

**Terakreditasi**Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kemristekdikti  
Keputusan No: 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018DOI: <http://dx.doi.org/10.33772/jitro.v7i3.12203>  
<http://ojs.uho.ac.id/index.php/peternakan-tropis>**Kualitas Semen Beku Sexing Sapi Peranakan Ongole  
Menggunakan Volume Semen Awal Yang Berbeda****Irvan Mardi<sup>1)</sup>, Aulia Puspita Anugra Yekti<sup>2)</sup>, Kuswati<sup>2)</sup>, Muchamad Luthfi<sup>3)</sup>,  
Trinil Susilawati<sup>2)\*</sup>**1) Mahasiswa Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 651452) Dosen Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya  
Jl. Veteran, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 651453) Loka Penelitian Sapi Potong Grati, Pasuruan  
Jl. Pahlawan Grati, Bebekan Lor, Kec. Grati, Pasuruan, Jawa Timur 67184\*Email Korespondensi: [irvanmardi06@gmail.com](mailto:irvanmardi06@gmail.com) & [tsusilawati@ub.ac.id](mailto:tsusilawati@ub.ac.id)

(Diterima 22-05-2020; disetujui 25-09-2020)

**ABSTRAK**

Inseminasi buatan dengan menggunakan semen *sexing* diharapkan menghasilkan pedet dengan jenis kelamin sesuai harapan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas, proporsi, dan jumlah produksi *straw sexing* menggunakan metode sentrifugasi gradien densitas percoll dengan volume awal semen yang berbeda. Penelitian dilakukan di Loka Penelitian Sapi Potong, Kecamatan Grati, Kabupaten Pasuruan dan Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang. Materi yang digunakan adalah semen sapi peranakan ongole berumur berkisar lima tahun dan bobot badan berkisar 700 kg sebanyak tiga ekor, motilitas massa  $\geq 2+$  dan motilitas individu  $\geq 70\%$ . Metode yang digunakan adalah eksperimental dengan tiga perlakuan volume awal saat *sexing*, yaitu 1 (P1); 1,5 (P2); dan 2 (P3) ml dengan ulangan 11 kali (ulangan berfungsi sebagai kelompok). Data dianalisa menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan volume awal semen tidak berpengaruh (menurun) terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, total spermatozoa motil, *recovery rate* dan proporsi spermatozoa ( $P > 0,05$ ). Pengaruh yang sangat nyata (meningkat) terhadap jumlah produksi *straw* ( $P < 0,01$ ). Ulangan penelitian ini memberikan pengaruh yang sangat nyata (meningkat) terhadap kualitas (motilitas, konsentrasi, viabilitas, abnormalitas, total spermatozoa motil, RR, proporsi dan jumlah *straw*) dan proporsi spermatozoa X dan Y ( $P < 0,01$ ). Total spermatozoa motil setiap perlakuan telah memenuhi nilai harapan (10 juta/*straw*). Proporsi spermatozoa X dan Y telah memenuhi nilai harapan (80%:20%).

**Kata Kunci:** kualitas, proporsi, semen beku *sexing*, *straw***ABSTRACT**

Artificial insemination using *sexing* semen is expected to produce calves with the expected sex. The aim of this study was to determine the quality, proportion, and quantity of *sexing* semen production using the percoll density gradient centrifugation method with different initial semen volumes. The research was conducted at the Beef Cattle Research, Grati District, Pasuruan Regency, East Java Province, Indonesia, and the Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Animal Science, University of Brawijaya, Malang, East Java Province, Indonesia. The material used was semen from three Ongole crossbred bull aged around five years and the bodyweight of around 700 kg, mass motility of  $\geq 2+$ , and individual motility  $\geq 70\%$ . The method used was experimental with three initial volume treatments during *sexing*, namely 1 (P1); 1.5 (P2), and 2 (P3) ml with 11 replications (replications function as groups). The data were analyzed using a randomized block design (RBD). The results showed that the treatment of differences in initial semen volume did not affect motility, viability, abnormalities, concentration, total motile sperm, recovery rate, and proportion of sperm ( $P > 0.05$ ). On the other hand, the difference in the initial volume of semen had a very significant effect (increased) on the amount of frozen semen production ( $P < 0.01$ ). Repeated research also had a very significant effect (increased) on the semen quality (motility, concentration, viability, abnormality, total sperm motility, recovery rate proportion, and *straw* production) and the proportion of spermatozoa X and Y ( $P < 0.01$ ). The total motile sperm for each treatment had met the expected value (10 million/*straw*). Proportions of spermatozoa X and Y have met the expected value (80%:20%).

