

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai evaluasi kualitas semen beku sapi Brahman *post thawing* di dataran rendah bertempat di Poskeswan Tayu Kabupaten Pati dan dataran tinggi bertempat di kelompok ternak Desa Kejajar Kabupaten Wonosobo dilaksanakan pada bulan Oktober-November 2016 dan di Laboratorium Genetika, Pemuliaan, dan Reproduksi, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

#### 3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah *mini straw* (0,25 ml) semen beku sapi Brahman dengan kode 40411 sebanyak 80 *straw* (motilitas 40%) yang berasal dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Sidomulyo, Ungaran, Semarang. Alat dan bahan yang digunakan meliputi alat dan bahan untuk menyimpan semen beku, yaitu *container* ukuran 5 liter yang berisi nitrogen cair dengan suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ , alat-alat untuk *thawing* yaitu pinset untuk mengambil *mini straw* dari *container*, gelas untuk tempat *thawing*, pemanas air, *thermometer* untuk mengukur suhu air *thawing*, dan *timer* untuk menghitung lama waktu *thawing*, sedangkan bahan yang digunakan yaitu semen beku/*mini straw* dan air.

Pemeriksaan kualitas semen meliputi motilitas, persen hidup, dan abnormalitas sel sperma menggunakan alat-alat antara lain : mikroskop untuk mengamati sperma secara mikroskopis, gunting untuk memotong *mini straw*, kaca

objek untuk meletakkan semen, kaca penutup untuk menutup semen pada kaca objek, kertas tisu untuk mengelap *mini straw*, membersihkan kaca objek dan kaca penutup, korek api dan lampu bunsen untuk membuat preparat apus serta *hand tally counter* untuk menghitung jumlah sel sperma, sedangkan bahan yang digunakan yaitu semen beku/*mini straw*, pewarna eosin 2% dan spiritus.

### 3.2. Metode

Metode penelitian eksperimental dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) berpola faktorial  $2 \times 4$  dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama (A) adalah perbedaan suhu lingkungan di dataran rendah dan dataran tinggi yang terdiri dari :

T1 = dataran rendah                      T2 = dataran tinggi

Faktor kedua (B) adalah lama *thawing* yang berbeda yaitu :

P1 = 20 detik                              P2 = 30 detik

P3 = 40 detik                              P4 = 50 detik.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan

Tempat <i>Thawing</i>	Lama <i>Thawing</i> (37°C)			
	20 (P1)	30 (P2)	40 (P3)	50 (P4)
	------(detik)-----			
Dataran rendah (T1)	T1P1U1	T1P2U1	T1P3U1	T1P4U1
	T1P1U2	T1P2U2	T1P3U2	T1P4U2
	T1P1U3	T1P2U3	T1P3U3	T1P4U3
Dataran tinggi (T2)	T2P1U1	T2P2U1	T2P3U1	T2P4U1
	T2P1U2	T2P2U2	T2P3U2	T2P4U2
	T2P1U3	T2P2U3	T2P3U3	T2P4U3

T1P2 dan T2P2 merupakan Standar Operasional Prosedur (SOP) pelaksanaan *thawing*

Selanjutnya untuk melihat pengaruh metode *thawing* sesuai dengan kondisi nyata yang ada di lapangan maka dilakukan pengamatan kualitas semen beku sesuai metode *thawing* inseminator di lapangan dan dibandingkan dengan kualitas semen beku sesuai SOP pelaksanaan *thawing* (suhu 37°C selama 30 detik). Sehingga diperoleh:

$x_i$  = metode *thawing* sesuai SOP

$x'_i$  = metode *thawing* inseminator di lapangan

Metode *thawing* yang digunakan inseminator di dataran rendah yaitu dengan air biasa/air keran (suhu air 27°C) selama 3 sampai dengan 5 menit (3,5; 4 dan 4,5 menit). Sedangkan di dataran tinggi *thawing* dilakukan dengan menggunakan air hangat (suhu air 29°C) selama 30 menit sampai dengan 1 jam (35, 40, dan 45 menit).

