konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme. Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa, karena radikal bebas memiliki sifat yang sangat reaktif untuk memperoleh elektron melalui reaksi peroksidasi lipid (Holt, 2000).

Upaya optimalisasi pengolahan semen agar diperoleh kualitas semen yang optimal dapat dilakukan melalui pemilihan jenis pengencer semen. Pengencer harus dapat menyediakan zat-zat makanan, mencegah perubahan pH, mencegah pertumbuhan kuman, melindungi sperma dari cekaman dingin serta memperbanyak volume semen. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan sperma dapat bergerak secara progresif, tidak bersifat racun, menjadi penyanggah bagi sperma, dapat melindungi dari cekaman dingin (cold shock) baik untuk semen beku maupun semen cair (Hartanti dkk., 2012).

Senyawa antioksidan dapat menghambat kerja radikal bebas yang dapat merusak spermatozoa, sehingga keutuhan membran plasma sel spermatozoa dapat tetap dipertahankan selama proses kriopreservasi. Membran plasma sel yang utuh dan tudung akrosom yang utuh akan berpengaruh positif terhadap persentase motilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa. Salah satu sumber antioksidan alami yang dapat digunakan adalah ekstrak bunga telang dengan kandungan seperti *tanin*, *saponin*, *fenol*, *triterpenoid*, *alkaloid*, *flobatanin*, dan *flavonoid* yang memiliki fungsi sebagai antioksidan (Arifin & Ibrahim, 2018). Sedangkan, ada

beberapa jenis antioksidan yang lain juga dapat digunakan dalam pengencer semen alami (organik) salah satunya bunga Kasumba Turate (*Carthamus tinctorius* L.). Kasumba turate memiliki kandungan senyawa dan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. Oleh karena itu, tanaman ini dapat dijadikan salah satu sumber antioksidan alami khususnya pada bagian bunga yang kemudian dapat diformulasi dalam suatu sediaan antioksidan (Meng dkk., 2018). Hal inilah yang melatar belakangi dilakukannya penelitian terkait pengaruh perbandingan penambahan ekstrak bungan telang dan ekstrak bunga kasumba turate sebagai antioksidan dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) terhadap membrane plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa kambing Saanen.

Landasan teori

1.2.1. Kualitas Semen Kambing Saanen

Evaluasi semen adalah salah satu parameter untuk memprediksi kemampuan seekor pejantan dalam melakukan fertilisasi. Metode yang digunakan untuk evaluasi semen sangat banyak, namun hanya beberapa saja yang digunakan untuk menentukan kualitas semen secara praktis. Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas semen adalah parameter makroskopik dan mikroskopik. Parameter makroskopik merupakan parameter yang terdiri dari pengamatan volume, warna, konsistensi, dan derajat keasaman atau pH. Sedangkan parameter mikroskopik merupakan parameter yang diamati dengan bantuan mikroskop seperti konsentrasi, motilitas, abnormalitas, viabilitas, MPU, TAU, dan kinematika spermatozoa (Moradpour, 2019).

MPU (Membran Plasma Utuh)

Membran plasma merupakan pelindung spermatozoa bagian luar yang sangat berperan dalam proses fertilisasi. Kerusakan membran mengakibatkan terganggunya proses metabolisme intraseluler, sehingga spermatozoa akan lemah dan bahkan mengakibatkan kematian spermatozoa. Penyimpanan semen yang lebih lama akan semakin meningkatkan tingkat kematian spermatozoa karena rusaknya membran plasma yang berakibat pada terganggunya suplai energi spermatozoa sehingga menurunkan motilitas. Jumlah spermatozoa yang mati akan memengaruhi spermatozoa yang masih hidup selama proses penyimpanan (Syafi'i dan Rosadi, 2022).

Membran plasma berfungsi untuk memelihara integritas membran dan membentuk permukaan yang dinamis antar sel serta sebagai pelindung terhadap lingkungan ekstrim. Kerusakan membran pada bagian kepala menyebabkan enzim yang berfungsi untuk fertilisasi keluar dan spermatozoa kehilangan fertilitasnya serta kerusakan spermatozoa pada bagian ekor akan menyebabkan keluarnya enzim aspartat aminotransferase. Enzim aspartat aminotransferase yang berfungsi untuk merombak Adenosina Trifosfat (ATP) menjadi Adenosina Difosfat (ADP) dan Adenosina Monofosfat (AMP) akibatnya spermatozoa akan kehilangan kemampuan untuk bergerak (Ardhani dkk., 2020).

