

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kualitas Semen Segar

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas semen segar yang diperoleh dari Domba Dorper jantan memiliki kelayakan untuk dilanjut dalam proses separasi seks spermatozoa yang kemudian digunakan untuk produksi semen beku. Kualitas semen segar dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Evaluasi semen segar Domba Dorper jantan

Evaluasi Makroskopis	1	2	3	4	Rata-Rata
Volume (ml)	1	1.5	2	1.5	1.5
Konsistensi	Kental	Kental	Kental	Kental	Kental
Warna	Krem	Krem	Krem	Krem	krem
Aroma	Khas	Khas	Khas	Khas	khas
pH	6.7	6.65	6.8	6.7	6.71
Evaluasi Mikroskopis	1	2	3	4	Rata-Rata
Viabilitas (%)	87	89	85	87	87 ± 1.63
Abnormalitas (%)	6	5	4.5	4	4.875 ± 0.85
Motilitas Masa	3	2	3	3	2.75 ± 0.50
Motilitas Individu (%)	80	80	75	75	77.5 ± 2.86
Konsentrasi (10^7 sel/ml)	390	350	320	310	342.5 ± 35.93

Semen segar yang diperoleh dilakukan pengujian secara makroskopik dan mikroskopik terlebih dahulu. Evaluasi semen segar Domba Dorper secara makroskopik diperoleh volume rata-rata semen sebanyak 1,5 ml dengan aroma semen yang khas. Volume semen segar pada domba umumnya bervariasi. Menurut Ntemka *et al.* (2019) volume semen segar pada domba diperoleh 1,02 hingga 1,09 ml, sedangkan pada penelitian Alvionita (2015) rata-rata volume semen domba berkisar 0,4 – 0,85 ml. Volume semen dapat dipengaruhi oleh usia ternak. Ternak dengan usia di bawah satu tahun atau saat pubertas memiliki volume semen yang relatif rendah karena fungsi testis belum optimal. Testis akan terus berkembang setelah pubertas menyebabkan tubulus seminiferus yang lebih panjang dan diameter lumen meningkat bersamaan dengan kelenjar aksesori yang berkembang, sehingga produksi spermatozoa akan lebih meningkat dan menghasilkan semen yang lebih tinggi (Brillianti *et al.*, 2021).

Warna semen segar pada Domba Dorper yaitu rata-rata krem. Warna tersebut masuk dalam kategori normal seperti hasil penelitian Hamdi *et al.* (2024) yang menghasilkan warna semen domba berupa krem, didukung oleh Tambing *et al.* (2001) bahwa warna semen domba yaitu putih hingga krem. Warna memiliki hubungan yang erat terhadap konsistensi dan konsentrasi dari spermatozoa. Warna semen cukup beragam seperti krem, putih, dan kuning, dengan konsistensi dari kental hingga encer. Konsentrasi spermatozoa yang semakin tinggi menunjukkan warna semen yang semakin keruh, hal tersebut berbanding lurus dengan konsistensi semen yang semakin kental (Alvionita, 2015). Hal serupa dinyatakan oleh penelitian Feradis (2007) bahwa warna semen yang semakin keruh maka konsistensi yang dihasilkan akan semakin kental. Warna semen yang abnormal contohnya berwarna kemerahan yang mengindikasikan adanya darah segar, dan warna kecoklatan yang mengindikasikan darah pada semen telah mengalami dekomposisi, serta warna kehijauan menunjukkan adanya bakteri pembusuk (Pangestu *et al.*, 2021).

Konsentrasi spermatozoa pada semen segar Domba Dorper dihasilkan rata-rata $342,5 \pm 35,93 \times 10^7$ sel/ml. Hasil tersebut berada dalam kisaran normal seperti yang dilaporkan oleh Garner and Hafez (2000) bahwa konsentrasi spermatozoa domba yaitu $2-3 \times 10^9$ sel/ml. Penelitian Nubatonis *et al.* (2022) juga menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa domba hasil penelitiannya rata-rata $2,94 \times 10^9$ sel/ml, sedangkan hasil yang dilaporkan oleh Rizal *et al.* (2015) menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa bisa mencapai $4,296 \times 10^9$ sel/ml. Nilai pH semen segar Domba Dorper pada penelitian ini yaitu 6,71. Nilai tersebut masih dalam rentang normal. Garner and Hafez (2000) menyebutkan bahwa nilai pH normal semen domba berkisar antara 6,4 – 7,8 dan menurut penelitian Nahriyanti *et al.* (2017) pH semen domba yang diteliti yaitu antara 6,50 – 6,80.

Evaluasi secara mikroskopik dilakukan dengan melihat motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi dari spermatozoa. Motilitas massa spermatozoa yang diperoleh pada semen segar yaitu berkisar dari (++) ke (+++) dan memiliki rata-rata motilitas individu $77,50\% \pm 2,88$. Motilitas diperiksa dengan cara meneteskan sedikit

semen pada *object glass* dan beri sedikit NaCl fisiologis, lalu tutup semen dengan *cover glass*. Motilitas diamati di bawah mikroskop perbesaran 400x dengan hasil penilaian dari persentase 0-100% (Apriyanti *et al.*, 2017). Motilitas massa mencerminkan gerakan dan konsentrasi dari spermatozoa. Spermatozoa akan bergerak bersama-sama membentuk gelombang yang tebal atau tipis. Cepat atau lambannya pergerakan juga dipengaruhi oleh konsentrasi dari spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa yang semakin tinggi menunjukkan gelombang yang terbentuk semakin tebal dengan pergerakan yang semakin cepat (Feradis, 2007). Motilitas massa yang paling baik yaitu jika tampak (++++) yang menunjukkan gerakan spermatozoa sangat progresif dan pekat, serta motilitas normal semen segar rata-rata dapat berkisar 60-80% (Khairi *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian Rokana *et al.* (2023) motilitas semen segar yang diperoleh dapat mencapai rata-rata 88,57%. Semen segar jika menurut Waluyo (2014) dapat diproses lebih lanjut sebagai semen beku apabila motilitas spermatozoa lebih dari 70%.

Viabilitas spermatozoa pada semen segar Domba Dorper diperoleh rata-rata $87\% \pm 1,63$ dengan abnormalitas rata-rata $4,875\% \pm 0,85$. Viabilitas memiliki korelasi dengan motilitas karena viabilitas menjadi daya hidup dari spermatozoa (Gustina *et al.*, 2022). Nilai viabilitas akan lebih tinggi dari nilai motilitas karena nilai viabilitas mengukur dari sel spermatozoa yang hidup baik yang bergerak progresif maupun yang diam atau tanpa gerakan (Setiono *et al.*, 2022). Viabilitas dan abnormalitas dapat dihitung di bawah mikroskop dari semen yang diberi pewarna eosin-nigrosin dan diulas pada *object glass*. Spermatozoa yang hidup tampak tidak terwarnai dan sebaliknya pada spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna merah-keunguan akibat rusaknya membran plasma (Vidyana, 2011). Penelitian Apriyanti *et al.* (2017) menghasilkan nilai viabilitas dan abnormalitas pada semen segar domba yaitu 93,57% dan 9,13%. Nilai viabilitas dan abnormalitas bervariasi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti genetik maupun lingkungan yang buruk sehingga menentukan kualitas dari spermatozoa. Abnormalitas yang lebih dari 14% juga dapat menunjukkan adanya gejala infertilitas pada ternak pejantan (Afiati *et al.*, 2015). Menurut Garner and Hafez (2000) abnormalitas spermatozoa pada domba masih dalam rentang normal jika berada antara 5-20%.

5.2 Semen Cair Pasca Separasi Seks

Semen segar yang telah lolos seleksi dilanjutkan menuju proses separasi seks spermatozoa untuk memisahkan spermatozoa X dan Y. Pemisahan tersebut dilakukan menggunakan medium gradien percoll dengan hasil pemisahan diuji persentasenya melalui pengukuran luas kepala spermatozoa atau disebut morfometrik. Pengukuran morfometrik dilakukan di bawah mikroskop perbesaran 400x dari preparat ulas semen yang telah diwarnai. Rumus perhitungan morfometrik menurut Solihati *et al.* (2017) dilakukan sebagai berikut:

$$LKS = (0,8988 \times P \times L) - 1,63$$

Keterangan :

LKS : Luas Kepala Spermatozoa
0,8988 : faktor koreksi
P : Panjang kepala spermatozoa
L : Lebar kepala spermatozoa
1,63 : Nilai konstanta regresi

Peluang untuk memperoleh anakan berjenis kelamin laki-laki, maka semen yang diinseminasikan harus mengandung banyak spermatozoa Y dengan persentase yang tinggi dibandingkan spermatozoa X sebagai bukti keberhasilan dalam separasi seks spermatozoa. Penelitian menunjukkan bahwa hasil morfometrik semen segar Domba Dorper memiliki rata-rata proporsi spermatozoa X dan Y sebesar 49,25% dan 50,5%. Hal ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Kusumawati *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa semen yang tidak mengalami *sexing* memiliki proporsi spermatozoa X dan Y masing-masing yaitu 50,4% dan 49,6%, sedangkan pada penelitian Takdir dan Biantara (2017) menghasilkan spermatozoa *nonsexing* dengan proporsi spermatozoa X dan Y masing-masing yaitu 57% dan 43%.

