

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Spermatozoa merupakan sel reproduksi jantan yang memiliki peran penting dalam proses fertilisasi. Kualitas spermatozoa, yang diukur melalui viabilitas dan abnormalitas, sangat mempengaruhi keberhasilan reproduksi pada hewan ternak, termasuk sapi Bali. Sapi Bali merupakan salah satu jenis sapi lokal yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan berkontribusi signifikan terhadap sektor peternakan di Indonesia. Oleh karena itu, upaya untuk meningkatkan kualitas spermatozoa sapi Bali sangat penting untuk meningkatkan produktivitas dan efisiensi reproduksi (Kadir, A., & Sari, D. 2020).

Viabilitas spermatozoa mengacu pada kemampuan sel sperma untuk bertahan hidup dan berfungsi dengan baik, sedangkan abnormalitas spermatozoa merujuk pada adanya kelainan bentuk atau struktur yang dapat mengurangi kemampuan fertilisasi. Berbagai faktor dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa, termasuk metode pengenceran yang digunakan. Pengenceran yang tepat dapat membantu menjaga viabilitas spermatozoa dan meminimalkan tingkat abnormalitas (Rahardjo, P., & Setiawan, B. 2018).

Pengencer berbasis Tris Kuning Telur (TKT) telah terbukti efektif dalam menjaga integritas membran spermatozoa karena kandungan lipoprotein dan lesitin dalam kuning telur yang melindungi dari *cold shock*. Selain itu, kuning telur juga mengandung nutrisi penting seperti karbohidrat, vitamin, dan mineral yang mendukung daya tahan hidup spermatozoa (Parera, H. 2022). Akan tetapi, pengencer TKT memiliki kekurangan yaitu minimnya antioksidan alami yang dapat mempengaruhi viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Kombinasi pengencer TKT dengan bahan alami seperti ekstrak tumbuhan mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa serta menurunkan tingkat abnormalitas secara signifikan (Rahmansyah, A. & Hariani, D. 2023).

Antioksidan alami merupakan salah satu alternatif dengan menggunakan senyawa bioaktif yang berguna untuk pengobatan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan radikal bebas. Antioksidan akan berinteraksi dengan radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Dari sejumlah senyawa, flavanoid merupakan yang dapat bekerja langsung untuk meredam radikal bebas. Senyawa tersebut terdapat pada kandungan bunga telang dan juga senyawa antosianin adalah yang paling utama bertanggungjawab untuk kebanyakan warna merah, biru, ungu, pada buah, sayur dan tanaman hias. (Jannah, S. 2022).

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), yang kaya akan senyawa antioksidan seperti flavonoid dan antosianin, memiliki potensi untuk mempertahankan kualitas semen dengan mengurangi stres oksidatif pada spermatozoa. Stres oksidatif diketahui dapat merusak membran sel dan mengurangi viabilitas serta meningkatkan abnormalitas spermatozoa (Tethool, A. N., 2022). Penggunaan ekstrak bunga telang pada pengencer semen sapi Bali masih sangat terbatas. Hal ini yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian ini, untuk mengevaluasi viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi Bali setelah penambahan pengencer berbasis ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) pada Tris Kuning Telur (TKT).

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Bali

Viabilitas spermatozoa mengacu pada persentase sel sperma yang hidup dalam suatu sampel semen, yang mencerminkan integritas membran plasma dan kemampuan sperma untuk bertahan hidup hingga mencapai sel telur. Pemeriksaan viabilitas dapat menjadi indikator penting dalam menilai kualitas semen dan potensi fertilitasnya (Prastika, Z., dkk. 2018). Abnormalitas spermatozoa merujuk pada penyimpangan morfologi dari struktur normal sperma, yang dapat terjadi pada kepala, leher, atau ekor. Kelainan ini dapat berupa bentuk kepala yang tidak normal, seperti berbentuk buah pir atau kepala ganda, serta ekor yang melingkar atau terputus. Abnormalitas tersebut dapat mempengaruhi kemampuan sperma untuk bergerak dan membuahi sel telur, sehingga menurunkan tingkat fertilitas (Aliyah, S. N., dkk. 2022).

Viabilitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk integritas membran plasma yang berfungsi melindungi organel spermatozoa dan mendukung metabolisme sel. Membran plasma yang utuh sangat penting untuk memastikan bahwa spermatozoa dapat bertahan hidup dan berfungsi dengan baik setelah proses pengenceran dan penyimpanan. Penelitian menunjukkan bahwa kerusakan pada membran plasma dapat mengakibatkan penurunan viabilitas dan kemampuan fertilisasi spermatozoa. Selain itu, viabilitas spermatozoa juga berkorelasi positif dengan motilitas. (Yunair, R. M., dkk. 2024).

Abnormalitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk genetik, lingkungan, dan manajemen reproduksi. Faktor genetik, seperti kelainan bawaan, dapat menyebabkan cacat pada kepala atau ekor spermatozoa. Lingkungan yang buruk, seperti suhu ekstrem atau paparan toksin, dapat mengganggu proses spermatogenesis, menghasilkan spermatozoa abnormal. Manajemen reproduksi yang tidak tepat, seperti frekuensi ejakulasi yang terlalu tinggi, dapat meningkatkan persentase abnormalitas spermatozoa. (Sitepu, S. A. dkk. 2023).

1.2.2 Pengencer Tris Kuning Telur (TKT)

Pengencer semen berperan krusial dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses penyimpanan dan inseminasi buatan. Fungsi utama pengencer adalah menyediakan nutrisi, menjaga keseimbangan pH, dan melindungi membran spermatozoa dari kerusakan oksidatif serta stres termal. Komponen seperti kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang melindungi membran spermatozoa dari kerusakan selama penyimpanan. Selain itu, penambahan antioksidan seperti astaxanthin dan glutathione dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) terbukti meningkatkan kualitas semen cair dengan mengurangi kerusakan oksidatif pada spermatozoa. Pemilihan dan formulasi pengencer yang tepat sangat penting untuk menjaga viabilitas dan motilitas spermatozoa, sehingga meningkatkan keberhasilan program reproduksi pada ternak (Pratiwi, N., dkk. 2019).

Pengencer Tris Kuning Telur (TKT) memiliki sejumlah kelebihan dalam menjaga kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Kombinasi tris dan kuning telur menyediakan nutrisi esensial, menjaga keseimbangan pH, serta melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan. Penggunaan pengencer tris kuning telur dapat mempertahankan motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma spermatozoa secara efektif. Namun, pengencer ini memiliki kekurangan, yaitu minimnya kandungan antioksidan alami, sehingga kurang optimal dalam menangkalkan radikal bebas dan mencegah peroksidasi lipid yang dapat merusak spermatozoa selama penyimpanan (Rahmansyah, A. dan Hariani, D. 2023).

1.2.3 Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) sebagai Antioksidan

Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) kaya akan berbagai senyawa bioaktif yang berkontribusi pada aktivitas farmakologisnya. Senyawa utama yang terkandung dalam bunga ini meliputi antosianin, flavonoid, dan senyawa fenolik lainnya. Antosianin, seperti delphinidin 3-O-glikosida, bertanggung jawab atas warna biru khas bunga telang dan memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan. Flavonoid lain yang ditemukan antara lain kaempferol, quercetin, dan myricetin, yang juga berperan sebagai antioksidan dan memiliki potensi sebagai agen antibakteri (Yurisna, V. C., dkk. 2022).

Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) memiliki potensi antioksidan yang kuat, terutama karena kandungan antosianin dan flavonoidnya memiliki potensi untuk meningkatkan kualitas semen dengan mengurangi stres oksidatif pada spermatozoa (Rudia, F., dkk. 2024). Stres oksidatif pada spermatozoa Sapi Bali merupakan fenomena yang umum terjadi, terutama selama proses kriopreservasi atau pembekuan semen. Stres ini disebabkan oleh peningkatan jumlah radikal bebas yang berasal dari metabolisme spermatozoa dan lingkungan sekitar, seperti udara yang kaya oksigen selama pengolahan semen beku. Radikal bebas ini dapat menyebabkan peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa, mengakibatkan kerusakan membran, penurunan motilitas, dan viabilitas spermatozoa (Wijayanti, A., dkk. 2023).