TAU (Tudung Akrosom Utuh)

Tudung akrosom merupakan bagian terpenting dari spermatozoa karena memiliki peranan dalam keberhasilan fertilisasi saat proses perkawinan. Tudung akrosom memiliki fungsi yang cukup penting untuk keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. Hal ini berhubungan dengan kandungan enzim-enzim yang terkandung di dalamnya. Kerusakan tudung akrosom akan menyebabkan enzim-enzim keluar yang menyebabkan hilangnya kemampuan spermatozoa saat pembuahan. Spermatozoa harus dalam keadaan Tudung Akrosom Utuh (TAU) agar memiliki kemampuan dalam fertilisasi oosit. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai dengan terlihatnya garis pembungkus pada bagian kepala dan garis cincin nukleus, sedangkan yang rusak tidak terdapatnya warna lebih gelap pada bagian atas kepala spermatozoa (Syafii dan rosadi, 2022).

Kepala spermatozoa dibagi menjadi dua daerah, yaitu akrosom anterior yang dibungkus oleh tudung akrosom dan post akrosomal posterior. Tudung akrosom mengandung akrosin, hyaluronidase, dan enzim-enzim hidrolitik lainnya yang terlibat pada proses fertilisasi. Kerusakan tudung akrosom spermatozoa diakibatkan karena proses penanganan dan pembekuan semen. Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluarannya materi genetik dan enzim hyaluronidase. Enzim hyaluronidase mempunyai peranan penting untuk melisiskan zona pelusida pada sel telur yang berfungsi pada saat fertilisasi. Tudung akrosom perlu tetap utuh sebelum semen diinseminasikan agar enzim-enzim seperti hyaluronidase, akrosin, dan sebagainya yang terdapat di dalamnya dapat terbawa dan baru dilepaskan di dalam organ reproduksi betina (Ardhani dkk., 2020).

1.2.2. Pengencer TKT (Tris Kuning Telur)

Bahan pengencer semen mempunyai fungsi antara lain sebagai sumber energi, pelindung spermatozoa terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat (anti cold shock), menjadi penyangga (buffer) untuk mencegah efek terhadap perubahan, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, menambah volume semen, serta melindungi sel spermatozoa selama proses kualitas spermatozoa serta mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa (Toelihere, 1993). Tris (Tris hydroxymethyl aminomethane) pada umumnya digunakan sebagai komponen utama dalam pengencer karena memiliki kapasitas penyangga yang baik dan toksisitas yang rendah. Pengencer Tris aminomethan terdiri atas tris, asam sitrat, fruktosa dan air sebagai pencegah perubahan pH, mempertahankan tekanan osmotik, menjaga keseimbangan elektrolit, mengikat butir-butir lemak, sumber energi, melindungi sel spermatozoa selama proses pengawetan, adanya kuning telur dalam pengencer Tris aminomethan akan melengkapi fungsi pengencer dalam melindungi dan mempertahankan motilitas sel spermatozoa ketika terjadinya perubahan suhu dari 5 sampai -196oC (Nirwana et al, 2017).

Pengenceran semen dilakukan dengan mencampurkan semen ke dalam pengencer tris kuning telur. Semen diencerkan untuk mendapatkna konsentrasi spermatozoa sebanyak 25 juta/straw (0,25ml). Berdasarkan Tambing et al., (2003),

volume pengenceran yang akan dibutuhkan dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$Volume\ Pengencer = \left(\frac{motilitas \times konsentrasi\ sperma \times 0.25 \times vol.\ semen}{25 \times 10^6} \right) - vol.\ semen$$

1.2.3 Bunga Telang Sebagai Antioksidan

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sering disebut juga sebagai butterfly pea atau blue pea merupakan bunga yang khas dengan kelopak tunggal berwarna ungu, biru, merah muda (pink) dan putih. Kandungan antosianin pada bunga telang dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Antosianin adalah subkelas dari flavonoid yang larut dalam air yang bertanggung jawab atas warna merah, ungu dan biru pada buah, sayuran, sereal, bunga. Sehingga antosianin dapat menjadi pewarna makanan alami, selain itu, antosianin juga dipercaya sebagai antioksidan (Purwaniati et al., 2020). 8 Kandungan fitokimia lain yang terdapat pada bunga telang seperti flavonoid. Kandungan flavonoid pada bunga telang dapat berperan sebagai sumber antioksidan (Handito dkk., 2022).