Semen cair yang telah diseparasi seks dilakukan pengukuran morfometrik untuk melihat proporsi spermatozoa Y dalam memperoleh anakan berjenis kelamin jantan sebagai ternak pedaging. Penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa Y yang dihasilkan dari konsentrasi medium 45:90% atau 30:70% dengan lama waktu inkubasi 30 menit, 45 menit, dan 60 menit, menunjukkan persentase spermatozoa Y lebih dari 70%. Proporsi spermatozoa Y dari hasil morfometrik dicantumkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata proporsi morfometrik spermatozoa Y pasca separasi seks pada semen cair

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Proporsi (%)
g_1t_1	70.75 ± 3.09
g_1t_2	79 ± 4.69
g_1t_3	78.5 ± 6.85
g_2t_1	77.5 ± 3.31
g_2t_2	75.5 ± 2.64
g_2t_3	72 ± 8.36

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Berdasarkan tabel morfometrik, persentase tertinggi diperoleh pada perlakuan g_1t_2 dengan proporsi spermatozoa Y sebesar $79 \pm 4,69\%$ serta persentase terendah pada perlakuan g_1t_1 dengan proporsi spermatozoa Y yaitu $70,75 \pm 3,09\%$. Hasil rata-rata dilakukan analisis variansi yang menunjukkan tidak adanya pengaruh signifikan dari konsentrasi medium gradien percoll dan lama waktu inkubasi terhadap proporsi spermatozoa Y ($P > 0,05$). Hal ini didukung oleh penelitian Patriani *et al.* (2019) menyatakan bahwa spermatozoa Y mampu menembus lapisan percoll meski pada rasio medium 10:90 dan 20:80 dan didominasi oleh spermatozoa X, sehingga menunjukkan bahwa saringan yang dibentuk pada medium percoll masih memiliki densitas yang rendah karena rendahnya rasio konsentrasi percoll yang digunakan. Komposisi medium percoll apabila semakin tinggi maka saringan yang terbentuk akan semakin rapat sehingga pemisahan antara spermatozoa X dan Y lebih jelas.

Spermatozoa dengan ukuran kecil dapat menembus medium. Ukuran kepala spermatozoa Y yang lebih kecil dan ringan pergerakannya lebih cepat dan lebih terkonsentrasi (Sonjaya dan Sutomo, 2005). Percoll memiliki viskositas rendah (maksimum 15 cP) dengan densitas $1,130 \pm 0,005$ g/ml sehingga memungkinkan terciptanya gradien densitas yang stabil tanpa membahayakan sel dan mampu sebagai pemisah sel. Spermatozoa-Y umumnya ditemukan dalam fraksi yang ringan dengan densitas rendah yaitu sekitar 1,06 g/ml, namun kepadatan spermatozoa domba diukur berdasarkan jumlah sperma permililiter (sel/mL) (Kumala, 2006). Pemisahan

berdasarkan konsentrasi medium gradien percoll dan lama waktu inkubasi dihasilkan proporsi rata-rata spermatozoa Y seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Proporsi morfometrik spermatozoa Y pasca separasi seks pada konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g ₁	g ₂	t ₁	t ₂	t ₃
Proporsi Spermatozoa Y (%)	70.75	77.5	70.75	79	78.5
	79	75.5	77.50	75.5	72
	78.5	72			
Rata-Rata	76.08 ± 4.62	75 ± 2.78	74.12 ± 4.77	77.25 ± 2.47	75.25 ± 4.59

Keterangan :

g₁ = medium percoll gradien 45:90%; g₂ = medium percoll gradien 30:70%; t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan bahwa proporsi tertinggi dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh separasi seks spermatozoa Y terbaik pada konsentrasi medium g₁ (45:90%) dengan rata-rata 76,08 ± 4,62% dan lama waktu terbaik yaitu pada t₂ (45 menit) dengan rata-rata 77.25 ± 2,47%.

Banyak penelitian yang telah mengungkapkan bahwa penggunaan metode sentrifugasi gradien percoll memiliki hasil pemisahan spermatozoa yang cukup baik. Spermatozoa yang tidak dilakukan separasi seks memiliki proporsi alami kromosom X dan Y dengan ratio 50:50% (Ferlianthi, 2016) sehingga perlakuan separasi seks spermatozoa akan mengubah proporsi alami tersebut. Apabila spermatozoa dilakukan separasi seks maka proporsi kromosom X dan Y akan berubah. Menurut hasil penelitian Yekti *et al.* (2023) menunjukkan bahwa separasi seks menggunakan medium percoll dapat memisahkan spermatozoa X dan Y dengan persentase tinggi yakni menghasilkan spermatozoa Y sebanyak 72%.

5.3 Motilitas Semen Cair Pasca Separasi Seks

Semen cair pasca separasi seks dievaluasi kualitas semen berupa motilitas spermatozoa dari faktor perlakuan yang memengaruhi motilitas tersebut. Hasil penelitian menunjukkan motilitas rata-rata spermatozoa Y pada semen cair pasca separasi seks seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Rata-rata motilitas spermatozoa Y pasca separasi seks

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Rata-Rata Motilitas (%)
g_1t_1	63.75 ± 2.50
g_1t_2	62.50 ± 2.88
g_1t_3	61.25 ± 2.50
g_2t_1	63.75 ± 2.50
g_2t_2	62.50 ± 2.88
g_2t_3	62.50 ± 2.88

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Motilitas spermatozoa Y terbaik ditunjukkan pada motilitas dari perlakuan g_1t_1 dan g_2t_1 dengan nilai rata-rata yang sama yaitu $63,75 \pm 2,50\%$, sedangkan nilai motilitas terendah diperoleh pada perlakuan g_1t_3 dengan nilai rata-rata $61,25 \pm 2,50\%$. Berdasarkan nilai rata-rata motilitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata motilitas spermatozoa Y pasca separasi seks dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan secara berbeda seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Motilitas spermatozoa Y pasca separasi seks pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g_1	g_2	t_1	t_2	t_3
Motilitas Spermatozoa Y (%)	63.75	63.75	63.75	62.5	61.25
	62.5	62.5	63.75	62.5	62.5
	61.25	62.5			
Rata-Rata	62.50 ± 1.25	62.91 ± 0.72	63.75 ± 0	62.50 ± 0	61.87 ± 0.88

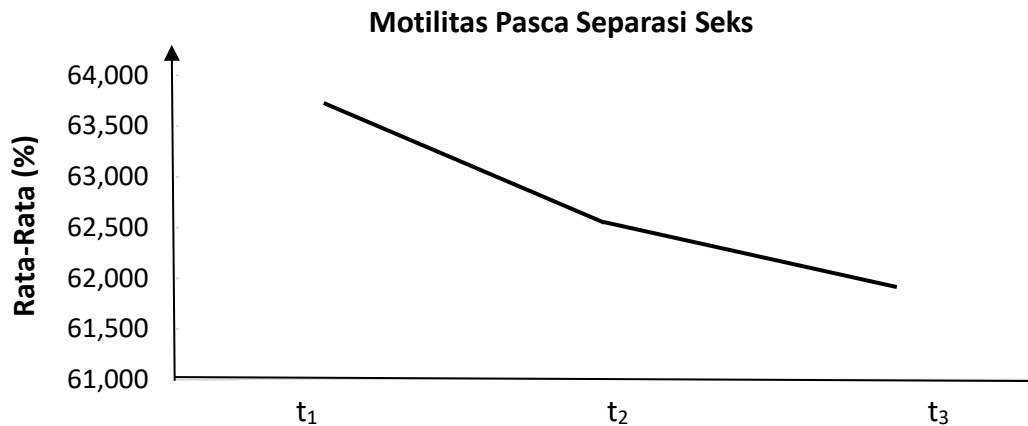
Keterangan :

g_1 = medium percoll gradien 45:90%; g_2 = medium percoll gradien 30:70%; t_1 = waktu inkubasi 30 menit; t_2 = waktu inkubasi 45 menit; t_3 = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan bahwa dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh motilitas tertinggi yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g_2) dengan nilai rata-rata yaitu $62,91 \pm 0,72\%$, serta motilitas terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 30 menit (t_1) dengan nilai rata-rata yaitu 63,75%.

Waktu inkubasi menjadi salah satu faktor penentu dalam proses separasi seks spermatozoa. Waktu inkubasi yang singkat menghasilkan proporsi dari spermatozoa Y lebih sedikit. Jika waktu inkubasi terlalu lama maka dapat memicu peningkatan kerusakan dari sel spermatozoa dan menurunkan kualitasnya (Anwar, 2019). Diketahui bahwa motilitas sebagai salah satu indikator yang menentukan kualitas dari spermatozoa untuk keberhasilan fertilitas (Gustina *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa lama waktu inkubasi pada proses separasi seks spermatozoa memberikan pengaruh signifikan ($P < 0,05$) pada motilitas semen cair hasil separasi seks.