**Keywords:** proportion, quality, *sexing* frozen semen, *straw*

## PENDAHULUAN

Inseminasi buatan menggunakan semen *sexing* telah terbukti dapat meningkatkan efisiensi pada usaha peternakan sapi. IB dapat ditingkatkan nilainya dengan menghasilkan bibit unggul dengan jenis kelamin yang sesuai dengan tujuan pemeliharaan, misalnya untuk potong dibutuhkan sapi pejantan dan untuk perah dibutuhkan sapi betina. *Sexing* dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya sentrifugasi gradien densitas percoll (SGDP) yang hasilnya lebih baik, dapat dibuat lebih mudah dan dapat memisahkan spermatozoa X dan Y sebesar 80% (Susilawati, 2014). Hasil penelitian Fernanda *et al.* (2014) menunjukkan bahwa setelah *thawing* semen *sexing*, persentase motilitas spermatozoa X sebesar 35% dan spermatozoa Y sebesar 40%. Hasil penelitian Susilawati *et al.* (2017) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa X dan Y semen *sexing* SGDP *post thawing* masing-masing adalah  $31,45 \pm 7,20\%$  dan  $27,45 \pm 8,69\%$ . Hasil penelitian Mahfud *et al.* (2019) menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa *sexing* beku sebanyak 12,125 juta/*straw*.

Standar konsentrasi spermatozoa hasil *sexing* sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI) belum ada sampai saat ini dan konsentrasi spermatozoa untuk semen beku sapi sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI 01-4869.1-2017). Semen beku yang dapat didistribusikan dan diinseminasikan harus memiliki *post thawing motility* minimal sebesar 40% dan konsentrasi spermatozoa sebesar 25 juta/*straw* atau 25 juta/0,25 ml. Upaya memenuhi persyaratan mutu (konsentrasi spermatozoa) semen beku yang telah ditetapkan sesuai SNI dan karena belum adanya konsentrasi spermatozoa hasil *sexing* SGDP sesuai SNI, maka penelitian ini perlu dilakukan.

## MATERI DAN METODE

### Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Loka Penelitian Sapi Potong, Jalan Pahlawan No. 2, Desa Klindungan, Kecamatan Grati, Kabupaten Pasuruan pada bulan Januari sampai Maret 2020, sedangkan penelitian mengenai uji proporsi spermatozoa X dan Y dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.

### Materi

Sampel semen yang digunakan pada penelitian ini adalah semen yang berasal dari tiga ekor pejantan sapi peranakan ongole (PO) berumur berkisar lima tahun dengan bobot badan berkisar 700 kg. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa  $\geq +2$ , motilitas individu  $\geq 70\%$ , viabilitas  $\geq 80\%$ , dan abnormalitas  $< 20\%$  Percoll (Sigma-Adrich, Germany), dan pengencer Andromed<sup>®</sup> (Minitube, USA).

### Metode

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dengan tiga perlakuan volume semen awal saat *sexing*, yaitu 1 (P0); 1,5 (P1); dan 2 ml (P2). Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 11 kali (ulangan sebagai kelompok). Data dianalisa menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Parameter yang diukur adalah persentase motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, total spermatozoa motil, *recovery rate*, proporsi spermatozoa X dan Y dan produksi semen beku.

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan 10 densitas gradien dengan konsentrasi 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; dan 65%. Masing-masing densitas Percoll ditambahkan pengencer Andromed<sup>®</sup> dengan volume 0,5 ml dibuat 10n gradien dari 65% sampai dengan 20%. Semen dengan volume yang berbeda dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan percoll+pengencer dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm selama lima menit. Larutan di lapisan atas diambil sebanyak 2 ml (spermatozoa Y) dan 2 ml bagian bawah (spermatozoa X) ditempatkan dalam tabung reaksi yang berbeda yang berisi 3 ml pengencer setelah sentrifugasi. Pencucian dengan sentrifugasi kecepatan 1500 rpm selama tiga menit. Bagian atas (*supernatant*) dibuang dan disisakan endapan (*precipitate*) sebanyak 1 ml di dasar tabung. Supernatan ditambahkan pengencer dengan prediksi konsentrasi 25 juta/ml dan dilanjutkan pada tahap pembekuan.

