

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 2 Maret 2015 sampai 25 Mei 2015. Berlokasi di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, Bogor.

3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sperma sapi Freisian Holstein (FH) yang berumur ± 5 tahun hasil penampungan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, vagina buatan (minitube[®]), tabung sentrifugasi 15 mL (corning[®]), glove, corong, termometer, jelly pelicin (KY gel), pH indikator (universal indikator), *object glass* (sail brand), *cover glass* (20x20mm, assiteat), mikro pipet 10-100 μ l, 200 μ l, 5 mL (eppendorf[®]), tips, tabung reaksi kaca, parafilm (labmate[®]), *warming plate* (HT 400, minitube[®]), isotemp (fisher scientific), *hand counter*, mikroskop (olympus BH-2[®]), mikroskop Axio Vision Imager Z2 (zeiss[®]) dan aplikasi AxioVision REL 4.9.1 (zeiss[®]), laminar *air flow* (telstar BH-100[®]), inkubator (thermo scientific), *photometer* (SDM-6, minitube[®]), *filling sealing* (minitube[®]), *printing machine* (leibinger jet 2 SE, minitube[®]), *straw*, rak *straw*, *cool box*, pinset, guting *straw*, gelas ukur 50 mL dan 100 mL (iwaki[®]), erlenmeyer 50 mL dan 100 mL (iwaki[®]), *sentrifuge* (hettich EBA 20[®]).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA) *fraction V* (roche) konsentrasi 5%, 7,5% dan 10%, eosin-nigrosin 2%,

medium BO, *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOSTest) dan medium tris kuning telur (m-TKT).

3.2. Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *observational* observasi dilakukan terhadap sperma sapi FH hasil *sexing* dengan metode kolom BSA. Parameter yang diamati untuk morfometri sperma sapi FH pada tiap kolom BSA 5%, 7,5% dan 10% antara lain adalah panjang, lebar dan luas kepala sperma pada kolom BSA dengan pewarnaan *eosin-nigrosin* yang dinilai dari pengamatan mikroskopis pada mikroskop *Zeiss Imager Z.2*, kemudian menggunakan aplikasi Axio Vision REL 4.9.1 untuk mengukur morfometri spermatozoa yang meliputi panjang, lebar dan luas kepala sperma. Tahapan yang diamati pada saat pengenceran BO, equilibrasi dan PTM.

3.2.1. Rancangan percobaan

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Rancangan ini terdiri dari 4 perlakuan dan 3 ulangan. Analisis data dengan menggunakan SPSS 16. Data yang diperoleh dalam penelitian dianalisis menggunakan one-way ANOVA dengan post test uji Duncan.

3.2.2. Penampungan semen

Koleksi semen sapi FH dilakukan dengan menggunakan vagina buatan (Gambar 1) dengan membawa pejantan pemancing ke kandang jepit untuk

merangsang libido pejantan yang akan ditampung. Penampungan semen sapi FH dilakukan seminggu sekali dan ulangan 3 kali, dengan menggunakan vagina buatan yang diisi air hangat bertemperatur $40^{\circ}\text{C} - 52^{\circ}\text{C}$, tabung sentrifugasi 15 mL dipasang pada corong karet vagina buatan, kemudian dipompa sampai vagina buatan menggeembung.

Kemudian dilakukan pemberian gel pelicin pada vagina buatan dan diperiksa temperaturnya dengan termometer dan diukur tempreatur vagina buatan tersebut, apabila sapi sudah siap ditampung corong karet vagina buatan dipasang jaket vagina buatan, kemudian vagina buatan dimasukan ke penis sapi sampai ejakluasi.

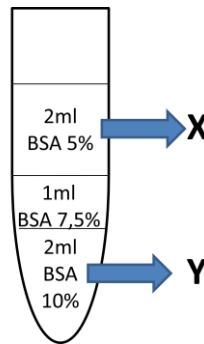


Gambar 1. Penampungan Semen Sapi Menggunakan Vagina Buatan

3.2.3. *Sexing* sperma dengan metode kolom BSA

Sexing sperma yang dilakukan menggunakan metoda kolom BSA. Kolom BSA dilarutkan dalam tabung reaksi dengan konsentrasi 10 % di kolom bawah, 7,5 % + *Phenol Red* di kolom tengah dan konsentrasi 5 % di kolom atas (Ilustrasi 1), kemudian tiap tabung ditempatkan pada rak tabung dan disimpan di dalam

water bath. Semen yang sudah diperiksa melalui evaluasi mikroskopis kemudian ditambah dengan BO, lalu ditambahkan pada masing-masing tabung kolom BSA sebanyak 1 mL semen dan dibiarkan selama 45 menit.



