



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

PENGARUH LEVEL GLISEROL TERHADAP KUALITAS SEMEN KERBAU

SKRIPSI



ZULFIKAR
05 161 013

JURUSAN PRODUKSI TERNAK
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

Kami dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang di tulis oleh :

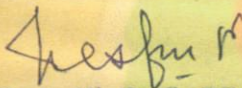
ZULFIKAR

**PENGARUH LEVEL GLISEROL TERHADAP KUALITAS SEMEN
KERBAU**

Diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Peternakan
Pada Program Studi Produksi Ternak

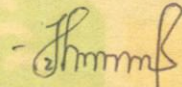
Menyetujui,

Pembimbing I



Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin BP, MS
NIP. 194305101969002001

Pembimbing II



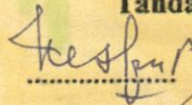
Ir. Hj. Tinda Afriani, MP
NIP. 196204261987032001

Tim Penguji

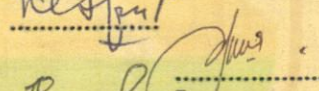
Nama

Tanda Tangan

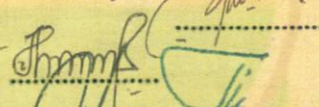
Ketua Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin BP, MS



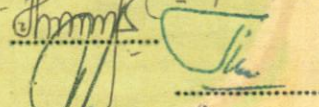
Sekretaris Hilda Susanty, S.Pt, M.Si



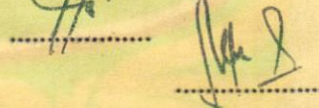
Anggota Ir. Hj. Tinda Afriani, MP



Anggota Prof. Dr. Ir. H. Suardi, MS, MS



Anggota Dr. Ir. H. Hendri, MS



Anggota Dr. Ir. H. Jaswandi, MS



Mengetahui,

**Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Andalas**

**Ketua Jurusan
Produksi Ternak**

**Ketua Program Studi
Produksi Ternak**



Dr. Ir. H. Jafrinur, M.SP
NIP. 196002151986031005

Dr. Rusfidra, S.Pt, MP
NIP. 132231457

Dr. Ir. H. Hendri, MS
NIP. 196207291988101001

Tanggal Lulus : 31 Juli 2012

PENGARUH LEVEL GLISEROL TERHADAP KUALITAS SEMEN KERBAU

ZULFIKAR, dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin BP, MS.** dan
Ir. Hj. Tinda Afriani, MP, Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan,
Universitas Andalas, 2012

ABSTRAK

Kurang tersedianya kerbau pejantan di masyarakat disebabkan peternak kurang mau memelihara pejantan, karena sulitnya pengendalian pejantan. Untuk mengatasi hal ini maka dapat dilakukan penyediaan semen beku dari pejantan unggul, sehingga ketersediaan bibit unggul dapat dipenuhi. Dengan tersedia bibit unggul yang berupa semen beku, maka teknologi reproduksi dalam bentuk Inseminasi Buatan (IB) dapat dikembangkan pada ternak kerbau sebagaimana pada sapi. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK), dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan. Dengan peubah yang diamati Gerakan massa, Motilitas, Persentase hidup, Abnormalitas dan Membran Plasma Utuh semen kerbau. Pada motilitas spermatozoa sesudah thawing pada perlakuan 6% memperlihatkan bahwa penambahan gliserol 6% dalam bahan pengencer sudah optimal untuk menyediakan perlindungan untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama berlangsungnya proses pembekuan. Pada persentase hidup didapat pada penambahan gliserol sebanyak 6 % persentase spermatozoa didapat sebanyak 49.88%. Pada abnormalitas juga didapat paling rendah pada gliserol 7 % dengan jumlah 13.78% dan MPU didapat terbaik gliserol 6 % dengan 44.38 %. Dapat ditarik kesimpulan bahwa penambahan gliserol 6% pada pengencer tris kuning telur lebih efektif mempertahankan motilitas, daya hidup, abnormalitas dan MPU semen Kerbau sesudah thawing. Disarankan agar menggunakan gliserol 6% pada pengencer tris kuning telur pada pembuatan semen beku Kerbau.

Kata kunci: Kerbau, semen, gliserol, Thawing spermatozoa, persentase hidup, motilitas, abnormalitas dan MPU

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT atas Rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul : **“Pengaruh Level Gliserol Terhadap Kualitas Semen Kerbau”**. Kemudian shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW yang telah membawa umat-Nya ke alam yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Penulis mengucapkan terimakasih sebanyak-banyaknya kepada pembimbing I dan Pembimbing Akademik Ibu Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin BP, MS. dan kepada pembimbing II Ibu Ir. Hj. Tinda Afriani, MP yang telah memberikan bimbingan, saran dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini. Seterusnya ucapan terima kasih disampaikan kepada kedua orang tua dan semua pihak yang telah memberikan dorongan, semangat dan doanya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang akan membangun untuk perbaikan skripsi ini, penulis ucapkan banyak terima kasih. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Padang, Juli 2012

Zulfikar

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
E. Hipotesis Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Kerbau	6
B. Semen dan Kualitas Semen	7
C. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Semen	9
D. Pengenceran Semen	10
E. Buffer	12
F. Krioprotektan	13
G. Antibiotik	18
H. Zat Aditif Pengenceran	19
I. Equilibraasi Semen	20
J. Thawing	21

III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

A. Materi Penelitian	24
B. Metoda Penelitian.....	24
C. Prosedur Kerja.....	25
D. Peubah Yang Diamati.....	30
E. Tempat dan Waktu Penelitian	34

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kualitas Semen Segar Kerbau	35
B. Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa.....	39
C. Pengaruh Perlakuan Terhadap Persentase Hidup Spermatozoa	42
D. Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa	44
E. Membran Plasma Utuh (MPU).....	46

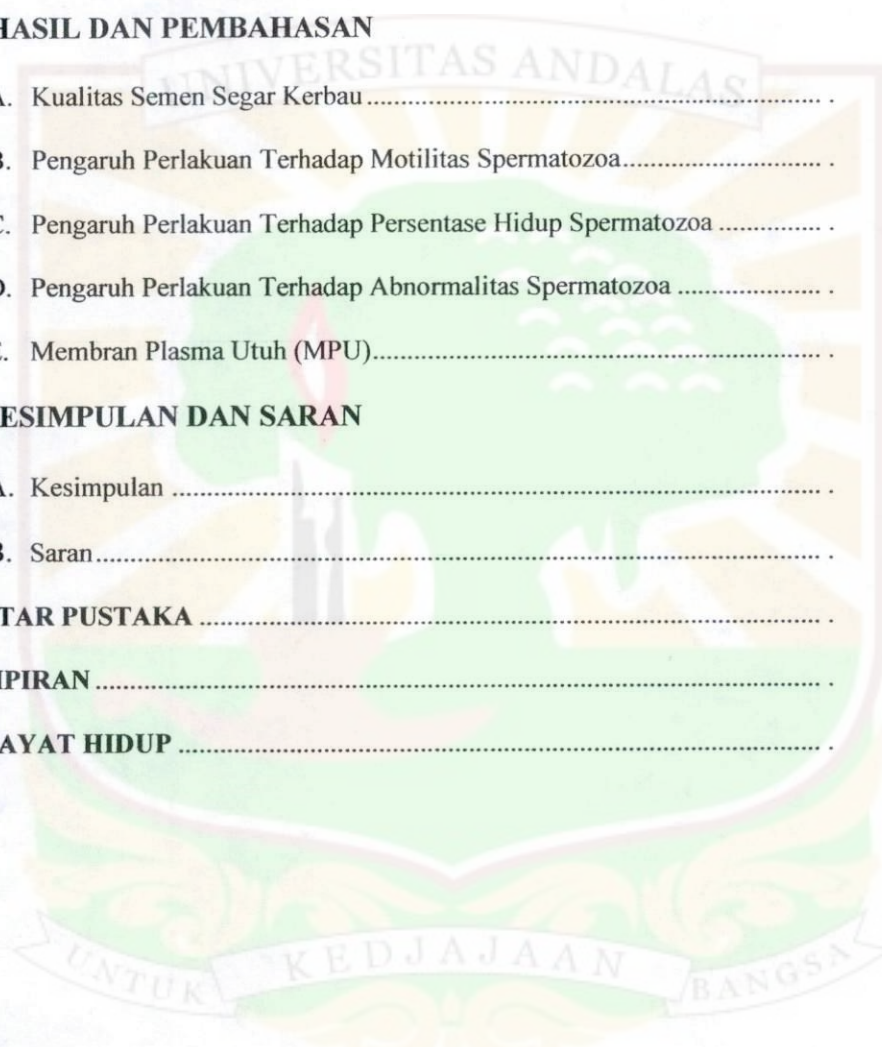
V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	48
B. Saran.....	48

DAFTAR PUSTAKA	49
----------------------	----

LAMPIRAN	57
----------------	----

RIWAYAT HIDUP	72
---------------------	----



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Semen Kerbau Setelah Penampungan.....	8
2. Hasil Evaluasi Semen Kerbau Sebelum Perlakuan.....	35
3. Rataan Motilitas Spermatozoa Dalam Berbagai Kombinasi Dosis Gliserol Pada Pengencer Tris Kuning Telur (%)	39
4. Rataan Persentase Hidup Spermatozoa Dalam Berbagai Kombinasi Dosis Gliserol Pada Pengencer Tris Kuning Telur (%)	42
5. Rataan Abnormalitas Spermatozoa Dalam Berbagai Kombinasi Dosis Gliserol Pada Pengencer Tris Kuning Telur (%)	44
6. Rataan Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Dalam Berbagai Kombinasi Dosis Gliserol Pada Pengencer Tris Kuning Telur (%).....	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Motilitas Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan (%).....	57
2. Persentase Hidup Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan (%).....	61
3. Abnormalitas Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan (%).....	65
4. Membran Plasma Utuh (MPU) Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan (%)	68



I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kerbau adalah salah satu ternak besar penghasil daging yang banyak dikembangkan di Indonesia. Bahkan untuk program swasembada daging tahun 2014 ini, kerbau dimasukkan sebagai salah satu ternak unggulan untuk menghasilkan daging disamping sapi. Ternak kerbau banyak dipelihara di Indonesia karena kerbau mempunyai kelebihan yaitu mampu menghasilkan bobot badan yang lebih tinggi dari pada sapi lokal. Disamping itu juga karena kerbau mampu memanfaatkan pakan dengan kualitas yang jelek. Namun jika dilihat dari perkembangan ternak kerbau dari tahun ke tahun terjadi penurunan populasi kerbau. Selama tujuh belas tahun terakhir ini populasi ternak kerbau mengalami penurunan populasi, yaitu dari 3.291.345 ekor pada tahun 1992 menjadi 2.191.636 ekor pada tahun 2008. Hal ini menunjukkan bahwa populasi ternak kerbau di Indonesia mengalami penurunan setiap tahunnya.

Dari penurunan populasi ternak kerbau, telah teridentifikasi beberapa kendala dalam peningkatan populasi ternak kerbau. Salah satunya yaitu adanya faktor reproduksi. Padahal faktor reproduksi kerbau hampir sama dengan faktor reproduksi sapi, tetapi pada kerbau masalah ini belum bisa teratasi. Faktor reproduksi yang menjadi kendala dalam pengembangbiakan kerbau menyangkut faktor induk dan faktor pejantan. Faktor induk ini dapat berupa birahi diam, lama masa kebuntingan, panjang jarak antar kelahiran dan tingkat kematian yang cukup tinggi pada anak kerbau. Sedangkan faktor dari pejantan yaitu kurang tersedia pejantan unggul yang mampu menghasilkan bibit-bibit unggul.

Kurang tersedianya kerbau pejantan di masyarakat disebabkan peternak kurang mau memelihara pejantan, karena sulitnya pengendalian pejantan. Untuk mengatasi hal ini maka dapat dilakukan penyediaan semen beku dari pejantan unggul, sehingga ketersediaan bibit unggul dapat dipenuhi. Dengan tersedia bibit unggul yang berupa semen beku, maka teknologi reproduksi dalam bentuk Inseminasi Buatan (IB) dapat dikembangkan pada ternak kerbau sebagaimana pada sapi.

Inseminasi buatan pada ternak kerbau merupakan cara untuk meningkatkan kemampuan reproduksi, namun kurang begitu berkembang di masyarakat peternak kerbau. Hal ini juga berkaitan dengan sistem pemeliharaan ternak kerbau yang bersifat ekstensif dalam kelompok-kelompok di lapangan. Adanya kebuntingan ternak kerbau dengan inseminasi buatan menggunakan semen beku pertama kali dilaporkan oleh Bairov pada tahun 1964. Sedangkan keberhasilan pembuatan semen beku pada kerbau pertama kali dilaporkan oleh Roy et al. pada tahun 1956. Di Indonesia inseminasi buatan pada kerbau dilakukan pertama kali oleh Toelihere pada tahun 1975 di Tanah Toraja, Sulawesi Selatan.

Kurang berkembangnya inseminasi buatan pada kerbau salah satunya disebabkan oleh kurang tersedianya semen beku dari pejantan unggul. Penerapan pembuatan semen beku merupakan salah satu alternatif untuk menyelesaikan masalah kelangkaan pejantan unggul ternak kerbau. Dalam pembuatan semen beku, diharapkan semen beku yang dihasilkan mempunyai kualitas yang baik sehingga lebih banyak akseptor yang dapat diinseminasi dan dapat meningkatkan angka kebuntingan kerbau. Kualitas semen beku yang dihasilkan oleh pejantan

juga dipengaruhi oleh kesanggupan untuk mempertahankan kualitas dan memperbanyak volume semen tersebut untuk beberapa saat lebih lama setelah ejakulasi. Kualitas semen beku nantinya akan sangat berpengaruh kepada tingkat konsepsi yang dihasilkan dalam inseminasi buatan.

Usaha untuk mempertahankan kualitas semen dan memperbanyak hasil sebuah ejakulasi dari pejantan unggul adalah dengan melakukan pengenceran semen menggunakan bahan pengencer. Bahan pengencer harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan spermatozoa dapat bergerak secara progresif, tidak bersifat racun bagi spermatozoa, menjadi penyanggah bagi spermatozoa, dan dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*). Kerusakan spermatozoa akan terjadi akibat adanya pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel berakibat kematian spermatozoa. Pada saat pembekuan, semen mengalami penurunan kualitas sekitar 10-40% hingga 50%.

