

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 7 Maret – 19 April 2016, bertempat di Balai Pembibitan dan Budidaya Ternak Non Ruminansia (BPBTNR) Provinsi Jawa Tengah di Kota Surakarta.

3.1. Materi

Materi yang digunakan adalah 32 ekor kelinci betina dari bangsa New Zealand White umur 6 bulan – 2 tahun, bobot badan 1,6-3,0 kg. Selain itu digunakan pula 2 ekor kelinci jantan dari bangsa New Zealand White umur 6 bulan-2 tahun, bobot badan 1,6-3,0 kg, sudah pernah mengawini, memiliki libido tinggi, dan memiliki catatan reproduksi baik.

Kelinci penelitian dipelihara pada kandang individu. Pakan kelinci berupa bekatul diberikan pukul 07.00 WIB, jerami kacang tanah diberikan pukul 12.00 WIB, dan pelet diberikan pukul 15.00 WIB. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Kandang dibersihkan setiap pagi pukul 07.00 WIB dan sore pukul 15.00 WIB. Sisa pakan dibuang pada saat pembersihan kandang di pagi hari.

Alat yang digunakan antara lain vagina buatan, tabung penampung semen, mikroskop, pipet tetes, kertas label, *object glass*, *cover glass*, *hemocytometer*, bunsen, pH indikator, Beaker glass, spuit, kateter, aluminium foil, handuk dan alat tulis. Bahan-bahan pendukung antara lain adalah eosin 2%, eosin 0,2%, aquabidest, NaCl 0,9%, dan HCG.

3.2. Metode

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan dua perlakuan dan dua kelompok (Mas, 2009). Perlakuan pertama (T0) untuk kelinci NZW yang dikawinkan secara alami, dan perlakuan kedua (T1) untuk kelinci NZW yang dikawinkan secara inseminasi buatan. Pengelompokan ini berdasarkan indikator status fisiologis ternak, kelompok pertama untuk kelinci dara (P0) dan kelompok kedua untuk kelinci induk (P1).

Setiap perlakuan terdiri dari 16 ekor kelinci NZW (8 ekor kelinci dara dan 8 ekor kelinci induk). Pejantan yang digunakan berjumlah 2 yang merupakan pejantan terbaik dari 6 pejantan yang sudah dievaluasi semennya baik secara makroskopis maupun mikroskopis.

3.2.1. Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dua tahap. Tahap pertama yaitu seleksi kelinci induk dan tahap kedua adalah seleksi kelinci pejantan. Pada tahap pertama, kriteria kelinci induk yang dipilih adalah kelinci dari bangsa NZW yang memiliki bobot badan 1,6-3,0 kg, umur 6 bulan-2 tahun dan sehat. Jumlah kelinci induk yang dipakai sebanyak 32 ekor yang diseleksi dari 600 ekor kelinci.

Pada tahap kedua, kriteria kelinci jantan yang dipilih adalah dari bangsa NZW yang sudah pernah mengawini dan memiliki bobot badan 1,6-3,0 kg, umur 6 bulan-2 tahun, sehat, memiliki libido tinggi, memiliki catatan reproduksi yang baik dan memiliki kualitas semen yang baik pada saat pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.

Kualitas semen kelinci diketahui melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Semen kelinci ditampung terlebih dahulu sebelum dilakukan pemeriksaan. Proses penampungan dilakukan di didalam kandang kelinci jantan dengan menggunakan kelinci betina sebagai pemancing. Pada saat kelinci pejantan terangsang, pejantan akan menaiki betina, pada saat pejantan ereksi, vagina buatan disorongkan kearah penis pejantan hingga terjadi ejakulasi, sebelumnya vagina buatan yang sudah dipasangkan pada tabung penampung diisi air hangat dengan suhu 39°-41°C dan diolesi pelicin serta ditutup kain pada bagian tabung penampung. Penampungan semen dilakukan pada ejakulasi pertama.