Data mengenai kadar fenol, flavonoid, dan antiosianin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternatea L.*), dapat dilihat pada tabel 1. kadar fenol, flavonoid, dan antiosianin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternatea L.*)

Tabel 1. Kadar fenol, flavonoid, dan antiosianin dalam ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternatea L.*)

	Kadar Fenol Total (mgGAE/100g)	Kadar Flavonoid Total (mg/100g)	Kadar Antosianin (mg /100g)
Rerata	2459,94	1171,105	122,79
Standar Deviasi (±)	1057,931	154,9483	84,25884

Kuswandari, dkk. (2022)

1.3 Rumusan Masalah

Kualitas spermatozoa sangat penting untuk menunjang keberhasilan dalam inseminasi buatan hingga kebuntingan. Perlu adanya pengencer yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa khususnya viabilitas dan abnormalitas. Pengencer Tris Kuning Telur (TKT) merupakan salah satu solusi yang umum digunakan, namun masih diperlukan tambahan zat yang dapat meningkatkan efektivitasnya. Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) diketahui memiliki kandungan antioksidan yang berpotensi dalam menjaga stabilitas membran spermatozoa dan mengurangi kerusakan akibat radikal bebas. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak bunga telang pada pengencer TKT dapat mempertahankan viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi Bali.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak bunga telang pada pengencer tris kuning telur (TKT) terhadap viabilitas dan abnormalitas Spermatozoa sapi Bali.

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan mampu menjadi sumber informasi ilmiah bagi peneliti untuk melihat hasil uji kualitas Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa sapi Bali setelah Penambahan Pengencer Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) pada Pengencer Tris Kuning Telur (TKT).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2025. Pembuatan ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternate L.*) dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit Processing Semen dan dievaporasi di Laboratorium Kimia Radiasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan sampel semen dilakukan di Lingkungan Kandang Ternak Sapi Potong Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Pengujian kualitas semen dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit Processing Semen Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

2.2 Materi Penelitaian

Materi penelitian yang digunakan adalah sapi Bali sebanyak 2 ekor dengan kisaran umur 4-5 tahun. Bahan yang digunakan yaitu tris (hydroxymethyl) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, kuning telur ayam kampung, gliserol, penisilin, streptomisin, aquabidest, Ekstrak Bunga Telang 2%, Ekstrak Bunga Telang 2,5%, Ekstrak Bunga Telang 3%, aquadest, vaseline, Tissue, Sabun cuci piring, NaCl 0,9%, Aluminium foil, Kertas saring, parafilm, Alkohol dan Eosin 2%.

Alat yang digunakan antara lain adalah vagina buatan, termos, ember, tabung skala, alat tulis (pulpen, label, pensil), tabung reaksi, gelas ukur, spoit, gloves latex drying and sterilization oven, CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), mikroskop Olympus Trinokuler, Photometer SDM 6, Hot plate, kuvet, Mikroskop, Timbangan elektrik, makro dan mikro pipet, minicropipet tip, tally counter, pinset, objek glass, cover glass, Syringe Filter dan Ratory Evaporator.