Upaya untuk mengurangi kerusakan spermatozoa karena pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) adalah dengan penambahan gliserol dalam pengencer dan waktu equilibrasi. Gliserol merupakan krioprotektan bagi spermatozoa yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Menurut White dalam Toelihere (1993) gliserol adalah suatu zat yang dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa dan dapat di metaboliser dalam proses-proses yang menghasilkan energi untuk membentuk fructosa. Penambahan gliserol ke dalam pengencer adalah esensial untuk pembekuan. Sedangkan level gliserol yang sesuai dalam bahan pengencer untuk mempertahankan kualitas semen kerbau belum disepakati oleh para peneliti

sehingga berbagai level telah disarankan oleh peneliti seperti 6 % (Sansone *et al.*, 2000), 7 % (Vale, 2010), 8 % (Koenjaenak dan Martinez, 2007).

Selama pembekuan dengan adanya penambahan gliserol dan yang sesuai diharapkan semen beku yang dihasilkan dapat memiliki kualitas yang tinggi untuk di inseminasikan kepada betina. Setelah proses thawing diharapkan juga kualitas dari spermatozoa tetap terjaga. Dengan adanya semen beku yang berkualitas maka masalah ketersediaan bibit dari pejantan unggul dapat diatasi dan dapat mendukung program inseminasi buatan pada ternak kerbau.

Beranjak dari permasalahan diatas maka perlu dilakukan penelitian tentang level gliserol yang tepat dalam pengenceran spermatozoa kerbau untuk menghasilkan kualitas semen beku yang baik.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas dapat diidentifikasi beberapa masalah yang akan diteliti yaitu : Bagaimana pengaruh level gliserol terhadap kualitas semen kerbau sebelum dan sesudah thawing meliputi: motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas spermatozoa dan Membran Plasma Utuh (MPU).

C. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh level gliserol terhadap kualitas semen kerbau sebelum dan sesudah thawing meliputi : motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas spermatozoa dan Membran Plasma Utuh (MPU).

D. Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang ilmu reproduksi pada ternak kerbau.
2. Untuk mengetahui level gliserol yang terbaik untuk menghasilkan spermatozoa yang berkualitas sehingga dapat dipakai dalam pembuatan semen beku dari kerbau. Dengan adanya semen beku dari kerbau yang berkualitas dapat mengatasi permasalahan ketersediaan bibit dan dapat mendukung program inseminasi buatan pada ternak kerbau.

E. Hipotesis Penelitian

Dengan memperhatikan latar belakang di atas, dapat dibangun hipotesis yang akan diuji dalam penelitian ini. Hipotesis tersebut adalah: Kadar gliserol dalam bahan pengencer akan meningkatkan ketahanan spermatozoa dalam proses pembekuan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kerbau

Kerbau termasuk kedalam family *Bovidae* genus *Bubalis*. Menurut Hardjosubroto dan Astuti (1993), populasi kerbau yang ada diseluruh dunia saat ini berasal dari daerah sekitar India yang merupakan hasil domestikasi dari kerbau liar (*Bubalus Arnicee*). Beberapa tipe kerbau liar masih banyak ditemukan antara lain Anoa (*Bubalus depreesicornis*) yang terdapat di Sulawesi, kerbau Mindoro (*Bubalus mindoroensis*) yang terdapat di Filipina, *Bubalus caffer* yang terdapat di Afrika Timur dan Barat Daya dan kerbau Merah di daerah Tsad, Niger, Maroko selatan dan Kongo. Kerbau domestik secara umum dikelompokan menjadi kerbau rawa (*Swamp buffalo*) dan kerbau sungai (*River buffalo*).

Kerbau merupakan ternak ruminansia yang banyak dikembangkan di Indonesia. Kerbau merupakan penghasil daging, susu dan sebagai ternak pekerja. Di zaman dahulu sebelum digunakannya mesin bajak dalam menggarap lahan pertanian, kerbau banyak dipelihara oleh petani untuk dipakai tenaganya dalam menggarap sawah. Kerbau sebagai penghasil daging telah memberikan kontribusi dan diprioritaskan dalam program swasembada daging disamping sapi. Sebagai penghasil susu, kerbau telah dikenal oleh masyarakat, bahkan di Sumatera Barat susu yang dihasilkan dibuat sebagai Dadiah yang merupakan makanan bernilai gizi tinggi dan merupakan ciri khas daerah tersebut (Dwiyanto dan Handiwirawan, 2006).

Kerbau diketahui memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan sapi. Kerbau mempunyai daya adaptasi yang tinggi terhadap daerah tropis dan

mempunyai efisiensi pakan yang baik sehingga bisa hidup dengan ketersediaan pakan yang terbatas. Kerbau juga dapat berkembang biak dalam rentang kawasan yang luas dari daerah yang basah sampai di daerah yang relative kering (Kumar and Singh, 2010).

Populasi kerbau didunia meningkat dari sekitar 135 juta ekor pada tahun 1991 menjadi sekitar 165 juta ekor di tahun 2007, yaitu pada tingkat pertumbuhan tahunan sebesar 3,3% (FAO dalam Soliman and Bassiony, 2009). Hal ini kontras dengan perkembangan populasi kerbau di Indonesia. Selama tujuh belas tahun terakhir ini populasi ternak kerbau mengalami penurunan populasi, yaitu dari 3.291.345 ekor pada tahun 1992 menjadi 2.191.636 ekor pada tahun 2008. (Subianto, 2010). Dengan populasi sebanyak itu, Indonesia mempunyai jumlah populasi 1.213 % dari populasi dunia keseluruhan (Cruz, 2010).

B. Semen dan Kualitas Semen

Semen adalah hasil ejakulasi yang terdiri dari spermatozoa yang dihasilkan oleh testes yang tercampur dalam plasma semen, berupa cairan yang dihasilkan oleh testes dan kelenjar aksesoris lainnya (Toelihere, 1985). Dalam seminal plasma kerbau mengandung kalsium, klorida, fosfor anorganik, kalium, magnesium, sodium, bikarbonat, kolesterol total, asam sitrat, dan Glutamic Oxalo Acetat (Sukhla *et al.*, 2009). Setiap individu kerbau mempunyai karakteristik semen yang berbeda seperti yang ditampilkan dalam Tabel 1.

Kandungan berbagai bahan kimia dalam semen, mempengaruhi kualitas semen yang dihasilkan. Kalsium dan magnesium dalam plasma semen memainkan peranan penting dalam melestarikan motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan

melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh reaksi oksidatif.

Hal ini akan menyebabkan kualitas semen meningkat (Eghbali *et al.*, 2010).

Tabel 1. Karakteristik semen kerbau setelah penampungan.

No	Karakteristik	Vale, 1994	Asadpour <i>et al.</i> , 2007	Koonjaenak <i>et al.</i> , 2007	Eghbali <i>et al.</i> , 2010
1.	Colour	White, milky white, with light blue tinge			
2.	Volume (ml)	3 (2 – 8)	3.7 ± 1.4	3 – 4	3.07 ± 1.17
3.	Konsentrasi spermatozoa ($\times 10^6$ sel/ml)	600 – 1200	1121.0 ± 167.0	800 – 1200	1374.14 ± 61.22
4.	Motilitas (%)	>70	70 ± 8.5	65 – 80	87.02 ± 1.06
5.	Abnormalitas (%)	<70	15.9 ± 4.7	<15	6.53 ± 0.32
6.	pH	6.5 – 7.5	-	6.9 – 7.0	-

Kualitas semen mempengaruhi tingkat keberhasilan inseminasi. Kualitas semen yang baik akan menghasilkan angka konsepsi yang tinggi. Dalam penilaian kualitas semen, penilaian motilitas spermatozoa merupakan hal yang mudah dan murah dilakukan. Kadang-kadang motilitas dijadikan sebagai parameter tunggal untuk menilai kualitas spermatozoa, walaupun sebenarnya tidak layak hanya digunakan satu parameter saja (Morrel and Martinez, 2009). Penilaian motilitas dilakukan melalui estimasi visual terhadap pergerakan sel spermatozoa menggunakan mikroskop (Sansone *et al.*, 2000).

Kriteria penting dalam menilai motilitas spermatozoa adalah "motilitas progresif", yang menjadi dasar untuk penilaian. Jika ada 40% atau lebih pergerakan spermatozoa aktif setelah pembekuan dan thawing, kualitas semen yang dihasilkan bisa digunakan untuk inseminasi. Beberapa sistem evaluasi mencirikan motilitas sebagai: (a) % motilitas progresif (bergerak maju), (b) % motilitas lokal (gerakan berputar), dan (c) % tidak ada gerakan (mungkin semua

mati). Untuk menilai motilitas ini di bawah mikroskop, gambaran umum pertama dinilai dan kemudian jenis motilitas dinilai. Agar spermatozoa dapat diterima, lebih dari 50% harus bergerak dan lebih dari 70% harus menunjukkan motilitas progresif. Motilitas sesudah thawing harus 40% (Vale, 2010).

Disamping penilaian motilitas, abnormalitas spermatozoa juga perlu dilihat. Abnormalitas spermatozoa dideteksi dengan metode pewarnaan dan biasanya digolongkan sebagai kepala, badan dan ekor yang abnormal. Abnormalitas spermatozoa yang paling umum adalah kepala berbentuk buah pir, tetesan sitoplasma proksimal, ekor bengkok, dan ekor melingkar di bawah kepala (Koonjaenak and Martinez, 2007). Dalam semen kerbau Nili-Ravi, kelainan sebagian besar ditemukan pada kepala spermatozoa $5,78 \pm 2,1\%$, sedangkan kelainan badan spermatozoa kurang dari 1% dan abnormalitas ekor bervariasi dari $3,92 \pm 1,0\% - 5,7 \pm 0,4\%$ (Saeed *et al.*, 1990).

C. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kualitas Semen

Kualitas spermatozoa hasil ejakulasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti lama siang hari, musim, umur ternak dan pakan. Lama penyinaran atau panjang siang hari merupakan faktor lingkungan penting yang mempengaruhi reproduksi dan aktivitas seksual dari kerbau. Musim mempunyai pengaruh terhadap libido dan juga kualitas spermatozoa yang dihasilkan (Sansone *et al.*, 2000).

Di daerah beriklim tropis seperti Indonesia, kualitas semen lebih baik selama musim hujan dari pada musim kemarau (Vale, 1994). Sedangkan di daerah temperate semen mutunya lebih baik selama musim dingin dan musim semi dari pada di musim panas dan musim gugur (Mohan and Sahni, 1990; Galli *et al.*,

1993). Penelitian lain menunjukkan bahwa pada musim dingin akan dihasilkan kualitas spermatozoa yang lebih baik dari pada musim panas (Heuer *et al.*, 1987; Sagdeo *et al.*, 1991; Bahga dan Khokar, 1991). Pada musim panas kerbau mempunyai tingkat stres yang lebih tinggi karena kerbau sangat sensitif terhadap stres panas, sehingga kualitas semen akan menurun pada musim panas (Sansone *et al.*, 2000). Sedangkan Shoustari and Babazadeh (2009) menemukan hal yang berbeda setelah melakukan penelitian pengaruh musim terhadap kualitas semen kerbau di Azerbaijan, bahwa kualitas spermatozoa lebih baik dihasilkan pada musim panas dan musim gugur.

Selama musim panas dan musim semi, aktifitas saluran gonad dan saluran kelamin berkurang. Pengaruh terhadap testes dan epididimis oleh faktor musim ini dimulai dari retina dan melibatkan pineal hipotalamus, hipofisis, poros gonad dengan memodulasi fluktuasi hormon yang pada gilirannya mempengaruhi proses spermatogenesis (Arrighi *et al.*, 2010). Manajemen pengelolaan kerbau juga akan mempengaruhi kualitas semen yang dihasilkan, seperti pakan dan kandang (Chinnaiya dan Ganguli, 1990). Faktor lain yang mempengaruhi adalah usia kerbau. Kerbau yang telah dewasa akan menghasilkan kualitas semen yang lebih baik dibandingkan kerbau yang baru mencapai dewasa kelamin (Chinnaiya dan Ganguli, 1990; Saeed *et al.*, 1990). Tiap individu kerbau juga mempunyai kualitas semen yang berbeda (Mohan dan Sahni, 1990; Galli *et al.*, 1993;).

D. Pengenceran Semen

Setelah pengambilan semen dari pejantan dengan menggunakan vagina buatan maka selanjutnya dilakukan pengenceran. Jarak kandang tempat pengumpulan semen terkadang agak jauh, Hal ini membutuhkan waktu tempuh

yang cukup lama. (Fabbrocini *et al.* (1995) mengemukakan bahwa kualitas spermatozoa (motilitas dan morfologi) belum berubah hingga waktu satu jam. Bahkan Vale *et al.* (1991) mengemukakan bahwa spermatozoa sebaiknya dibiarkan selama 10 – 15 menit di dalam plasmanya sebelum diencerkan. Namun sifat semen yang bisa mengalami aglutinasi, maka sebaiknya semen segera diencerkan setelah ejakulasi agar tidak terjadi aglutinasi semen dan motilitas semen tetap terjaga (Sansone *et al.*, 2000).

Spermatozoa kerbau lebih rentan terhadap pembekuan dibandingkan dengan spermatozoa sapi sehingga perlu dilakukan pengenceran dengan menggunakan media pengencer yang sesuai (Galli *et al.*, 1993). Media pengencer yang digunakan harus mampu melindungi spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan thawing (Salamon dan Maxwell, 2000), dan juga akan menentukan kualitas dari semen beku yang dihasilkan (Sansone, *et al.*, 2000). Kerusakan yang terjadi selama proses pembekuan-thawing akan mempengaruhi terutama membran selular (plasma dan mitokondria) dan dalam kasus terburuk, inti (Blesbois, 2007). Kerusakan pada membran ini memiliki konsekuensi terhadap viabilitas dan faktor metabolisme yang berbeda termasuk konsentrasi adenosin trifosfat (ATP) dalam spermatozoa. Oleh karena itu, perubahan dalam integritas spermatozoa mempengaruhi kelangsungan hidup dan kesuburan (Andrabi, 2009).

Pada berbagai ternak, pengenceran telah dilakukan dengan berbagai perbandingan volume pengencer dengan semen. Pengenceran dengan tingkat perbandingan 1: 1 sampai 1: 12 telah berhasil digunakan untuk semen kerbau. Sebaiknya perbandingan volume pengencer dengan volume semen didasarkan

pada konsentrasi spermatozoa (Purdy, 2006). Media pengencer biasanya terdiri dari buffer, krioprotektan dan zat-zat lain yang ditambahkan kedalam pengencer, yang melindungi spermatozoa selama pembekuan dan thawing. Antibiotik biasanya juga ditambahkan kedalam media pengenceran (Sansone, *et.al.*, 2000).