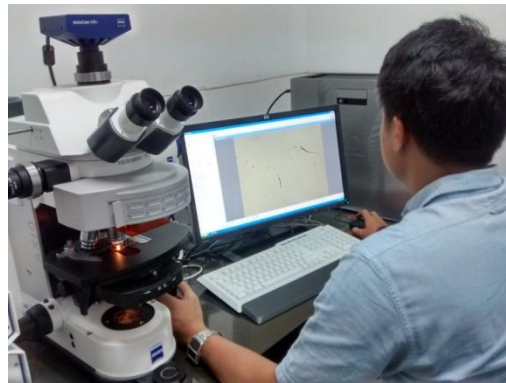
Ilustrasi 1. Kolom *Bovine Serum Albumin* pada Tabung Reaksi

Tiap kolom dipisahkan kemudian ditambahkan BO dan disentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm selama 10 menit (Kaiin *et al.*, 2005). Kolom BSA bagian atas dengan konsentrasi 5 % diprediksi mengandung sperma kromosom X dan bagian bawah dengan konsentrasi 10 % diprediksi mengandung sperma kromosom Y. Periksa kembali spermatozoa dengan pengamatan dengan melihat kualitas mikroskopis dan morfometri untuk keperluan pengenceran, pengenceran menggunakan mTKT. *Straw* diberikan label dengan alat *printing*, pengemasan sperma dilakukan menggunakan alat *filling sealing (minitube)*. *Straw* diekuilibrasikan selama 3 jam pada suhu 5 °C di dalam *cool top (minitube)*. Pembekuan *straw* yang berisi sperma pembawa kromosom X dan Y dilakukan dua tahap. *Straw* dimasukkan kedalam *styrofoam* yang telah berisi N₂ cair yang di letakkan 5 – 8 cm di atasnya selama 15 menit dan selanjutnya dengan pelan-pelan masukkan *straw* ke dalam N₂ cair dan diangkat menggunakan pinset (Affandhy *et al.*, 2007).

Straw yang telah dibekukan disimpan di dalam *container* N₂, kemudian dilakukan pemeriksaan *straw* beku pasca pembekuan atau PTM yang diambil pada *container* N₂. Proses *thawing* dilakukan dengan mencelupkan *straw* kedalam air hangat dengan suhu 37°C selama 30 detik. Pengamatan PTM dengan melihat kualitas mikroskopis dan morfometri spermatozoa.

3.2.4. Pemeriksaan morfometri spermatozoa pada tahap pengenceran BO, equilibrasi dan PTM

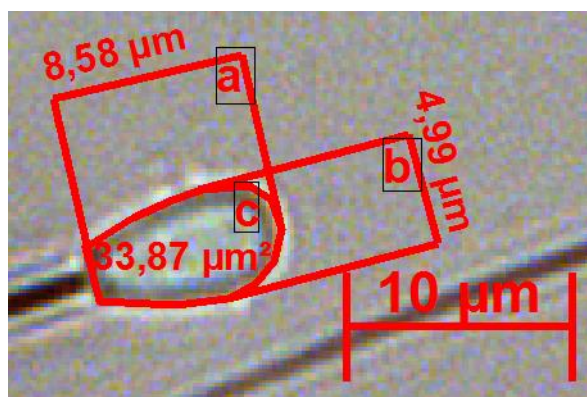
Pengamatan morfometri pada spermatozoa dilakukan pada saat pengenceran dengan menggunakan medium BO, equilibrasi dan PTM dengan pewarnaan Eosin Nigrosin kemudian diamati di bawah mikroskop *Zeiss Imager Z.2*, kemudian menggunakan aplikasi Axio Vision REL 4.9.1 untuk mengukur morfometri spermatozoa.