Tahap pembekuan diawali dengan memasukkan semen *sexing* ke dalam tabung reaksi yang direndam dalam *waterbath* suhu 30°C dan suhu diturunkan sampai suhu 4°C (*refrigerator* atau *cool tub*). Uji motilitas

individu dilakukan sebelum proses pembekuan untuk memastikan kualitas semen *sexing*. Proses *filling and sealing* dilakukan pada suhu mendekati suhu *refrigerator*. *Straw* yang telah berisi semen dilakukan *pre freezing* (penguapan diatas nitrogen cair) pada suhu  $-140^{\circ}$  selama sembilan menit untuk penyesuaian suhu semen sebelum direndam dalam nitrogen cair. Proses *freezing* dengan merendam *straw* berisi semen hasil *sexing* dalam *container* yang berisi nitrogen cair dengan suhu  $-19^{\circ}\text{C}$  selama minimal 24 jam dan selanjutnya, dilakukan pengamatan uji kualitas dan proporsi spermatozoa X dan Y.

### Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini, meliputi:

#### Motilitas Individu (%)

Motilitas individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya (CX-23, Olympus, Jepang) dengan perbesaran 400X. Penentuan persentase motilitas dilakukan dengan pengamatan lima lapang pandang dan rata-rata diambil dari lima lapang pandang tersebut (SNI 01-4869.1-2017).

#### Konsentrasi Spermatozoa

Proses perhitungan konsentrasi menggunakan *haemocytometer* (Marienfield, Germany). Semen diencerkan 200 kali dengan larutan fisiologis NaCl 0,9% dan dikocok membentuk angka delapan selama dua menit. Semen dibuang 1-2 tetes dan semen diteteskan diatas kamar hitung *haemocytometer* yang ditutupi *cover glass*. Spermatozoa diamati pada lima kotak dengan arah diagonal menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Perhitungan konsentrasi spermatozoa menurut Susilawati (2011).

$$\text{Konsentrasi} = \text{Total spermatozoa} \times 10^6$$

#### Viabilitas spermatozoa (%)

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan untuk mengetahui persentase spermatozoa yang hidup dengan preparat ulas atau *smear*. Preparat ulas dibuat dengan mencampur satu tetes semen dan satu tetes eosin-negrosin dengan ose, kemudian dibuat *smear* dengan *object glass* dengan kemiringan  $45^{\circ}\text{C}$ . Jumlah spermatozoa yang diamati minimal sebanyak 200 spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x (Susilawati, 2011).

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

#### Abnormalitas spermatozoa (%)

Abnormalitas spermatozoa dievaluasi menggunakan preparat ulas untuk pengamatan viabilitas. Morfologi spermatozoa abnormal (tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor abnormal, bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proximal dan bentuk abnormal ekor dengan distal droplet) diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Jumlah spermatozoa yang diamati minimal sebanyak 200 spermatozoa dan dinyatakan dalam persen (%) (Noakes et al., 2009; Susilawati & Yekti, 2018).

$$\% \text{ Abnormalitas} = \frac{\text{spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

#### Total Spermatozoa Motil (TSM)

Total spermatozoa motil adalah perhitungan total spermatozoa motil yang diperoleh dari perkalian antara persentase motilitas individu spermatozoa dengan konsentrasi spermatozoa dalam juta/*straw*. Perhitungan total spermatozoa yang motil menurut Susilawati (2011), sebagai berikut:

$$\text{TSM (juta/straw)} = \text{KS} \times \text{MS}$$

Keterangan:

- KS : konsentrasi spermatozoa (juta)  
MS : motilitas spermatozoa (%)

#### Recovery Rate (RR)

*Recovery Rate* merupakan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan pembagian antara motilitas spermatozoa setelah *thawing* dengan motilitas spermatozoa segar (Garner & Hafez, 2000). Persentase RR dapat dihitung dengan rumus, sebagai berikut:

$$\text{Recovery Rate} = \frac{\text{Motilitas Semen Beku}}{\text{Motilitas Semen}} \times 100\%$$

#### Proporsi spermatozoa

Solihati et al. (2017) menyatakan bahwa metode morfometrik sebagai dasar untuk aplikasi *sexing* melalui identifikasi ukuran-ukuran kepala spermatozoa. Identifikasi morfometri spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya (235, Olympus, Jepang) dengan perbesaran 400x yang dilengkapi micrometer okuler. Pengukuran morfometri, meliputi panjang dan lebar kepala spermatozoa. Penetapan spermatozoa X adalah jika panjang kepala lebih besar dari rata-rata dan spermatozoa

Y adalah jika panjang kepala lebih kecil dari rata-rata. Data yang diperoleh dilakukan perhitungan persentase spermatozoa X dan Y.