E. Buffer

Penggunaan buffer yang sesuai dalam media pengenceran merupakan salah satu faktor penting terhadap kelangsungan hidup spermatozoa (Rasul *et al.*, 2000). Buffer ideal harus memiliki syarat-syarat berikut: (i) pH antara 6 dan 8, lebih baik dengan pH 7; (ii) kelarutannya air maksimum dan kelarutannya dalam semua pelarut lainnya minimum, (iii) pengaruh terhadap garam minimum; (iv) konsentrasi penyangga minimum; (v) tahan terhadap perubahan suhu; (vi) interaksi kation baik, (vii) kekuatan ion lebih besar dan (viii) sifat kimia yang stabil (Keith dan Morrison 1981).

Beberapa penelitian tentang penggunaan buffer yang lebih cocok untuk semen kerbau telah dilakukan. Matharoo dan Singh (1980) meneliti penggunaan tris (hydroxymethyl aminomethanex) dan asam sitrat sebagai buffer dalam semen beku kerbau. Menurut penelitian menemukan bahwa kerusakan yang ditimbulkan akibat pembekuan berkurang dengan penggunaan Tris yang diuji terhadap motilitas post-thawing. Demikian pula, Chinnaiya dan Ganguli (1980) menemukan motilitas spermatozoa post-thawing yang lebih baik dengan penggunaan Tris dari pada penggunaan asam sitrat. Kemudian Ahmad *et al.* (1986) menemukan bahwa kombinasi Tris-asam sitrat cocok digunakan dalam pembekuan spermatozoa kerbau karena mempunyai motilitas dan daya tahan hidup post-thawing yang baik.

Dhami dan Kodagali (1990) mempelajari pengaruh penggunaan Tris dan asam sitrat. Menurut penelitian melaporkan bahwa penggunaan Tris dapat meningkatkan kualitas spermatozoa kerbau beku yang dinilai berdasarkan enzim ekstraseluler yang dihasilkan dan fertilisasi *in vivo*. Demikian pula, Singh *et al.* (1991) melaporkan bahwa penggunaan Tris dapat memberikan perlindungan terbaik terhadap kerusakan akrosom dibandingkan dengan asam sitrat.

Rasul *et al.* (2000) melakukan penelitian untuk mengidentifikasi buffer yang cocok untuk kriopreservasi semen kerbau. Buffer yang digunakan adalah Tris-natrium sitrat, Tris-asam sitrat, Tris-Tes dan Tris-Hepes. Menurut penelitian menemukan bahwa Tris-sitrat cenderung lebih baik dalam memperbaiki karakteristik gerak spermatozoa kerbau post-thawing. Kemudian Siddique *et al.*, (2006) mengemukakan bahwa kombinasi Tris dan natrium sitrat dihidrat dapat digunakan sebagai buffer untuk pembekuan spermatozoa kerbau. Namun, jika hanya satu buffer yang digunakan, Tris lebih baik dibandingkan dengan natrium sitrat dihidrat.

F. Krioprotektan

Kriopreservasi merupakan metode non-fisiologis yang melibatkan adaptasi tingkat tinggi sel biologis terhadap kejutan osmotik dan termis yang terjadi baik selama pengenceran, pendinginan-pembekuan dan selama prosedur pencairan (Watson *et al.*, 1992;. Holt 2000). Sedangkan krioprotektan adalah bahan atau media yang dipakai untuk proses kriopreservasi. Prinsip-prinsip kriopreservasi adalah sama pada semua spesies, membantu mencegah pembentukan es dan mencegah kerusakan sel selama proses pembekuan-thawing. Krioprotektan yang cocok dapat mempertahankan keadaan spermatozoa dalam pembekuan -196°C

dalam nitrogen cair tanpa mengurangi kemampuan fertilisasi spermatozoa (Chaudhari dan Mshelia, 2010). Ada dua jenis krioprotektan, yaitu:

1. Krioprotektan Permeabel

Salah satu krioprotektan permeabel dan banyak digunakan adalah gliserol. Gliserol mampu berikatan dengan air, mampu melewati membran sel, dan tidak beracun selama paparan sel dalam konsentrasi antara sekitar 1-5 mol/l, tergantung pada jenis sel dan kondisi eksposur (Fuller and Paynter, 2004). Tindakan fisiologis gliserol selama kriopreservasi spermatozoa berlangsung adalah menggantikan air intraselular yang diperlukan untuk pemeliharaan volume sel, interaksi dengan ion dan makromolekul, dan menekan titik beku air dan akibatnya menurunkan konsentrasi elektrolit pada fraksi yang dicairkan sehingga es kurang terbentuk pada temperatur berapapun (Holt 2000; Medeiros *et al.* 2002).

Dalam pembuatan semen beku kerbau, beberapa penelitian telah dilakukan dalam upaya untuk menemukan tingkat optimum penggunaan gliserol sebagai krioprotektan. Dalam konteks ini, Jainudeen dan Das (1982) mempelajari efek dari dua tahap penambahan gliserol (satu langkah dan dua langkah) dan pengaruh tingkat gliserol di pengencer (3%, 5% atau 7%). Menurut penelitian menemukan bahwa tahap penambahan tidak berpengaruh signifikan terhadap sifat-sifat hidup seperti motilitas spermatozoa dan integritas akrosom. Menurut penelitian juga menemukan bahwa motilitas post-thawing spermatozoa secara signifikan lebih baik dalam gliserol 5%, sedangkan persentase acrosomes utuh lebih tinggi pada

spermatozoa yang diberi gliserol 3% atau gliserol 5% dibandingkan pada spermatozoa dengan gliserol 7%.

Dalam studi lain, Kumar *et al.* (1992) menemukan bahwa tingkat terbaik gliserol adalah 6% untuk Pengencer Tris dan susu, dan 9% gliserol untuk pengencer natrium sitrat untuk memperoleh motilitas post-thawing yang lebih baik pada spermatozoa kerbau. Ramakrishnan and Ariff (1994), dan Nastri *et al.* (1994) juga mencoba mengurangi konsentrasi gliserol dari 8% sampai 2% atau 3%, namun menurut penelitian menemukan bahwa penurunan gliserol di bawah 5% menurunkan motilitas dan integritas akrosom spermatozoa post-thawing dalam pengencer yang diuji. Abbas dan Andrabi (2002) meneliti pengaruh berbagai konsentrasi gliserol (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 10% atau 12%) terhadap kualitas spermatozoa post-thawing. Menurut penelitian melaporkan bahwa spermatozoa beku yang ditambahkan gliserol 7% didalamnya nyata lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi lain yang dinilai terhadap motilitas, daya tahan hidup dan integritas membran plasma post-thawing. Mengenai tahap penambahan gliserol, Singh *et al.* (2006) telah mengemukakan bahwa penambahan dengan satu langkah lebih cocok terhadap motilitas spermatozoa kerbau. Namun Chaudhari dan Mshelia (2010) berpendapat bahwa gliserol dalam jumlah yang banyak bersifat sedikit racun bagi spermatozoa jika ditambahkan dalam satu langkah, sehingga jika level gliserol lebih tinggi maka pencampuran dilakukan secara bertahap dengan air mani lebih dari 1 jam.

El-Harary *et al.*, (2011) melakukan penelitian untuk meningkatkan kemampuan gliserol sebagai krioprotektan dalam extender. Dalam penelitian tersebut diuji beberapa bahan yaitu gliserol, dimetil sulfoxide (DMSO) dan kombinasi dari gliserol tambah dimetil sulfoxide. Disimpulkan bahwa kombinasi dari 3.5 % gliserol tambah 3.5 % DMSO serta disuplementasi dengan 0.4 mM glutathione menunjukkan hasil yang terbaik terhadap kualitas spermatozoa post-thawing maupun hasil setelah inseminasi pada sapi Fressian Holstein dibandingkan dengan 7 % gliserol dan 7 % DMSO.

2. Krioprotektan Non-Permeabel.

Krioprotektan non-permeabel yang umum dipakai adalah kuning telur. Kuning telur dipakai untuk sebagian besar spesies ternak, termasuk kerbau (Sansone *et al.*, 2000.). Dipercaya secara luas bahwa low density lipoprotein (LDL) yang terkandung dalam kuning telur memberikan perlindungan spermatozoa selama kriopreservasi. LDL melekat pada membran spermatozoa dan memberikan perlindungan pada spermatozoa dengan menstabilkan membran. Fosfolipid dalam LDL melindungi spermatozoa dengan membentuk lapisan pelindung pada permukaan spermatozoa atau dengan mengganti fosfolipid membran spermatozoa yang hilang atau rusak selama proses kriopreservasi (Quinn *et al.*, 1980;. Graham dan Foote, 1987). Mekanisme perlindungan ketiga menunjukkan bahwa LDL menyerap protein yang merugikan yang hadir dalam plasma semen sehingga meningkatkan kemampuan pembekuan spermatozoa (Bergeron dan Manjunath 2006).

Isi lesitin dan lipoprotein dalam kuning telur memberikan kontribusi pada pelestarian selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Kumar *et al.*, 1992). Namun, di samping tindakan perlindungan terhadap cold-shock, kuning telur juga merangsang sistem enzim spermatozoa. Hal ini menyebabkan deaminasi tertentu asam amino spesifik biasanya hadir dalam kuning telur dan menghasilkan peroksida hidrogen, yang merupakan racun bagi spermatozoa selama penyimpanan dalam kondisi aerobik, karena itu kuning telur akan di dialisis sebelum ditambahkan dalam pengencer (Sahni and Mohan, 1990).

Beberapa penelitian dilakukan mengenai penggunaan level kuning telur yang diperlukan untuk semen beku kerbau, dan umumnya digunakan dengan konsentrasi 20% (Sansone *et al.*, 2000; Andrabi *et al.*, 2008.). Sahni dan Mohan (1990) mempelajari berbagai level kuning telur dalam pengencer sebagai krioprotektan non-permeabel untuk semen kerbau. Konsentrasi kuning telur yang digunakan adalah 0%, 2%, 5%, 10% atau 20%. Menurut penelitian menyimpulkan bahwa konsentrasi kuning telur bisa dikurangi dari 20% menjadi 5% tanpa mempengaruhi motilitas post-thawing spermatozoa. Kumar *et al.* (1994) mempelajari pengaruh berbagai level kuning telur (0%, 1%, 5%, 10% dan 20%) dalam pengencer Tris didasarkan pada motilitas spermatozoa dan daya tahan hidupnya sebelum dan setelah pembekuan pada kerbau. Menurut penelitian menemukan bahwa motilitas dan daya tahan hidup post-thawing terbaik adalah dengan kuning telur 5%. Singh *et al.* (1999) mempelajari pengaruh berbagai tingkat kuning telur pada semen beku kerbau. Menurut penelitian

menemukan bahwa kuning telur sebesar 10% menghasilkan kualitas semen beku kerbau yang lebih baik dalam pengencer Tris dibandingkan pada konsentrasi rendah (5%).

Gula yang tidak mampu berdifusi melintasi membran plasma, seperti laktosa, sukrosa, raffinosa, trehalosa atau dekstran juga ditambahkan sebagai krioprotektan non-permeabel. Dalam hal ini, gula meningkatkan tekanan osmotik, merangsang dehidrasi sel dan juga menghambat pembentukan es ekstraseluler. Gula ini berinteraksi dengan fosfolipid dalam membran plasma, reorganisasi membran yang menghasilkan spermatozoa yang lebih cocok untuk bertahan dalam proses kriopreservasi (Molinia *et al.*, 1994;. Aisen *et al.*, 2002.).

G. Antibiotik

Mikroba dapat berasal dari dalam semen hasil ejakulasi maupun berasal dari bahan pengencer yang ditambahkan kedalam semen. Apalagi saat ini banyak bahan pengencer yang berasal dari hewan (kuning telur) yang dapat menjadi sumber mikroba, sehingga semen dapat mengandung bibit penyakit (Marco-Jimenez *et al.*, 2004; Ruigh de *et al.*, 2006). Kehadiran bakteri dalam ejakulasi dapat memberikan efek langsung terhadap fertilisasi (Morrell 2006), mempengaruhi motilitas (Panangala *et al.*, 1981), mikroba juga dapat memiliki efek tidak langsung dengan memproduksi racun (Morrell 2006). Sehingga melalui penambahan antibiotik dalam pengencer dapat mempengaruhi kelangsungan hidup atau kesuburan spermatozoa sapi (Thibier and Guerin 2000; Morrell 2006).

Penisilin 1000 IU/ml. dan streptomisin sulfat 1.0 mg/ml biasanya ditambahkan ke Pengencer, dalam kombinasi keduanya atau salah satunya (Sansone *et al.*, 2000). Aleem *et al.* (1990) melakukan penelitian terhadap mikroorganisme dalam semen kerbau, dan kepekaan terhadap antibiotik yang biasa digunakan. Menurut penelitian menemukan bahwa kombinasi penisilin dan neomisin lebih efektif daripada kombinasi penisilin dan streptomisin. Streptomisin dan penisilin bukanlah kombinasi yang efektif (Aleem *et al.*, 1990; Hussain *et al.*, 1990; Ali *et al.*, 1994; Amin *et al.*, 1999). Ahmed dan Greesh (2001), menemukan bahwa bakteri yang terisolasi dari semen kerbau tahan terhadap penisilin. SP (Streptomisin dan Penisilin) dapat menurunkan kualitas spermatozoa post-thawing. Menurut penelitian menyimpulkan bahwa gentamicin (500 µg/ml) atau amikacin (500 µg/ml) atau norfloxacin (200 µg/ml) adalah pilihan antibiotik yang bisa ditambahkan dalam pengencer untuk efisiensi kriopreservasi semen kerbau.

H. Zat Aditif Pengenceran

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas spermatozoa seperti menambahkan zat aditif seperti vitamin, asam amino, chelating agen, enzim, stimulan metabolis dan lain-lain. Plasma seminalis dari hewan domestik terutama mengandung vitamin C larut dalam air dan B (Sansone *et al.*, 2000). Kolev (1997) meneliti pengaruh dari vitamin A 100 dan 200 IU/ml, D 200 dan 400 IU/ml. dan E 0,3 dan 0,5 mg/ml yang ditambahkan ke dalam pengencer pembekuan untuk semen kerbau. Motilitas post-thawing terbaik diperoleh setelah penambahan vitamin E sebesar 0,3 mg/ml. Motilitas yang baik juga diperoleh dengan vitamin A 100 IU/ml. Dengan demikian, beberapa vitamin

memiliki dampak positif terhadap kelangsungan hidup spermatozoa kerbau post-thawing. Penambahan Kafein dalam pengenceran semen kerbau dapat merangsang motilitas spermatozoa (El-Menoufy *et al.*, 1985).