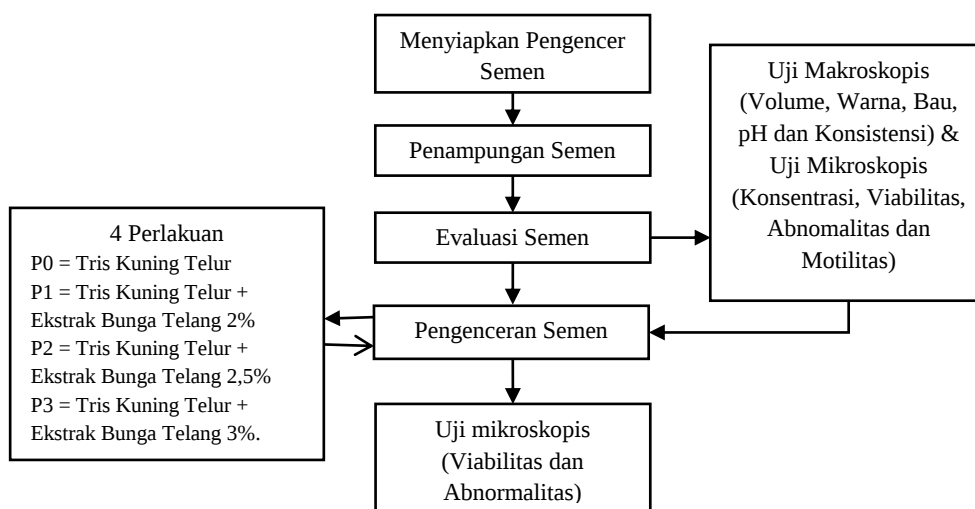
2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan 5 kali ulangan (penampungan semen). Perlakuan dalam penelitian ini adalah jenis pengencer spermatozoa yang terdiri atas:

- P0 = Tris Kuning Telur
- P1 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2%
- P2 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2,5%
- P3 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 3%

2.4 Alur Penelitian

Proses pengenceran semen dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria Ternate*) dan tris kuning telur (TKT).



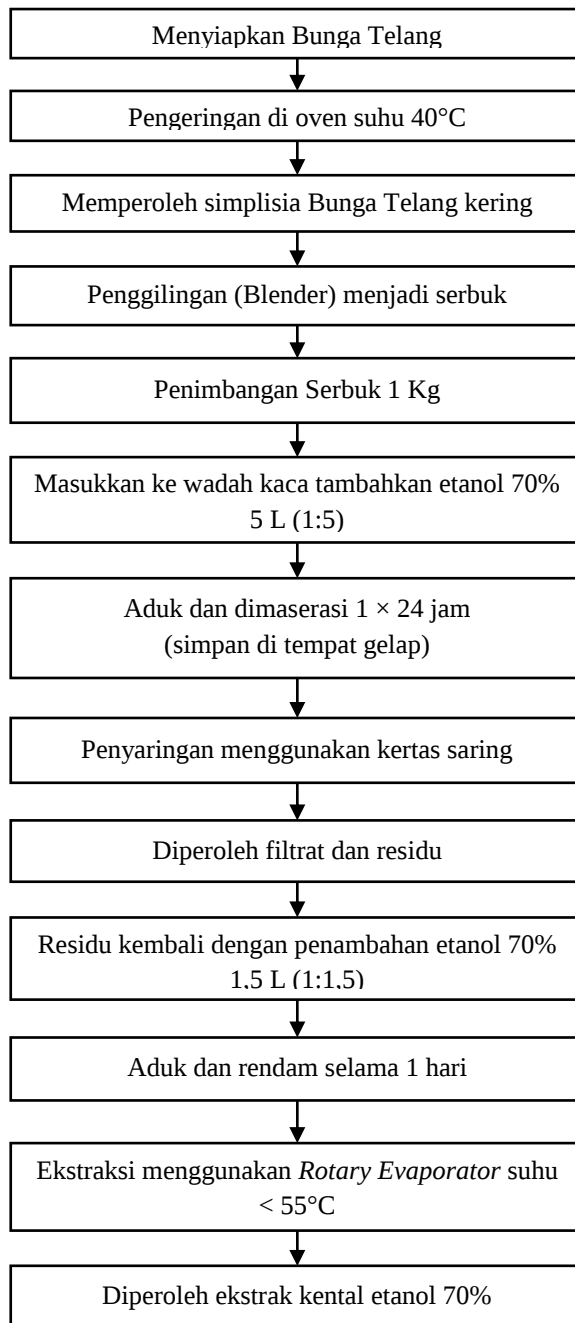
Gambar 1. Diagram Alir proses pengenceran dan penambahan ekstrak bunga telang dan tris kuning telur.

