

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang Perbedaan Kualitas Semen Segar Domba Batur dalam *Flock Mating* dan *Pen Mating* secara Mikroskopis ini dilaksanakan pada tanggal 27 Maret sampai dengan 1 Mei 2016 di KTT Manunggal Mandiri, Desa Batur, Kecamatan Batur, Kabupaten Banjarnegara, Jawa Tengah.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen dari 8 ekor pejantan domba Batur dengan 4 ekor untuk perlakuan *flock mating* dan 4 ekor untuk perlakuan *pen mating* yang berumur 2 - 3 tahun atau *poel* 1 - 2 dengan memiliki ciri fisik perawakan baik, garis punggung lurus, kondisi wool baik, kondisi alat reproduksi baik yaitu memiliki testis yang simetris. Bahan yang digunakan yaitu larutan eosin 0,2% yang digunakan dalam pemeriksaan konsentrasi, larutan eosin 2% digunakan dalam pembuatan preparat untuk pengamatan persen hidup dan abnormalitas spermatozoa, NaCl 0,9% sebagai pengencer, vaselin digunakan sebagai pelicin pada vagina buatan saat melakukan penampungan semen. Alat yang digunakan dalam penelitian ini untuk proses penampungan semen segar yaitu vagina buatan, tabung penampung bervolume, pompa untuk memompa vagina buatan yang sudah diberi air hangat, termos digunakan untuk menyimpan air panas, thermometer digunakan untuk mengukur suhu air yang akan dimasukkan ke dalam vagina buatan. Alat yang digunakan pada saat pemeriksaan semen segar

yaitu mikroskop, *object glass*, *cover glass*, *haemocytometer* digunakan untuk menghitung konsentrasi spermatozoa, bunsen digunakan untuk memfiksasi preparat ulas, pipet untuk mengambil semen, eosin 2%, eosin 0,2% dan NaCl fisiologis 0,9%.

3.2. Metode

Penelitian observasional dilakukan dalam 2 tahap yaitu tahap pertama persiapan dan tahap kedua pelaksanaan dan pengambilan data. Tahap pertama pengambilan sampel percobaan yaitu memilih pejantan domba Batur yang berumur 2 - 3 tahun atau *poel* 1 - 2, dengan ciri fisik tubuh tegap, memiliki perawakan yang baik, kondisi wool bagus, kondisi alat reproduksi normal, testis simetris, tidak terlalu gemuk dan tidak terlalu kurus. Tahap kedua pelaksanaan dan pengambilan data yaitu melakukan penampungan semen dan pemeriksaan kualitas semen segar secara mikroskopis terhadap 8 ekor domba Batur yang memiliki ciri fisik fisik tubuh tegap, memiliki perawakan yang baik, kondisi wool bagus, kondisi alat reproduksi normal, testis simetris. Setelah pemilihan ternak percobaan terpilih dilanjutkan pemberian perlakuan pemeliharaan secara *pen mating* dan *flock mating* selama 20 hari dan setelah 20 hari dilakukan penampungan semen segar dan pemeriksaan secara mikroskopis, pada pejantan dalam *pen mating* dilakukan pencampuran dengan betina yang sedang birahi selama 7 hari kemudian dilakukan penampungan semen segar setelah 7 hari pencampuran dan melakukan pemeriksaan semen segar secara mikroskopis. Tahapan yang dilakukan untuk mengetahui

kualitas mikroskopis semen segar meliputi tahap penampungan semen dan tahap pemeriksaan semen segar.