Penambahan asam amino kedalam pengencer semen beku telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas semen kerbau. El-Shestawy *et al.*, (2008) melakukan penelitian dengan penambahan beberapa asam amino kedalam media pengencer semen beku. Dia menyarankan bahwa penambahan 25 mM glutamine, glisin dan 5 mM sistein dapat dilakukan dalam medium pembekuan konvensional sehingga dapat meningkatkan motilitas dan integritas akrosom semen kerbau sesudah thawing. Disamping itu, Ansari *et al.*, (2010) mencoba menambahkan glutation kedalam extender, dan mengemukakan hasil penelitian bahwa penambahan glutation hingga 2.0 mM kedalam extender mampu meningkatkan spermatozoa kerbau post-thawing.

Yulnawati *et al.*, (2010) melakukan penambahan Maltosa dalam beberapa bahan pengencer. Didapatkan bahwa dengan penambahan maltose dalam bahan pengencer dapat meningkatkan masa simpan spermatozoa cair pada suhu rendah. Hal ini dikarenakan keberadaan maltosa sebagai tambahan substrat sumber energi dalam bahan pengencer dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan dalam bentuk cair. Disamping sebagai sumber energi, maltose juga berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler.

I. Equilibrasi Semen

Waktu equilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Toelihere,

1993). Equilibrasi secara tradisional dianggap sebagai waktu total selama spermatozoa tetap berhubungan dengan gliserol sebelum pembekuan. Pada tahap ini, gliserol menembus ke dalam sel spermatozoa untuk membentuk konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler yang seimbang. Tidak boleh diabaikan bahwa pada equilibrasi tidak hanya terjadi keseimbangan konsentrasi gliserol, tetapi juga komponen ekstender osmotis aktif lainnya (Salamon dan Maxwell 2000). Oleh karena itu, fenomena ini berinteraksi dengan jenis extender (buffer dan krioprotektan) yang digunakan dan dengan mudah dapat berinteraksi dengan prosedur kryogenik lain (Marshall, 1984). Dalam hal ini, Tuli *et al.* (1981) meneliti equilibrasi semen kerbau diencerkan dengan Tris atau asam sitrat selama 2, 4 atau 6 jam. Menurut penelitian menemukan bahwa daya tahan spermatozoa post-thawing lebih baik setelah 4 jam equilibrasi dari pada setelah 2 atau 6 jam.

Tidak ada kesepakatan di antara para peneliti mengenai durasi equilibrasi. Beberapa peneliti menyarankan durasi pendek waktu equilibrasi (2 – 4 jam) (Singh *et al.*, 1990;. Dhimi and Sahni, 1994), sementara yang lain menganjurkan durasi equilibrasi panjang (sekitar 6 jam) (Rao *et al.*, 1990;. Chinnaiya dan Ganguli, 1990; Dhimi dan Kodagali, 1990; Haranath *et al.*, 1990;. Talevi *et al.*, 1994). Beberapa ahli lainnya dalam penelitiannya menggunakan waktu equilibrasi yang berbeda-beda yaitu: 4 jam (Vale, 2010), 6 jam (Shiddique *et al.*, 2006).

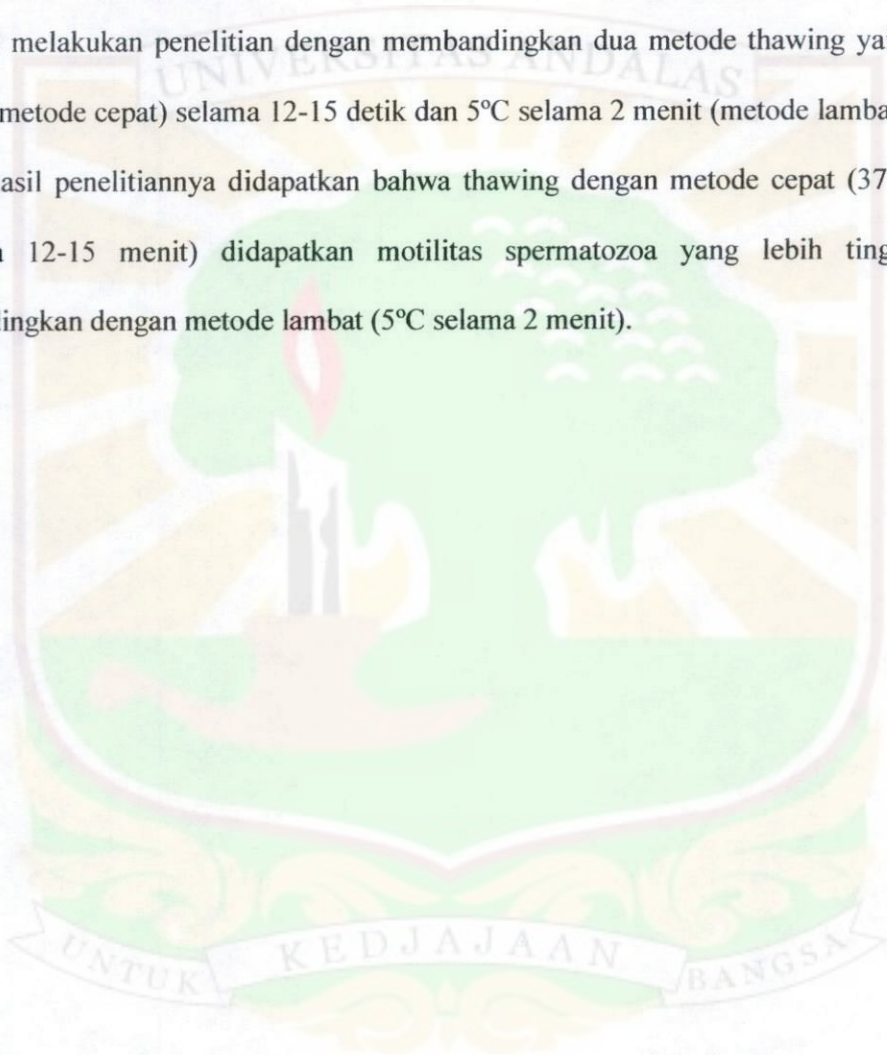
J. Thawing

Thawing sama pentingnya dengan fase pembekuan bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Spermatozoa yang telah bertahan selama pendinginan dalam suhu -196 °C harus dilakukan pencairan kembali (Marshall, 1984). Pengaruh

pencairan tergantung pada apakah tingkat pendingin telah cukup tinggi untuk menginduksi pembekuan intraselular, atau cukup rendah untuk menghasilkan dehidrasi sel. Dalam kasus yang pertama, pencairan cepat diperlukan untuk mencegah rekristalisasi dari setiap es intraseluler dalam spermatozoa. Thawing dengan waktu yang cepat menyebabkan keseimbangan intraselular dan ekstraselular lebih cepat dari pada pencairan lambat (Salamon dan Maxwell 2000). Thawing pada temperatur tinggi untuk waktu yang terlalu lama dapat mengakibatkan fluktuasi pH dan kemudian denaturasi protein dan kematian sel. Thawing praktis untuk spermatozoa ternak sapi, yang direkomendasikan oleh kebanyakan peneliti, adalah menggunakan air kran 35°C selama minimal 30 detik (Marshall 1984). Untuk kriopreservasi spermatozoa kerbau dalam pengencer Tris, Rao *et al.* (1986) menguji dua tingkat pencairan (37°C selama 30 detik dan 75°C selama 9 detik). Menurut penelitian menyimpulkan bahwa nilai terbaik untuk motilitas post-thawing didapatkan pada semen yang dicairkan pada 37°C selama 30 detik. Dhami *et al.* (1992) mempelajari pengaruh tingkat pencairan (40°C selama 60 detik, 60°C selama 15 detik dan 80°C selama 5 detik) terhadap motilitas post-thawing spermatozoa kerbau yang dikriopreservasi dalam pengencer Tris. Menurut penelitian melaporkan bahwa thawing pada suhu 60°C selama 15 detik menghasilkan motilitas spermatozoa lebih tinggi dibandingkan dengan suhu lainnya. Ramakrishnan dan Ariff (1994) mendapatkan penggunaan thawing terbaik pada suhu 35°C selama 30 detik sedangkan Fabbrocini *et al.* (1995) mendapatkan thawing terbaik pada suhu 39°C selama 30 detik).

Dalam studi lain, Dhami *et al.* (1996) menentukan tingkat pencairan untuk semen beku kerbau. Tingkat pencairan yang diteliti adalah 4°C selama 5 menit,

40°C selama 1 menit dan 60°C selama 15 detik. Menurut penelitian menyimpulkan bahwa thawing pada suhu 60°C selama 15 detik menghasilkan spermatozoa dengan pemulihan post-thawing yang baik dan umur panjang. Chaudari dan Mshelia (2010) mengemukakan hasil penelitiannya bahwa thawing pada suhu 37°C selama 10 detik memberikan kesuburan yang lebih tinggi dari pada thawing pada 20°C untuk satu menit atau 5°C selama 2 detik. Hashemi *et al.*, (2007) melakukan penelitian dengan membandingkan dua metode thawing yaitu 37°C (metode cepat) selama 12-15 detik dan 5°C selama 2 menit (metode lambat). Dari hasil penelitiannya didapatkan bahwa thawing dengan metode cepat (37°C selama 12-15 menit) didapatkan motilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lambat (5°C selama 2 menit).



III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

A. Materi Penelitian

Materi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Semen Kerbau yang ditampung dengan Vagina Buatan yang terdapat pada Balai Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato.

Bahan-bahan yang digunakan untuk pengenceran semen seperti: Gliserol, Sitrat, kuning telur, Tris, kertas saring, tissue, straw, aquades, dan lain-lain.

Peralatan yang akan digunakan adalah peralatan untuk penampungan, pengenceran dan pembekuan semen seperti: 1 set vagina buatan, kandang jepit, termometer, kontainer, gelas ukur, cawan petri, pingset, inkubator, mikroskop, gunting, objek glass, cover glass, pipet tetes, gelas ukur, aluminium foil, dan lain-lain.

B. Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dan laboratoris dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK), dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan.

Dimana: Perlakuan 1 = 6 % gliserol

Perlakuan 2 = 7 % gliserol

Perlakuan 3 = 8 % gliserol

Perlakuan 4 = 9 % gliserol

Perlakuan 5 = 10 % gliserol

Model matematis Rancangan Acak Kelompok (RAK) sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + E_{ij}$$

Dimana: Y_{ij} = Hasil pengamatan pada unit percobaan yang mendapat perlakuan ke I dan kelompok ke j

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke i

β_j = Kelompok atau blok ke j

E_{ij} = Hasil pengamatan dari pengaruh sisa yang mendapat perlakuan ke I dan kelompok ke j

C. Prosedur Kerja

Prosedur kerja penelitian dengan langkah sebagai berikut:

1. Penampungan semen dengan vagina buatan

Betina pemancing dimasukkan kedalam kandang jepit, penampung berada disebelah kanan memegang vagina buatan dengan tangan kanan. Pejantan didekatkan kepada betina pemancing dan dilakukan false mount 1-2 kali. Setelah itu pejantan dibiarkan menaiki pemancing, penampung meraih penis dengan tangan kiri dan mengarahkannya ke vagina buatan sehingga ejakulasi terjadi didalam vagina buatan. Putar vagina buatan menurut angka delapan agar seluruh semen turun ke tabung penampung. Lepaskan tabung penampung kemudian diberi tanda kode jantan dan ejakulatnya. Tempatkan semen pada termos tertutup yang hangat (27-37⁰C) dan segera dievaluasi

2. Evaluasi Semen setelah penampungan meliputi :

a. Makroskopis

- Volume semen: Volume semen dapat langsung dilihat, bila pada saat penampungan menggunakan tabung yang memiliki skala.
- Bau: Semen yang sudah ditampung didekatkan ke hidung untuk di amati baunya, umumnya semen yang normal berbau khas.
- Warna: semen kerbau normal memiliki warna krem, krem keputihan atau putih susu.
- pH: Ditentukan dengan kertas pH universal, perubahan warna pH dicocokkan dengan warna standar.
- Konsistensi atau derajat kekentalan dapat langsung di ketahui dengan menggoyangkan tabung penampung semen secara perlahan-lahan. Konsistensi semen biasanya berhubungan dengan warna, misalnya semen warna krem biasanya konsistensinya pekat atau kental, sedangkan yang warna jernih atau terang biasanya konsistensinya encer.

b. Mikroskopis

➤ Gerakan Massa :

Diamati dengan cara meneteskan satu tetes semen diatas objek glass dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 dan cahaya yang dikurangi. Kemudian dilihat gelombang-gelombang yang ditimbulkan oleh gerakan spermatozoa. Kualitas spermatozoa yang baik dapat ditentukan dengan memberi tanda sebagai berikut :

+++ (sangat baik) : terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal, aktif, dan bergerak cepat berpindah-pindah tempat.

++ (baik) : terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban.

+ (lumayan) : tidak terlihat gelombang melainkan gerak individual aktif progresif.

0 (buruk) : bila hanya sedikit gerakan atau bahkan tidak ada gerakan individual

➤ Konsentrasi Spermatozoa :

Metoda yang digunakan untuk menentukan konsentrasi spermatozoa adalah penghitungan dengan haemocytometer. Pipet diisi dengan semen yang belum diencerkan sampai tanda 0,5. Larutan NaCl 3% dihisap sampai tanda 101 pada pipet, larutan tersebut mengencerkan sekaligus membunuh spermatozoa. Campuran ini dikocok hati-hati menurut angka delapan selama dua sampai tiga menit, beberapa tetes dibuang dan dikocok lagi. Beberapa tetes lagi dibuang. Kemudian satu tetes diletakkan dibawah gelas penutup pada kamar hitung sel darah merah. Dihitung dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Setiap kamar mempunyai 16 ruangan kecil dan didalam 5 kamar terdapat 80 ruangan kecil. Seluruh gelas haemacytometer memiliki 400 ruangan kecil dengan volume 0.1 mm^3 dan pengenceran 200 kali. Didalam kamar kecil terdapat x spermatozoa, maka konsentrasi spermatozoa adalah :

$$X \times \frac{400}{80} \times 100 \times 200 = 1000 \times X \text{ mm}^3$$

$$= X \text{ 0.01 juta sperma/mm}^3$$

$$= X \times 10^7 \text{ sperma/ml}$$

➤ **Motilitas Spermatozoa**

Adalah daya gerak yang di jadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk Inseminasi Buatan.

➤ **Persentase Hidup Spermatozoa**

Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan menurut pewarnaan differensial (Toelihere, 1993).

➤ **Abnormalitas Spermatozoa**

Adalah penyimpangan morfologi dari bentuk spermatozoa normal.

➤ **Membran Plasma Utuh (MPU)**

Dihitung spermatozoa yang memiliki membran plasma yang masih utuh.

3. Berdasarkan konsentrasi dan persentase hidup mati spermatozoa maka di encerkan dengan media Tris-kuning telur dengan penambahan Gliserol 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%.

