

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Kelompok Tani Ternak (KTT) Manunggal IV Dusun Wawar Lor, Desa Bedono, Kecamatan Jambu, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Pelaksanaan penelitian dari persiapan, pelaksanaan dan pengumpulan data dilaksanakan pada bulan Maret – Juni 2016.

3.1. Materi

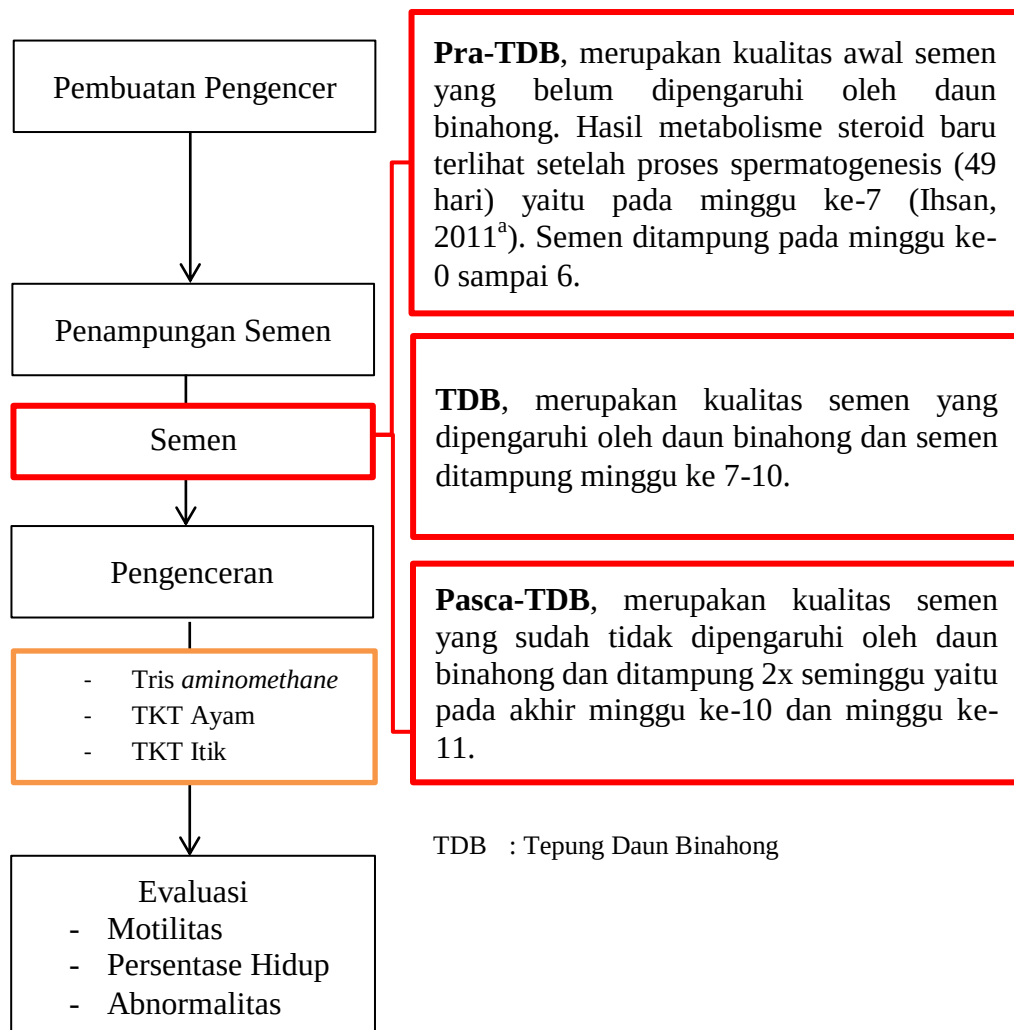
Materi yang digunakan adalah semen segar dari kambing PE yang diberi pakan tambahan tepung daun binahong 43,9 mg/kgBB/hari (T_1) dan diberi tepung daun binahong 87,8 mg/kgBB/hari (T_2). Perlakuan dalam penelitian adalah semen segar hasil penampungan masing-masing diencerkan dengan Tris *aminomethane*, TKT Ayam dan TKT Itik.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kertas saring untuk memisahkan kuning telur dengan membran vitelin, timbangan untuk menimbang bahan-bahan pengencer, batang pengaduk untuk mengaduk pengencer agar homogen, tabung reaksi sebagai tempat pengenceran semen, *object glass* dan *deck glass* untuk pembuatan preparat ulas dan pengamatan motilitas, pipet untuk mengambil semen dan cairan lainnya, bunsen untuk mengeringkan preparat, *handtally counter* untuk menghitung jumlah spermatozoa, mikroskop untuk mengamati spermatozoa. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Tris