Pemeriksaan makroskopis terdiri dari pengukuran volume, bau, warna, pengukuran PH dan memeriksa kekentalan. Volume semen kelinci yang tertampung dapat langsung terbaca pada tabung penampungan semen yang berskala (Irwansyah, 2015). Volume juga dapat digunakan dalam menentukan jumlah sperma per ejakulasi bila dikalikan dengan konsentrasi. Bau, warna dan kekentalan dinilai sebelum pengukuran pH. Indikator pH yang digunakan adalah pH *paper*. Semen berkualitas baik biasanya lebih condong ke asam (pH rendah) daripada semen dengan konsentrasi spermatozoa yang rendah (Lestari, 2013).

Pemeriksaan mikroskopis terdiri dari gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi, mortalitas dan abnormalitas. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan bantuan alat mikroskop. Gerakan massa diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen segar ke dalam *object glass* lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Gerakan massa semen kelinci dinilai dalam persentase.

Gerakan individu diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen segar ke

dalam *object glass* lalu meneteskan satu tetes NaCl 0,9% kemudian ditutup dengan *cover glass* dan mengamatinya di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Gerakan individu semen kelinci dinilai dalam persentase.

Konsentrasi semen kelinci diukur dengan menghitung jumlah spermatozoa dalam satu ml semen. Langkah dalam pengukuran ini yaitu dengan menyedot semen kelinci dengan pipet eritrosit sampai angka 0.5, lalu menyedot larutan eosin 0,2% dengan menggunakan pipet eritrosit yang sama sampai angka 1.01, menutup kedua ujung pipet eritrosit dengan tangan dan mengocoknya membentuk angka 8 selama 3 menit, membuang 2 tetes semen dengan cara membuka salah satu ujung pipet yang dekat dengan angka 0.5 lalu meneteskannya pada bilik hitung yang sudah ditutup dengan *cover glass*, menghitung jumlah sperma yang ada pada bilik hitung dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Bilik hitung terdapat 25 kotak besar dan dalam 1 kotak besar terdapat 16 kotak kecil dengan volume pada setiap kotak kecil sebesar 0,1 mm³ dan pengenceran sebanyak 200 kali. Jumlah spermatozoa dihitung pada 5 kotak besar. 4 kotak besar berada pada setiap pojok kotak dan 1 kotak besar yang berada di tengah kotak. Metode perhitungannya adalah Y spermatozoa yang terdapat pada 5 kotak besar tersebut. Sperma yang dihitung adalah sperma yang tidak melewati batas kotak dan tidak pada batas kotak. Rumus perhitungan konsentrasi spermatozoa menurut Kartasudjana (2001) yaitu:

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

Keterangan:

Y = Jumlah spermatozoa pengamatan dalam 5 kamar

- 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)

Mortalitas merupakan perhitungan kematian spermatozoa yang dinyatakan dalam persen. Spermatozoa yang mati memiliki ciri-ciri berwarna merah muda hingga merah jika dicampur dengan larutan eosin, sedangkan spermatozoa hidup tidak berwarna. Cara membuat preparat untuk perhitungan mortalitas sperma yaitu, meletakkan satu tetes semen ke *object glass* lalu meneteskan satu tetes larutan eosin 0,2+2% ke *object glass* yang sama dan mencampurnya, mengulas campuran tersebut pada *object glass* dengan menggunakan *object glass* lain yang diarahkan maju dengan sudut 30^0 , mengeringkan ulasan lalu mengamatnya dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa hidup dan spermatozoa mati dihitung jumlahnya. Perhitungan jumlah spermatozoa yang hidup dan mati minimal 200 spermatozoa. Mortalitas didapatkan dari membandingkan jumlah spermatozoa mati dengan spermatozoa terhitung dan dinyatakan dalam persen.