Waktu inkubasi dari perlakuan pertama (t_1) hingga ketiga (t_3) mengalami penurunan nilai motilitas seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Motilitas semen segar pada hasil penelitian diperoleh nilai rata-rata 77,5% dan mengalami penurunan motilitas setelah proses separasi seks dengan waktu inkubasi berbeda menjadi 63,72% (t_1), 62,55% (t_2), dan 61,91% (t_3). Hasil penelitian menyatakan bahwa waktu inkubasi terbaik yaitu selama 30 menit (t_1) dengan nilai rata-rata motilitas sperma 63,72%. Waktu inkubasi selama 45 menit (t_2) dan 60 menit (t_3) tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), namun keduanya berbeda nyata dengan t_1 ($P < 0,05$) (Tabel 8). Hasil tersebut sesuai dengan penelitian dari Situmorang *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa waktu inkubasi terendah pada proses separasi seks spermatozoa menunjukkan nilai motilitas yang lebih tinggi dibandingkan waktu inkubasi yang lebih lama. Penelitian tersebut menggunakan waktu inkubasi selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.



Keterangan :

t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Gambar 2. Waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata motilitas semen pasca separasi seks

Tabel 8. Waktu Inkubasi terhadap Nilai Rataan Motilitas Semen Pasca Separasi Seks

Waktu Inkubasi (t)	Motilitas Pasca Separasi Seks (%)
t ₁	63.72 ± 0 ^a
t ₂	62.55 ± 0 ^b
t ₃	61.91 ± 0.88 ^b

Keterangan :

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

$P < 0,05$ menunjukkan pengaruh nyata dan $P > 0,05$ menunjukkan pengaruh tidak nyata

t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Motilitas yang mengalami penurunan dapat disebabkan adanya kebutuhan energi yang lebih banyak dalam mempertahankan kondisi fisiologis spermatozoa saat bergerak melewati konsentrasi medium pemisahan (Ferlianti, 2016). Hal ini serupa pada Sali et al. (2000) dengan hasil penelitian diperoleh motilitas spermatozoa pasca separasi seks dari 77% (semen segar) menjadi 64,5; 51,0; 63,0; dan 50,5%, yang menyatakan bahwa energi yang digunakan oleh spermatozoa untuk menormalkan kondisi fisiologisnya, akan mengurangi motilitas hingga diam tidak bergerak, meskipun tidak dalam keadaan mati. Penurunan motilitas pada separasi seks spermatozoa menggunakan gradien densitas percoll juga dapat disebabkan oleh proses sentrifugasi. Proses sentrifugasi memberikan efek pemisahan yang baik terhadap kromosom X dan Y pada spermatozoa, namun juga berdampak pada kualitas spermatozoa akibat adanya gesekan mekanis yang memicu kerusakan membran spermatozoa sehingga

menurunkan motilitas maupun viabilitasnya (Setiono *et al.*, 2022). Penurunan motilitas akibat sentrifugasi dapat memengaruhi struktur maupun fungsi membran dari spermatozoa akibat pecahnya kepala dan ekor spermatozoa saat masing-masing kromosom X dan Y menempati area sesuai gradien medium (Sumaryadi *et al.*, 2025).

5.4 Motilitas Semen Beku *Post Thawing*

Semen beku yang telah diproduksi dalam bentuk *straw* dilakukan *thawing* untuk evaluasi kualitas semen beku *post thawing*. Evaluasi berupa motilitas spermatozoa Y pada semen beku sangat penting dilakukan agar mengetahui layak tidaknya semen beku tersebut untuk diinseminasi. Hasil rata-rata motilitas spermatozoa Y pada semen beku *post thawing* seperti yang tercantum dalam Tabel 9.

Tabel 9. Rata-rata motilitas spermatozoa Y pada semen beku *post thawing*

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Rata-Rata Motilitas (%)
g_1t_1	13.75 ± 4.78
g_1t_2	4.75 ± 1.70
g_1t_3	4.00 ± 1.15
g_2t_1	13.75 ± 4.78
g_2t_2	11.25 ± 2.5
g_2t_3	6.75 ± 2.36

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Motilitas spermatozoa Y yang terbaik dari semen beku *post thawing* ditunjukkan pada perlakuan g_1t_1 dan g_2t_1 dengan nilai rata-rata yang sama yaitu $13,75 \pm 4,78\%$, sedangkan nilai motilitas terendah diperoleh pada perlakuan g_1t_3 dengan nilai rata-rata $4,00 \pm 1,15\%$. Berdasarkan nilai rata-rata motilitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata motilitas pada spermatozoa Y *post thawing* dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan seperti pada Tabel 10.

Tabel 10. Motilitas spermatozoa *Y post thawing* pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g ₁	g ₂	t ₁	t ₂	t ₃
Motilitas	13.75	13.75	13.75	4.75	4.00
Spermatozoa	4.75	11.25	13.75	11.25	6.75
Y (%)	4	6.75			
Rata-Rata	7.5 ± 5.42	10.58 ± 3.54	13.75 ± 0	8.00 ± 4.59	5.375 ± 1.94

Keterangan :

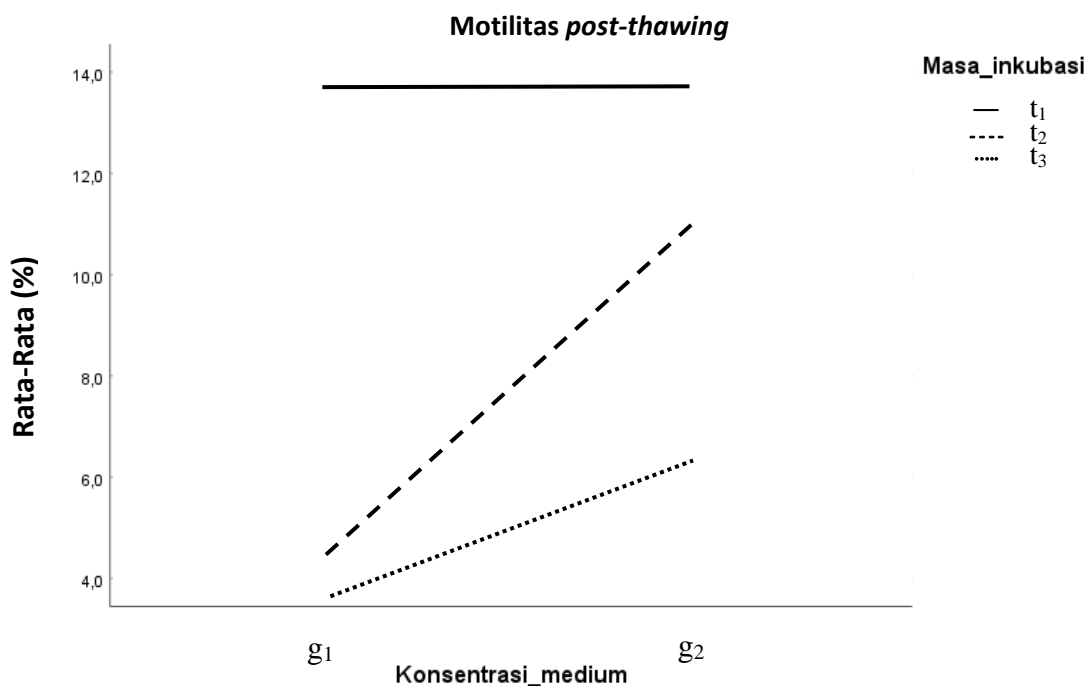
g₁ = medium percoll gradien 45:90%; g₂ = medium percoll gradien 30:70%; t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan bahwa dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh motilitas spermatozoa *Y post thawing* yang tertinggi yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g₂) dengan nilai rata-rata yaitu 10,58 ± 3,54%, serta motilitas terbaik diperoleh pada waktu inkubasi 30 menit (t₁) dengan nilai rata-rata yaitu 13,75%.

Hasil penelitian juga menunjukkan motilitas spermatozoa pada semen beku *post thawing* memiliki interaksi antar konsentrasi medium percoll (g) dan lama waktu inkubasi (t) (P<0,05). Perlakuan g₂t₁ tidak berbeda nyata dengan perlakuan g₁t₁, g₂t₂ (P>0,05), namun berbeda nyata dengan perlakuan g₁t₂, g₁t₃, dan g₂t₃ (P<0,05). Perlakuan g₁t₂ tidak berbeda nyata dengan g₁t₃ dan g₂t₃ (P>0,05) (Tabel 11). Motilitas spermatozoa terbaik terdapat pada konsentrasi medium dengan gradien percoll 30:70% (g₂) selama waktu inkubasi 30 menit (t₁) atau pada perlakuan g₂t₁ dengan konsentrasi medium percoll 45:90% (g₁) selama waktu inkubasi 30 menit (t₁) dengan nilai rata-rata motilitas yang sama yaitu sebesar 13,75%. Motilitas pada g₁t₁ menunjukkan bahwa tidak adanya pengaruh berbeda baik menggunakan konsentrasi medium g₁ (45:90%) maupun g₂ (30:70%), hanya saja rata-rata nilai menunjukkan bahwa konsentrasi g₂ lebih tinggi nilai motilitasnya dibandingkan dengan g₁ seperti yang tercantum pada Gambar 3. Grafik juga menunjukkan penurunan motilitas akan tampak sejalan dengan lamanya waktu inkubasi yang digunakan saat proses separasi seks spermatozoa.