Cara mempersiapkan bahan pengencer Tris kuning telur :

- Telur disterilisasikan
- Kuning dan putih telur dipisahkan dengan kertas saring dan kuning telur jangan sampai pecah
- Kuning telur ditusuk dengan jarum, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur

- Larutan tris dibuat dengan mengencerkan 3,634 gr tris kedalam 100 ml aquades
- Sebanyak 20% larutan tris dikeluarkan, kemudian kekosongan 20% tersebut diisi dengan kuning telur. Sehingga perbandingan antara tris dengan kuning telur adalah 4 : 1
- Bahan pengencer tersebut diaduk sampai menyatu.
- Bahan pengencer dibagi menjadi 5 kelompok dan beri no 1,2, 3,4 dan 5.

4. Gliserolisasi

- Dikeluarkan sebanyak 6%, 7%, 8%, 9% dan 10% dari masing-masing bahan pengencer 1, 2, 3, 4 dan 5 tadi kemudian ditambahkan kekosongan dengan gliserol sebanyak 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% ke dalam masing-masing pengencer tersebut
- Bahan pengencer dicampurkan dengan semen
- Kemudian dievaluasi motilitas, abnormalitas, persentase hidup spermatozoa dan membran plasma utuh (MPU).

5. Filling dan Sealing Straw

Semen dimasukkan kedalam straw dengan menggunakan mesin filling dan sealing yang bekerja secara otomatis.

6. Equilibrasi

Waktu equilibrasi 5 jam. Equilibrasi di lakukan pada suhu 5⁰C.

7. Pembekuan semen

- Straw dibekukan di atas uap Nitrogen cair (2-3 cm) didalam storage container dengan suhu -110⁰C sampai dengan -120⁰C selama 9 menit.

- Setelah itu straw disimpan di dalam container yang berisi nitrogen cair dengan suhu -196°C .

8. Thawing

- Straw di Thawing dengan air kran pada suhu 27°C selama 30 detik.
- Kemudian amati motilitas, abnormalitas dan persentase hidup spermatozoa

D. Peubah Yang Diamati

1. Evaluasi semen setelah penampungan/sebelum diencerkan

a. Secara makroskopis

Peubah yang diamati	Hasil pengamatan
Volume	
Bau	
Warna	
pH	
Konsentrasi	

b. Secara mikroskopis

Peubah yang diamati	Hasil pengamatan
Gerakan massa	
Motilitas	
Persentase hidup	
Abnormalitas	
Membran Plasma Utuh	

2. Evaluasi semen setelah diencerkan

Peubah yang diamati	Gliserol/persentase				
	1	2	3	4	5
Motilitas					
Persentase hidup					
Abnormalitas					
Membran Plasma Utuh					

3. Evaluasi semen setelah thawing

Peubah yang diamati	Gliserol/persentase				
	1	2	3	4	5
Motilitas					
Persentase hidup					
Abnormalitas					
Membran Plasma Utuh					

- **Motilitas spermatozoa meliputi :**

Persentase spermatozoa motil (% SM) dievaluasi secara subjektif kuantitatif yang dilakukan dengan meneteskan sedikit semen di atas gelas objek yang bersih, kemudian ditambahkan 4-5 tetes NaCl fisiologis, dihomogenkan dan diambil satu tetes pada gelas objek yang lain dan ditutup dengan gelas penutup. Jumlah spermatozoa diusahakan setiap lapang pandang hanya 10-20 sel dan dihitung dari 10 lapang pandang yang berbeda. Penilaian dilakukan mulai dari 0% tidak ada SM yang bergerak progresif sampai 100% bergerak progresif seluruhnya dengan kisaran penilaian 5%.

- **Persentase hidup spermatozoa meliputi :**

Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan meneteskan zat warna eosin pada gelas objek yang bersih, kemudian ambil sedikit semen lalu diaduk dengan batang pengaduk. Buat preparat ulas yang tipis dan segera dikeringkan di atas nyala lampu bunsen. Kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Kepala spermatozoa yang telah mati akan menyerap zat warna, sedangkan yang masih hidup akan tetap bening. Hitung sekurang-kurangnya 200 spermatozoa yang hidup dan mati dengan menggunakan rumus :

$$\text{Persentase Hidup} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{jumlah spermatozoa dihitung}} \times 100\%$$

- **Abnormalitas spermatozoa meliputi :**

Pengamatan dilakukan dengan meneteskan zat warna eosin pada ujung sebuah gelas objek kemudian diambil sedikit contoh semen lalu diaduk dengan batang pengaduk supaya bercampur dengan zat warna eosin sampai homogen. Buat preparat ulas yang tipis dan segera keringkan preparat ulas tersebut. Lihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 45. Spermatozoa dihitung secara diagonal dibawah mikroskop. Spermatozoa yang berubah morfologinya akan terlihat seperti ekor menggulung, ekor terputus dan bagian tengahnya terlipat. Toelihere (1993) menyatakan gunakan gelas objek untuk membuat kaca preparat ulas dengan sudut 45° serta hitung sel spermatozoa normal dan abnormal dengan menggunakan rumus :

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

- **Membran Plasma Utuh (MPU)**

Persentase MPU dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 45 menit. Buat preparat ulas tipis pada gelas objek kemudian evaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

$$\% MPU = \frac{\text{jumlah MPII}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

E. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato di Payakumbuh, Sumatera Barat. Dari tanggal 30 Januari 2012 sampai dengan tanggal 24 April 2012.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kualitas Semen Segar Kerbau

Hasil penilaian secara makroskopis dan mikroskopis semen yang ditampung dari seekor kerbau sebagai gambaran kuantitas dan kualitas semen kerbau yang diperoleh pada penelitian ini tertera pada Tabel 2

Tabel 2. Hasil evaluasi semen kerbau sebelum perlakuan

No	Pengamatan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata
		1	2	3	4		
1	Volume (ml)	1.5	1.5	2	2	7	1.75
2	Warna	PS	PS	PS	PS		
3	Bau	Amis	Amis	Amis	Amis		
4	pH	7	7	7	7		
5	Konsistensi	Sedang	Sedang	Pekat	Sedang		
6	Gerakan Massa	++	++	+++	++		
7	Gerakan Individu	Progresif	Progresif	Progresif	Progresif		
8	Konsentrasi (10^7)	1300	1300	1600	1500	5700	1425
9	Motilitas (%)	70	70	75	75	290	72.5
10	Persentase Hidup (%)	78.5	80.5	83.5	82	324.5	81.125
11	Abnormalitas (%)	15.1	14.4	12.3	11.1	52.9	13.225
12	MPU (%)	74.5	77	79.5	80	311	77.75

Keterangan : PS = Putih Air Susu

Semen segar harus segera dievaluasi setelah proses penampungan, hal ini sangat penting dilakukan sebelum melakukan proses lebih lanjut. Kualitas semen segar kerbau dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil evaluasi kualitas semen segar kerbau lumpur menunjukkan bahwa volume yang diperoleh berkisar antara 0.5 sampai 2 ml dengan rata-rata 1.75 ml Hasil ini menunjukkan kisaran yang sama dengan semen segar kerbau Belang di Sulawesi Selatan yang ditampung dengan metoda vagina buatan, seperti yang dilaporkan Batosamma (1985) yaitu; volume berkisar antara 0.3 sampai 3.8 ml dengan rata-rata $1,7 \pm 0,8$ ml.

Dari Tabel 2 di dapatkan persentase progresif motilitas spermatozoa selama penelitian di dapatkan rata – rata 72.50. Motilitas progresif minimal 70%, Toelihere (1985) menyatakan bahwa kebanyakan pejantan yang fertil mempunyai 50-80% spermatozoa yang aktif progresif. Lebih lanjut dikatakan bahwa persentase motilitas spermatozoa kerbau dibawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering berhubungan dengan infertilitas.

Persentase Hidup. Setelah pemeriksaan dari empat kali penampungan diperoleh persentase hidup spermatozoa berturut-turut 78.50%, 80.50%, 83.50%, 82.00%, dengan rata-rata 81.125%. persentase spermatozoa hidup 48 sampai 80%. Pada penelitian semen segar kerbau lumpur yang lahir dan tumbuh sampai dewasa kelamin mempunyai kualitas yang normal dan tingkat kesuburan yang tinggi.

Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh dari empat kali penampungan semen berturut-turut adalah 15.10%, 14.40%, 12.30%, dan 11.10% dengan rata-rata 13.225%. Abnormalitas spermatozoa yang baik berkisar antara 10 sampai 20% Toelihere (1975). melaporkan bahwa abnormalitas kerbau di Tana Toraja, kurang dari 20%. Ax *et al.* (2000), spermatozoa dengan abnormalitas lebih dari 20 % tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan.

MPU. Membran plasma utuh spermatozoa yang diperoleh dari hasil evaluasi semen berturut-turut adalah (%) :74.50 , 77.00 , 79.50 dan 80.00 dengan rata-rata 77.75%. Amin (1989) menyatakan bahwa membran plasma yang utuh (baik) mutlak harus dimiliki oleh spermatozoa agar kelangsungan hidupnya tetap terjamin. Hasil evaluasi terhadap integritas spermatozoa pada semen segar persentase MPU 77,757%. MPU yang diperoleh lebih rendah dari persentase MPU pada kerbau Murrah, yaitu 80,38% dan pada sapi yakni 74,05% (Sharma *et al.*, 1992).

Warna. Warna semen yang diperoleh selama penelitian dari empat kali penampungan pada kerbau adalah putih, dan putih susu yang menunjukkan semen normal dan sehat. Sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) bahwa semen normal bewarna seperti susu atau kuning keputihan dan keruh. Derajat kekeruhannya tergantung kepada konsentrasi spermatozoa. Semakin keruh biasanya jumlah spermatozoa per ml semen ini semakin banyak (Partodihardjo, 1992). Warna ini disebabkan oleh pigmen riblovlavin yang dibawa oleh gen autosom resesif dan tidak mempunyai pengaruh terhadap fertilitas. Selanjutnya bahwa warna semen sebagian juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti adanya sel-sel nanah, darah, pengaruh pigmen ribovlafin, kuman dan kontaminasi dengan feses.

Bau. Bau semen yang diperoleh selama penelitian dari empat kali penampungan adalah normal, berbau khas.

pH. Dari enam kali penampungan diperoleh pH semen 7. Menurut Toelihere (1985) bahwa pada sapi, kerbau dan domba, pH semen adalah netral sekitar 6.2-7.5. pH, semen yang mencapai 7.0 atau lebih ditemukan pada sapi yang terlalu sering dipakai, pada ejakulasi yang tidak sempurna, pada kondisi-kondisi patologik, pendarahan pada testes, epididymis, ampula atau kelenjar-kelenjar vesikularis.

Konsistensi. Konsistensi semen yang diperoleh selama penelitian ini adalah tiga kali penampungan semen mempunyai konsistensi sedang dan satu kali penampungan semen mempunyai konsistensi pekat. Hasil yang didapatkan tergolong baik, sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) bahwa semen sapi dan domba mempunyai konsistensi kental berwarna krem. Pada sapi semen dengan konsistensi krem mempunyai konsentrasi 1.000 juta sampai 2.000 juta atau lebih sel per ml. Menurut Salisbury dan VanDemark (1985), kekentalan dan sifat-sifat air mani tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Kekentalan air mani akan naik selaras dengan konsentrasi spermatozoa.

Gerakan massa. Berdasarkan hasil pengamatan dari empat kali penampungan semen diperoleh satu kelompok semen mempunyai gerakan massa sangat baik (+++), tiga kelompok semen mempunyai gerakan massa yang baik (++) dan tidak ada kelompok semen mempunyai gerakan massa yang lumayan (+). Semen yang memenuhi syarat meliputi: gerakan massa ++ atau +++, (Rizal *et al.*, 1999).

Menurut Toelihere (1981), spermatozoa dalam satu kelompok mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersama-sama kesatu arah merupakan gelombang-gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat tergantung dari konsentrasi spermatozoa yang hidup di dalamnya. Selanjutnya Partodihardjo (1992)

bahwa syarat minimal untuk pengolahan semen adalah semen yang mempunyai gerakan massa yang baik (++).

Gerakan individual. Dari hasil pemeriksaan sebanyak empat kali penampungan semen diperoleh gerakan individu spermatozoa yang progresif, bergerak maju dan cepat. Menurut Toelihere (1985) gerakan individu spermatozoa yang terbaik adalah pergerakan progresif atau gerakan aktif maju kedepan. Gerakan progresif spermatozoa secara normal disebabkan oleh rotasi kepala spermatozoa sepanjang sumbu longitudinal (Salisbury dan VanDemark,1985).

Antibiotika ditambahkan dalam pengencer semen dimaksudkan untuk menghindari kuman-kuman mengontaminasi spermatozoa dan mengontrol mikroorganisme yang ada dalam semen yang disimpan pada suhu tinggi. Toelihere (1985) menyatakan bahwa antibiotika efektif menghambat pertumbuhan kuman di dalam semen yang diencerkan.

B. Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Rata-rata motilitas semen kerbau setelah diencerkan dengan pengencer sitrat kuning telur dengan ditambahkan berapa level gliserol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Motilitas Spermatozoa dalam berbagai kombinasi dosis gliserol pada pengencer tris kuning telur (%)

Tahapan pengamatan	Perlakuan Gliserol				
	A1 (6%)	A2 (7%)	A3 (8%)	A4 (9%)	A5 (10%)
Sesudah pengenceran	65.00±4.08 ^a	66.25±4.79 ^a	65.00±4.08 ^a	63.75±2.50 ^a	63.75±2.50 ^a
Sesudah thawing	42.50±5.00 ^{Aa}	41.25±7.50 ^{Aab}	37.50±2.89 ^{Bc}	36.25±4.79 ^{cd}	32.50±2.89 ^{Bd}

Keterangan :Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05), superskrip dengan huruf besar yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.01)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer tris belum mempengaruhi motilitas spermatozoa sesudah pengenceran. Hal ini terlihat dari hasil analisa statistik yang menunjukkan bahwa penambahan gliserol tidak berpengaruh nyata ($P > 0.05$) terhadap motilitas spermatozoa sesudah pengenceran. Tetapi pada sesudah thawing, penambahan gliserol telah mampu memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap motilitas spermatozoa.

Berdasarkan uji *Duncan's* sesudah thawing perlakuan A1 berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) dengan perlakuan A5 tetapi dengan perlakuan A3 dan A4 memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$), pada perlakuan A1 tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan perlakuan A2. Perlakuan A2 tidak berbeda nyata dengan perlakuan A3.