- a. Tahap penampungan, metode yang dilaksanakan pada tahap penampungan yaitu melakukan persiapan alat penampungan seperti vagina buatan, tabung penampung, pompa, air panas, air dingin, termometer dan vaselin. Tahap awal yang dilakukan yaitu mencampur air panas dengan air dingin hingga mencapai suhu 60°C - 65°C kemudian memberi tekanan udara pada vagina buatan menggunakan pompa dengan tekanan sedang sehingga gland penis masih mudah masuk pada vagina buatan, memberi vaselin pada vagina buatan. Melakukan persiapan ternaknya yaitu dengan menempatkan pejantan pada kandang yang akan digunakan untuk mengawinkan, setelah peralatan penampungan siap digunakan dan penampung siap di dalam kandang kemudian memasukan betina kedalam kandang kawin dan dilakukan *handling* agar tenang saat dinaiki pejantan, membiarkan terjadi *false mount* agar semen yang dihasilkan berkualitas baik, menunggu pejantan melakukan *mounting* dan mengarahkan *gland* penis ke vagina buatan kemudian melihat apakah sudah terjadi ejakulasi atau belum dan jika belum mengulangi penampungan.
- b. Tahap pemeriksaan semen segar, metode yang dilaksanakan pada tahap pemeriksaan semen segar adalah melakukan persiapan alat pemeriksaan sebelum melakukan penampungan, setelah penampungan semen berhasil dilakukan segera dibawa ke ruang pemeriksaan dan melakukan pemeriksaan. Tahap pemeriksaan kualitas mikroskopis semen segar meliputi pemeriksaan gerak

massa, motilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa, persen hidup spermatozoa dan abnormalitas spermatozoa.

1. Gerak massa

Metode yang dilakukan pada pengamatan parameter gerak massa dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen pada *object glass* kemudian menempatkan pada mikroskop dengan perbesaran 10×10 dan melakukan penilaian dengan cara melihat gerakan massa spermatozoa dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. Sangat baik dengan nilai (+++) yang artinya bentuk spermatozoa seperti kebulan awan hitam yang tebal dan mampu bergerak pindah dengan cepat seperti waktu akan turun hujan.
- b. Baik dengan nilai (++) yang artinya kondisi bentuk spermatozoa seperti awan tipis, memiliki gerakan yang kurang jelas dan lamban.
- c. Cukup dengan nilai (+) yang artinya bentuk spermatozoa secara kelompok tidak terlihat hanya gerakan individu spermatozoa.
- d. Buruk (N) kondisi spermatozoa yang buruk yaitu tidak terlihat gerakan sperma secara individual.

2. Gerak individu

Metode yang dilakukan dalam pengamatan gerak individu yaitu dengan cara meletakkan semen pada *object glass*, kemudian meneteskan NaCl fisiologi 0,9% dan ditutup menggunakan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40×10 . Mengamati pergerakan spermatozoa yang memiliki pergerakan *progressive motility* atau memiliki kemampuan untuk bergerak aktif

kedepan dengan melihat 10 lapangan pandang. Metode penilaian yang dilakukan pada pengamatan yaitu menggunakan penilaian berupa persen dari 0 - 100%.

3. Konsentrasi spermatozoa

Metode yang dilakukan untuk mengetahui konsentrasi spermatozoa yaitu melakukan pengamatan dan perhitungan menggunakan alat yang disebut *Haemocytometer Improved Neubauer* dengan melakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 40×10 . Metode perhitungan menggunakan *Haemocytometer* dilakukan dengan cara mengisi pipet eritrosit dengan semen segar yang belum diencerkan sampai tanda 0,5 kemudian menambahkan larutan eosin 0,2% sampai pada skala 1,01. Kemudian campuran tersebut dikocok dengan metode pengocokan angka 8 yang dilakukan selama 2 - 3 menit. Membuang beberapa tetes, kemudian satu tetes diletakkan di bawah *cover glass* pada kamar hitung sel darah merah. Sel-sel spermatozoa didalam lima kamar dihitung dengan arah diagonal, dalam setiap kamar terdapat 16 ruangan kecil maka untuk lima kamar terdapat 80 ruangan kecil dengan volume pada setiap ruangan kecil sebesar $0,1 \text{ mm}^3$ dan pengenceran sebanyak 200x. Rumus perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan dengan rumus :

$$X \times \frac{400}{80} \times \frac{200}{0,1} = X \times 10.000/\text{mm}^3 = X \times 10 \text{ juta/ml}$$