Penurunan motilitas terjadi sejak proses separasi seks spermatozoa, dilanjut proses equilibrasi hingga kriopreservasi. Semen beku yang telah dicairkan akan memengaruhi

kualitas spermatozoa berupa motilitas yang secara keseluruhan dapat disebabkan oleh faktor individu, lingkungan, teknik kriopreservasi, serta media pengencer yang digunakan sebagai krioprotektan, demi menjaga tekanan pH dan osmotik sel. Secara fisiologis, membran plasma utuh pada spermatozoa berkaitan dengan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Kerusakan yang terjadi pada membran plasma dapat memicu hilangnya enzim yang dibutuhkan untuk proses metabolisme spermatozoa sehingga tidak adanya energi yang dihasilkan dan menyebabkan motilitas menjadi rendah (Ariantie *et al.*, 2013). Apabila berdasarkan nilai motilitas *post-thawing* maka semen yang mengandung banyak spermatozoa Y masih belum layak untuk diinseminasikan karena memiliki nilai motilitas di bawah standar semen beku yaitu minimal 40% menurut SNI.



Keterangan :

g₁t₁ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g₁t₂ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g₁t₃ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g₂t₁ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g₂t₂ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g₂t₃ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Gambar 3. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata motilitas semen beku *post thawing*

Tabel 11. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata motilitas semen beku *post thawing*

Interaksi Konsentrasi Medium (g) dan Waktu Inkubasi (t)	Motilitas <i>Post Thawing</i> (%)
g_1t_1	13.75 ± 4.78^a
g_1t_2	4.75 ± 1.70^c
g_1t_3	4.00 ± 1.15^c
g_2t_1	13.75 ± 4.78^a
g_2t_2	11.25 ± 2.50^{ab}
g_2t_3	6.75 ± 2.36^{bc}

Keterangan :

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

$P < 0,05$ menunjukkan pengaruh nyata dan $P > 0,05$ menunjukkan pengaruh tidak nyata

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Hal ini sejalan dengan penelitian Eberhardt *et al.* (2022) menyatakan bahwa proses pembekuan semen akan menyebabkan modifikasi struktur gamet jantan dan apabila dilakukan pencairan (*post thawing*) maka perubahan struktur tersebut tidak sepenuhnya kembali normal. Motilitas yang rendah atau menurun saat proses pembekuan dapat disebabkan oleh pembentukan es pada sel, toksisitas dari bahan kimia yang digunakan dalam proses separasi seks dan equilibrasi, serta produksi spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebih sehingga memicu kerusakan membran spermatozoa. Faktor paling utama yang membatasi efektivitas kriopreservasi yaitu kualitas awal dari spermatozoa pada semen segar.

Menurut Dorado *et al.* (2009) kriopreservasi memicu kerusakan pada sel spermatozoa yang menurunkan motilitas, integritas akrosom serta mengurangi fertilitas. Semen beku yang dicairkan kembali masih dapat bergerak dan bertahan hidup, namun terjadi penurunan fekunditas, motilitas, dan kelangsungan hidup. Krioprotektan menjadi faktor penting dalam melindungi spermatozoa dari *coldshock*. Kondisi tersebut akan mengubah membran spermatozoa menjadi konfigurasi hexagonal. Membran yang mengalami kerusakan akan menurunkan kerja mitokondria yang menghasilkan enzim aspartat aminotransferase (AspAT) sebagai enzim yang memproduksi ATP untuk dilepaskan menuju seminal plasma. Produksi ATP yang

terganggu menjadi penyebab utama motilitas spermatozoa menurun (Arifiantini dan Purwantara, 2010). Berdasarkan beberapa pemicu tersebut, nilai motilitas juga dipengaruhi dari sejak proses separasi seks dengan lama waktu inkubasi akan menentukan nilai motilitas terbaik, yaitu selama 30 menit baik pada gradien konsentrasi medium percoll 30:70% maupun 45:90%.

5.5 Viabilitas Semen Cair Pasca Separasi Seks

Nilai viabilitas pada semen cair pasca separasi seks dievaluasi untuk melihat kualitas semen berdasarkan daya hidup sel spermatozoa Y yang diperoleh. Hasil penelitian menunjukkan viabilitas rata-rata spermatozoa Y pasca separasi seks seperti pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil rata-rata viabilitas spermatozoa Y pasca separasi seks

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Rata-Rata viabilitas (%)
g_1t_1	71.12 ± 3.27
g_1t_2	69.62 ± 3.19
g_1t_3	66.50 ± 4.70
g_2t_1	71.37 ± 3.19
g_2t_2	68.25 ± 1.93
g_2t_3	69.75 ± 3.96

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Viabilitas spermatozoa Y terbaik pada semen cair pasca separasi seks dari perlakuan kombinasi menunjukkan bahwa g_2t_1 memiliki nilai rata-rata tertinggi yaitu sebesar $71,37 \pm 3,19\%$, sedangkan nilai viabilitas terendah diperoleh pada perlakuan g_1t_3 dengan nilai rata-rata $66,50 \pm 4,70\%$. Berdasarkan nilai rata-rata viabilitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata viabilitas spermatozoa Y pasca separasi seks dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi secara terpisah seperti pada Tabel 13.

Tabel 13. Viabilitas spermatozoa Y pasca separasi seks pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

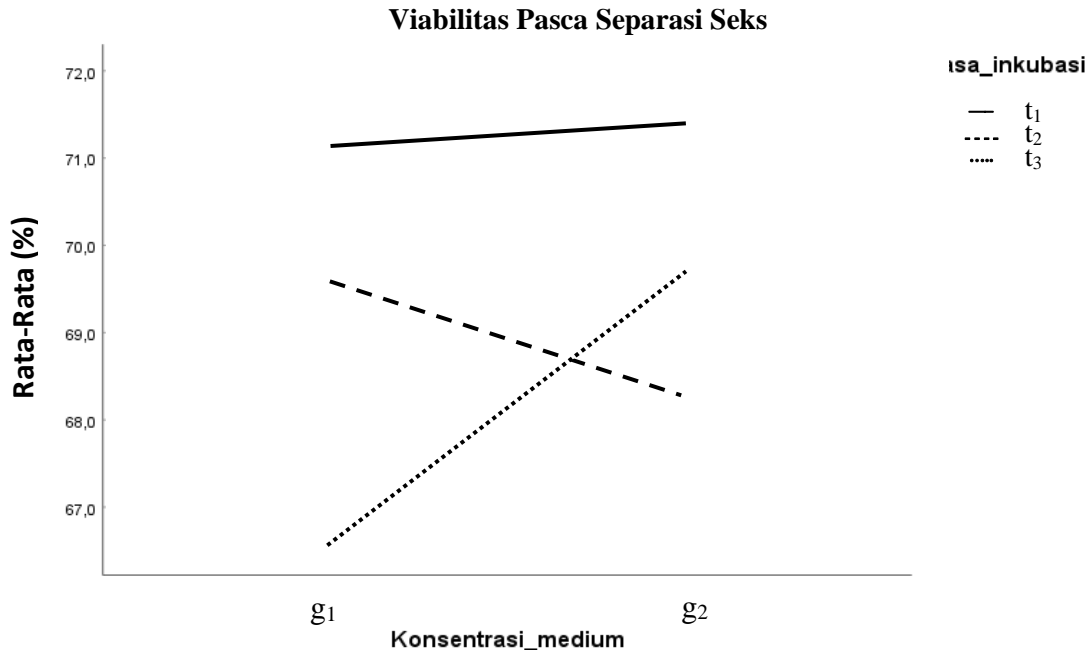
Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g ₁	g ₂	t ₁	t ₂	t ₃
Viabilitas Spermatozoa Y (%)	71.12	71.37	71.12	69.62	66.50
	69.62	68.25	71.37	68.25	69.75
	66.50	69.75			
Rata-Rata	69.08 ± 2.35	69.79 ± 1.56	71.24 ± 0.17	68.93 ± 0.96	68.12 ± 2.29

Keterangan :

g₁ = medium percoll gradien 45:90%; g₂ = medium percoll gradien 30:70%; t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh viabilitas tertinggi yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g₂) dengan nilai rata-rata yaitu 69,79 ± 1,56%, serta viabilitas terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 30 menit (t₁) dengan nilai rata-rata yaitu 71,24 ± 0,17%.

Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh signifikan dari interaksi konsentrasi medium percoll (g) dengan waktu inkubasi (t) terhadap viabilitas semen pasca separasi seks (P<0.05). Nilai viabilitas tertinggi ditunjukkan pada interaksi g₂t₁. Nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan interaksi g₁t₁ (P>0,05), dan berbeda nyata dengan interaksi g₁t₂, g₁t₃, g₂t₂, dan g₂t₃ (P<0,05). Interaksi g₁t₁ juga berbeda nyata dengan g₁t₃ dan g₂t₂ (P<0,05), serta tidak berbeda nyata dengan g₁t₂ dan g₂t₃ (P>0,05). Interaksi g₁t₃ juga berbeda nyata dengan g₂t₂ (P<0,05) (Tabel 14). Secara grafik menunjukkan nilai viabilitas yang semakin menurun seiring dengan lamanya waktu inkubasi yang digunakan. Viabilitas spermatozoa dalam penelitian tidak dipengaruhi dari konsentrasi medium percoll. Nilai viabilitas terbaik dihasilkan dari interaksi g₂t₁ dengan nilai sebesar 71,40%, diikuti interaksi g₁t₁ dengan nilai rata-rata 71,12%. Berdasarkan hasil tersebut, maka viabilitas spermatozoa terbaik yaitu pada waktu inkubasi 30 menit (t₁), baik dengan menggunakan konsentrasi medium 45:90% (g₁) atau 30:70% (g₂) (Gambar 4).



Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Gambar 4. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata viabilitas semen pasca separasi seks

Tabel 14. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata viabilitas semen pasca separasi seks

Interaksi Konsentrasi Medium (g) dan Waktu Inkubasi (t)	Viabilitas Pasca Separasi Sex (%)
g_1t_1	71.12 ± 3.27^{ab}
g_1t_2	69.60 ± 3.19^{bc}
g_1t_3	66.52 ± 4.70^d
g_2t_1	71.40 ± 3.19^a
g_2t_2	68.25 ± 1.93^c
g_2t_3	69.75 ± 3.96^{bc}

Keterangan :

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

$P < 0,05$ menunjukkan pengaruh nyata dan $P > 0,05$ menunjukkan pengaruh tidak nyata

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Metode separasi seks dengan gradien densitas percoll efektif untuk memisahkan jenis kelamin spermatozoa (antara X dan Y) sesuai berat dan ukuran kepala sperma. Proses ini tidak lain juga dapat menyebabkan kerusakan membran sehingga menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa akibat beberapa faktor seperti proses pemisahan, tingkat gradien, sentrifugasi, pengenceran, dan faktor pembekuan (Simbolon *et al.*, 2024). Viabilitas memiliki korelasi dengan motilitas karena viabilitas menjadi daya hidup dari spermatozoa (Gustina *et al.*, 2022). Spermatozoa yang hidup menjadi indikator integritas dari struktur membran spermatozoa (Prastika *et al.*, 2018). Kondisi spermatozoa yang hidup tidak selalu menunjukkan motilitas spermatozoa. Spermatozoa yang hidup dapat dari sel spermatozoa yang tanpa pergerakan/ memiliki pergerakan kurang progresif, sedangkan spermatozoa yang bergerak dengan motilitas bagus sudah dipastikan hidup. Hal tersebut menunjukkan mengapa persentase viabilitas selalu lebih tinggi jika dibandingkan dengan motilitas individu (Setiono *et al.*, 2022).

Penurunan viabilitas sama halnya seperti penurunan motilitas, banyak penyebab yang menjadi faktor penurunan, terutama lamanya waktu inkubasi yang digunakan memengaruhi persentase viabilitas yang berbeda. Radikal bebas akan muncul selama waktu inkubasi karena semakin lama waktu inkubasi yang digunakan maka banyak energi yang digunakan berasal dari metabolisme sel secara aerob dan anaerob, sehingga terjadi peningkatan konsumsi oksigen yang memicu peningkatan pembentukan radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) (Anwar, 2019). Selain waktu inkubasi, proses separasi seks spermatozoa menggunakan medium percoll dilakukan dengan sentrifugasi yang dapat menghasilkan ROS. Produksi ROS akan mengubah fungsi fisiologis spermatozoa, dan apabila berlebihan maka dapat mengubah fungsinya dengan memperoleh elektron dari asam nukleat, protein, lipid, karbohidrat, atau molekul lain. Kerusakan sel akan meningkat dan mengganggu status metabolisme spermatozoa yang dikaitkan dengan aktivitas sel (Rawat dan Sharma, 2020).

5.6 Viabilitas Semen Beku *Post Thawing*

Evaluasi kualitas semen beku *post thawing* dilihat dari nilai viabilitas untuk mendukung kelayakan semen beku yang dihasilkan. Viabilitas selalu berkorelasi dengan motilitas. Nilai rata-rata viabilitas spermatozoa Y yang dihasilkan pada semen beku *post*

thawing dipengaruhi oleh faktor perlakuan dalam penelitian seperti yang tercantum pada Tabel 15.

Tabel 15. Rata-rata viabilitas spermatozoa Y pada semen beku *post thawing*

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Rata-Rata viabilitas (%)
g_1t_1	20.37 ± 4.88
g_1t_2	7.25 ± 0.95
g_1t_3	6.75 ± 1.70
g_2t_1	18.87 ± 3.22
g_2t_2	16.87 ± 3.11
g_2t_3	10.25 ± 3.22

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Viabilitas spermatozoa Y terbaik pada semen beku *post thawing* ditunjukkan pada perlakuan g_1t_1 yang memiliki nilai rata-rata sebesar $20,37 \pm 4,88\%$, sedangkan nilai viabilitas terendah diperoleh pada perlakuan g_1t_3 dengan nilai rata-rata $6,75 \pm 1,70\%$. Berdasarkan rata-rata viabilitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata viabilitas spermatozoa Y *post thawing* dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan seperti pada Tabel 16.

Tabel 16. Viabilitas spermatozoa Y *post thawing* pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g_1	g_2	t_1	t_2	t_3
Viabilitas Spermatozoa Y (%)	20.37	18.87	20.37	7.25	6.75
	7.25	16.87	18.87	16.87	10.25
	6.75	10.25			
Rata-Rata	11.4 ± 9.27	15.33 ± 4.51	19.62 ± 1.06	12.06 ± 6.80	8.5 ± 2.47

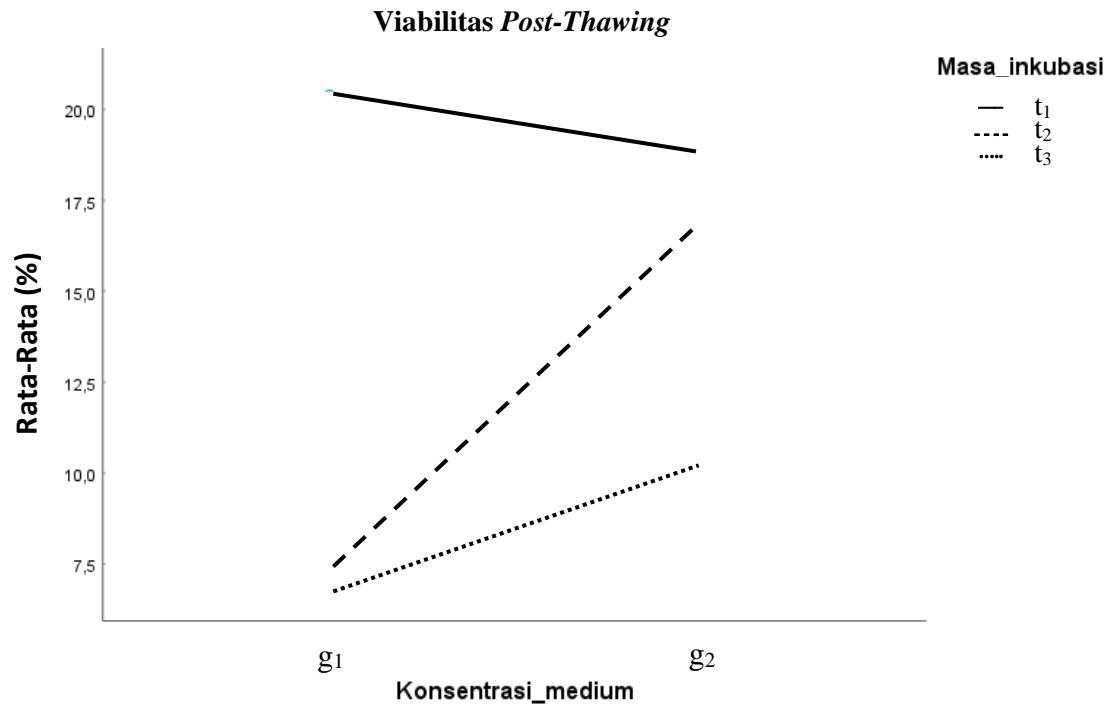
Keterangan :

g_1 = medium percoll gradien 45:90%; g_2 = medium percoll gradien 30:70%; t_1 = waktu inkubasi 30 menit; t_2 = waktu inkubasi 45 menit; t_3 = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh viabilitas tertinggi pada semen beku *post thawing* yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g_2) dengan nilai rata-rata $15,33 \pm 4,51\%$, serta viabilitas terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 30 menit (t_1) dengan nilai rata-rata yaitu $19,62 \pm 1,06\%$.

Hasil penelitian juga menunjukkan adanya pengaruh signifikan dari interaksi konsentrasi medium percoll (g) dengan lama waktu inkubasi (t) terhadap viabilitas semen beku *post thawing* ($P < 0,05$). Nilai viabilitas tertinggi ditunjukkan pada interaksi g_1t_1 . Interaksi g_1t_1 berbeda nyata dengan seluruh interaksi lainnya ($P < 0,05$). Interaksi g_1t_2 tidak berbeda nyata dengan interaksi g_1t_3 ($P > 0,05$), namun berbeda nyata dengan interaksi g_2t_1 , g_2t_2 , g_2t_3 ($P < 0,05$). Interaksi g_2t_1 berbeda nyata dengan g_2t_2 dan g_2t_3 ($P < 0,05$), serta g_2t_2 berbeda nyata dengan g_2t_3 ($P < 0,05$) (Tabel 17). Grafik menunjukkan bahwa nilai viabilitas tertinggi pada semen beku *post thawing* yaitu pada perlakuan g_1t_1 atau dalam konsentrasi medium percoll 45:90% selama waktu inkubasi 30 menit dengan nilai rata-rata 20,4%. Hal ini berbeda nyata dengan perlakuan dalam konsentrasi medium percoll 30:70% sehingga menandakan bahwa konsentrasi medium memiliki pengaruh juga pada viabilitas semen beku *post thawing*.