Abnormalitas merupakan perhitungan spermatozoa yang tidak normal dan dinyatakan dalam persen. Preparat yang digunakan adalah preparat yang sama yang digunakan dalam perhitungan mortalitas sperma. Jumlah antara sperma yang normal dan tidak normal minimal 200 sperma. Spermatozoa abnormal bisa dilihat dari bentuk morfologi spermatozoa itu sendiri, yaitu kepala terlalu besar atau kecil, ekor putus, ekor bercabang, ekor melingkar. Rata-rata kualitas semen kelinci jantan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas Semen Kelinci New Zealand White

Kualitas Semen	Jumlah
Makroskopis	
Volume ejakulat (ml)	0,8
Warna	Putih
Bau	Amis
Kekentalan	Kental
PH	7,6
Mikroskopis	
Gerakan massa (%)	70
Gerakan individu (%)	70
Konsentrasi (10^7)	76,5
Mortalitas (%)	6,25
Abnormalitas (%)	7,25

3.2.2. Prosedur penelitian

Sebelum perkawinan, dilakukan induksi ovulasi pada semua kelinci penelitian. Waktu yang tepat untuk induksi ovulasi adalah 5-6 jam sebelum dilakukan kawin alam dan inseminasi buatan. Hormon yang digunakan adalah *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) secara intravena dengan dosis 30 IU/ekor.

Perkawinan secara alami, induk kelinci yang estrus dimasukkan ke dalam kandang kelinci jantan dan dibiarkan untuk dikawini pejantan. Ciri-ciri perkawinan terjadi adalah jika pejantan menjatuhkan tubuhnya dengan posisi penis masih melakukan penetrasi ke vagina (kopulasi). Setelah terjadi dua kali perkawinan, induk dikembalikan ke kandangnya.

Pada perkawinan secara inseminasi buatan dilakukan melalui 3 tahap yaitu penampungan semen kelinci, pengenceran semen, dan inseminasi buatan. Proses penampungan dilakukan di dalam kandang dengan menggunakan kelinci betina

sebagai pemancing. Pada saat kelinci pejantan terangsang, pejantan akan menaiki betina, pada saat pejantan ereksi, vagina buatan disorongkan ke arah penis pejantan hingga terjadi ejakulasi, sebelumnya vagina buatan yang sudah dipasangkan pada tabung penampung diisi air hangat dengan suhu 39°-41°C dan diolesi pelicin serta ditutup kain pada bagian tabung penampung. Penampungan semen dilakukan pada ejakulasi pertama.

Pengenceran dilakukan dengan perbandingan 1:4 untuk semen : pengencer. Bahan pengencer yang digunakan adalah NaCl fisiologis 0,90%, karena larutan ini memiliki tekanan osmotik yang ekuivalen dengan darah. Dosis yang digunakan untuk inseminasi buatan pada kelinci NZW adalah 0,5 cc/ekor dengan konsentrasi sperma sebesar 75×10^7 sel spermatozoa/ml.

Inseminasi buatan dilakukan 5 jam setelah penyuntikan hormon HCG. Semen cair hasil pengenceran diisap dengan kateter khusus yang dirancang untuk ternak kelinci sebanyak 0,5 cc, kemudian kateter dimasukkan ke dalam vagina dengan ujung yang membengkok diarahkan ke punggung induk kelinci, setelah bagian yang membengkok masuk, kateter diputar 180° dan terus didorong secara hati-hati sampai menyentuh serviks uteri. Selanjutnya semen cair disemprotkan perlahan-lahan dan kateter ditarik keluar.