Gambar 1.Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.)

Sumber: Handito.,2022

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Infrodivisi	: Angiospermae
Kelas	: Mangnoliopsida
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabacea
Genus	: Clitoria
Spesies	: Clitoria ternatea L.

Kandungan bunga telang diantaranya adalah tanin, saponin, fenol, triterpenoid, alkaloid, flobatanin, dan flavonoid. Kandungan flavonoid bunga telang merupakan senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antioksidan (Budiasih, 2017). Bunga telang mengandung pigmen antosianin dapat dijadikan sebagai alternative pewarna alami yang menghasilkan warna biru keunguan. Warna mencolok ini di identifikasi mengandung antosianin dan klorofil. Antosianin merupakan salah satu golongan senyawa flavonoid yang memiliki sifat mudah terdegradasi oleh lingkungan seperti pH lingkungan dan oksigen. Kandungan

senyawa fitokimia yang terdapat pada bunga telang lainnya seperti triterpenoid, flavonoid, kuinon, polifenolat, saponin, dan steroid ini bekerja secara sinergis sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Turang dkk., 2023).

1.2.4 Kasumba Turate Sebagai Antioksidan

Kasumba turate merupakan tanaman suku Asteraceae, memiliki kandungan seperti flavonoid, fenolik dan karotenoid. Hasil penelitian dari (Rukmana, 2014) menyatakan bahwa ekstrak bunga kasumba turate memiliki kadar total fenolik sebanyak 17371,42 µg/ml, kadar total flavonoid 12453,33 µg/ml serta kadar total karotenoid sebanyak 2710 µg/ml. Senyawa flavonoid dapat bekerja langsung untuk meredam radikal bebas oksigen seperti superoksida yang dihasilkan dari reaksi enzim xantin oksidase (Jannah dkk., 2022). Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu mentransfer sebuah elektron atau sebuah atom hidrogen ke senyawa radikal bebas dengan menghentikan tahap awal reaksi oksidasi, dengan begitu flavonoid dapat menghambat peroksidasi lipid, mencegah kerusakan jaringan oleh radikal bebas (Tahir dkk., 2003).



Gambar 2. Kasumba Turate (*Carthamus tinctorius*)
Sumber : Yasir.,2021

Kerajaan	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: Carthamus
Jenis	: Carthamus tinctorius L.

Kasumba turate mengandung senyawa terpenoid dan dapat digunakan sebagai obat cacar air bagi suku Bugis Makassar (Imran. 2014). Tanaman ini juga mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, tannin dan antrakuinon (Hamsidi dkk., 2018), serta quinokalkon, glikosida, hidroksi safflower yellow A,N-(P Kumaroil) dan serotonin yang memiliki aktivitas antioksidan (Zhang dkk., 2016). Senyawa antioksidan berperan penting dalam menangkal radikal bebas. Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas yang 8 baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah (Khlifi dkk., 2005).

Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari Penelitian ini untuk mengetahui perbandingan kualitas ekstrak Bunga Telang dan Kasumba Turate sebagai antioksidan yang ditambahkan dalam pengencer TKT terhadap semen kambing Saanen. Kegunaan penelitian ini diharapkan mampu menjadi sumber informasi ilmiah bagi calon peneliti untuk mendapatkan pengaruh perbandingan dari pemberian ekstrak bunga telang dan ekstrak bunga kasumba Turate dengan pengencer Tris Kuning Telur (TKT) pada Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa kambing saanen.

Rumusan Masalah

Reaksi radikal bebas yang terjadi pada semen kambing Saanen dapat mengurangi kualitas Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU), sehingga diperlukan penggunaan antioksidan. Terdapat berbagai jenis antioksidan, termasuk bunga telang dan kasumba terate, yang ditambahkan pada pengencer TKT. Namun, belum ada informasi yang jelas mengenai perbedaan efektivitas kedua antioksidan tersebut dalam melindungi MPU dan TAU dari radikal bebas.