*Produksi straw semen sexing.*

Jumlah *straw* yang dihasilkan setelah proses pembekuan dapat diketahui dengan perhitungan konsentrasi semen cair yang dibagi dengan konsentrasi spermatozoa didalam *straw* sesuai dengan SNI 01-4869.1-2017, yaitu 25 juta/*straw*.

$$\text{Produksi Straw} = \frac{\text{volume total}}{\text{volume straw}}$$

### Analisis Data

Data penelitian dianalisis menggunakan RAK dan 11 ulangan sebagai blok pada setiap perlakuannya untuk mengetahui pengaruh perbedaan setiap perlakuan. Uji *Chi-square* untuk menguji kesesuaian dengan SNI.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen

Kualitas semen merupakan salah satu faktor yang menjadi pertimbangan untuk melakukan teknologi IB. Proses pembekuan semen dilakukan dengan metode konvensional menggunakan proses pembekuan bertingkat (*slow freezing*). Parameter pengamatan yang dilakukan terhadap semen *sexing* beku, diantaranya motilitas individu (%), konsentrasi, viabilitas (%), abnormalitas (%), total spermatozoa motil, *recovery rate*, dan proporsi spermatozoa semen *sexing* beku.

Tabel 1. Kualitas semen perlakuan

Ulangan	Kode Pejantan	Motilitas Massa	Motilitas Individu (%)
1	15.7.9	2+	78
2	15.7.9	2+	78
3	15.7.9	2+	72
4	15.7.9	2+	66
5	13.12.26	2+	71
6	15.7.9	2+	73
7	15.7.9	2+	67
8	13.12.26	2+	70
9	13.12.26	2+	69
10	15.7.9	2+	71
11	12.4.6	2+	69
Rata-rata	-	2+	71,27

### Persentase Motilitas Individu Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

Pengamatan persentase motilitas spermatozoa dilakukan pada semen beku yang telah diberi perlakuan awal yang berbeda tidak menurunkan persentase motilitas individu pada semen *sexing* beku ( $P > 0,05$ ) (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase motilitas individu semen *sexing* beku pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (%)
P1 semen beku X	40,91±6,82
P2 semen beku X	39±3,74
P3 semen beku X	38,45±4,95
P1 semen beku Y	40,09±5,8
P2 semen beku Y	38,36±3,26
P3 semen beku Y	37,91±4,7

Keterangan: P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Persentase motilitas tertinggi pada spermatozoa X diperoleh dari perlakuan P1 (40,91±6,82%). Hal ini diduga disebabkan oleh volume semen awal yang digunakan lebih sedikit dibandingkan perlakuan lainnya, sehingga daya saing spermatozoa untuk memperoleh nutrisi lebih rendah dibandingkan pada perlakuan lainnya menggunakan volume semen awal yang lebih tinggi. Rataan spermatozoa Y tertinggi diperoleh dari perlakuan P1 (40,09±5,8%). Hasil analisis menggunakan uji *chi-square* menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan tidak mempengaruhi penurunan persentase motilitas semen beku hasil *sexing* ( $P > 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan sesuai dengan persyaratan mutu SNI, untuk semen beku minimal memiliki persentase motilitas minimum 40% (SNI-4869-1. 2017).

Pengaruh yang terdapat antar ulangan diduga disebabkan oleh penggunaan sapi pejantan yang tidak sama pada setiap ulangan, waktu dan lama koleksi semen, suhu lingkungan penampungan semen dan kondisi fisiologis ternak (*libido* pejantan), sehingga memberikan hasil yang tidak sama. Proses *sexing* hingga *before freezing* memerlukan waktu yang cukup lama, sehingga mempengaruhi persentase motilitas spermatozoa saat dilakukan uji kualitas pada penelitian ini. Susilawati (2013) menjelaskan bahwa kualitas semen dipengaruhi oleh individu sapi, pakan yang diberikan, *libido* dan proses penampungannya.

### Konsentrasi Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dalam satu *straw* semen beku setelah *thawing* untuk memastikan jumlah spermatozoa sesuai dengan SNI SNI 01-4869.1-2017.