Keterangan :

X = Jumlah spermatozoa pengamatan dalam 5 kotak besar

400 = Total kotak kecil dalam kamar hitung

80 = Jumlah kotak kecil dalam 5 kotak besar

200 = Pengenceran 200 kali

0,1 = Volume kotak hitung (mm^3)

4. Persen hidup spermatozoa

Metode yang dilakukan dalam perhitungan jumlah sperma yang hidup yaitu dengan melakukan pewarnaan semen menggunakan pewarna eosin 2% kemudian membuat preparat ulas dengan mengeringkan di atas api, kemudian melakukan pengamatan dibawah mikroskop. Melakukan perhitungan terhadap jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna eosin atau tetap berwarna bening, sedangkan pada sperma yang mati akan memiliki warna merah. Perhitungan spermatozoa yang hidup dilakukan pada perbesaran mikroskop 40 X 10. Rumus perhitungan persen hidup spermatozoa sebagai berikut:

$$\% \text{ Spermatozoa Hidup} = \frac{\text{Jumlah sperma tidak terwarnai}}{\text{Total sperma yang dihitung}} \times 100\%$$

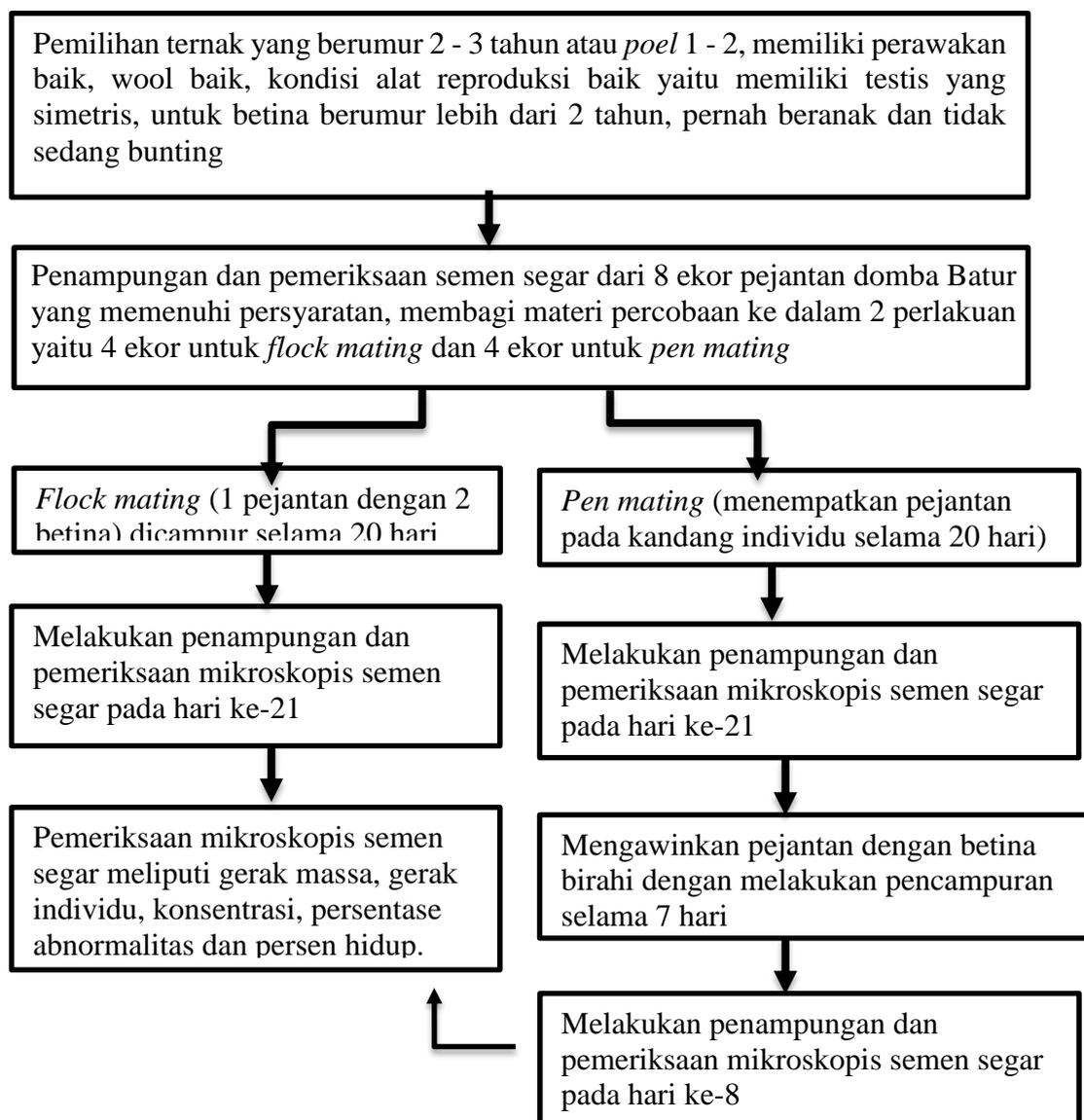
5. Abnormalitas spermatozoa

Metode yang dilakukan pada perhitungan abnormalitas spermatozoa yaitu dilakukan dengan cara meneteskan sedikit semen pada *object glass* kemudian ditetesi dengan eosin 2%, dibuat preparat ulas menggunakan *object glass* yang baru dan melakukan fiksasi menggunakan bunsen sampai preparat benar-benar kering, setelah preparat kering kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop. Pewarnaan eosin digunakan untuk mengamati bentuk spermatozoa yang tidak normal. Pengamatan abnormalitas dilakukan di bawah mikroskop yang memiliki perbesaran 10 x 40. Penilaian morfologi spermatozoa dilakukan dengan melihat keabnormalan yang terjadi pada morfologinya yang ditentukan dari kondisi kepala yang terlalu besar, kepala terlalu kecil, kepala bercabang atau memiliki kepala