Alur penelitian ini diawali dengan persiapan pengencer semen, yang kemudian diformulasikan dalam beberapa perlakuan sesuai dengan rancangan yang telah ditetapkan. Setelah pengencer disiapkan, tahap berikutnya adalah penampungan semen, dimana semen segar dikumpulkan dari hewan ternak jantan. Semen yang telah ditampung selanjutnya dievaluasi untuk menentukan kualitas awal sebelum dilakukan proses lebih lanjut. Evaluasi awal mencakup uji makroskopis dan mikroskopis. Uji makroskopis meliputi pengamatan terhadap warna, pH, bau, konsistensi, dan volume semen. Sementara itu, uji mikroskopis meliputi penilaian motilitas, konsentrasi, viabilitas, serta abnormalitas spermatozoa. Setelah itu, dilakukan proses pengenceran, yaitu semen dilarutkan dengan pengencer sesuai dengan masing-masing perlakuan. Terdapat empat perlakuan utama, yaitu: P0 (Tris Kuning Telur tanpa tambahan ekstrak), P1 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2%), P2 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2,5%), dan P3 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 3%). Tahap akhir meliputi uji mikroskopis untuk mengevaluasi viabilitas (daya hidup) dan abnormalitas spermatozoa. Hasil dari pengujian ini memberikan informasi mengenai kualitas semen setelah penambahan pengencer yang mengandung ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan Tris Kuning Telur (TKT).

2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Proses Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

Proses pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria Ternate L.*) sebagai berikut:



Gambar 2. Diagram alir proses ekstraksi bunga telang

Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) diperoleh melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Bunga telang terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh simplisia bunga telang kering. Simplisia kering tersebut kemudian digiling menggunakan blender hingga menjadi serbuk (Erna et al., 2019). Serbuk bunga telang ditimbang sebanyak 1 kg, kemudian dimasukkan ke dalam wadah kaca dan ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 (sebanyak 5 L). Campuran tersebut diaduk hingga homogen, kemudian didiamkan selama 24 jam di tempat gelap untuk menghindari paparan sinar matahari. Setelah proses maserasi pertama selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat dan residu. Residu kemudian dimaserasi kembali dengan penambahan etanol 70% menggunakan perbandingan 1:1,5 (sebanyak 1,5 L). Campuran diaduk hingga merata, wadah ditutup rapat, dan direndam kembali selama 24 jam. Filtrat hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu kurang dari 55°C untuk memperoleh ekstrak etanol bunga telang yang kental (Fernanda et al., 2022).

2.5.2 Pembuatan Pengencer Tris Kuning Telur

Bahan pengencer Tris disiapkan dengan mencampurkan 3,634 g Tris (hydroxymethylaminomethane), 1,7 g asam sitrat, 1,25 g fruktosa, dan 6 mL gliserol (Merck, Germany), kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades destilata (aquabidest). Larutan buffer Tris sebanyak 80 mL selanjutnya dicampurkan dengan 20 mL kuning telur, kemudian dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan antibiotik berupa benzil penisilin (1000 IU/mL; Pharmacia & Upjohn, Belgium) dan streptomisin sulfat (1000 µg/mL; Pharmacia & Upjohn, Belgium), serta 7 mL gliserol tambahan (Yendraliza et al., 2023).

2.5.3 Penampungan Semen

Penampungan semen dilakukan menggunakan vagina buatan satu kali dalam seminggu pada pukul 06.00–09.00 WITA. Sebelum penampungan, dilakukan persiapan dengan memanaskan air hingga mencapai suhu 50–55°C, kemudian air panas tersebut dimasukkan ke dalam klep vagina buatan hingga mencapai $\frac{3}{4}$ bagian, lalu klep ditutup rapat. Selanjutnya, udara dimasukkan melalui klep bagian atas dan klep kembali ditutup. Bagian muka vagina buatan diberi pelicin (pelumas), kemudian suhu vagina buatan diukur hingga mencapai 42–44°C. Tabung penampung semen dipasang pada corong vagina buatan dan diikat dengan karet agar kuat. Tabung penampung dibungkus menggunakan aluminium foil untuk melindungi semen dari paparan langsung cahaya matahari. Setelah vagina buatan siap, penampungan semen dapat dilakukan. Seekor sapi betina disiapkan di kandang jepit sebagai pemancing. Sapi jantan kemudian didekatkan dengan sapi betina tersebut. Saat sapi jantan pertama kali menaiki sapi betina, penis diarahkan menjauh dari vagina betina (teasing) sehingga sapi jantan akan turun dengan sendirinya. Pada percobaan kedua atau ketiga, penampungan dilakukan dengan mengarahkan penis sapi jantan ke dalam vagina buatan.

