

# **EVALUASI TEKNIK PENGENCERAN BERTAHAP DAN KAJI BANDING BERBAGAI JENIS PENGENCER UNTUK KRIOPRESERVASI SEMEN SAPI**

**ANI ATUL ARIF**



**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2020**

*@Hak cipta milik IPB University*

**IPB University**



**IPB University**  
Bogor Indonesia

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 IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



### *@Hak cipta milik IPB University*

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, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul **Evaluasi Teknik Pengenceran Bertahap dan Kaji Banding Berbagai Jenis Pengencer untuk Kriopreservasi Semen Sapi** adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2020

*Ani Atul Arif*  
NIM B352170021



### *@Hak cipta milik IPB University*

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, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## RINGKASAN

ANI ATUL ARIF. Evaluasi Teknik Pengenceran Bertahap dan Kaji Banding Berbagai Jenis Pengencer untuk Kriopreservasi Semen Sapi. Dibimbing oleh RADEN IIS ARIFIANTINI dan BAMBANG PURWANTARA

Proses pembuatan semen beku sapi di Balai Inseminasi Buatan di Indonesia sangat bervariasi dari segi teknik pengenceran dan jenis pengencer yang dipakai. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi teknik pengenceran bertahap dan pengaruh berbagai jenis pengencer untuk kriopreservasi semen sapi. Penelitian ini menggunakan sapi limousin sebanyak 3 ekor (umur 3 tahun). Semen sapi dikoleksi menggunakan vagina buatan kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen segar yang memiliki motilitas spermatozoa  $>70\%$  diproses menjadi semen beku. Penelitian ini terdiri atas 2 tahap penelitian. Tahap pertama yaitu evaluasi teknik pengenceran bertahap terhadap kualitas semen beku sapi limousin dalam pengencer skim kuning telur, dan Tahap kedua yaitu kaji banding berbagai jenis pengencer terhadap kualitas semen beku sapi limousin. Semen beku *post-thawing* dianalisis dan dievaluasi kualitasnya meliputi: parameter motilitas spermatozoa menggunakan CASA (*Computer assisted semen analysis*), viabilitas spermatozoa menggunakan pewarnaan eosin negrosin, integritas membran plasma (MPU) menggunakan larutan *hypoosmotic swelling* (HOS) test, kerusakan DNA menggunakan pewarnaan *Acridine Orange* (AO), kadar Malondialdehyde (MDA) menggunakan metode *asam thiobarbituric*, dan konsentrasi enzim aspartat aminotransferase (AST) menggunakan kit komersial (*Glory diagnostics, Spain*). Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf nyata 95% dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Data diolah menggunakan program SPSS versi 24.0. Data disajikan dalam bentuk rerata  $\pm$  *standard error of mean* (SEM).

Hasil penelitian Tahap 1 menunjukkan teknik pengenceran tidak memengaruhi nilai motilitas spermatozoa. Teknik pengenceran satu tahap menunjukkan nilai viabilitas dan keutuhan membran spermatozoa yang lebih baik ( $P < 0.05$ ) dengan nilai *enzim* AST yang lebih rendah ( $P < 0.05$ ) dibandingkan dengan tiga tahap. Hasil penelitian Tahap 2 menunjukkan motilitas spermatozoa semen beku sapi limousin dalam pengencer Andromed® lebih baik ( $P < 0.05$ ) dibanding dengan pengencer Skim Kuning Telur (SKT), namun tidak berbeda ( $P > 0.05$ ) dengan pengencer Tris Kuning Telur (TKT) dan Tris Kuning Telur (TSKT). Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa dari keempat pengencer tidak berbeda ( $P > 0.05$ ). Kadar MDA dan konsentrasi enzim AST spermatozoa dalam pengencer Andromed® menunjukkan nilai lebih rendah dibandingkan dengan pengencer SKT ( $P < 0.05$ ) namun tidak terdapat perbedaan dengan pengencer TKT atau TSKT ( $P > 0.05$ ). Penelitian ini menyimpulkan teknik pengenceran satu atau dua tahap dan pengencer TKT, TSKT dan andromed® dapat digunakan dengan hasil yang sama baiknya.

Kata kunci: teknik pengenceran, jenis pengencer, semen beku, MDA, Enzim AST.