Tabel 2. Metode *Thawing* Inseminator di Lapangan

Tempat	<i>Thawing</i>	
	Suhu --(°C)--	Lama --(menit)--
Dataran Rendah	27	3,5
	27	4,0
	27	4,5
Dataran Tinggi	29	35,0
	29	40,0
	29	45,0

Variabel penelitian yang diamati adalah :

1. Motilitas sel sperma
2. Persen hidup sel sperma
3. Abnormalitas sel sperma

Prosedur penelitian meliputi tahap persiapan, tahap perlakuan, tahap pengambilan data dan tahap pengolahan data. Persiapan yang dilakukan meliputi pengadaan alat dan bahan, pengadaan *mini straw* dengan kode *batch straw* yang sama agar semen yang digunakan merupakan semen yang ditampung dari pejantan yang sama dengan kualitas yang sama. Penyimpanan semen beku disimpan di dalam *container* berisi nitrogen cair dengan suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Setiap seminggu sekali dilakukan *refilling* nitrogen cair agar volume nitrogen cair tidak kurang dari  $2/3$  *container* dan semen tetap terendam nitrogen.

Tahap perlakuan dilaksanakan dengan melakukan *thawing* dengan air hangat pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan perlakuan kedua faktor yang berbeda sesuai rancangan penelitian. Perlakuan *thawing* sesuai SOP pada T1P2 dan T2P2 dibandingkan dengan perlakuan sesuai metode *thawing* inseminator di lapangan dataran rendah dan dataran tinggi.

Pengambilan data dilakukan setelah semen beku *dithawing*. Data yang diambil adalah motilitas sel sperma (%), persen hidup sel sperma (%) dan abnormalitas sel sperma (%). Data pemeriksaan motilitas sperma diambil dengan meneteskan semen di atas kaca objek, menutupnya dengan kaca penutup, dan mengamati menggunakan mikroskop. Penilaian motilitas sel sperma dilakukan dengan menggunakan pengamatan gerak individu. Gerakan sel sperma dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran  $40 \times 10$ . Persentase sel sperma yang pergerakannya progresif maju ke depan dibandingkan dengan yang tidak bergerak dan dinyatakan dalam persen (%), penilaian yang diberikan berkisar antara 0 sampai dengan 100%.

Pemeriksaan persen hidup sperma dilakukan dengan meneteskan satu tetes semen di atas kaca objek dan ditambahkan dengan satu tetes pewarna eosin 2%, campurkan secara perlahan semen dengan zat pewarna eosin menggunakan kaca objek steril yang lain, usapkan sedikit semen yang sudah tercampur eosin 2% pada kaca objek yang lainnya, usahakan setiap melakukan pengulasan dibuat setipis mungkin agar sel sperma tidak menumpuk, panaskan kaca objek pada lampu bunsen, setelah kering preparat dapat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran  $40 \times 10$ , dari  $\pm 100$  sel sperma dihitung sel sperma yang hidup/ tidak menyerap warna dan sel sperma yang mati/ menyerap warna kemudian dihitung persentasenya. Persen hidup sel sperma dapat dirumuskan sebagai berikut:

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

Pemeriksaan abnormalitas sperma dilakukan dengan mengamati preparat yang sama dengan pemeriksaan persen hidup, preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran  $40 \times 10$ . Pada  $\pm 100$  sel sperma yang diamati dihitung jumlah sel sperma abnormal kemudian membandingkannya dengan jumlah total sel sperma yang diamati. Abnormalitas sel sperma dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$\% \text{ abnormalitas sel sperma} = \frac{\text{jumlah sel sperma abnormal}}{\text{total sel sperma yang diamati}} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

Data dari variabel yang diamati diolah secara statistik menggunakan analisis ragam ANOVA (Lampiran 1), apabila hasil analisis ragam menunjukkan adanya perbedaan nyata pada taraf signifikansi 5% maka akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD). Evaluasi pembandingan kualitas semen *post*

*thawing* oleh inseminator di lapangan dan kualitas semen *post thawing* sesuai SOP menggunakan metode perbandingan *paired sample t-test*.

