

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan bulan Februari – Maret 2016 di Desa Bocor, Kecamatan Buluspesantren, Kabupaten Kebumen, Jawa Tengah. Penelitian diawali dengan survey untuk mengetahui karakteristik sapi Kebumen dan sistem pemeliharaannya selanjutnya memilih sapi yang akan dijadikan objek penelitian.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen hasil dari penampungan pejantan sapi PO Kebumen sebanyak 2 ekor yang berumur 2 tahun. Masing-masing ternak ditampung semennya kemudian semen yang sudah tertampung dilakukan pengenceran.

Bahan yang digunakan sebagai pengencer adalah sari kedelai (supernatan), larutan Tris-*Buffer* yang terdiri dari Tris (*hydroxymethyl*) *aminomethane*, fruktosa, asam sitrat, antibiotik (*penicilin* dan *streptomycin*), *aquabidest*, bahan yang digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis NaCl fisiologis 0,9% dan eosin 2%. Alat yang digunakan untuk penampungan semen adalah vagina buatan, KY- Jelly, corong karet, tabung reaksi untuk menampung semen, tali, selongsong kain, termos berisi air panas, termometer, kompor, panci. tambang pengikat pemancing dan sarung tangan. Alat yang digunakan untuk pembuatan pengencer antara lain tabung erlenmeyer, cawan porselin mortir, *beaker glass* atau labu ukur, termometer, pipet tetes, pengaduk, kertas saring, aluminium foil sedangkan untuk

pemeriksaan mikroskopis adalah mikroskop, tabung *eppendorf*, *object glass*, *cover glass*, pipet tetes, *beaker glass*, *hand tally counter*, bunsen, tabung reaksi, label, tisu, kamera dan alat tulis.

3.2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode analisis ekperimental, yang terdiri dari lima tahapan yaitu : rancangan penelitian, tahap persiapan penelitian, tahap penelitian, parameter yang diukur dan hipotesis penelitian.

3.2.1. Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan pengencer sari kedelai yang digunakan (T1=5%, T2=10% dan T3=15%) dan diulang sebanyak 3 kali, apabila signifikan selanjutnya dilakukan uji lanjutan Duncan. Percobaan ini menggunakan 2 ekor sapi yang berumur 2 tahun.

Model matematik yang digunakan menganalisis motilitas, persentase hidup dan abnormalitas :

$$Y_{ij} = \mu + i + ij \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

Y_{ij} = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i yang merupakan kombinasi perlakuan pengencer sari kedelai dan Tris dengan level berbeda

μ = Nilai tengah umum (rata-rata populasi) perbedaan level dalam pengencer

i = Pengaruh akibat kombinasi perlakuan pengencer sari kedelai dan Tris yang ke-i

ij = Pengaruh perlakuan galat percobaan, perlakuan ke- i penggunaan sari kedelai dan Tris pada ulangan ke- j

i = Perlakuan j = Ulangan

3.2.2. Tahap persiapan penelitian

Tahap persiapan sebelum pelaksanaan penelitian yaitu persiapan ternak, proses adaptasi ternak, persiapan alat dan bahan, pelaksanaan penampungan semen.

3.2.2.1. Persiapan ternak. Persiapan ternak diawali dengan memilih pejantan sapi Peranakan Ongole (PO) Kebumen yang berumur 2 tahun sebanyak 2 ekor, sebelum dilakukan penampungan semen, pejantan-pejantan yang akan ditampung semennya secara ditempatkan berdekatan satu sama lain pada tambatan disekitar kandang penampungan untuk meningkatkan libido dan dilakukan *exercise*. *Exercise* dilakukan dengan menempatkan pejantan pada tempat-tempat yang terkena sinar matahari dan cukup untuk gerak.

3.2.2.2. Proses adaptasi ternak. Proses adaptasi meliputi adaptasi pemacek atau *teaser* dan pejantan lain yang akan diambil semennya serta adaptasi waktu penampungan semen yang dilakukan pada pagi hari.

3.2.2.3. Persiapan alat dan bahan. Persiapan alat yang akan digunakan untuk penampungan maupun yang akan digunakan pada proses pengenceran meliputi alat dibersihkan, dicuci dan disterilkan, vagina buatan disiapkan serta alat-alat lainnya.

3.2.2.4. Pelaksanaan penampungan semen. Penampungan semen diawali dengan pejantan dinaik-turunkan ke pemancing atau *teaser* dan semen ditampung setelah pejantan mengalami *false mount* sebanyak 2 - 3 kali. Selama proses penampungan, kolektor memegang vagina buatan dengan telapak tangan kanan dengan sudut 30 - 45⁰ dan kolektor berada disebelah kanan pejantan yang akan ditampung. Ketika ereksi telah terjadi telapak tangan sebelah kiri diarahkan dan disentuh pada ujung penis ke mulut vagina buatan. Ejakulasi akan ditandai oleh suatu dorongan cepat ke depan, biarkan penis berada di dalam vagina buatan sampai pejantan menarik penisnya keluar dari vagina buatan secara perlahan.

3.2.3. Tahap penelitian

Tahap penelitian meliputi persiapan pembuatan sari kedelai, pembuatan pengencer, evaluasi semen segar, perlakuan pengenceran dan evaluasi semen cair.

3.2.3.1. Pembuatan sari kedelai. Pembuatan sari kedelai yaitu dengan Kedelai dipilih yang baik dan masih utuh, ditimbang sebanyak 10 g kemudian dicuci menggunakan air hingga bersih dan ditiriskan. Kedelai yang sudah bersih direndam kedalam air hangat sebanyak 40 ml selama 24 jam hingga kedelai mengembang dan pecah-pecah. Kedelai yang sudah direndam dan air sisa rendaman ditimbang kembali. Kemudian ditumbuk cawan porselin mortir hingga halus, diambil sebanyak 2,5 g dan dilarutkan dalam 97,5 g *aquabidest*, diaduk hingga merata kemudian disaring menggunakan kertas saring hingga didapatkan sari kedelai (supernatannya).