Nilai viabilitas semakin menurun sejalan dengan lamanya waktu inkubasi yang meningkat saat proses separasi seks. Hasil penelitian menunjukkan nilai viabilitas terendah pada perlakuan g_1t_3 yaitu pada konsentrasi medium percoll 45:90% selama waktu inkubasi 60 menit dengan nilai rata-rata 6,72% (Gambar 5).



Keterangan :

g₁t₁ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g₁t₂ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g₁t₃ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g₂t₁ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g₂t₂ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g₂t₃ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Gambar 5. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata viabilitas semen beku *post thawing*

Tabel 17. Interaksi konsentrasi medium dan waktu inkubasi terhadap nilai rata-rata viabilitas semen beku *post thawing*

Interaksi Konsentrasi Medium (g) dan Waktu Inkubasi (t)	Viabilitas <i>Post Thawing</i> (%)
g ₁ t ₁	20.40 ± 4.88 ^a
g ₁ t ₂	7.27 ± 0.95 ^e
g ₁ t ₃	6.72 ± 1.70 ^e
g ₂ t ₁	18.87 ± 3.22 ^b
g ₂ t ₂	16.87 ± 3.11 ^c
g ₂ t ₃	10.25 ± 3.22 ^d

Keterangan :

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P≤0,05)

P<0,05 menunjukkan pengaruh nyata dan P>0,05 menunjukkan pengaruh tidak nyata

g₁t₁ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g₁t₂ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g₁t₃ = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g₂t₁ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g₂t₂ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g₂t₃ = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Lama waktu inkubasi terbaik diperoleh pada waktu 30 menit. Banyak faktor dugaan penyebab variasi dari nilai viabilitas yang muncul dan faktor penurunannya. Apabila selama proses separasi seks hasil menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata antara konsentrasi medium 1 (g_1) dan 2 (g_2) sebagai medium pemisah, maka kemungkinan faktor pembekuan/ kriopreservasi dapat memengaruhi nilai viabilitas spermatozoa Y pada semen beku. Proses *thawing* dengan metode tertentu dapat memengaruhi hasil viabilitas yang selalu dikaitkan dengan motilitas individu.

Menurut Malinda *et al.* (2021) semen beku yang telah di-*thawing* memiliki metode yang berbeda tergantung dari lama waktu dan suhu *thawing* yang digunakan. Hal tersebut memengaruhi kualitas dari spermatozoa. Suhu *thawing* disesuaikan untuk mencegah kerusakan dari spermatozoa. *Thawing* dengan suhu di atas 37°C dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Suhu *thawing* akan mengubah siklus metabolisme spermatozoa menjadi lebih tinggi sehingga energi yang diperlukan juga lebih tinggi. Penelitian spermatozoa pada sapi Friesian Holstein menyatakan bahwa suhu *thawing* yang lebih tinggi mencapai 46°C dapat menurunkan persentase motilitas dan memengaruhi viabilitas spermatozoa (Putri dan Humaidah, 2022). Menurut Ristiani *et al.* (2020) menyatakan bahwa viabilitas ditentukan pada membran plasma yang utuh. Membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai pelindung organel spermatozoa serta transport elektrolit untuk metabolisme spermatozoa. Apabila membran plasma mengalami kerusakan maka akan memicu gangguan metabolisme dan fungsi fisiologis spermatozoa sehingga terjadi kematian spermatozoa yang akhirnya menurunkan nilai viabilitasnya. Keutuhan membran plasma akan sangat berkorelasi dengan motilitas spermatozoa.

5.7 Abnormalitas Semen Cair Pasca Separasi Seks

Separasi seks spermatozoa menjadi metode yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa. Kualitas tersebut selain dilihat dari motilitas dan viabilitas, juga dapat dilihat dari persentase abnormalitas yang muncul pada spermatozoa. Abnormalitas dengan nilai yang tinggi menandakan bahwa kualitas dari spermatozoa kurang baik sehingga memengaruhi tingkat fertilitas (Permana *et al.*, 2023). Tidak dijelaskan secara detail dalam SNI terkait nilai abnormalitas spermatozoa maksimum yang dapat diproses menjadi

semen beku, namun disebutkan bahwa standar abnormalitas tidak boleh lebih dari 20% baik abnormalitas primer maupun sekunder. Arifiantini dan Purwantara (2010) menyatakan bahwa dalam melanjutkan proses menjadi semen beku, maka abnormalitas spermatozoa primer diharapkan tidak lebih dari 10%.

Abnormalitas spermatozoa Y pada semen cair hasil separasi seks ditunjukkan nilai rata-rata abnormalitas pada perlakuan g_1t_1 , g_1t_2 , g_1t_3 , g_2t_1 , g_2t_2 , dan g_2t_3 berturut-turut yaitu 8,5%; 8,5%; 8,5%; 10%; 8,75%; 8,5% seperti pada Tabel 18.

Tabel 18. Rata-rata abnormalitas spermatozoa Y pasca separasi seks

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Rata-Rata abnormalitas (%)
g_1t_1	8.50 ± 1.29
g_1t_2	8.50 ± 0.57
g_1t_3	8.50 ± 1.29
g_2t_1	10.00 ± 2.58
g_2t_2	8.75 ± 0.95
g_2t_3	8.50 ± 1.91

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Abnormalitas spermatozoa Y pasca separasi seks pada hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan g_1t_1 , g_1t_2 , g_1t_3 , dan g_2t_3 memiliki nilai rata-rata abnormalitas terendah sebesar 8,50%. Berdasarkan rata-rata abnormalitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata abnormalitas spermatozoa Y pasca separasi seks dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan seperti pada Tabel 19.

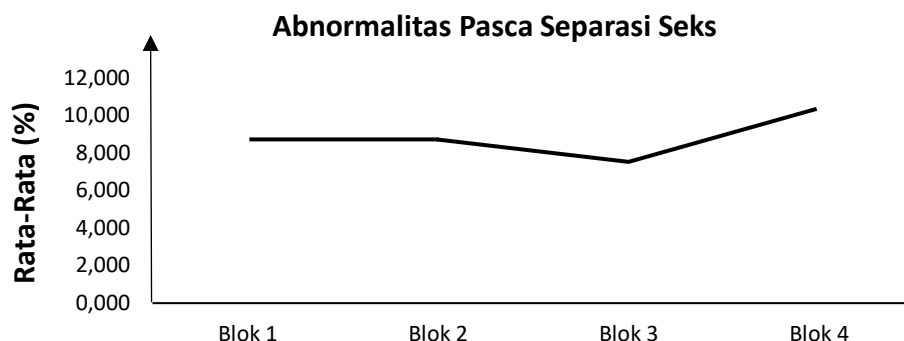
Tabel 19. Abnormalitas spermatozoa Y pasca separasi seks pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g ₁	g ₂	t ₁	t ₂	t ₃
Abnormalitas Spermatozoa Y (%)	8.50	10.00	8.50	8.50	8.50
	8.50	8.75	10.00	8.75	8.50
	8.50	8.50			
Rata-Rata	8.50 ± 0	9.08 ± 0.65	9.25 ± 0.75	8.62 ± 0.12	8.50 ± 0

g₁ = medium percoll gradien 45:90%; g₂ = medium percoll gradien 30:70%; t₁ = waktu inkubasi 30 menit; t₂ = waktu inkubasi 45 menit; t₃ = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh abnormalitas terendah pada semen cair pasca separasi seks yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 45:90% (g₁) dengan nilai rata-rata yaitu 8,5%, serta abnormalitas terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 60 menit (t₃) dengan nilai rata-rata yaitu 8,5%.

Berdasarkan standar abnormalitas tersebut, apabila dibandingkan dengan hasil penelitian menunjukkan persentase abnormalitas yang masih dalam standar aman. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan dari pengulangan kelompok perlakuan (blok) dalam proses koleksi semen terhadap jumlah abnormalitas spermatozoa pasca separasi seks ($P < 0.05$). Uji lanjut Duncan menunjukkan nilai abnormalitas terbesar yaitu pada blok 4 seperti pada gambar 6. Blok 4 memiliki perbedaan nyata dengan blok 1, 2, dan 3 ($P < 0.05$), serta diantara blok 1, 2, dan 3 tidak ada perbedaan nyata ($P > 0.05$) (Tabel 20).