Tabel 3. Konsentrasi spermatozoa semen *sexing* beku pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (juta/ <i>straw</i> )
P1 semen beku Y	25,23±0,93
P2 semen beku Y	25,73±0,79
P3 semen beku Y	26,18±1,63
P1 semen beku X	23,09±1,36
P2 semen beku X	23,41±0,89
P3 semen beku X	23,86±2,32

Keterangan: P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Berdasarkan hasil perhitungan, maka perlakuan P1, P2, dan P3 semen beku telah memenuhi persyaratan mutu SNI dan jumlah spermatozoa minimal pada semen beku adalah 25 juta spermatozoa/*straw*. Konsentrasi spermatozoa pada perlakuan lainnya belum memenuhi syarat mutu SNI yang telah ditetapkan. Mahfud *et al.* (2019) melaporkan bahwa jumlah spermatozoa semen *sexing* beku yang diperoleh dari semen beku adalah 12,125±4,19 juta/*straw*. Hasil analisis menggunakan uji *chi-square* menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan tidak mempengaruhi konsentrasi spermatozoa per *straw* ( $P>0,05$ ), sehingga dapat dikatakan sesuai dengan persyaratan mutu SNI, yaitu 25 juta/*straw* (SNI-4869-1.2017).

Hasil perhitungan konsentrasi semen beku *sexing* pada spermatozoa X yang tidak memenuhi persyaratan mutu SNI, hal ini diduga oleh proses *pipetting* (pengambilan lapisan bawah yang mengandung spermatozoa X) pasca *sexing* yang kurang maksimal. Proses *sexing* spermatozoa menggunakan metode SGDP menghasilkan spermatozoa X pada lapisan bawah tidak memiliki warna yang kontras dengan medium *sexing* yang digunakan, sehingga pada saat pengambilan (*pipetting*) spermatozoa sering tercampur dengan gradien *sexing*. Hal ini mengakibatkan jumlah spermatozoa X pada tahap semen cair (setelah *sexing*) lebih rendah dibandingkan dengan jumlah spermatozoa Y yang memiliki

warna yang sangat kontras antara semen dengan medium *sexing*. Lebih jauh lagi, proses *filling and sealing* yang dilakukan secara manual mengakibatkan jumlah spermatozoa yang terkandung dalam satu *straw* tidak memiliki keteraturan (kesamaan) antar perlakuan.

### Persentase Viabilitas Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

Persentase viabilitas merupakan salah satu indikator fertilitas dan kualitas spermatozoa. Persentase viabilitas spermatozoa umumnya dinilai dari spermatozoa yang masih hidup yang dibandingkan dengan spermatozoa yang mengalami kerusakan selama pembekuan (Felipe-Pérez *et al.*, 2008). Hasil pengamatan persentase viabilitas diperoleh hasil spermatozoa X dan Y dari masing-masing perlakuan (Tabel 4).

Tabel 4. Persentase viabilitas spermatozoa semen *sexing* beku pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (%)
P1 semen beku Y	23,86±8,85
P2 semen beku Y	26,23±6,81
P3 semen beku Y	30,33±14,53
P1 semen beku X	24,20±7,57
P2 semen beku X	23,35±10,11
P3 semen beku X	32,33±11,47

Keterangan: Diantara perlakuan dan ulangan semen beku Y memberikan perbedaan pengaruh yang tidak nyata ( $P>0,05$ ), sedangkan P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Berdasarkan data (Tabel 4) bahwa persentase viabilitas spermatozoa X dan Y pada perlakuan P3 memiliki persentase viabilitas tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Rendahnya nilai persentase viabilitas spermatozoa diduga disebabkan oleh proses *filling and sealing* hingga proses *before freezing*, sehingga mengakibatkan rendahnya persentase viabilitas spermatozoa. Persentase viabilitas memiliki korelasi terhadap persentase motilitas. Hal ini sesuai dengan Susilawati (2014) bahwa persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa berkaitan dengan kualitas membran sperma-tozoa. Kualitas membran yang buruk akan mempengaruhi persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa. Proses sentrifugasi dan proses

pembekuan spermatozoa dapat merusak membran spermatozoa, sehingga menyebabkan penurunan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa. Perlakuan volume semen awal yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap viabilitas spermatozoa. Pengaruh yang terdapat antar ulangan diduga disebabkan oleh penggunaan sapi pejantan yang tidak sama pada setiap ulangan, waktu dan lama penampungan semen, suhu lingkungan saat penampungan semen dan kondisi fisiologis ternak (libido pejantan).

Proses pembekuan menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa, sehingga kerusakan membran plasma tersebut memberikan celah untuk masuknya zat pewarna (eosin-negrosin) pada kepala spermatozoa yang menyebabkan timbulnya warna pada spermatozoa yang rusak (mati). Spermatozoa yang tidak mengalami kerusakan membran plasma tidak dapat menyerap zat warna, sehingga spermatozoa yang hidup tidak berwarna. Hal ini sesuai dengan Azzahra *et al.* (2016) bahwa persentase hidup spermatozoa ditentukan oleh adanya kerusakan pada membran plasma spermatozoa.