3.2.3.2. Pembuatan pengencer. Cara pembuatan Tris sari kedelai yaitu pertama bahan ditimbang sesuai dengan komposisi, Tris (*hydroxymethyl*) *aminomethane* sebanyak 2,98 g, asam sitrat 1,65 g, fruktosa 2 g dan dilarutkan dalam 100 ml *aquabidest* (Lampiran 1). Kedua larutan antibiotik (*penicilin* dan *streptomycin*) dibuat dengan cara 1 *flc penicilin* dan 3 *flc streptomycin* ditambahkan kedalam 30 ml *aquabidest* dan dihomogenkan (Lampiran 2). Pembuatan larutan pengencer dengan komposisi (8,5 ml Tris *buffer*, 1 ml antibiotik dan 0,5 ml sari kedelai) untuk T1 level 5%, (8 ml Tris *buffer*, 1 ml antibiotik dan 1 ml sari kedelai) untuk T2 level 10%, (7,5 ml Tris *buffer*, 1 ml antibiotik dan 1,5 ml sari kedelai) untuk T3 level 15% (Lampiran 3). Masing-masing larutan pengencer yang akan dibuat dimasukkan kedalam gelas piala kemudian dihomogenkan dan ditutup dengan alumunium foil.

3.2.3.3. Evaluasi semen segar. Pemeriksaan semen segar dilakukan setelah pejantan sapi Peranakan Ongole ditampung semennya, kemudian dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan derajat keasaman (pH), sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerak massa, motilitas, viabilitas dan mati, abnormalitas dan konsentrasi.

3.2.3.4. Perlakuan pengenceran. Pengencer yang telah disiapkan sebanyak 10 ml untuk setiap level yang terdiri dari larutan Tris *buffer*, sari kedelai dan antibiotik dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan. 3 buah tabung *eppendorf* disiapkan untuk masing-masing level (5%, 10% dan 15%), semen dan

Tris sari kedelai dicampur dengan perbandingan 1:1, dimasukkan secara perlahan semen yang sudah ditampung sebanyak 0,25 ml kemudian tambahkan dengan larutan Tris sari kedelai yang sebelumnya sudah dibuat sebanyak 0,25 ml pada masing-masing tabung.

3.2.4. Parameter yang diukur

Parameter yang diuji kualitasnya antara lain yaitu motilitas, persentase hidup dan persentase abnormalitas yang kemudian dianalisis statistika menggunakan analisis ragam (anova).

3.2.4.1. Motilitas. Pengamatan motilitas dilakukan dengan cara semen ditetaskan sebanyak 1 tetes pada gelas obyek dan ditutup dengan *cover glass*. Diperiksa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Perhitungan pergerakan dalam persen (%) dengan melihat jumlah spermatozoa yang bergerak aktif dan membandingkan dengan spermatozoa yang tidak bergerak. Pengamatan motilitas diamati setiap 15 menit untuk setiap level hingga motilitasnya 40%. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ragam (anova).

3.2.4.2. Persentase hidup. Preparat ulas dibuat tipis pada gelas obyek dengan cara sampel semen cair ditetaskan pada gelas obyek, kemudian ditambahkan setetes eosin 2% selanjutnya diaduk hingga homogen dan ulas menggunakan gelas objek yang lain membentuk sudut 45° kemudian hasilnya dikeringkan di atas api bunsen. Preparat yang sudah siap, diamati di bawah mikroskop elektrik, untuk melihat awal pemeriksaan dengan pembesaran 10 x 10 kemudian 10 x 40 lalu

amati. Sperma yang mati akan menyerap warna merah eosin, sedangkan yang hidup tidak akan menyerap warna merah tersebut. Pengamatan viabilitas hanya diamati sekali pada menit ke-1 untuk setiap sampel level.

Viabilitas spermatozoa dihitung dengan menggunakan rumus:

$$A = [P / Q] \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

keterangan:

A = Viabilitas spermatozoa

P = Jumlah spermatozoa yang tidak terwarnai

Q = Jumlah spermatozoa yang dihitung

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ragam (anova).

3.2.4.3. Abnormalitas. Abnormalitas spermatozoa diamati dengan cara preparat ulas dibuat pada gelas objek dari satu tetes semen cair yang dicampur satu tetes eosin 2%. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Mencatat semua jenis-jenis abnormalitas spermatozoa yang ditemukan. Pengamatan abnormalitas hanya diamati sekali pada menit ke-1 untuk setiap sampel level.

Persentase abnormalitas spermatozoa dihitung dengan menggunakan rumus:

$$A = [P / (P + Q)] \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

keterangan:

A = Persentase abnormalitas spermatozoa

P = Jumlah spermatozoa yang abnormal

Q = Jumlah spermatozoa yang normal

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ragam (anova).

3.2.5. Hipotesis penelitian

- a. H0 = $(\alpha\beta)_{ij} = 0$; Tidak ada pengaruh interaksi antara perbedaan level pengencer dan lama penyimpanan terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole Kebumen.
- H1 = Minimal ada satu $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$; Ada pengaruh interaksi antara perbedaan level pengencer dan lama penyimpanan terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole Kebumen.
- b. H0 = $\alpha_i = 0$; Tidak ada pengaruh perbedaan level pengencer terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole Kebumen.
- H1 = Minimal ada satu $\alpha_i \neq 0$; Ada pengaruh perbedaan level pengencer terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole Kebumen.