Lebih tingginya persentase motilitas spermatozoa sesudah thawing pada perlakuan 6% memperlihatkan bahwa penambahan gliserol 6% dalam bahan pengencer sudah optimal untuk menyediakan perlindungan untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama berlangsungnya proses pembekuan. Pengaruh perlindungannya yaitu mencegah terbentuknya kristal-kristal es selama proses pembekuan, sehingga kerusakan organel-organel sel spermatozoa dapat dihindarkan. Bila organel-organel sel spermatozoa, seperti mitokondria maka rantai oksidasi akan terputus sehingga proses metabolisme tidak dapat berlangsung dan akhirnya mati.

Terjadinya perbedaan motilitas spermatozoa disebabkan oleh perbedaan kekentalan pada masing-masing pengencer. Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa bila konsentrasinya didalam pengencer optimal, dan

bila tidak optimal akan menimbulkan gangguan pada spermatozoa berupa penurunan kualitas spermatozoa.

Kadar gliserol yang terlalu tinggi atau rendah tidak akan efektif menjalankan fungsi protektifnya. Menurut Rizal *et al.*, (2002) konsentrasi gliserol yang berlebihan akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa, sebaliknya apabila kurang, gliserol tidak akan memberikan efek yang optimal. Rendahnya persentase motilitas sesudah thawing pada penambahan gliserol 10% kemungkinan disebabkan oleh efek toksik dari gliserol. Semakin tinggi dosis gliserol yang ditambahkan ke dalam pengencer, efek toksik dari gliserol juga semakin besar. Efek toksisitas dari gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat metabolisme energi (McLaughlin *et al.*, 1992). Akibat terganggunya mekanisme spermatozoa, menyebabkan spermatozoa akan mengalami kekurangan energi sehingga viabilitas dan motilitasnya menurun.

Hasil penelitian lain yang diperoleh (Shinha *et al.* 1992), penambahan gliserol 6% dalam pengencer memberikan persentase motilitas yang lebih tinggi (58,10%), sesudah thawing dibandingkan dengan penambahan gliserol sebesar 5% (57.93%) dan 7% (57.93%).

Gliserol berfungsi sebagai agen pelindung (*Protective Agent*). Penambahan gliserol pada pengencer sebagai bahan pengencer dapat menghalangi retaknya sel pada saat sel-sel spermatozoa tersebut diinginkan. Penambahan gliserol dalam pengencer dapat melindungi spermatozoa terhadap efek-efek mematikan selama pengenceran. Selain itu, gliserol juga dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa

dan dapat dimetabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktosa. Glukosa atau fruktosa sebagai sumber energi dan faktor-faktor non penetrasi yang menembus dan melindungi spermatozoa dari kebekuan yang akan mencair dan kerusakan, seperti kuning telur dan gliserol. Hal ini diterima bahwa kuning telur meminimalkan kerusakan sengatan dingin, tapi mekanisme tindakan adalah diperdebatkan. Langsung asosiasi antara lipid dari kuning telur dan membran spermatozoa telah dilaporkan Maxwell dan Watson (1996)

C. Pengaruh Perlakuan Terhadap Persentase Hidup Spermatozoa

Rata-rata persentase hidup semen kerbau setelah diencerkan dengan pengencer sitrat kuning telur dengan ditambahkan berapa level gliserol dapat dilihat pada Tabel 4 .

Tabel 4. Rataan Persentase Hidup Spermatozoa dalam berbagai kombinasi dosis gliserol pada pengencer tris kuning telur (%)

Tahapan pengamatan	Perlakuan Gliserol				
	A1 (6%)	A2 (7%)	A3 (8%)	A4 (9%)	A5 (10%)
Sesudah pengenceran	73.88±2.32 ^a	74.25±2.72 ^a	73.75±3.30 ^a	73.50±1.83 ^a	72.13±2.21 ^a
Sesudah thawing	49.88±5.62 ^{Aa}	48.63±7.43 ^{Aa}	46.00±2.38 ^{ab}	44.00±3.94 ^{bc}	41.38±3.61 ^{Bc}

Keterangan :Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$), superskrip dengan huruf besar yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P<0.01$)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer tris belum mempengaruhi daya hidup spermatozoa sesudah pengenceran. Hal ini terlihat dari hasil analisa statistik yang menunjukkan bahwa penambahan gliserol tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap persentase hidup spermatozoa

sesudah pengenceran. Tetapi pada sesudah thawing, penambahan gliserol telah mampu memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap daya hidup spermatozoa.

Menurut uji *duncan's* pada sesudah thawing perlakuan A1 tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dengan perlakuan A2 dan A3 tetapi berbeda sangat nyata ($P < 0.01$) A5. Pada perlakuan A3 menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0.5$) dengan perlakuan A4 tetapi berbeda nyata dengan perlakuan A5 ($P < 0.05$).

Tingginya persentase hidup spermatozoa kerbau sesudah thawing pada perlakuan A1 dan A2 ini dipengaruhi oleh adanya gliserol dalam pengencer maka efek dari kejutan dingin tersebut dapat meminimalisir kematian spermatozoa. Peranan tris dalam pengencer juga berfungsi untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa serta sebagai *buffer* (penyangga) dari perubahan pH bahan pengencer.

Menurut (Tambing, *et. al.*, 2000), efek perlindungannya adalah menjaga keseimbangan elektrolit intra dan extra seluler sehingga proses biokimia yang terjadi di dalam sel spermatozoa tetap berlangsung dan mengurangi kematian sel spermatozoa yang berlebihan. Salah satu pengaruh yang merugikan adalah cekaman dingin (*cold shock*) dimana efeknya adalah kematian spermatozoa yang terjadi setelah spermatozoa dithawing, akibat tingginya daya kontraksi selubung lipoprotein dinding sel.

Persentase hidup spermatozoa, gliserol berperan mempertahankan spermatozoa dari kematian yang disebabkan rusaknya organel-organel yang berperan dalam metabolisme energi sel, sehingga menyebabkan sel bisa mendapatkan pasokan energi dengan baik. Jika energi tidak bisa dimetabolisme maka akan menyebabkan

kematian spermatozoa. Persentase hidup terbaik didapatkan pada penambahan gliserol 6 %. Hal yang sama juga didapat oleh Kumar *et al.* (1992) yang mendapatkan level gliserol 6% merupakan tingkat pemakaian gliserol terbaik dalam pengencer Tris. Tetapi pendapat Crabo, *et. al.*, (1980) yang mendapatkan level gliserol 7% lebih baik dari pada penggunaan level 9%.

D. Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Rata-rata abnormalitas semen kerbau setelah diencerkan dengan pengencer sitrat kuning telur dengan ditambahkan berapa level gliserol dapat dilihat pada Tabel 5

Tabel 5. Rataan Abnormalitas Spermatozoa dalam berbagai kombinasi dosis gliserol pada pengencer tris kuning telur (%)

Tahapan pengamatan	Perlakuan Gliserol				
	A1 (6%)	A2 (7%)	A3 (8%)	A4 (9%)	A5 (10%)
Sesudah pengenceran	13.65±1.79 ^a	13.43±1.84 ^a	14.00±1.90 ^a	14.10±1.58 ^a	13.83±1.52 ^a
Sesudah thawing	14.18±2.03 ^a	13.78±1.93 ^a	14.28±1.88 ^a	14.53±1.83 ^a	14.35±1.68 ^a

Keterangan : angka yang dikuti oleh huruf superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata (P>0.05)

Dari hasil penelitian terlihat bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer tris kuning telur tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa sesudah pengenceran dan sesudah thawing. Hal ini didukung dari hasil analisa statistik yang menunjukkan bahwa penambahan gliserol tidak berpengaruh nyata (P>0.05) terhadap abnormalitas spermatozoa kerbau.

Pada penelitian ini didapat abnormalitas spermatozoa kerbau sesudah thawing 13.78±1.93 sampai 14.53±1.83 Hasil penelitian ini masih dalam batas normal

abnormalitas spermatozoa untuk IB. Ini sesuai dengan yang di anjurkan Toelihere (1993) dan Hafez (2000) bahwa selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dan tidak melebihinya maka spermatozoa masih dalam keadaan baik dan dapat dipakai untuk program IB. Menurut Bearden dan Fuquay (1997), semen biasanya mengandung 5% spermatozoa yang abnormal, fertilitas tidak akan terganggu sampai tingkat abnormal 20-25%.

Tidak terjadinya perbedaan yang sesudah thawing terhadap abnormalitas spermatozoa kerbau ini dipengaruhi dari spermatozoa pada penelitian ini kebanyakan abnormalitas sekunder seperti ekor bergulung, leher patah, kepala dan leher putus. Abnormalitas sekunder disebabkan perlakuan ketika pembuatan preparat ulas (Solihati *et al.*, 2008). Selain itu, juga ditemui bentuk dari abnormalitas primer seperti kepala terlampau kecil (*microcephalic*), dan ekor berganda.

Selain itu abnormalitas oleh pengaruh pendinginan disebabkan oleh karena terjadinya ketidakseimbangan konsentrasi air intraseluler dan ekstraseluler sehingga mengakibatkan membran plasma sel spermatozoa akan menggelembung bahkan pecah. Pengelembungan membran sel akan menyebabkan kepala spermatozoa lebih besar dari ukuran normal. Salisbury dan VanDemark (1985) menambahkan bahwa spermatozoa yang mengalami *could shock* kadang-kadang ekor dan bagian tubuhnya melingkari bagian kepala, hal ini menyebabkan abnormalitas. Setiap spermatozoa abnormal tidak akan mampu membuahi ovum, tanpa memandang apakah abnormalitas primer atau sekunder (Toelihere, 1985).

E. Membran Plasma Utuh (MPU)

Rata-rata membran plasma utuh (MPU) semen kerbau setelah diencerkan dengan pengencer sitrat kuning telur dengan ditambahkan berapa level gliserol dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Rataan Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa dalam berbagai kombinasi dosis gliserol pada pengencer tris kuning telur (%)

Tahapan pengamatan	Perlakuan Gliserol				
	A1 (6%)	A2 (7%)	A3 (8%)	A4 (9%)	A5 (10%)
Sesudah pengenceran	71.00±4.36 ^a	72.25±3.38 ^a	72.00±3.85 ^a	69.88±1.97 ^a	69.38±3.75 ^a
Sesudah thawing	44.38±4.96 ^{Aa}	43.75±6.18 ^{Aa}	42.63±1.75 ^a	41.75±2.40 ^a	37.75±3.30 ^{Bb}

Keterangan :Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$), superskrip dengan huruf besar yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P<0.01$)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer tris belum mempengaruhi membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sesudah pengenceran. Hal ini terlihat dari hasil analisa statistik yang menunjukkan bahwa penambahan gliserol tidak berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sesudah pengenceran. Tetapi pada sesudah thawing, penambahan gliserol telah mampu memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P<0.01$) terhadap membran plasma utuh (MPU) spermatozoa.

Pada uji *Duncan's* perlakuan A1 tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan perlakuan A2, A3 dan A4 tetapi menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P<0.01$) dengan perlakuan A5. Pada perlakuan A5 menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$) dengan perlakuan A2 dan A3.

Jadi penambahan gliserol 6% pada pengencer tris kuning telur merupakan dosis yang optimal dalam melindungi membran plasma supaya tidak rapuh sehingga kerusakan karena retak dapat diatasi. Menurut Toelihere (1993) gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif tergantung pada konsentrasi dan lamanya kontak antara spermatozoa dengan gliserol. Tingkat konsentrasi gliserol yang tidak optimal akan menyebabkan terjadinya cekaman osmotik dan menimbulkan efek negatif terhadap antibiotik yang ada dalam pengencer.

Gliserol selama proses pembekuan akan menjaga keutuhan membran plasma spermatozoa dengan jalan mengikat gugus pusat phospholipid sehingga mengatasi ketidakstabilan membran. Disamping itu, gliserol juga akan menjaga keseimbangan konsentrasi larutan intaseluler dan ekstraseluler, jika konsentrasi ini tidak seimbang akan menyebabkan rusaknya membran plasma bahkan dapat membuat sel spermatozoa pecah.

Pada gliserol 6%, kemampuan gliserol optimal dalam memberikan perlindungan membran plasma, sedangkan pada gliserol 7% belum tercapai kemampuan optimal dari gliserol untuk melindungi membran plasma. Sebaliknya pada gliserol 8%, 9% dan 10%, telah terjadi efek toksisitas dari gliserol yaitu dapat memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi menghambat metabolisme energi (McLaughlin *et. al.*, 1992)

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa penambahan gliserol 6% pada pengencer tris kuning telur lebih baik untuk pembuatan semen beku Kerbau, dimana didapatkan rata-rata motilitas, persentase hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh (MPU) terbaik sesudah thawing yaitu $42.50 \pm 5.00\%$, $49.88 \pm 5.62\%$, $14.18 \pm 2.03\%$ dan $44.38 \pm 4.96\%$.

B. Saran

1. Berdasarkan hasil yang didapatkan dari penelitian ini disarankan agar menggunakan gliserol 6% pada pengencer tris kuning telur pada pembuatan semen beku Kerbau.
2. Kepada pemerintah atau instansi terkait diharapkan dapat mengadakan penyediaan semen beku kerbau.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A. and S.M.H Andrabi. 2002. Effect of different glycerol concentrations on motility before and after freezing, recovery rate, longevity and plasma membrane integrity of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. Pak. Vet J. 22:1-4.
- Ahmad, A. and Khan. 1986. Cryopreservation of buffalo spermatozoa in Tris .Pakistan Vet. Journal: vol 6(1) p. 1-3
- Ahmed K, M. Greesh. 2001. Effect of antibiotics on the bacterial load and quality of semen of Murrah buffalo bulls during preservation. Indian J Anim Reprod 22, 79-80.
- Aisen, E.G, V.H. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology 57, 1801-1808.
- Aleem M, R.A. Chaudhry, N.U. Khan, A.R. Rizvi and Ahmed. 1990. Occurrence of pathogenic bacteria in buffalo semen. Buffalo J 6, 93-98.
- Ali H, A.Din, H.A. Samad, S. Ali, M.A. Sabri. 1994. Comparative effects of combiotic, ampicillin and gentamycin sulphate on motility percentage, liveability and absolute index of liveability in the buffalo bull semen. Pak Vet J 14, 223-227.
- Amin, A.H., J.L., Bailey, B.T., Storey, L., Blasco, S., Heyner. 1996. A comparison of the three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. Hum. Reprod. 11, 741-745.
- Andrabi S.M.H., M.S., Ansari, N., Ullah, M., Anwar, A., Mehmood and S., Akhter. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 104:427-433.
- Andrabi, S.M.H. 2009. Factors Affecting the quality of cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. Reprod. Dom. Anim. 44:552-569.
- Arrighi S., G. Bosi, D. Groppetti and F. Cremonesi. 2010. Morphometric and Histometric Evaluations on the Testis and Epididymis in Buffalo Bulls During the Different Reproductive Seasons. The Open Anatomy Journal. 2:29-33.