Ilustrasi 2. Pengukuran Morfometri Spermatozoa Menggunakan Mikroskop *Zeiss Imager Z.2* dengan Menggunakan Aplikasi Axio Vision REL 4.9.1

Sampel pewarnaan Eosin Nigrosin yang telah digunakan untuk pengamatan viabilitas dilakukan kembali untuk morfometri spermatozoa dengan menggunakan mikroskop *Zeiss Imager Z.2* dengan perbesaran 400 x, kemudian spermatozoa

diamati pengukuran morfometri dengan menggunakan aplikasi Axio Vision REL 4.9.1 (Ilustrasi 2).



Ilustrasi 3. Bagian-bagian spermatozoa yang diukur menggunakan program aplikasi AxioVision REL 4.9.1

Keterangan: a. Morfometri panjang kepala spermatozoa, b. Morfometri lebar kepala spermatozoa, c. Morfometri luas kepala spermatozoa

Sampel yang telah diletakan dibawah mikroskop selanjutnya diproses menggunakan aplikasi Axio Vision REL 4.9.1. Hal pertama yang dilakukan adalah menetapkan skala yang sesuai dengan perbesaran mikroskop yang digunakan. Sampel difoto pada tiap sisi untuk mewakili sampel yang akan dianalisis morfometri kepala spermanya, bagian yang diamati adalah bagian terpanjang, terlebar dan terluas dari kepala spermatozoa sesuai Ilustrasi 3. Berikut pengukuran morfometri sperma yang diambil: panjang kepala sperma – jarak antara titik persimpangan kepala dengan bagian titik tengah dan titik terjauh di bagian kepala sperma, lebar kepala sperma – jarak antara titik terjauh yang terletak di kepala sperma, diukur tegak lurus dengan sumbu panjang kepala sperma, luas kepala sperma – merupakan area yang dibatasi oleh bagian luar kepala sperma pada gambar mikroskop (Banaszewska *et al.*, 2009).

Bearden and Fuquay (1984) memberi batasan tentang ukuran besar kepala spermatozoa sapi, panjang kepala spermatozoa sebesar 8 – 10 μm , lebar kepala 4 – 5 μm dan besar kepala spermatozoa sebesar 35 - 40 μm . Berdasarkan hasil penelitian Pratiwi *et al.* (2006) menjelaskan hasil pengukuran luas kepala spermatozoa setelah pengenceran dan sentrifugasi bahwa fraksi bawah yang diprediksikan sebagai spermatozoa Y (calon pedet jantan) menunjukkan ukurannya lebih kecil $22,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$ daripada fraksi atas $28,7 \pm 2,7 \mu\text{m}$ yang diprediksikan sebagai spermatozoa X (calon pedet betina). Karakteristik morfometri meliputi panjang kepala, lebar kepala, panjang ekor bagian tengah, panjang ekor utama dan panjang total sperma dari 50 spermatozoa per sampel (Arifiantini *et al.*, 2006).

3.2.5. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis

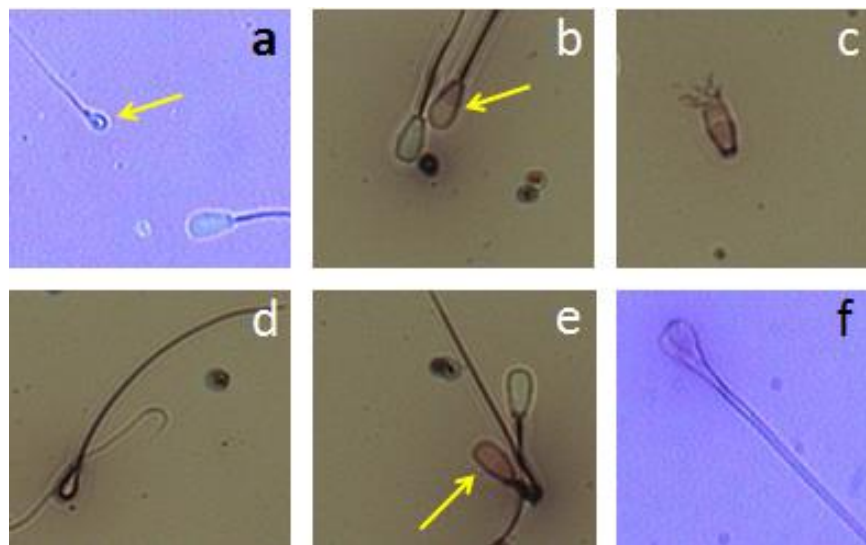
Tujuan pemeriksaan semen secara makroskopis dan mikroskopis adalah untuk mengetahui apakah semen layak untuk dilakukan proses *sexing* spermatozoa. Pengamatan semen secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, bau dan pH. Volume semen dapat diketahui dengan melihat volume semen yang tertampung pada tabung sentrifugasi. Warna semen dapat diamati dengan cara visual. Konsistensi semen diamati dengan cara memiringkan tabung penampung apakah gerakan semen bergerak cepat atau perlahan. Bau semen dapat diamati dengan cara menghirup bau di sekitar mulut tabung. pH dapat diamati dengan menggunakan pH meter.