Apabila terjadi gerakan ejakulasi yang ditandai dengan dorongan kuat dari sapi jantan, vagina buatan segera dilepaskan bersamaan dengan turunnya sapi jantan dari sapi betina. Apabila semen terlihat dalam tabung penampung, dilakukan gerakan berbentuk angka delapan agar seluruh semen terkumpul di dasar tabung. Semen yang telah terkumpul segera dibawa ke laboratorium untuk dievaluasi lebih lanjut. (Papituan, A., *et al.*, 2021)

2.5.4 Pengenceran Semen

Proses pengenceran diawali dengan pengumpulan semen dari pejantan menggunakan metode tertentu, seperti vagina buatan atau elektroejakulator. Setelah semen terkumpul, tahap selanjutnya adalah penyiapan bahan pengencer. Pengencer berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses penyimpanan dan pembekuan, serta membantu mempertahankan kualitas dan viabilitasnya (Yahaq *et al.*, 2019). Proses pengenceran dilakukan dengan menggunakan larutan pengencer yang telah disiapkan sebelumnya. Volume pengencer yang ditambahkan disesuaikan dengan konsentrasi spermatozoa hasil pengujian. Jumlah volume pengencer yang diperlukan dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$Volume\ Pengencer = \frac{Volume\ semen \times Konsentrasi\ sperma \times Motilitas}{Konsentrasi\ spermatozoa\ yang\ diinginkan/ml}$$

2.5.5 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

1. Volume

Semen yang diejakulasikan juga menjadi parameter utama dalam pengamatan mikroskopis. Volume normal bervariasi tergantung pada jenis ternak; misalnya, sapi biasanya menghasilkan 4-8 ml per ejakulasi, sementara kambing menghasilkan sekitar 0,5-2 ml. Volume yang terlalu rendah dapat mengindikasikan masalah reproduksi seperti hipospermia atau ejakulasi tidak lengkap, sedangkan volume yang terlalu tinggi bisa menunjukkan adanya cairan tambahan dari kelenjar aksesori (Saleh, D. M., 2020).

2. Warna

Semen yang normal biasanya putih susu hingga krem, tergantung pada jenis ternak. Warna semen mencerminkan konsentrasi spermatozoa dan kesehatan pejantan. Warna kekuningan dapat disebabkan oleh pencampuran urin, sedangkan warna kemerahan menunjukkan adanya darah (hematospermia), yang bisa diakibatkan oleh trauma atau infeksi pada saluran reproduksi (Nugraha, A., 2018).

3. Bau

Semen segar memiliki aroma khas yang normalnya tidak menyengat atau berbau busuk. Bau ini dapat menjadi indikator kesehatan reproduksi pejantan, di mana bau yang tidak normal, seperti amis atau busuk, sering kali dikaitkan dengan adanya infeksi atau kontaminasi bakteri pada saluran reproduksi. Penelitian menunjukkan bahwa bau yang khas pada semen juga dipengaruhi oleh komposisi kimiawi cairan seminalis (Pramesth, N., 2015).

4. Derajat Keasaman (pH)

Semen normal memiliki pH berkisar antara 6,5 hingga 7,5, tergantung pada jenis ternak. pH pada sperma sapi Bali berkisar antara 6,2 hingga 7,0. Beberapa penelitian menunjukkan nilai pH spesifik seperti 6,5 dan 6,4, yang menunjukkan bahwa sperma ini layak untuk digunakan dalam proses reproduksi Prastowo, S., Dkk. (2018). pH yang terlalu asam atau terlalu basa dapat memengaruhi viabilitas dan motilitas spermatozoa (Pramesth, N., 2015).