(*hydroxymethyl*) *aminomethane*, telur ayam dan itik, alkohol 96%, asam sitrat, fruktosa, penisilin, streptomisin, akuabides, eosin 2% dan NaCl fisiologis 0,9%.

3.2. Metode

Metode penelitian ini meliputi beberapa tahap yaitu pembuatan pengencer, penampungan semen, pengenceran dan evaluasi semen secara mikroskopis (motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa) (Ilustrasi 3).



Ilustrasi 3. Diagram Tahapan Penelitian

1.2.1. Parameter pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu kualitas semen secara mikroskopis yang terdiri dari motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa.

1.2.2. Pembuatan pengencer

Pembuatan pengencer dilakukan 3 hari sebelum penampungan semen. Pembuatan pengencer tris kuning telur dimulai dengan menyiapkan bahan-bahan pengencer seperti Tris *aminomethane*, asam sitrat, fruktosa, penisilin, streptomisin, kuning telur ayam dan itik dengan komposisi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Pengencer Tris Kuning Telur (Kaka, 2011)

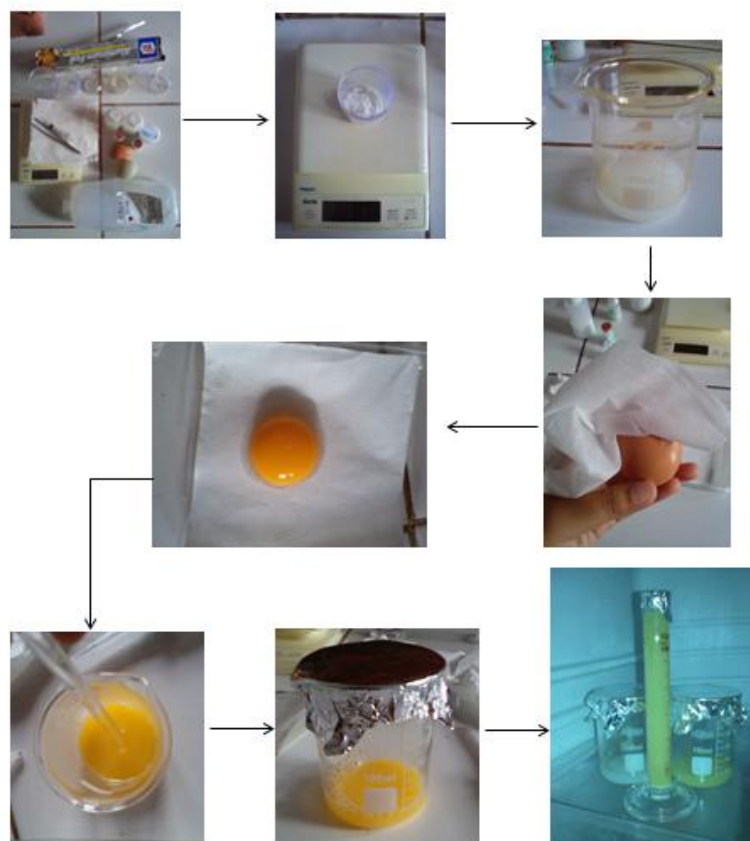
Bahan	Komposisi
Tris (<i>hydroxymethyl</i>) <i>aminomethane</i> (g)	3,634
Asam sitrat (g)	1,99
Fruktosa (g)	0,35
<i>Penicilin</i> (g)	1
<i>Streptomycin</i> (g)	1
Akuabides (ml)	100
Kuning telur (ml)	20