ganda, ekor terlalu panjang atau terlalu pendek, ekor bercabang atau memiliki ekor ganda. Rumus perhitungan nilai abnormalitas spermatozoa:

$$\% \text{ Sperma Abnormal} = \frac{\text{Jumlah sperma abnormal}}{\text{Total sperma yang dihitung}} \times 100\%$$

Skema penelitian dapat dilihat pada ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Skema Penelitian

3.2.1. Hipotesis penelitian

$H_0 : \tau_1 = \tau_2$ (Pemeliharaan secara *flock mating* dan *pen mating* tidak berpengaruh terhadap kualitas mikroskopis semen segar domba Batur).

$H_1 : \text{paling sedikit ada satu } \tau_1 \neq \tau_2$ (Pemeliharaan *flock mating* atau *pen mating* berpengaruh terhadap kualitas mikroskopis semen segar domba Batur).

3.2.2. Parameter pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah gerak massa, motilitas, konsentrasi, persen hidup spermatozoa dan abnormalitas spermatozoa.

3.2.3. Hipotesis penelitian

Sistem perkawinan secara *pen mating* memiliki kualitas semen yang lebih baik dibandingkan dengan sistem perkawinan secara *flock mating*.

3.2.4. Analisis data

Analisis data yang digunakan untuk parameter motilitas, persen hidup, konsentrasi dan abnormalitas dilakukan uji normalitas kemudian dilanjutkan menggunakan uji F maksimal untuk data yang menunjukkan kenormalan dilanjutkan untuk data yang menerima H_0 akan dilakukan *t-test* asumsi ragam tidak sama sedangkan data yang menerima H_1 dilakukan *t-test* asumsi ragam sama, gerak massa menggunakan uji median (Djarwanto, 2003).