#### Persentase Abnormalitas Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

Abnormalitas spermatozoa adalah kegagalan bentuk fisik dari spermatozoa. Kegagalan dapat berupa bentuk kepala yang meruncing dan kerusakan bagian kepala spermatozoa. Susilawati (2014) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi dua, yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi saat spermatogenesis di tubulus seminiferus testis dan faktor genetik, sedangkan abnormalitas sekunder dapat terjadi setelah spermatogenesis didalam tubulus seminiferus hingga semen diejakulasikan dan saat prosesing semen. Salim *et al.* (2012) menambahkan bahwa abnormalitas tersier memiliki ciri-ciri ekor yang terputus dari kepala spermatozoa. Data pengamatan abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan data pengamatan persentase abnormalitas semen *sexing* beku (Tabel 5) menunjukkan bahwa spermatozoa Y pada perlakuan P3 memiliki abnormalitas yang lebih

tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan pada spermatozoa X terdapat persentase abnormalitas tertinggi pada perlakuan P2. Hal ini diduga oleh proses pembekuan yang dilakukan dan pembuatan preparat ulas sampel yang kurang baik. Persentase abnormalitas semen beku yang layak digunakan dalam pelaksanaan IB sebesar <20% (Carvalho *et al.*, 2010). Hasil tersebut sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional Indonesia (BSNI) tahun 2005 bahwa semen sapi memiliki morfologi abnormalitas, baik primer maupun sekunder, dibawah 20%.

Tabel 5. Persentase abnormalitas semen *sexing* beku pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (%)
P1 semen beku Y	5,21±1,18
P2 semen beku Y	4,40±1,27
P3 semen beku Y	5,28±1,48
P1 semen beku X	4,92±1,09
P2 semen beku X	5,39±1,73
P3 semen beku X	5,25±1,82

Keterangan: Diantara perlakuan memberikan perbedaan pengaruh yang tidak nyata ( $P>0,05$ ). P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Persentase dari hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa menunjukkan persentase yang berbeda-beda pada masing-masing perlakuan, namun dengan perbedaan nilai persentase yang tidak terlalu jauh. Perlakuan volume semen awal yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa. Pengaruh antar ulangan diduga disebabkan oleh penggunaan sapi pejantan yang tidak sama pada setiap ulangan, waktu dan lama koleksi semen, suhu lingkungan pengoleksian semen dan kondisi fisiologis ternak (libido pejantan).

#### Total Spermatozoa Motil Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

Pengamatan total spermatozoa motil bertujuan untuk menentukan interpretasi nilai fertilitas spermatozoa berdasarkan jumlah konsentrasi dan motilitas spermatozoa (Mahfud *et al.*, 2019). Perhitungan total spermatozoa motil dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Total spermatozoa motil semen *sexing* beku pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (juta/ <i>straw</i> )
P1 semen beku Y	10,14±1,66
P2 semen beku Y	9,87±0,88
P3 semen beku Y	9,93±1,43
P1 semen beku X	9,48±1,85
P2 semen beku X	9,11±0,70
P3 semen beku X	9,19±1,61

Keterangan: Diantara perlakuan memberikan perbedaan pengaruh yang tidak nyata ( $P>0,05$ ). P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Berdasarkan data hasil penelitian (Tabel 6) menunjukkan bahwa rata-rata total spermatozoa motil tertinggi pada perlakuan P1 sebesar (10,14±1,66 juta/*straw*) untuk spermatozoa Y dan 9,48±1,85 juta/*straw* untuk spermatozoa X, sedangkan nilai ekspektasi total spermatozoa motil sebesar 10 juta/*straw*. Hasil tersebut dipengaruhi oleh persentase motilitas spermatozoa X dan Y pada perlakuan P1 lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Hasil perhitungan total spermatozoa motil menggunakan uji *chi-square* pada perlakuan P1 semen beku X dan Y sudah memenuhi persyaratan mutu yang ditetapkan BSNI ( $P>0,05$ ) (BSNI, 2005), sehingga dapat dikatakan sesuai semen beku minimal memiliki total spermatozoa motil 10 juta/*straw* (SNI-4869-1. 2017). Perlakuan volume semen awal yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap total spermatozoa motil. Pengaruh antar ulangan diduga disebabkan oleh penggunaan sapi pejantan yang tidak sama pada setiap ulangan, waktu dan lama penampungan semen, suhu lingkungan saat penampungan semen dan kondisi fisiologis ternak (libido pejantan).