- Ax, R.L., M.A. Dally, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez and M.E. Bellin, 2000. Semen Evaluation. In: Reproduction in Farm Animals, Hafez, B. and E.S.E. Hafez (Eds.). 7th Edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp: 365-375.
- Bahga C.S. and B.S. Khokar. 1991. Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-a-vis freezability of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). Int. J. Biometeorol. 35:222-224.
- Batosamma, J.T. 1985. Penerapan teknologi inseminasi buatan untuk pelestarian sumber daya ternak kerbau Belang. Disertasi. Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Bergeron A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Mol. Reprod. Dev. 73:1338-1344.
- Beardenh, J. and J. W. Fuquay. 1997. The male reproduction system. In: Applied Animal Reproduction 4th Edition. Prentice Hall, New Jersey. pp.19-32.
- Blesbois, E. and J.P. Brillard. 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. Animal, 1, 10, 1472-1481.
- Chaudhari S.U.R. and G.D. Mshelia. 2002. An Overview of Cryopreservation of Cattle and Buffalo Bull Semen. International Journal Of Agriculture & Biology. 4(4):572-575.
- Chinnaiya, G.P. and N.C. Ganguli, 1980. Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. Zbl Vet Med A 27, 339-342.
- Crabo B.G, R.S, Jeyendran, H. H., Van Der Ven, M. Peres-Palaez and L.J.D. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to order semen characteristics. J Reprod. Fertil. 70: 219 - 228.
- Cruz, L.C. 2010. Recent Developments in the Buffalo Industry of Asia. Proc. 9th World Buffalo Congr., Argentine, Buenos Aires. 7-19.
- Dhami, A.J. and S.B. Kodagali. 1990. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology. 34(5):853-863.
- Dhami A.J., K.L. Sahni and G. Mohan. 1992. Effect of various cooling rates (from 30 deg to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. Theriogenology. 38:565-574.

- Dhami, A.J. and K.L. Sahni. 1994. Effects of various cooling _from 30⁰C to 5⁰C., equilibration and diluents treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. *Buffalo J.* 2:147–159.
- Dhami A.J, K.L, Sahni, G. Mohan and V.R. Jani. 1996. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology.* 46:109–120.
- Dwiyanto K. and Handiwirawan, 2006. Strategi pengembangan ternak kerbau: Penjaringan dan distribusi. prosiding lokakarya nasional usaha ternak kerbau mendukung program kecukupan daging sapi 2006. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Bogor.
- Eghbali M., S.M.A. Shoushtari, S.A. Rezaei, M.H.K. Ansari. 2010. Calcium, Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. *Veterinary Research Forum.* 1(1):12-20.
- El-Menoufy A.A., M.S.S Abdou, M.M El-Guindi and K. Zaki 1977. Some biochemical and metabolic aspects of the semen of bovine (*Bubalus bubalis* and *Bos taurus*).I. Seminal fructose in consecutive ejaculates and its relation to libido and semen quality. *Z.Tierzuchtg. Zuchtgsbiol,* 94 : 8.
- El-Sheshtawy, G.A. El-Sisy and W.S. El-Nattat. 2008. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinaria* 2 (4): 146-150, 2008 ISSN 1992-6197.
- Fabbrocini, A., S. Ieropoli, A. L. Langellotti, M. Occidente, and D. Matassino. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44, 229– 239.
- Fuller, B. and S. Paynter . 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 9, 680–691.
- Galli, A., Bornaghi, V. Balduzzi, D., Buttazzoni, L. and R. Aleandri, 1993. Sexual behaviour and semen quality relating to Italian buffalo. *Proceedings, 3rd World Buffalo Congress Varna, Bulgaria,* 01: 562-570.
- Graham J.K. and R.H. Foote. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology.* 24:42–52.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. *Reproduction in farm animals.* 7th Ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins.

- Haranath G.B, T.B. Suryaprakasam, A.V.N. Rao, and G. Somasekharam. 1990: Freezability of semen and fertility of frozen semen packaged in mini and medium French straws: a note. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar AT (eds) Proceedings of 2nd World Buffalo Cong, New Delhi, India. International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 87–88.
- Harjosubroto W. dan J.M. Astuti. 1993. Buku Pintar Peternakan. Jakarta: PT. Gramedia Widiasarana Indonesia.
- Hashemi A., P. Farhoomand, P. Rasul., N. Mehdi dan R. Razzaghzades. 2007. Effect extender and thawing methods on Post-Thawing Preservation. *Journal Ani. and vet. Adv.* 6 (11):1337-1339.
- Heuer C, M.N. Tahir and H. Amjad. 1987. Effect of season on fertility of frozen buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.* 13:15–21.
- Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3–22.
- Hussain S.S, N. Ahmad, A. Din, N.A. Chaudhry. 1990. Effect of different antibiotics on motility and liveability of spermato-zoa and viable bacterial count in buffalo semen. *Pak Vet J*10, 171–174.
- Jainudeen M.R. and S. Das. 1982. Effect of level of glycerol, rates of freezing and thawing on the survival of buffalo spermatozoa in straws. In: Jainudeen MR, Omar AR (eds), Proceedings of Asian-Australian Anim Sci Cong, Serdang, Malaysia. 409–411.
- Jimenez, F, S. Puchades, E. Moce, J.S. Vicente and M. Rodriguez. 2004. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reprod Domest Anim* 39, 438–441.
- Keith, J.E. and J.F Morrison. 1981. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol* 87, 405–426.
- Kolev, S.I. 1997. Effect of vitamins A, D, E on the motility and acrosomal integrity of cryopreserved buffalo bulls' spermatozoa. In: Borghese A, Failla S, Barile VL (eds), Proceedings of 5th World Buffalo Cong., Caserta, Italy. International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 833–835.
- Koonjaenak, S. and H.R. Martinez. 2007. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:701-704.
- Kumar, S, K.L. Sahni and G. Mohan. 1992. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, Tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 8:151–156.

- Kumar, R. and R. Singh. 2010. Buffalo Production System in India. Proc. 9th World Buffalo Congr., Argentine, Buenos Aires. 32-37.
- Marshall, C.E. 1984. Considerations for cryopreservation of semen. Zoo Biol. 3:343-356.
- Matharoo, J.S and M. Singh. 1980: Revivability of buffalo-sperma-tozoa after deep freezing the semen using various extenders. Zbl Vet Med A 27, 385-391.
- Mclaughlin, E. A., W. C. L. Ford and M. G. R. Hull. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. Journal Reproduction. 95: 527-534.
- Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira and J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why is it better. Theriogenology. 57:327-344.
- Molinia, F.C, G. Evans, P.I Casares, W.M.C. Maxwell. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim Reprod Sci 36, 113-122.
- Morrell J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. Reprod Domest Anim 41, 63-67.
- Morrell, J.M, A. Johannisson, H. Strutz, A. M Dalin and H. Martinez. 2009. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. J Equine Vet Sci, 29:24-32.
- Panangala V.S, A.J. Winter, A. Wijesinha, and R.H. Foote. 1981. Decreased motility of bull spermatozoa caused by Myco-plasma bovigenitalium. Am J Vet Res 42, 2090-2093.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta. Penerbit Mutiara.
- Purdy, P.H. 2006: A review on goat sperm cryopreservation. Small. Rumin. Res. 63:215-225.
- Quinn, P.J., P.Y. Chow and I.G. White. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J. Reprod Fertil. 60:403-407.
- Ramakrishnan, P. and M.O. Ariff. 1994. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, Proceedings of 4th World Buffalo Cong, Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 540-542.

- Rao, A.V.N., G.B. Haranath and G. Somasekharam. 1990. Effect of equilibration and thawing rates on survival and acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa in straws. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds., Recent Advances in Buffalo Research vol. 3 pp. 20–24.
- Rizal, M., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf dan P. Situmorang. 1999. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 4: 143-147..
- Rizal, M., M. R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2002. Kaulitas semen beku domba Garut dalam berbagai dosis gliserol. Jurnal Veteriner. 7 (3): 194-199.
- Rasul, Z, M. Anzar, S. Jalali and N. Ahmad. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 59:31–41.
- Sagdeo, L.R, A.B. Chitnis and A.S. Kaikini. 1991. Effect of seasonal variations on freezability of Surti buffalo bull semen. Indian J. Anim. Reprod. 12:1–3.
- Saeed, A., R.A., Chaudhry, I.H. Khan and N.U. Khan. 1990. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya, R.M., Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds, Recent Advances in Buffalo Research vol. 3 pp. 17–19.
- Sacke, R.G. 1981. Component of Semen Quality. Biennial Symp. on Animal Reproduction, Amer. Soc. of Anim. Sci. Annu. Meet. North Carolina State Univ., Raleigh, NC.
- Salamon, S. and W.M.C, Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62:77–111.
- Salisbury, G.W. dan N.L.Van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sansone, G, M.J.F. Nastri and Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod. Sci. 62:55–76.
- Sharma, M.L., G. Mohan, and K.L. Sahni. 1992. A study on acrosomal damage on cryopreservation of crossbred bull semen. Indian Vet. J. 69: 962-964.
- Shoushtari, S.M.A. and H.B. Babazadeh. 2009. Seasonal variation in the characteristics of the Azarbaijani buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Indian J. Vet. Res. 7(1):14.

- Shinha, S., B. C. Deka, M. K. Tanulu, and B. N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and gliserol level in tris extender of quality of frozen Goat semen. *Indian Vet, J.* 69 : 1107-1110.
- Shukla, M.K., A.K. Misra and H.P. Gupta. 2009. Studies on some biochemical constituents of murreh buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma. *Buffalo Bulletin.* 28(3):123-126.
- Singh, J, G.R. Pangawkar, R.K. Biswas, A.K. Srivastava and R. D. Sharma. 1990. Studies on lactic dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase release in relation to deep freezing of buffalo semen in certain extenders. *Theriogenology.* 34:371-378.
- Singh, P, and R.K. Sharma. 2006. Initial stage glycerolization prevents the incidence of backward sperm motility during cryopreservation and increases buffalo semen freezability. *Indian J. Anim. Sci.* 76:777-779.
- Siddique, M., R. Ali And A. Raza. 2006. Effect of Buffers on Freezing of Buffalo Bull Semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences.* 2(2):117-119.
- Soliman, I. and H. Bassiony. 2010. Role of Buffalo in International Trade. *Proc. 9th World Buffalo Congr., Argentine, Buenos Aires.* 1058-1073.
- Subianto, M. 2010. Populasi Kerbau Semakin Menurun: Menuju Swasembada Daging 2014. *Publikasi Budidaya Ternak Ruminansia.* Ed. 1.
- Taming, S. N., M. R., Toelihere, T.L., Yusuf dan I.K. Utama. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.* 5 (2): 1-8.
- Talevi, R, S. Pelosi, G. Sansone, F. Graso and D. Matasino. 1994. Effect of different prefreezing rates on buffalo sperm motility and ultrastructure preservation. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, *Proceedings of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo, Brazil.* International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 537-539.
- Toelihere, M. R. 1985. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak.* Penerbit Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M. R. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak.* Penerbit Angkasa, cetakan ke-3, Bandung.
- Tuli, R.K, M. Singh and J.S. Matharoo. 1981. Fertility trial under field conditions with frozen buffalo bull semen using Tris yolk glycerol extender. *Indian J. Dairy Sci.* 34:456-458.
- Vale, W.G., O.M., Ohashi, H.F.L. Ribeiro and J.S. Sousa. 1991. Semen freezing and artificial insemination in water buffalo in the amazon valley. *Buffalo J.* 7(2):137.

Vale, W.G. 1994. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen of buffalo semen. Buffalo J. 2:65-72.

Vale, W.G. 2010. Deep freezing buffalo semen-state of art. Proc. 9th World Buffalo Congr., Argentine, Buenos Aires. 83-92.

Yulnawati. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis 30: 229-236.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Motilitas Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan

Motilitas Spermatozoa Sesudah Pengenceran

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	60	65	60	65	60	310
2	65	60	65	60	65	315
3	70	70	70	65	65	340
4	65	70	65	65	65	330
JUMLAH	260	265	260	255	255	1295
RATA	65	66.25	65	63.75	63.75	
SD	4.08	4.79	4.08	2.50	2.50	

$$FK = \frac{(1295)^2}{20} = 83851.25$$

$$JKK = \frac{((310)^2 + \dots + (330)^2)}{5} - FK = 113.75$$

$$JKP = \frac{((260)^2 + \dots + (255)^2)}{4} - FK = 17.50$$

$$JKT = ((60)^2 + \dots + (65)^2) - FK = 223.75$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 92.50$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 37.92$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 4.38$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 7.71$$

$$F_{hitung\ K} = \frac{KTK}{KTS} = 4.92$$

$$F_{hitung\ P} = \frac{KTP}{KTS} = 0.57$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	17.50	4.38	0.57 ^{ns}	3.26	5.41
KELOMPOK	3	113.75	37.92	4.92*	3.49	5.95
SISA	12	92.50	7.71			
TOTAL	19	223.75				

*= Berbeda nyata (P<0.05)

**= Berbeda sangat nyata (P<0.01)

Ns= Tidak berbeda nyata (P>0.05)

Motilitas Spermatozoa Sesudah Thawing

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	35	30	35	35	30	165
2	45	45	40	40	35	205
3	45	45	35	30	30	185
4	45	45	40	40	35	205
JUMLAH	170	165	150	145	130	760
RATA	42.5	41.25	37.5	36.25	32.5	
SD	5.00	7.50	2.89	4.79	2.89	

$$FK = \frac{(760)^2}{20} = 28880.00$$

$$JKK = \frac{((165)^2 + \dots + (205)^2)}{5} - FK = 220.00$$

$$JKP = \frac{((170)^2 + \dots + (130)^2)}{4} - FK = 257.50$$

$$JKT = ((35)^2 + \dots + (35)^2) - FK = 620.00$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 142.50$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 73.33$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 64.38$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 11.88$$

$$\text{Fhitung K} = \frac{KTK}{KTS} = 6.18$$

$$\text{Fhitung P} = \frac{KTP}{KTS} = 5.42$$

$$SE = \sqrt{\frac{KTS}{5}} = 1.54$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	257.50	64.38	5.42**	3.26	5.41
KELOMPOK	3	220.00	73.33	6.18**	3.49	5.95
SISA	12	142.50	11.88			
TOTAL	19	620.00				

*= Berbeda nyata ($P < 0.05$)

**= Berbeda sangat nyata ($P < 0.01$)

Ns= Tidak berbeda nyata ($P > 0.05$)