3.2.3. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati yaitu persentase kebuntingan, lama bunting, *litter size*, dan bobot lahir. Persentase kebuntingan diperoleh dari perbandingan jumlah

induk yang bunting dengan jumlah induk yang dikawinkan dan dinyatakan dalam persen. Rumus persentase kebuntingan adalah sebagai berikut.

$$\% \text{ Kebuntingan} = \frac{\text{jumlah induk bunting}}{\text{jumlah induk yang dikawinkan}} \times 100\%$$

Lama kebuntingan dinyatakan dalam hari dan dihitung mulai pada hari kelinci dikawinkan sampai pada hari kelinci melahirkan. *Litter size* dinyatakan dalam ekor dengan cara menghitung jumlah anak yang lahir. Bobot lahir kelinci didapatkan dengan cara menimbang anak kelinci satu persatu kemudian dijumlahkan dan dibagi jumlah anak yang lahir, bobot lahir dinyatakan dengan gram. Cara menimbang anak kelinci yaitu, pertama kotak melahirkan yang berisi anak kelinci dikeluarkan dari kandang, lalu anak kelinci ditimbang satu persatu.

3.3. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini ada tiga yaitu analisis deskriptif, *independent sample t-test*, dan uji Mann-Whitney u-test. Parameter persentase kebuntingan dianalisis dengan analisis deskriptif. Parameter lama bunting dan litter size dianalisis dengan *independent sample t-test* dan Mann-Whitney u-test, Mann-Whitney u-test di sini digunakan untuk menganalisis pengaruh status fisiologis terhadap lama bunting dan litter size yang dikawinkan secara inseminasi buatan saja, untuk data lainnya menggunakan analisis *independent sample t-test*. Parameter bobot lahir dianalisis dengan *independent sample t-test*. Ada 3 syarat dalam analisis *independent sample t-test* yaitu 1) data harus berdistribusi normal; 2) kedua sampel yang digunakan independent; 3) data

numerik. Uji normalitas data, *uji independent t-test*, dan uji Mann-Whitney u-test dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS 16. Misbahudin dan Hasan (2013) menyatakan bahwa prosedur dalam uji statistik *independent sample t-test* ini adalah sebagai berikut:

a. Menentukan formulasi hipotesisnya

Hipotesis yang digunakan adalah

H_0 = Tidak adanya pengaruh perbedaan sistem perkawinan terhadap lama bunting, litter size dan bobot lahir kelinci NZW

H_1 = Adanya pengaruh perbedaan sistem perkawinan terhadap lama bunting, litter size, dan bobot lahir kelinci NZW

b. Menentukan taraf nyata (α) dan t tabel

Taraf nyata yang digunakan biasanya 5% (0,05). Nilai t tabel memiliki derajat bebas (db) = $n_1 + n_2 - 1$.

c. Menentukan kriteria pengujian

1) Untuk H_0 : tidak ada perbedaan positif antara lama bunting, litter size, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_1 : ada perbedaan positif antara lama bunting, litter size, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_0 : diterima (H_1 ditolak) apabila $t_0 \geq t$

H_1 : diterima (H_0 ditolak) apabila $t_0 < t$

2) Untuk H_0 : tidak ada perbedaan negatif antara lama bunting, litter size, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_1 : ada perbedaan negatif antara lama bunting, *litter size*, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_0 : diterima (H_1 ditolak) apabila $t_0 \geq -t$

H_1 : diterima (H_0 ditolak) apabila $t_0 < -t$

3) Untuk H_0 : tidak ada perbedaan antara lama bunting, *litter size*, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_1 : ada perbedaan antara lama bunting, *litter size*, bobot lahir kelinci yang dikawinkan secara alami dan inseminasi buatan

H_0 : diterima (H_1 ditolak) apabila $-t_{\alpha/2} \leq t_0 \leq t_{\alpha/2}$

H_1 : diterima (H_0 ditolak) apabila $t_0 > t_{\alpha/2;(db)}$ atau $t_0 < -t_{\alpha/2}$

4) Menentukan nilai uji statistik (nilai t_0)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sum X_1^2 - \frac{(\sum X_1)^2}{n_1} + \sum X_2^2 - \frac{(\sum X_2)^2}{n_2}}{n_1 + n_2 - 2}} \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right)}$$

5) Membuat kesimpulan

Menyimpulkan H_0 diterima atau di tolak