## SUMMARY

ANI ATUL ARIF. Evaluation of Step Dilution and Comparative Study of Various Types of Diluents for bull semen Cryopreservation. By RADEN IIS ARIFANTINI dan BAMBANG PURWANTARA

The processes of bull frozen semen production at the Artificial Insemination Center in Indonesia were varied greatly in the step of dilution techniques and the type of dilution used. The objective of this study was to evaluate the dilution steps and comparison of various types of diluents for cryopreservation of bull semen. This study used semen from 3 certified limousine bulls (3 years old). Semen samples were collected using artificial vagina then evaluated macroscopically and microscopically. Fresh semen of limousine cattle which have the motility  $> 70\%$  were processed into frozen semen. This experiment consisted of 2 steps. The first step was the evaluation of the step dilution technique on the quality of frozen semen from limousine bull in egg yolk skim diluent; while the second step was to compare various types of diluents on the quality of frozen semen of limousine bulls. *Post-thawing* frozen semen were analyzed and evaluated for semen quality. The evaluation includes motility using CASA (Computer-assisted semen analysis); viability using *eosin nigrosin* staining; plasma membrane integrity (PMI) using *hypoosmotic swelling* (HOS) test. Moreover, DNA damage was evaluated using *Acridine Orange* (AO) staining; Malondialdehyde (MDA) levels using the *thiobarbituric acid* method; and the concentration of aspartate aminotransferase (AST) enzymes using commercial kits (Glory® diagnostics, Spain). Data were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) at a 95% significance level, then followed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Data were processed using the SPSS version 24.0 program. Data was presented in the form of the mean  $\pm$  *standard error of mean* (SEM).

Results of this first step experiment indicated that the dilution technique did not affect sperm motility. The one-step dilution showed better sperm viability and PMI ( $P < 0.05$ ) with lower AST of enzyme values ( $P < 0.05$ ) compared to the three-step dilution. Results of the second step showed limousine frozen semen in Andromed® extender had the percentage of progressive motility better than skim egg yolk (SEY) extender ( $P < 0.05$ ) but between Tris egg yolk (TEY) and Tris skim egg yolk (TSEY) extender ( $P > 0.05$ ) did not show a significant difference. In the percentage of viability and MPU in the four diluents, there were no differences ( $P > 0.05$ ). Whereas the MDA levels and concentration of AST in Andromed® diluents showed the lowest values compared to SEY ( $P < 0.05$ ) but did not differ from TEY and TSEY ( $P > 0.05$ ). In conclusion, one or two-step dilution techniques and TEY, TSEY and Andromed® diluents can be used with equally good results.

Keywords: step dilution, various of extender, frozen semen, MDA, Enzyme AST



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

## © Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2020 Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB*

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 IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### *@Hak cipta milik IPB University*

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, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



**EVALUASI TEKNIK PENGENCERAN BERTAHAP DAN  
KAJI BANDING BERBAGAI JENIS PENGENCER UNTUK  
KRIOPRESERVASI SEMEN SAPI**

**ANI ATUL ARIF**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains  
pada  
Program Studi Biologi Reproduksi

**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2020**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis : Dr drh Muhammad Agil MSc.Agr

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 IPB University.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Judul Tesis : Evaluasi Teknik Pengenceran Bertahap dan Kaji Banding Berbagai  
Jenis Pengencer untuk Kriopreservasi Semen Sapi  
Nama : Ani Atul Arif  
NIM : B352170021

Disetujui oleh  
Komisi Pembimbing

Prof Dr R Iis Arifiantini, MSi  
Ketua

Prof drh Bambang Purwantara, MSc, PhD  
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi  
Biologi Reproduksi

Prof Dr drh Mohamad Agus Setiadi

Dekan Sekolah Pascasarjana



Prof Dr Ir Anas Miftah Fauzi, MEng

Tanggal Ujian: 30 Juli 2020

Tanggal Lulus: 13 AUG 2021



*@Hak cipta milik IPB University*

IPB University



IPB University  
— Bogor Indonesia —

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, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PRAKATA

*Alhamdulillah*, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* serta shalawat dan salam tercurah untuk baginda Rasulullah Muhammad SAW atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah ini. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan September 2019 sampai Januari 2020 dengan judul “Evaluasi Teknik Pengenceran Bertahap dan Kaji Banding Berbagai Jenis Pengencer untuk Kriopreservasi Semen Sapi”. Karya ilmiah ini merupakan salah satu syarat kelulusan untuk memperoleh gelar Magister Sains, Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Terima kasih penulis ucapkan dan penghargaan yang tinggi kepada Ibu Prof Dr R Iis Arifiantini Msi dan Bapak Prof drh Bambang Purwantara Msc PhD selaku Dosen Pembimbing atas bimbingan, arahan, perhatian, motivasi serta nasihatnya selama melakukan penelitian dan penulisan karya ilmiah ini sehingga penulis dapat menyelesaikan rangkaian penelitian hingga selesai. Terima kasih kepada Bapak Prof Dr drh Mohamad Agus Setiadi selaku Kaprodi BRP dan kepada Dr drh Muhammad Agil MSc.Agr selaku penguji luar komisi pada Ujian Tesis yang telah memberikan masukan untuk penyempurnaan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Pimpinan beserta staf Sekolah Pascasarjana dan kepada Dekan FKH-IPB atas segala kemudahan, pelayanan dan bantuan lainnya yang tak terhitung selama penulis mengikuti pendidikan program magister di IPB.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, FKH-IPB, Balai Inseminasi Buatan Ungaran-Jawa Tengah, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Laboratorium Biokimia atas bantuan teknis dan non teknis selama pelaksanaan penelitian. Terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas Beasiswa yang telah diberikan serta kepada pengurus LPDP IPB atas semua bantuan yang diberikan.

Ungkapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada teman seperjuangan Ahmad Setiyono, Edelina S, Rhesti Indri, Kak Berlin atas segala bantuan dan dukungannya yang telah diberikan. Penulis juga sampaikan terima kasih kepada teman-teman seperjuangan BRP tahun 2017 (Faisal, Imam, Yusuf, Yoel, Mba Eva, Mba Dona, Zulfi), teman-teman BRP 2018 (Mba Sari, Mba Rahmah, Mba Cacha, Helpi, Wira dan Pak Aswad) dan para senior BRP (Pak Abdul, Pak Teguh, Mba Vira,mbk Ocha) atas segala doa dan semangat yang diberikan.

Ungkapan terima kasih, rasa cinta dan sayang sedalam-dalamnya penulis sampaikan kepada suami tercinta mas Ficky Fajrin, anaku Alifah Dien Assyifa. Rasa hormat patuh dan terima kasih penulis persembahkan kepada kedua orangtua Ibunda Suwarni, Ayahanda Madari dan Mama Sulami Nur Aini dan Papa Ainur Rofiq Assyikin serta seluruh keluarga atas segala doa, dukungan, semangat dan kasih sayangnya. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi para pembaca dan bisa menambah khazanah keilmuan.

Bogor, Agustus 2020  
*Ani Atul Arif*



## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	v
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	2
Manfaat Penelitian	2
Kerangka Pemikiran	2
Hipotesis	2
TINJAUAN PUSTAKA	3
Karakteristik Semen Sapi	3
Kriopreservasi Semen	3
Teknik Pengenceran Semen	4
Jenis-Jenis Pengencer	5
MATERI DAN METODE	6
Waktu dan Tempat Penelitian	6
Bahan dan Alat Penelitian	6
Prosedur Penelitian	7
Tahap I Evaluasi Teknik Pengenceran Bertahap	7
Tahap II Evaluasi Berbagai Jenis Pengencer	11
Analisis Data	12
HASIL DAN PEMBAHASAN	13
Evaluasi teknik pengenceran bertahap terhadap kualitas semen beku sapi	13
Evaluasi jenis pengencer terhadap kualitas semen beku sapi	17
SIMPULAN DAN SARAN	23
Simpulan	23
Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	24
RIWAYAT HIDUP	31



## DAFTAR TABEL

1	Komposisi pengencer skim kuning telur	7
2	Komposisi berbagai jenis pengencer	12
3	Kinematika spermatozoa semen beku sapi limousin dalam pengencer skim dengan berbagai teknik pengenceran	14
4	Viabilitas spermatozoa semen beku sapi limousin dalam pengencer skim kuning telur dengan berbagai teknik pengenceran semen	14
5	Keutuhan membran plasma spermatozoa sapi limousin dalam pengencer Skim kuning telur dengan berbagai teknik pengenceran semen	15
6	Kualitas semen beku sapi limousin pada berbagai jenis pengencer	18
7	Kinematika spermatozoa semen beku sapi limousin dalam berbagai jenis pengencer	20
8	Penurunan persentase viabilitas semen beku sapi limousin pada berbagai jenis pengencer	20
9	Penurunan persentase keutuhan membran plasma semen beku sapi limousin pada berbagai jenis pengencer	21

## DAFTAR GAMBAR

1	Mekanisme kejadian proses peroksidasi	4
2	Kerusakan DNA menggunakan pewarnaan Acridine Orange (AO). A. Spermatozoa dengan DNA utuh, B. Spermatozoa yang telah terfragmentasi.	15
3	Kadar malondialdehyde (MDA) dan enzim aspartat aminotransferase (AST) pada semen beku sapi Limousin dalam pengencer skim kuning telur dengan tiga tahap pengenceran	16
4	Kadar malondialdehyde (MDA) dan enzim aspartat aminotransferase (AST) pada semen beku sapi limousin dalam berbagai jenis pengencer	22

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 IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.