BAB II

METODE PENELITIAN

Waktu dan lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus-Oktober 2024, Pengujian semen dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit Processing Semen Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar, dan di Evaporasi di Laboratorium Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan semen dilakukan di *Animal Center* (Kandang Kambing), Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar.

Materi Penelitian

Materi penelitian adalah semen pejantan kambing saanen sebanyak 1 ekor. Bahan yang digunakan yaitu Trishydroxyl methylamine, asam sitrat, fruktosa, streptomycin, penicillin, ekstrak bunga telang, ekstrak kasumba turate, kuning telur, gliserol, aquadest, parafilm, Vaseline, pewarna eosin 2%, NaCl 0,9%, aluminium foil, dan alkohol 70%.

Alat yang digunakan antara lain vagina buatan, tabung skala, alat tulis (pulpen, label), tabung reaksi, tabung ukur, gelas ukur, minitube, evaporator, 13 komputer CASA (Computer assisted sperm analysis), photometer SDM 6, kuvet, centrifuge, mikroskop olympos trinokuler, timbangan elektrik, makro dan mikropipet, pinset, cawan petri, pH skala, objek glass, dan cover glass.

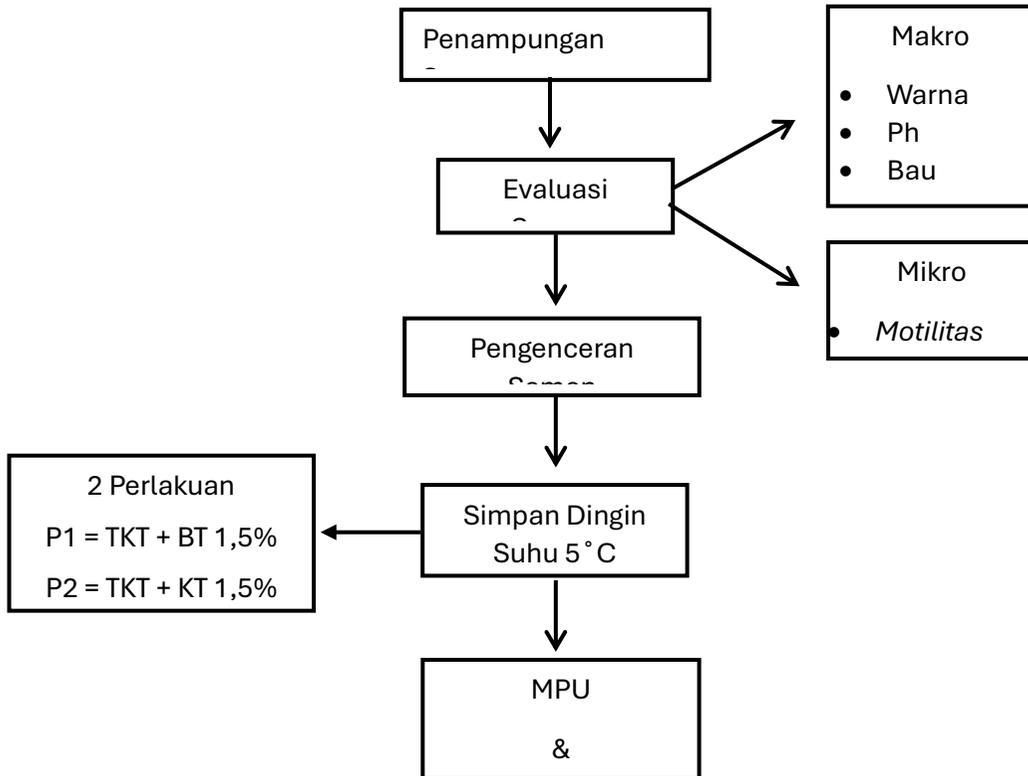
Rancangan Penelitian

Penelitian Penelitian ini menggunakan Uji- T (T- Test *Dependen Sampel*) dengan 2 perlakuan 3 kali ulangan (penampungan semen). Perlakuan dalam penelitian ini adalah jenis pengencer spermatozoa yang terdiri atas:

P1 = Tris Kuning Telur + Kasumba Turate 1,5%

P2 = Tris Kuning Telur + Bunga Telang 1,5%

Alur Penelitian



2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Ekstraksi Bunga Telang

Bunga Telang dipisahkan dari batang dan kelopak bunga kemudian dikeringkan menggunakan oven 75°C selama 1 jam dan diolah menjadi tepung. Kemudian bunga Telang ditimbang sebanyak 1 kg dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter pada wadah kaca. Selanjutnya bahan direndam 4 hari sambil diaduk setiap hari. Kemudian larutan disaring menggunakan kain kassa dan yang telah disterilisasi hingga diperoleh maserat. Selanjutnya filtrate ekstrak bunga telang diuapkan menggunakan alat *Rotatory Evaporator* dengan suhu 78°C dan diresidu menggunakan *water bath* dengan suhu <65°C hingga diperoleh ekstrak etanol kental. Kemudian ekstrak tersebut diencerkan dengan *aquadest* sebelum dicampurkan dengan dengan semen.

2.5.2 Ekstraksi Kasumba Turate

Kasumba Turate yang digunakan di peroleh dari Pasar Tradisional. Kasumba turate terlebih dahulu dibersihkan dari kotoran kemudian melakukan ekstraksi kasumba turate dengan metode maserasi. Kasumba turate ditimbang sebanyak 500gr kemudian direndam dalam 1liter larutan etil asetat. Sampel dimaserasi selama 3 x

24 jam dan diaduk secara berkala (Qolbi dan Yuliani, 2018). Maserat kemudian disaring dengan kertas saring (filtrat I) dan ampasnya dimaserasi kembali dengan 450 mL larutan etil asetat selama 1 hari dan disaring kembali (filtrat II). Filtrat I dan Filtrat II dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporation dengan kecepatan 50 rpm dan suhu 40°C untuk memisahkan ekstrak dan pelarutnya (Kandou dkk., 2016) dilanjutkan menggunakan penangas air untuk memperoleh ekstrak kental.

2.5.3 Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kualitas semen segar secara makroskopis dan kualitas spermatozoa yang meliputi pengamatan secara mikroskopis yang terdiri atas:

1) Makroskopis

Warna. Semen yang normal mempunyai warna putih susu sampai kekuningan yang disebabkan karena adanya kandungan riboflavin di dalam semen. Bila warnanya coklat kemerahan berarti sperma tersebut telah bercampur dengan darah atau nanah karena adanya luka pada saluran kelamin. Bila berwarna hijau kekuningan disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Sedangkan jika sperma berwarna coklat muda atau hijau biasanya sperma tersebut tercampur dengan kotoran ternak (feses) (Susilawati, 2013).

Bau. Bau semen yaitu khas semen yang menunjukkan bahwa semen tersebut normal dan tidak terdapat kontaminasi sehingga dapat dilakukan prosesing semen (Aini dkk., 2014).

Volume. Volume semen adalah banyaknya semen (ml) yang diejakulasikan oleh seekor ternak. Volume semen berbeda-beda antar ternak (Arifiantini, 2012). Hal ini dipengaruhi, antara lain oleh umur, besar tubuh, status kesehatan, status reproduksi, kualitas makanan, dan frekuensi penampungan. Selain itu, teknik dan metode penampungan serta persiapan alat penampungan akan mempengaruhi volume semen yang dihasilkan (Saili, 1999).

Derajat Keasaman (pH). pH diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus, selanjutnya dilihat pH semen dengan menggunakan pH indicator paper atau kertas pH, pH normal semen 6,4~7,8 (Garner and Hafez, 2008). Namun, dapat juga menggunakan pH meter dengan cara mencelupkan alat sensor pH ke dalam larutan yang akan diamati.

Konsistensi. Konsistensi semen adalah derajat kekentalan semen dapat diperiksa dengan cara menggoyangkan tabung yang berisi semen. Semen yang baik, derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu, sedangkan semen yang jelek, baik warna maupun kekentalannya sama dengan air buah kelapa (Garner dan Hafez, 2000).