#### Persentase *Recovery Rate* (RR) Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

*Recovery rate* merupakan pemulihan spermatozoa setelah setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa setelah *thawing* dengan motilitas spermatozoa segar (Garner dan Hafez, 2000). Arifiantini et al. (2005) melaporkan bahwa persentase nilai RR pada semen beku sapi Freisian Holstein menggunakan pengencer berbeda adalah 69,56±11,32% untuk pengencer mengandung kacang kedelai, 63,48±9,25% untuk pengencer

*Tris raffinose* dan 59,40±11,24% untuk pengencer *Tris fructose*. Nilai rata-rata RR dari masing-masing perlakuan spermatozoa X dan Y dapat dilihat pada Tabel 7.

Hasil yang diperoleh dari perhitungan persentase nilai RR menunjukkan bahwa perlakuan P1 semen beku X (57,63±10,58%) dan Y (56,54±9,69%) mempunyai nilai tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Tabel 7). Hasil ini diduga disebabkan oleh persentase motilitas individu masing-masing perlakuan pada spermatozoa X dan Y tidak jauh berbeda, sehingga menyebabkan nilai RR yang diperoleh tidak memiliki perbedaan antar perlakuan. Pengaruh antar ulangan diduga disebabkan oleh penggunaan sapi pejantan yang tidak sama pada setiap ulangan, waktu dan lama penampungan semen, suhu lingkungan saat penampungan semen dan kondisi fisiologis ternak (libido pejantan). Sunami et al. (2017) melaporkan bahwa nilai RR sapi Limousin pada musim yang berbeda dengan nilai RR tertinggi 62±0,03% pada musim hujan dan 67±0,05% pada musim kemarau. Berdasarkan hasil penjelasan tersebut, maka nilai RR tertinggi hasil penelitian ini (perlakuan P1 semen beku Y dan X) berada dibawah hasil penelitian Sunami et al. (2017).

Tabel 7. Persentase nilai *recovery rate* pada berbagai perlakuan

Perlakuan	<i>Recovery Rate</i> (%)
P1 semen beku Y	56,54±9,69
P2 semen Beku Y	54,03±6,06
P3 semen beku Y	53,41±7,83
P1 semen beku X	57,63±10,58
P2 semen Beku X	54,92±6,62
P3 semen beku X	54,15±7,97

Keterangan: Diantara perlakuan memberikan perbedaan pengaruh yang tidak nyata ( $P>0,05$ ). P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

#### Proporsi Spermatozoa Semen *Sexing* Beku pada Berbagai Perlakuan

*Sexing* merupakan upaya untuk mengubah proporsi-proporsi alamiah spermatozoa Y dan X (50%:50%) menjadi proporsi yang diinginkan dengan menggunakan metode *sexing* tertentu (Afiati, 2016). Persentase rata-rata proporsi spermatozoa X dan Y dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Proporsi spermatozoa pada berbagai perlakuan

Perlakuan	Rata-rata (%)
P1 semen beku Y	80,64 ± 2,94
P2 semen beku Y	81,64 ± 3,67
P3 semen beku Y	83,18 ± 1,99
P1 semen beku X	73,45 ± 3,72
P2 semen beku X	74,00 ± 3,82
P3 semen beku X	74,64 ± 4,57

Keterangan: Diantara perlakuan memberikan perbedaan pengaruh yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ). P1: volume awal 1 ml; P2: volume awal 1,5 ml; P3: volume awal 2 ml

Hasil yang didapat pada spermatozoa Y masing-masing perlakuan sebesar 80,64% (P1); 81,64% (P2) dan 83,18% (P3) telah memenuhi nilai ekspektasi *sexing* spermatozoa, yaitu 80%:20%. Spermatozoa X dari perlakuan yang berbeda adalah 73,45% (P1); 74% (P2) dan 74,64% (P3) dan nilai proporsi tersebut belum memenuhi nilai ekspektasi *sexing* spermatozoa. Hal ini diduga terjadi kesalahan pada proses *pipetting* saat koleksi spermatozoa X dan kemungkinan terambil spermatozoa Y yang berada di fraksi atas pada saat *sexing*. Perlakuan volume semen awal yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap proporsi spermatozoa. Fatahillah *et al.* (2016) melaporkan bahwa persentase spermatozoa X semen sapi Limousine adalah 54,60±10,76% dan persentase spermatozoa Y adalah 45,40±10,76%. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, bahwa IB menggunakan semen beku yang mengandung spermatozoa Y kemungkinan pedet yang akan dilahirkan adalah pedet jantan, karena rataan persentase spermatozoa Y lebih tinggi dibandingkan spermatozoa X.

### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan volume tidak memberikan pengaruh terhadap rataan persentase motilitas, konsentrasi, persentase viabilitas, persentase abnormalitas, persentase *recovery rate*, total spermatozoa motil dan proporsi spermatozoa.

### DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, L. 2004. Proporsi dan karakteristik spermatozoa X dan Y hasil separasi kolom albumin. *Media Peternakan* 27 (1):16-20.
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf, & N. Graha. 2005. Longitivitas dan *recovery rate* pasca *thawing semen* beku sapi friesian holstein menggunakan bahan pengencer yang berbeda. *Buletin Peternakan* 29(2):53-61.
- Azzahra, F.Y., E.T. Setiatin, & D. Samsudewa. 2016. evaluasi motilitas dan persentase hidup semen segar sapi PO Kebumen pejantan muda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia* 11(2):99-107.
- [BSNI] Badan Standarisasi Nasional Indonesia. 2005. Semen Beku Sapi. [SNI-014869.1-2005]. Badan Standarisasi Nasional Indonesia. Jakarta.
- [BSNI] Badan Standarisasi Nasional Indonesia. 2017. Semen Beku-Bagian 1: Sapi. [SNI-4869-1]. Badan Standarisasi Nasional Indonesia. Jakarta.
- Carvalho, J.O., R. Sartori, G.M. Machado, G.B. Mourão, & M.A.N. Dode. 2010. *Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometer and their use in vitro embryo production.* *Theriogenology* 74:1521-1530.
- Fatahillah, T. Susilawati, & N. Isnaini. 2016. Pengaruh lama sentrifugasi terhadap kualitas dan proporsi spermatozoa X-Y sapi Limousine hasil *sexing* dengan gradien *densitas* percoll menggunakan pengencer CEP-2+10% KT. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1):86-97.
- Felipe-Pérez. Y.E., M.L Juárez-Mosqueda, E.O. Hernández-González, & J.J Valencia. 2008. *Viability* of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Veterinaria Brasilica* 2(4):123-130.
- Fernanda, M.T., T. Susilawati, & N. Isnaini. 2014. Keberhasilan IB menggunakan semen beku hasil *sexing* dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll (SGDP) pada Sapi Peranakan Ongole (PO). *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 24(3):1-8.
- Garner, D.L. & E.S.E. Hafez. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Edited by Hafez



- E.S.E. and B. Hafez. Lippincot Williams & Wilkins Philadelphia (Pennsylvania).
- Mahfud, A., N. Isnaini, A.P.A. Yekti, Kuswati, & T. Susilawati. 2019. Kualitas spermatozoa post thawing semen beku sperma y hasil sexing pada sapi Limousin. Jurnal Ternak Tropika 20(1): 1-7.
- Noakes, D.E., T.J. Parkinson, & G.C.W. England. 2009. Veterinary reproduction and obstetrics. Edition 9<sup>th</sup>. Elsevier Inc. London.
- Salim, M.A, T. Susilawati, & S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh metode thawing terhadap kualitas semen beku sapi bali, sapi madura dan sapi PO. Agripet 12(2):14-20.
- Sunami, S., N. Isnaini, & S. Wahjuningsih. 2017. Kualitas semen segar dan *recovery rate* (RR) sapi Limousin pada musim yang berbeda. Jurnal Ternak Tropika 18(1):36-50.
- Susilawati, T. 2011. Spermatology. UB Press. Malang.
- Susilawati, T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak. UB Press. Malang.
- Susilawati, T. 2014. *Sexing* Spermatozoa. Hasil Penelitian Laboratorium dan Aplikasi pada Sapi dan Kambing. UB Press. Malang.
- Susilawati, T., E. D. Kusumawati, N. Isnaini, A. P. A. Yekti, H. Sudarwati, & A. Ridhowi. 2017. Effect of sexing process using percoll density gradien centrifugation and frozen on motility and damage to spermatozoa membrane of filial Ongole. Animal in Healt Science Research. 5: 227-231.
- Susilawati, T. & A.P.A. Yekti. 2018. Teknologi Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair (*Liquid Semen*). UB Press. Malang.