5. Konsistensi

Konsistensi dari semen diperiksa dengan cara memiringkan tabung yang berisi sperma secara perlahan-lahan. Semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti kemiringan tabung penampung dimana hampir semua atau sedikit lebih kental dari susu (Soi, M. N. J., 2016).

2) Mikroskopis

1. Motilitas

Motilitas spermatozoa dimulai dengan pengamatan preparat semen yang telah diencerkan dan diletakkan di bawah mikroskop. Penilaian motilitas dilakukan dengan mengamati gerakan spermatozoa dalam bidang pandang mikroskop pada perbesaran yang sesuai 100x (Hidayati *et al.*, 2021). Spermatozoa yang motil dapat dibedakan berdasarkan tipe gerakannya, yaitu gerakan linear (maju ke depan) dan non-linear (gerakan melingkar atau berputar). Kemudian menghitung persentase spermatozoa yang bergerak aktif dibandingkan dengan total spermatozoa yang diamati. Umumnya, spermatozoa yang dianggap berkualitas baik adalah yang memiliki motilitas lebih dari 70% (Prasetyo *et al.*, 2019).

2. Konsentrasi

Konsentrasi spermatozoa dimulai dengan pengambilan sampel semen yang telah diencerkan dan diletakkan di bawah mikroskop. Kemudian menentukan konsentrasi spermatozoa, preparat semen biasanya diletakkan di dalam hemocytometer, yaitu alat yang dirancang khusus untuk menghitung sel. Setelah preparat siap, mengamati bidang pandang hemocytometer pada perbesaran yang sesuai (Hidayati *et al.*, 2021). Spermatozoa dihitung dalam beberapa kotak yang telah ditentukan pada hemocytometer, dan hasilnya kemudian dikalibrasi untuk mendapatkan konsentrasi total spermatozoa per mililiter semen. Konsentrasi spermatozoa yang baik umumnya berkisar antara 1 hingga 3 miliar spermatozoa per mililiter semen (Sari *et al.*, 2020).

3. Abnormalitas

Abnormalitas spermatozoa merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan kualitas spermatozoa karena apabila persentase abnormalitasnya di atas 20% maka tingkat fertilitasnya rendah sehingga berpengaruh pada tidak terjadinya fertilisasi pada saat kopulasi (Manehat, F. X. 2021). Abnormalitas diamati dengan membuat ulas pada gelas objek dari satu tetes sperma yang dicampur dengan satu eosinNegrosin. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 40x. Spermatozoa yang normal dan abnormal dihitung sampai 100 sampai 200 sel (Yendraliza, Y., dkk, 2019). Berikut rumus menghitung abnormalitas spermatozoa:

$$Abnormalitas (\%) = \frac{\text{Jumlah Abnormal Spermatozoa}}{\text{Total Spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

4. Viabilitas

Viabilitas dievaluasi dengan menggunakan pewarnaan eosin (Sitepu, S. A. dan Putra, A. 2017). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang tidak menyerap zat warna, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah. Evaluasi dilakukan pada minimal 200 spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 40x. Rerata presentase tingkat viabilitas sapi Bali adalah $9,94 \pm 2,84$ Yekti *et al* (2018). Persentase spermatozoa hidup dihitung berdasarkan rumus:

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

2.5.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Progeam For Sosial Science* dengan ANOVA.

$$Y_{ij} = \mu + T_i \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, \dots, t$

$j = 1, 2, 3, \dots, n$

Ket :

Y_{ij} = Nilai Pengamatan pada perlakuan i (penambahan ekstrak bunga telang),
Ulangan j (banyak ulangan penampungan semen)

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke i (penambahan ekstrak bunga telang ke dalam semen)

ε_{ij} = Pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan ke i (penambahan ekstrak bunga telang ke semen) dan ulangan ke j (penampungan semen)

t = Banyak perlakuan penambahan ekstrak ke dalam semen

n = Banyak ulangan penampungan semen