Model linier aditif yang digunakan menurut Steel dan Torrie (1995) adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

- $Y_{ijk}$  = Kualitas semen pada petak percobaan ke-  $k$  yang memperoleh kombinasi perlakuan  $ij$  (Faktor A ke-  $i$  dan Faktor B ke-  $j$ )
- $\mu$  = Nilai tengah umum
- $\alpha_i$  = Pengaruh aditif dari faktor A ke-  $i$
- $\beta_j$  = Pengaruh aditif dari faktor B ke-  $j$
- $(\alpha\beta)_{ij}$  = Pengaruh interaksi antara faktor A ke-  $i$  dan faktor B ke-  $j$
- $\epsilon_{ijk}$  = Pengaruh galat percobaan pada petak ke-  $k$  yang memperoleh kombinasi perlakuan faktor A ke-  $i$  dan faktor B ke-  $j$

Hipotesis statistik penelitian :

- a.  $H_0 : (\alpha\beta)_{ij} = 0$ , tidak ada pengaruh interaksi antara perbedaan suhu lingkungan dan perbedaan lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen *post thawing*.  
 $H_1$  : Minimal ada satu  $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$ , ada pengaruh interaksi antara perbedaan suhu lingkungan dan perbedaan lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen *post thawing*.
- b.  $H_0 : \alpha_i = 0$ , tidak ada pengaruh perbedaan suhu lingkungan terhadap kualitas semen *post thawing*.  
 $H_1$  : Minimal ada satu  $\alpha_i \neq 0$ , ada pengaruh perbedaan suhu lingkungan

terhadap kualitas semen *post thawing*.

c. H0 :  $\beta_j = 0$ , tidak ada pengaruh perbedaan lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen *post thawing*.

H1 : Minimal ada satu  $\beta_j \neq 0$ , ada pengaruh perbedaan lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen *post thawing*.

Kriteria pengujian adalah sebagai berikut:

- a. Jika F hitung < F tabel, maka H0 diterima yang berarti tidak ada pengaruh perlakuan terhadap kualitas semen *post thawing*
- b. Jika F hitung  $\geq$  F tabel, maka H0 ditolak yang berarti ada pengaruh perlakuan terhadap kualitas semen *post thawing*.

Evaluasi kualitas semen pada hasil *thawing* oleh inseminator di lapangan dataran tinggi dan dataran rendah akan dibandingkan dengan menggunakan rumus *paired sample t-test*:

$$t = \frac{d}{sd\sqrt{n}} \dots \dots \dots (4)$$

Keterangan :

t = nilai hitung t

d = rata-rata selisih evaluasi 1 dan 2

sd = standar deviasi selisih evaluasi 1 dan 2

n = jumlah sampel

Hipotesis :

H0 =  $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ , tidak terdapat pengaruh perbedaan metode *thawing* terhadap motilitas, persen hidup, dan abnormalitas semen beku *post thawing*.

$H1 = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_n$ , terdapat pengaruh perbedaan metode *thawing* terhadap motilitas, persen hidup, dan abnormalitas semen beku *post thawing*.

Kriteria pengujian adalah sebagai berikut:

- a. Jika  $T \text{ hitung} < T \text{ tabel}$ , maka  $H_0$  diterima yang berarti tidak ada pengaruh perbedaan metode *thawing* terhadap motilitas, persen hidup, dan abnormalitas semen beku *post thawing*.
- b. Jika  $T \text{ hitung} \geq T \text{ tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak yang berarti ada pengaruh perbedaan metode *thawing* terhadap motilitas, persen hidup, dan abnormalitas semen beku *post thawing*.