Gambar 6. Ulangan (blok) terhadap rata-rata abnormalitas semen pasca separasi seks

Tabel 20. Ulangan (blok) terhadap rata-rata abnormalitas semen pasca separasi seks

Blok Ulangan	Abnormalitas Pasca Separasi Seks (%)
Blok 1	8.66 ^b
Blok 2	8.66 ^b
Blok 3	7.50 ^b
Blok 4	10.33 ^a

Keterangan :

^{a,b}. Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)
 $P < 0,05$ menunjukkan pengaruh nyata dan $P > 0,05$ menunjukkan pengaruh tidak nyata

Pengaruh ulangan menghasilkan nilai abnormalitas yang berbeda karena setiap pengulangan dalam koleksi semen berada di hari yang berbeda dengan kondisi semen yang mungkin berbeda pula kualitasnya. Kondisi ulangan (blok) 4 mengalami nilai abnormalitas terbesar dengan rata-rata nilai 10,33%, dan ulangan (blok) dengan nilai abnormalitas terendah yaitu pada blok 3 dengan rata-rata nilai 7,5%. Perbedaan abnormalitas dapat diakibatkan dari proses preparasi semen yang kurang baik, seperti suhu lingkungan yang tidak stabil, proses equilibrasi, atau dari kualitas semen segar yang memiliki nilai abnormalitas lebih tinggi sejak awal koleksi, serta kondisi stress yang meningkat seiring dengan perlakuan koleksi semen yang lebih sering. Sesuai dengan pernyataan Ardhani *et al.* (2019) bahwa nilai abnormalitas spermatozoa Y yang bervariasi disebabkan oleh beberapa faktor seperti genetik, tingkatan stres yang berbeda dari setiap individu, dan respon terhadap suhu lingkungan maupun penyakit. Menurut Sumaryadi *et al.* (2025) menyebutkan bahwa suhu lingkungan yang terjadi saat proses pengenceran semen juga mengubah permeabilitas membran dinding sel spermatozoa yang memicu kelainan spermatozoa. Peningkatan abnormalitas juga

terjadi akibat spermatozoa yang telah berada di luar tubuh akan terpisah dengan seminal plasma, dan saat proses separasi seks akan terjadi gesekan antar medium dengan membran spermatozoa sehingga mengubah struktur morfologi spermatozoa yang memicu adanya kelainan/ abnormalitas (Ama *et al.*, 2017). Secara fisik ternak juga menunjukkan bahwa tidak adanya penyakit internal yang mungkin terjadi pada ternak yang dapat memengaruhi abnormalitas spermatozoa.

5.8 Abnormalitas Semen Beku *Post Thawing*

Abnormalitas pada semen beku yang telah dicairkan (*post thawing*) pada hasil penelitian menunjukkan tidak adanya pengaruh signifikan dari konsentrasi medium percoll (g) dan lama waktu inkubasi (t) ($P>0,05$) (Lampiran 5.6). Nilai rata-rata abnormalitas dari spermatozoa Y pada perlakuan g_1t_1 , g_1t_2 , g_1t_3 , g_2t_1 , g_2t_2 , dan g_2t_3 berturut-turut yaitu 12,75%; 12,75%; 10,75%; 12,25%; 10,625%; 12% seperti pada Tabel 21 berikut. Berdasarkan nilai rata-rata tersebut, menurut SNI abnormalitas masih dalam batas maksimum yaitu $<20\%$ (SNI 4869-1: 2017). Abnormalitas spermatozoa Y semen beku *post thawing* pada hasil penelitian menunjukkan pada perlakuan g_2t_2 memiliki nilai rata-rata abnormalitas terbaik sebesar 10,62%, sedangkan nilai abnormalitas tertinggi diperoleh pada perlakuan g_1t_1 dan g_1t_2 dengan nilai rata-rata 12,75%. Berdasarkan rata-rata abnormalitas dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata abnormalitas spermatozoa Y *post thawing* dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan secara berbeda seperti pada Tabel 22. Spermatozoa yang memiliki bentuk abnormal tidak dapat membuahi ovum baik abnormalitas primer atau sekunder (Hoesni, 2017).

Tabel 21. Rata-rata nilai abnormalitas pada semen beku *post thawing*

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Abnormalitas <i>Post Thawing</i> (%)
g_1t_1	12.75 ± 1.5
g_1t_2	12.75 ± 2.21
g_1t_3	10.75 ± 1.70
g_2t_1	12.25 ± 1.70
g_2t_2	10.62 ± 0.75
g_2t_3	12.00 ± 2.94

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Tabel 22. Abnormalitas spermatozoa Y *post thawing* pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g_1	g_2	t_1	t_2	t_3
Abnormalitas Spermatozoa Y (%)	12.75	12.25	12.75	12.75	10.75
	12.75	10.62	12.25	10.62	12.00
	10.75	12			
Rata-Rata	12.08 ± 0.94	11.62 ± 0.71	12.5 ± 0.25	11.68 ± 1.06	11.37 ± 0.62

Keterangan :

g_1 = medium percoll gradien 45:90%; g_2 = medium percoll gradien 30:70%; t_1 = waktu inkubasi 30 menit; t_2 = waktu inkubasi 45 menit; t_3 = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh abnormalitas terendah pada semen beku *post thawing* yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g_2) dengan nilai rata-rata yaitu $11,62 \pm 0,71\%$, serta abnormalias terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 60 menit (t_3) dengan nilai rata-rata yaitu $11,375 \pm 0,62\%$. Bentuk abnormalitas pada hasil penelitian umumnya terlihat bagian ekor spermatozoa yang melingkar atau membengkok, serta selubung akrosom yang lepas dari kepala tanpa ekor. Abnormalitas pada semen beku tidak dipengaruhi baik dari konsentrasi medium percoll yang digunakan ataupun dari lama waktu inkubasi. Hal ini menjadikan abnormalitas spermatozoa yang muncul pada semen beku *post thawing*

diduga disebabkan faktor lain seperti proses separasi seks, lingkungan, dan proses kriopreservasi.

Hal ini sejalan dengan yang disampaikan oleh Afiati *et al.* (2015) bahwa abnormalitas primer terjadi karena faktor keturunan atau pengaruh lingkungan yang buruk, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi saat proses kriopreservasi spermatozoa. Selain itu dapat diduga dari perlakuan saat mewarnai semen untuk membuat preparat ulas pada *object glass*. Menurut (Garin *et al.*, 2015) dalam hasil penelitiannya menggunakan metode *thawing* berbeda, menyatakan bahwa *thawing* dengan suhu 5°C selama 30 detik memiliki nilai abnormalitas tertinggi yaitu sebesar $22,6 \pm 1,07\%$ dan tidak layak untuk diinseminasikan. Hal ini menunjukkan bahwa suhu *thawing* yang lebih rendah dapat merusak morfologi dari spermatozoa meskipun dalam waktu yang sesuai standar. Abnormalitas sendiri dapat terjadi karena kesalahan preparasi dan ejakulasi.

5.9 Konsentrasi Spermatozoa pada Semen Cair Pasca Separasi Seks

Semen cair pasca separasi seks menghasilkan konsentrasi spermatozoa Y yang berbeda-beda. Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh disesuaikan dengan bahan pengencer yang ditambahkan untuk dosis inseminasi yang tepat. Konsentrasi juga dipengaruhi dari proses separasi seks yang berbeda-beda termasuk jenis medium yang digunakan. Menurut Simbolon *et al.* (2024) kualitas spermatozoa pasca separasi seks menggunakan medium percoll tetap terjaga kualitasnya termasuk konsentrasi spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada konsentrasi spermatozoa dari variabel yang diujikan ($P > 0,05$). Nilai rata-rata konsentrasi spermatozoa Y pada semen cair pasca separasi seks pada perlakuan g_1t_1 , g_1t_2 , g_1t_3 , g_2t_1 , g_2t_2 , dan g_2t_3 berturut-turut yaitu $32,25 \times 10^7$ sel/ml; $29,25 \times 10^7$ sel/ml; $29,75 \times 10^7$ sel/ml; $29,25 \times 10^7$ sel/ml; 29×10^7 sel/ml; $29,25 \times 10^7$ sel/ml seperti pada Tabel 23.

Tabel 23. Rata-rata konsentrasi spermatozoa Y pada semen cair pasca separasi seks

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Konsentrasi Spermatozoa pada Semen Pasca Separasi Seks ($\times 10^7$ sel/ml)
g_1t_1	32.25 ± 3.5
g_1t_2	29.25 ± 1.5
g_1t_3	29.75 ± 2.5
g_2t_1	29.25 ± 2.21
g_2t_2	29.00 ± 2.58
g_2t_3	29.25 ± 1.70

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Berdasarkan rata-rata konsentrasi dari kombinasi perlakuan, maka dapat diperoleh nilai rata-rata konsentrasi spermatozoa Y pasca separasi seks dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan seperti pada Tabel 24.