Pengamatan semen secara mikroskopis dilakukan 3 kali yaitu pada saat semen ditambahkan pengencer BO, equilibrasi dan PTM. Pengamatan dilakukan

dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x dan 400 x meliputi gerakan massa, motilitas, persentase hidup (viabilitas), persentase abnormal, persentase MPU. Pengamatan morfometri sperma menggunakan mikroskop Zeiss *Imager Z.2* dengan aplikasi Axio VISION REL 4.9.1 untuk mengukur panjang, lebar dan luas sperma.

3.2.6. Pemeriksaan persentase abnormalitas

Pemeriksaan persentase abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan 10 μ L semen dan 20 μ L *eosin-nigrosin* pada gelas objek dan dilakukan di bawah mikroskop dengan lensa pembesaran 400x dan dihitung sampai 200 sel.



Ilustrasi 4. Contoh Abnormal Spermatozoa

Keterangan: a. Sperma kepala kecil (*microcephalic*); b. Sperma Kepala besar (*macrocephalic*); c. Sperma tanpa ekor; d. Sperma tanpa kepala; e. Sperma ekor abnormal; f. Sperma kepala abnormal

Parameter abnormalitas spermatozoa menurut Putra *et al.* (2012) yaitu abnormalitas primer seperti kepala tanpa ekor, ekor ganda, *macrocephalus*,

microcephalus dan ekor melingkar, serta abnormalitas sekunder meliputi tidak ada ekor atau kepala, ekor melipat dan ekor rusak (Ilustrasi 4). Rumus % abnormal spermatozoa:

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

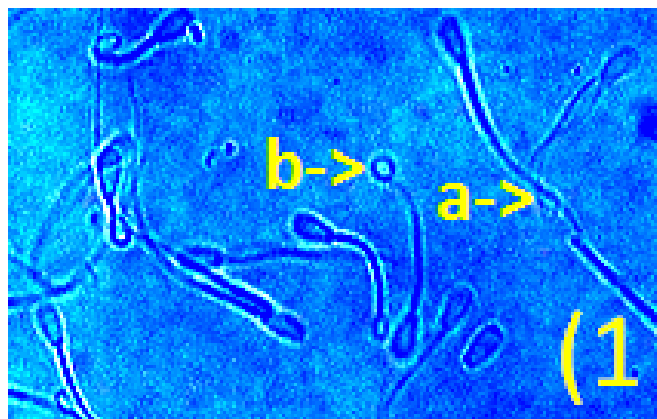
A= Persentase Abnormal

P= Jumlah spermatozoa yang abnormal

Q= Jumlah spermatozoa yang normal

3.2.7. Pemeriksaan persentase MPU

Pemeriksaan persentase MPU dilakukan dengan metode Purwoistri *et al.* (2013) yang telah dimodifikasi dengan cara memasukan 20 µL semen ke dalam mikrotube yang berisi larutan HOS test sebanyak 200 µL.



Ilustrasi 5. Contoh Reaksi MPU Spermatozoa

Keterangan: a. Sperma yang memiliki Membran Plasma tidak utuh;
b. Sperma yang memiliki Membran Plasma utuh

Inkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C, kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 400x. Keutuhan plasma membran ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar (Ilustrasi 5). Rumus % MPU:

$$X = [Y/(Y+Z)] \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

X= Persentase Membran Plasma Utuh (MPU)

Y= Jumlah spermatozoa dengan ekor melingkar

Z= Jumlah spermatozoa dengan ekor lurus