Bahan-bahan pengencer ditimbang sesuai komposisi. Kemudian larutan *buffer* dibuat dengan mencampur 3,634 g kristal Tris (*hydroxymethyl*) *aminomethane*, 1,99 g asam sitrat, 0,35 g fruktosa dan larutkan dengan 80 ml akuabides. Larutan antibiotik dibuat dengan komposisi 1 g penisilin dan 1 g streptomisin yang dilarutkan dalam 10 ml akuabides. Kemudian larutan *buffer* dan antibiotik dicampur hingga homogen, kemudian 20 ml kuning telur ayam dan itik

dimasukkan pada masing-masing larutan *buffer* antibiotik. Larutan pengencer diaduk hingga homogen, ditutup menggunakan *aluminium foil* dan disimpan pada *refrigerator* selama 3 hari (Ilustrasi 4).

3.2.2. Pengenceran semen

Pengenceran semen dilakukan setelah pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar. Pengenceran semen menggunakan tiga tabung reaksi dimana pada setiap tabung berisi satu tetes semen segar dan empat tetes pengencer. Penambahan pengencer dilakukan dengan perbandingan 1 : 4, yaitu satu tetes semen dan empat tetes pengencer (Lukman, 2003).



Ilustrasi 4. Alur Pembuatan Pengencer Tris Kuning Telur

Semen segar yang sudah dievaluasi dimasukkan ke dalam masing-masing tabung pengencer dengan memiringkan tabung reaksi dan memasukkannya secara perlahan melewati dinding-dinding tabung. Kemudian dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa.

3.2.3. Evaluasi kualitas semen

3.2.3.1. Motilitas. Motilitas spermatozoa dievaluasi dengan menggunakan *object glass* yang ditetesi 1 tetes semen yang telah diencerkan dan 1 tetes NaCl fisiologis 0,9% serta ditutup dengan *deck glass*. Kemudian diamati menggunakan mikroskop perbesaran 100x. Spermatozoa yang motil akan nampak bergerak maju ke depan, sedangkan sperma yang diam, mundur, bergerak melingkar dan tidak bergerak dianggap mati.

3.2.3.2. Persentase Hidup. Perhitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan teknik pewarnaan menggunakan semen yang ditambah larutan pewarna *eosin* 2%. Sebanyak satu tetes semen dicampurkan dengan satu tetes larutan pewarna eosin lalu dibuat preperat ulas dan dikeringkan. Spermatozoa yang mati ditandai dengan warna merah pada kepala sperma, sedangkan yang hidup bewarna putih. Kemudian dihitung dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persentase spermatozoa hidup} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{sperma yang diamati}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3.2.3.3. Abnormalitas. Abnormalitas spermatozoa diamati sejalan dengan pengamatan persentase hidup spermatozoa. Preparat yang digunakan sama dengan preparat ulas untuk persentase hidup dan mati spermatozoa. Spermatozoa yang tidak normal dapat diketahui dari kepala yang terlalu besar atau terlalu kecil, kepala bercabang, ekor terlalu panjang atau pendek, ekor putus dan tidak memiliki ekor. Preparat tersebut diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Kemudian dihitung dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persentase spermatozoa abnormal} = \frac{\text{Jumlah sperma abnormal}}{\text{Sperma yang diamati}} \times 100\% \dots\dots(2)$$

3.3. Analisis Data

Parameter yang telah diamati dalam penelitian ini kemudian dihitung menggunakan uji-t (*t-test*). Rumus uji-t menurut Mas (2009) :

- Uji-t

$$\text{Untuk CV} < 30\% : t \text{ hitung} = \frac{|\bar{X1} - \bar{X2}|}{Sg \sqrt{\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}}} \longrightarrow Sg = \sqrt{\frac{(n1-1)S1^2 + (n2-1)S2^2}{(n1+n2)-2}}$$

$$\text{Untuk CV} \geq 30\% : t \text{ hitung} = \frac{|\bar{X1} - \bar{X2}|}{\sqrt{\frac{S1^2}{n1} + \frac{S2^2}{n2}}}$$

Keterangan :
 CV : Koefisiens Varian
 $\bar{X}$: Rata – rata sampel
 n : Jumlah sampel
 S : Ragam atau Varians