Tabel 24. Konsentrasi spermatozoa Y pasca separasi seks pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g_1	g_2	t_1	t_2	t_3
Konsentrasi Spermatozoa Y (10^7 sel/ml)	32.25	29.25	32.25	29.25	29.75
	29.25	29.00	29.25	29.00	29.25
	29.75	29.25			
Rata-Rata	30.41 ± 1.31	29.16 ± 0.11	30.75 ± 1.5	29.12 ± 0.12	29.5 ± 0.25

Keterangan :

g_1 = medium percoll gradien 45:90%; g_2 = medium percoll gradien 30:70%; t_1 = waktu inkubasi 30 menit; t_2 = waktu inkubasi 45 menit; t_3 = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh konsentrasi tertinggi dari spermatozoa Y semen cair pasca separasi seks yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 45:90% (g_1) dengan nilai rata-rata yaitu $30,41 \pm 1,31 \times 10^7$ sel/ml, serta konsentrasi terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 30 menit (t_1) dengan nilai rata-rata yaitu $30,75 \pm 1,5 \times 10^7$ sel/ml. Penelitian menghasilkan bahwa konsentrasi medium (g) dan lama waktu

inkubasi (t) tidak memiliki pengaruh apapun pada konsentrasi spermatozoa pasca separasi seks ($P>0,05$) seperti yang tercantum dalam lampiran 5.7. Penurunan konsentrasi spermatozoa pasca separasi seks dapat disebabkan oleh sentrifugasi gradien percoll yang memicu kerusakan spermatozoa melalui pelepasan plasma mani dan berkurangnya perlindungan terhadap membran sperma (Sumaryadi *et al.*, 2025) sehingga menimbulkan jumlah kematian spermatozoa yang lebih banyak dan menurunkan jumlah konsentrasinya.

Proses separasi seks dilakukan dengan memenuhi waktu inkubasi terlebih dahulu sehingga memberikan kesempatan bagi spermatozoa untuk menempati medium pemisah yang sesuai antara spermatozoa X maupun spermatozoa Y. Menurut Takdir dan Biantara (2017) prinsip saat proses inkubasi terjadi pergerakan pada spermatozoa X dan Y menempati fraksi medium yang sesuai berdasarkan perbedaan struktur dan ukuran kepala spermatozoa. Spermatozoa Y memiliki pergerakan yang lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa X sehingga mampu bermigrasi ke lapisan medium dengan waktu inkubasi lebih cepat. Penelitian Simbolon *et al.* (2024) menyatakan bahwa separasi seks spermatozoa dengan sentrifugasi gradien percoll menggunakan prinsip perbedaan massa jenis dan ukuran kepala spermatozoa. Massa jenis spermatozoa Y lebih ringan sehingga saat sentrifugasi akan menetap pada lapisan atas. Saat proses sentrifugasi, akan terbentuk lapisan paling atas berupa supernatan dan banyak mewakili konsentrasi spermatozoa Y yang lebih tinggi (Utami *et al.*, 2025). Supernatan yang dibuang dapat mengindikasikan pengurangan jumlah konsentrasi spermatozoa akibat banyaknya spermatozoa yang mati mengapung terbangun bersama supernatan.

5.10 Konsentrasi Spermatozoa pada Semen Beku *Post Thawing*

Konsentrasi spermatozoa dipengaruhi kondisi ternak seperti mengikuti perkembangan seksual, kualitas pakan, kesehatan alat reproduksi, umur ternak, dan besar testis (Rosnizar *et al.*, 2021). Konsentrasi spermatozoa selama proses pasca separasi seks tidak dipengaruhi oleh konsentrasi medium maupun lama waktu inkubasi. Hasil tersebut sama seperti hasil konsentrasi semen beku *post thawing* bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan dari konsentrasi medium dan lama waktu inkubasi ($P>0,05$) seperti yang terlampir pada analisis variansi di Lampiran 5.8. Nilai rata-rata konsentrasi

spermatozoa Y pada semen beku *post thawing* dalam perlakuan g_1t_1 , g_1t_2 , g_1t_3 , g_2t_1 , g_2t_2 , dan g_2t_3 berturut-turut yaitu $5,50 \times 10^7$ sel/ml; $5,45 \times 10^7$ sel/ml; $5,02 \times 10^7$ sel/ml; $5,15 \times 10^7$ sel/ml; $5,20 \times 10^7$ sel/ml; $5,57 \times 10^7$ sel/ml seperti pada Tabel 25.

Tabel 25. Rata-rata konsentrasi spermatozoa Y pada semen beku *post thawing*

Perlakuan (Spermatozoa Y)	Konsentrasi Spermatozoa pada Semen Beku <i>Post Thawing</i> (10^7 sel/ml)
g_1t_1	5.50 ± 1.01
g_1t_2	5.45 ± 0.54
g_1t_3	5.02 ± 0.57
g_2t_1	5.15 ± 0.26
g_2t_2	5.20 ± 0.33
g_2t_3	5.57 ± 0.34

Keterangan :

g_1t_1 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 30 menit; g_1t_2 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 45 menit; g_1t_3 = medium percoll gradien 45:90% + inkubasi 60 menit; g_2t_1 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 30 menit; g_2t_2 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 45 menit; g_2t_3 = medium percoll gradien 30:70% + inkubasi 60 menit

Konsentrasi spermatozoa juga dapat ditentukan sesuai dengan banyak pengencer yang digunakan. Saat proses kriopreservasi maka semen cair pasca separasi seks dimasukkan ke dalam *straw* semen domba yang masing-masing berisi volume 0,25 ml dengan konsentrasi per *straw* minimal 50 juta sel.

Berdasarkan rata-rata konsentrasi dari kombinasi perlakuan, maka diperoleh rata-rata konsentrasi spermatozoa Y pada semen beku *post thawing* dari masing-masing konsentrasi medium gradien percoll dan waktu inkubasi yang digunakan seperti pada Tabel 26.

Tabel 26. Konsentrasi spermatozoa Y *post thawing* pada masing-masing konsentrasi medium dan waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Medium (g)		Waktu Inkubasi (t)		
	g_1	g_2	t_1	t_2	t_3
Konsentrasi Spermatozoa Y (10^7 sel/ml)	5.5 5.45 5.02	5.15 5.2 5.57	5.5 5.15	5.45 5.2	5.02 5.57
Rata-Rata	5.5 ± 0.26	5.15 ± 0.22	5.5 ± 0.24	5.45 ± 0.17	5.02 ± 0.38

Keterangan :

g_1 = medium percoll gradien 45:90%; g_2 = medium percoll gradien 30:70%; t_1 = waktu inkubasi 30 menit; t_2 = waktu inkubasi 45 menit; t_3 = waktu inkubasi 60 menit

Hasil menunjukkan dari masing-masing faktor perlakuan diperoleh konsentrasi tertinggi dari spermatozoa Y semen beku *post thawing* yaitu pada konsentrasi medium gradien percoll 30:70% (g_2) dengan nilai rata-rata $5,15 \pm 0,18 (10^7 \text{ sel/ml})$, serta konsentrasi terbaik diperoleh dari lama waktu inkubasi 30 menit (t_1) dengan nilai rata-rata yaitu $5.5 \pm 0.17 (10^7 \text{ sel/ml})$.

Proses *thawing* semen beku juga memengaruhi penurunan dari konsentrasi spermatozoa hasil separasi seks. Hal ini dapat disebabkan ketika proses pemisahan spermatozoa X dan Y dengan pemisahan lapisan atas dan bawah kurang berjalan baik, sehingga banyak populasi spermatozoa yang tersisa pada lapisan atas yang seharusnya mulai turun menuju lapisan bawah (Fatahilah *et al.*, 2017). Menurut Herdiawan (2004) konsentrasi sperma memiliki korelasi positif dengan angka konsepsi. Kualitas spermatozoa seperti volume, konsentrasi, dan motilitas spermatozoa akan menentukan jumlah dosis untuk inseminasi dari jumlah pengencer yang diberikan. Konsentrasi penting digunakan untuk memenuhi dosis IB melalui *straw* semen tanpa adanya kehilangan sel. Jumlah konsentrasi sperma dapat dipengaruhi saat proses kriopreservasi. Pembekuan dilakukan bertahap untuk memperlambat aktivitas metabolisme spermatozoa dan menghindari terjadinya *cold shock*. Konsentrasi spermatozoa yang terlalu pekat dapat berimbas dalam mengurangi aktivitas dari metabolisme spermatozoa (Saha *et al.*, 2022).

VI. PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Secara simultan bahwa konsentrasi gradien medium percoll dan waktu inkubasi memengaruhi kualitas spermatozoa Y berupa motilitas dan viabilitas semen pasca separasi seks dan *post thawing*. Kualitas semen relatif sama pada kedua konsentrasi medium (45:90% dan 30:70%), namun untuk mengetahui kualitas spermatozoa Y terbaik cenderung dilakukan pada konsentrasi gradien medium percoll 45:90% dengan lama waktu inkubasi 30 menit. Perolehan proporsi spermatozoa berkromosom Y tertinggi juga dapat dilakukan pada waktu inkubasi 45 menit dengan hasil proporsi mencapai 79%.

6.2 Saran

Proses koleksi semen, separasi seks spermatozoa, dan kriopreservasi lebih diperhatikan kondisi lingkungan dan suhu saat inkubasi, equilibrasi, maupun *post thawing*. Secara aplikatif dalam memperoleh kualitas spermatozoa Y yang tinggi sebaiknya dilakukan separasi seks spermatozoa menggunakan gradien medium percoll 45:90% dan lama waktu inkubasi 30 menit. Secara ilmu sains disarankan penelitian mendatang dapat dilakukan perlakuan inkubasi 0 menit (tanpa inkubasi) dan 30 menit pada separasi seks spermatozoa menggunakan sentrifugasi medium percoll. Konsentrasi spermatozoa yang rendah dapat menggunakan dosis ganda untuk keperluan inseminasi sehingga diperoleh anakan domba sesuai yang diinginkan.