2) Mikroskopis

Membran Plasma Utuh. Pengamatan MPU dilakukan dengan mencampurkan semen dengan larutan HOST dengan perbandingan 1 : 10 (100 μ semen yang telah diberi perlakuan : 1 ml larutan HOST) kemudian dihomogenkan dan diinkubasi suhu 37°C selama 30 menit. Lalu, mengambil satu tetes larutan, diletakkan diatas preparat, dan ditutup dengan cover glass. Pengamatan dilakukan menggunakan

mikroskop Trinokuler dengan pembesaran 400x dengan minimal 200 sel sperma. Spermatozoa dengan ekor yang melingkar menandakan bahwa membrane plasmanya utuh, sedangkan spermatozoa yang ekornya lurus menandakan membran plasmanya rusak (Ondho, 2020). Adapun rumusnya yaitu:

$$\%MPU = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Ekor Melingkar}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang dihitung}} 100\%$$

Tudung Akrosom Utuh. Pengamatan Tudung TAU dapat dilakukan dengan cara mencampurkan semen yang akan diuji dengan larutan formosaline dengan perbandingan 1 : 4 ke dalam tabung minitube. Lalu, didiamkan selama 5 menit dan ditetaskan diatas object glass lalu ditutup dengan cover glass. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop trinokuler menggunakan pembesaran 400x sebanyak minimal 200 sel spermatozoa. TAU ditandai dengan ujung kepala yang berwarna hitam (Cahaya dkk., 2018). Adapun rumusnya yaitu:

$$\%TAU = \frac{\text{jumlah kepala spermatozoa yang menghitam}}{\text{jumlah spermatozoa yang di hitung}} 100\%$$

Pembuatan Larutan HOST. Larutan HOST adalah larutan yang digunakan untuk pengamatan MPU. Larutan HOST dibuat dari campuran NaCl dengan aquabidest (Ondho, 2020). Larutan HOST ini dibuat dengan cara mencampurkan 20 ml NaCl fisiologis dengan 80 ml aquabidest, sehingga volumenya mencapai 100 ml.

Pembuatan Larutan Formosaline. Larutan Formosaline adalah larutan yang digunakan untuk pengamatan TAU. Larutan formosaline terbuat dari campuran dari NaCl fisiologis + formalin 1% (Cahaya dkk., 2018). Larutan formalin 1% dibuat dengan mencampurkan 1 ml formalin dengan 99 ml aquabidest, sehingga volumenya mencapai 100 ml. Lalu, ditambah dengan 100 ml NaCl fisiologi sehingga menjadi larutan formosaline.

Pembuatan Pengencer Tris Kuning Telur. Metode yang digunakan berdasarkan Amaliah dkk., (2023) yang dimodifikasi; menimbang bahan - bahan yaitu Trishydroxyl methylamine 3.63 gr, asam sitrat 1,78 gr, dan fruktosa 1,25 gr kedalam labu ukur, lalu menambahkan aquabidest hingga mencapai 100 ml kemudian dihomogenkan selama 15 menit. Langkah selanjutnya 80 ml larutan tris yang telah dibuat dimasukkan kedalam labu ukur dan menambahkan kuning telur 20 ml sampai mencapai 100 ml, kemudian dihomogenkan selama 10 sampai 20 menit.

Pengenceran semen. Endapan semen hasil pencucian diencerkan menggunakan pengencer andromed yang telah dibuat sebelumnya. Volume pengencer disesuaikan dengan konsentrasi spermatozoa yang telah diuji sebelumnya. Konsentrasi spermatozoa yang diinginkan di dalam straw adalah sebanyak 150×10^6 sel/straw. Volume pengencer yang akan ditambahkan dapat

dihitung dengan persamaan berikut. $Volume\ Pengencer = Volume\ semen \times Konsentrasi\ sperma \times motilitas$ Konsentrasi Spermatozoa yang diinginkan/ml.

Simpan dingin. Straw yang telah melalui proses pengenceran selanjutnya dilakukan filling dan sealing kemudian disimpan pada kulkas dengan suhu 5° C Pengamatan akan dilakukan setiap harinya dengan waktu yang sama selama 4 hari.

2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini akan dianalisis secara statistik yaitu Ditabulasi menggunakan Excel dan dianalisis dengan Uji- T (Paired Sample t-test.) dengan bantuan aplikasi Graphpad

$$t_{hit} = \frac{\bar{d}}{Sd / \sqrt{n}}$$

$$SD = \sqrt{\text{var}}$$

$$\text{var}(s^2) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

Keterangan

- t_{hit} : Nilai Statistik t-hitung
- Sd : Standar deviasi dari perbedaan antara pengamatan berpasangan
- N : Jumlah pengamatan berpasangan
- d : Perbedaan antara data yang berpasangan
- \bar{d} : Rata-rata selisih /perbedaan