Tabel SSR dan LSR Faktor A

Perlakuan	SSR		LSR	
	5%	1%	5%	1%
2	3.08	4.32	4.75	6.66
3	3.23	4.55	4.98	7.01
4	3.33	4.68	5.13	7.21
5	3.36	4.76	5.18	7.34

Rata-Rata Faktor A

A1= 42.50
 A2= 41.25
 A3= 37.50
 A4= 36.25
 A5= 32.50

Nilai P	Selisih	LSR 5 %	LSR 1 %	Ket
A1 vs A2	1.25	4.75	6.66	ns
A1 vs A3	5.00	4.98	7.01	*
A1 vs A4	6.25	5.13	7.21	*
A1 vs A5	10.00	5.18	7.34	**
A2 vs A3	3.75	4.75	6.66	ns
A2 vs A4	5.00	4.98	7.01	*
A2 vs A5	8.75	5.13	7.21	**
A3 vs A4	1.25	4.75	6.66	ns
A3 vs A5	5.00	4.98	7.01	*
A4 vs A5	3.75	4.75	6.66	ns

Superskrip :

A1^{Aa}

A2^{Aab}

A3^{bc}

A4^{cd}

A5^{Bd}

Lampiran 2. Persentase Hidup Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan

Persentase Hidup Spermatozoa Sesudah Pengenceran

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	71.50	74.00	69.50	74.50	70.00	359.50
2	74.00	70.50	73.50	71.50	74.50	364.00
3	77.00	76.50	77.50	72.50	73.50	377.00
4	73.00	76.00	74.50	75.50	70.50	369.50
JUMLAH	295.50	297.00	295.00	294.00	288.50	1470.00
RATA	73.88	74.25	73.75	73.50	72.13	73.50
SD	2.32	2.72	3.30	1.83	2.21	

$$FK = \frac{(1470.00)^2}{20} = 108045$$

$$JKK = \frac{((359.50)^2 + \dots + (369.50)^2)}{5} - FK = 34.1$$

$$JKP = \frac{((295.50)^2 + \dots + (288.50)^2)}{4} - FK = 10.63$$

$$JKT = ((71.50)^2 + \dots + (70.50)^2) - FK = 106.5$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 61.775$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 11.37$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 2.66$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 5.15$$

$$Fhtung K = \frac{KTK}{KTS} = 2.21$$

$$F_{hitung} P = \frac{KTP}{KTS} = 0.52$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	10.63	2.66	0.52 ^{ns}	2.85	4.30
KELOMPOK	3	34.10	11.37	2.21 [*]	1.93	2.53
SISA	12	61.77	5.15			
TOTAL	19	106.50				

*= Berbeda nyata (P<0.05)

**= Berbeda sangat nyata (P<0.01)

Ns= Tidak berbeda nyata (P>0.05)

Persentase Hidup Spermatozoa Sesudah Thawing

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	41.50	37.50	43.50	42.00	38.50	203.00
2	53.50	53.00	48.50	48.00	44.50	247.50
3	52.50	52.00	44.50	39.50	38.00	226.50
4	52.00	52.00	47.50	46.50	44.50	242.50
JUMLAH	199.50	194.50	184.00	176.00	165.50	919.50
RATA	49.88	48.63	46.00	44.00	41.38	
SD	5.62	7.43	2.38	3.94	3.61	

$$FK = \frac{(919.50)^2}{20} = 42274.01$$

$$JKK = \frac{((203.00)^2 + \dots + (242.50)^2)}{5} - FK = 240.74$$

$$JKP = \frac{((199.50)^2 + \dots + (165.50)^2)}{4} - FK = 189.18$$

$$JKT = ((41.50)^2 + \dots + (44.50)^2) - FK = 552.24$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 122.32$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 80.25$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 47.29$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 10.19$$

$$F_{hitung\ K} = \frac{KTK}{KTS} = 7.87$$

$$F_{hitung\ P} = \frac{KTP}{KTS} = 4.64$$

$$SE = \sqrt{\frac{KTS}{4}} = 1.43$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	189.18	47.29	4.64*	3.26	5.41
KELOMPOK	3	240.74	80.25	7.87**	3.49	5.95
SISA	12	122.32	10.19			
TOTAL	19	552.24				

*= Berbeda nyata ($P < 0.05$)

**= Berbeda sangat nyata ($P < 0.01$)

Ns= Tidak berbeda nyata ($P > 0.05$)

Tabel SSR dan LSR Faktor A

Perlakuan	SSR		LSR	
	0.05	0.01	0.05	0.01
2	3.08	4.32	4.40	6.17
3	3.23	4.55	4.61	6.50
4	3.33	4.68	4.75	6.68
5	3.36	4.76	4.80	6.80

Rata-Rata Faktor A

A1= 49.88
 A2= 48.63
 A3= 46.00
 A4= 44.00
 A5= 41.38

Nilai P	Selisih	LSR 5 %	LSR 1 %	Ket
A1 vs A2	1.25	4.40	6.17	Ns
A1 vs A3	3.88	4.61	6.50	Ns
A1 vs A4	5.88	4.75	6.68	*
A1 vs A5	8.50	4.80	6.80	**
A2 vs A3	2.63	4.40	6.17	Ns
A2 vs A4	4.63	4.61	6.50	*
A2 vs A5	7.25	4.75	6.68	**
A3 vs A4	2.00	4.40	6.17	Ns
A3 vs A5	4.63	4.61	6.50	*
A4 vs A5	2.63	4.40	6.17	Ns

Superskrip :

A1^{Aa}

A2^{Aab}

A3^{ab}

A4^{bc}

A5^{Bc}



Lampiran 3. Abnormalitas Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan

Abnormalitas Spermatozoa Sebelum Equilibrasi

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	15.60	15.30	15.80	15.70	15.20	77.60
2	14.70	14.50	15.10	14.80	15.00	74.10
3	12.50	12.70	13.60	13.90	13.00	65.70
4	11.80	11.20	11.50	12.00	12.10	58.60
JUMLAH	54.60	53.70	56.00	56.40	55.30	276.00
RATA	13.65	13.43	14.00	14.10	13.83	13.80
SD	1.79	1.84	1.90	1.58	1.52	

$$FK = \frac{(276.00)^2}{20} = 3808.80$$

$$JKK = \frac{((77.60)^2 + \dots + (58.60)^2)}{5} - FK = 43.80$$

$$JKP = \frac{((54.60)^2 + \dots + (55.30)^2)}{4} - FK = 1.18$$

$$JKT = ((15.60)^2 + \dots + (12.10)^2) - FK = 46.26$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 1.28$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 14.60$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 0.29$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 0.11$$

$$Fhtung K = \frac{KTK}{KTS} = 136.78$$

$$F_{hitung} P = \frac{KTP}{KTS} = 2.75$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	1.18	0.29	2.75 ^{ns}	2.85	4.30
KELOMPOK	3	43.80	14.60	136.78 ^{**}	1.93	2.53
SISA	12	1.28	0.11			
TOTAL	19	46.26				

*= Berbeda nyata (P<0.05)

**= Berbeda sangat nyata (P<0.01)

Ns= Tidak berbeda nyata (P>0.05)

Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Thawing

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	16.50	15.90	16.10	16.70	16.20	81.40
2	15.20	14.70	15.30	15.00	15.30	75.50
3	12.90	13.00	13.90	14.10	13.30	67.20
4	12.10	11.50	11.80	12.30	12.60	60.30
JUMLAH	56.70	55.10	57.10	58.10	57.40	284.40
RATA	14.18	13.78	14.28	14.53	14.35	14.22
SD	2.03	1.93	1.88	1.83	1.68	

$$FK = \frac{(284.40)^2}{20} = 4044.17$$

$$JKK = \frac{((81.40)^2 + \dots + (60.30)^2)}{5} - FK = 51.46$$

$$JKP = \frac{((56.70)^2 + \dots + (57.40)^2)}{4} - FK = 1.25$$

$$JKT = ((16.50)^2 + \dots + (12.60)^2) - FK = 54.01$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 1.30$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 17.15$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 0.31$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 0.11$$

$$F_{hitung\ K} = \frac{KTK}{KTS} = 158.34$$

$$F_{hitung\ P} = \frac{KTP}{KTS} = 2.89$$

$$SE = \sqrt{\frac{KTS}{4}} =$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4.00	1.25	0.31	2.89 ^{ns}	3.26	5.41
KELOMPOK	3.00	51.46	17.15	158.34 ^{**}	3.49	5.95
SISA	12.00	1.30	0.11			
TOTAL	19.00	54.01				

*= Berbeda nyata (P<0.05)

**= Berbeda sangat nyata (P<0.01)

Ns= Tidak berbeda nyata (P>0.05)

Lampiran 4. Membran Plasma Utuh Semen Kerbau Untuk Masing-Masing Perlakuan
 Membran Plasma Utuh Sesudah Pengenceran

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	67.50	71.50	69.50	70.50	65.50	344.50
2	72.50	68.00	73.00	67.00	71.50	352.00
3	76.50	76.00	77.00	71.50	73.50	374.50
4	67.50	73.50	68.50	70.50	67.00	347.00
JUMLAH	284.00	289.00	288.00	279.50	277.50	1418.00
RATA	71.00	72.25	72.00	69.88	69.38	70.90
SD	4.36	3.38	3.85	1.97	3.75	

$$FK = \frac{(1418.00)^2}{20} = 100536.2$$

$$JKK = \frac{((344.50)^2 + \dots + (347.00)^2)}{5} - FK = 112.5$$

$$JKP = \frac{((284.00)^2 + \dots + (277.50)^2)}{4} - FK = 25.675$$

$$JKT = ((67.50)^2 + \dots + (67.00)^2) - FK = 215.3$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 77.125$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 37.50$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 6.42$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 6.43$$

$$Fhtung K = \frac{KTK}{KTS} = 5.83$$

$$F_{hitung P} = \frac{KTP}{KTS} = 1.00$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	25.68	6.42	1.00 ^{ns}	2.85	4.30
KELOMPOK	3	112.50	37.50	5.83 ^{**}	1.93	2.53
SISA	12	77.13	6.43			
TOTAL	19	215.30				

*= Berbeda nyata (P<0.05)

**= Berbeda sangat nyata (P<0.01)

Ns= Tidak berbeda nyata (P>0.05)

Membran Plasma Utuh Sesudah Thawing

KELOMPOK	FAKTOR A					JUMLAH
	A1	A2	A3	A4	A5	
1	37.00	34.50	40.50	40.50	33.50	186.00
2	47.50	46.50	44.50	44.00	41.50	224.00
3	47.00	46.50	42.00	39.00	37.50	212.00
4	46.00	47.50	43.50	43.50	38.50	219.00
JUMLAH	177.50	175.00	170.50	167.00	151.00	841.00
RATA	44.38	43.75	42.63	41.75	37.75	
SD	4.96	6.18	1.75	2.40	3.30	

$$FK = \frac{(841.00)^2}{20} = 35364.05$$

$$JKK = \frac{((186.00)^2 + \dots + (219.00)^2)}{5} - FK = 171.35$$

$$JKP = \frac{((177.50)^2 + \dots + (151.00)^2)}{4} - FK = 108.825$$

$$JKT = ((37.00)^2 + \dots + (38.50)^2) - FK = 356.45$$

$$JKS = JKT - JKK - JKP = 76.275$$

$$KTK = \frac{(JKK)}{3} = 57.12$$

$$KTP = \frac{(JKP)}{4} = 27.21$$

$$KTS = \frac{(JKS)}{12} = 6.36$$

$$Fhitung K = \frac{KTK}{KTS} = 8.99$$

$$Fhitung P = \frac{KTP}{KTS} = 4.28$$

$$SE = \sqrt{\frac{KTS}{4}} = 1.13$$

ANOVA

SK	DB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0.05	0.01
PERLAKUAN	4	108.82	27.21	4.28*	3.26	5.41
KELOMPOK	3	171.35	57.12	8.99**	3.49	5.95
SISA	12	76.28	6.36			
TOTAL	19	356.45				

*= Berbeda nyata ($P < 0.05$)

**= Berbeda sangat nyata ($P < 0.01$)

Ns= Tidak berbeda nyata ($P > 0.05$)

Tabel SSR dan LSR Faktor A

Perlakuan	SSR		LSR	
	5%	1%	5%	1%
2	3.08	4.32	3.47	4.87
3	3.23	4.55	3.64	5.13
4	3.33	4.68	3.75	5.28
5	3.36	4.76	3.79	5.37

Rata-Rata Faktor A

A1=	44.38
A2=	43.75
A3=	42.63
A4=	41.75
A5=	37.75

Nilai P	Selisih	LSR 5 %	LSR 1 %	Ket
A1 vs A2	0.63	3.47	4.87	ns
A1 vs A3	1.75	3.64	5.13	ns
A1 vs A4	2.63	3.75	5.28	ns
A1 vs A5	6.63	3.79	5.37	**
A2 vs A3	1.13	3.47	4.87	ns
A2 vs A4	2.00	3.64	5.13	ns
A2 vs A5	6.00	3.75	5.28	**
A3 vs A4	0.88	3.47	4.87	ns
A3 vs A5	4.88	3.64	5.13	*
A4 vs A5	4.00	3.47	4.87	*

Superskrip :

A1^{Aa}

A2^{Aa}

A3^a

A4^a

A5^{Bb}



RIWAYAT HIDUP



Penulis adalah anak pertama dari tiga bersaudara dari ayahanda Yahya dan Ibunda Ely Desri. Penulis dilahirkan di Medan, Sumatera Utara pada tanggal 6 Juni 1988.

Tahun 1993 penulis menyelesaikan pendidikan di Taman Kanak-kanak (TK) Negeri Pembina, Medan, Sumatera Utara dan meneruskan pendidikan di Sekolah Dasar (SD) IKAL, Medan, Sumatera Utara sampai dengan kelas 5 dan kelas 6 pindah ke Sekolah Dasar (SD) Negeri 066653 Medan, Sumatera Utara hingga tamat pada tahun 1999. Pada tahun 1999 penulis di terima di Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama (SLTP) Negeri 43 Medan, Sumatera Utara, dan tahun 2000 pindah ke Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama (SLTP) Negeri 16 Medan, Sumatera Utara hingga tamat tahun 2002. Tahun 2005 menyelesaikan pendidikan Sekolah Pertanian Pembangunan (SPP) Negeri Padang, Sumatera Barat. Pada tahun 2005 terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang, Sumatera Barat di Jurusan Produksi Ternak melalui jalur SPMB.

Pada tanggal 13 Juli sampai 31 Agustus 2009 penulis mengikuti Program Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Tebing Tinggi, Kecamatan Pulau Punjung, Kabupaten Damasraya. Pada tanggal 20 September 2009 sampai 9 Maret 2010 penulis melaksanakan Farm Experience di Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Fakultas Peternakan Universitas Andalas.

Padang, Juli 2012

Zulfikar