

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Balai Inseminasi Buatan, Sidomulyo, Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah, dari 20 Maret hingga 27 April 2017.

#### 3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini yaitu semen segar dari 6 ekor kambing Peranakan Etawah jantan dalam kondisi sehat dan memiliki organ reproduksi normal, data dapat dilihat pada Tabel 3. Kualitas semen segar minimal memiliki kisaran volume 1,0-3,0 ml; konsentrasi  $800-3000 \times 10^9/\text{ml}$ ; motilitas 40-70% dan persentase hidup 40-70%. Hewan percobaan ditempatkan di dalam kandang individu yang dilengkapi tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa rumput Gajah dengan pemberian 10% dari bobot badan, konsentrat 1 kg/ekor/hari, serta mineral sekitar 10 gr/ekor/hari dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Tabel 3. Data Recording Ternak

No.	Nama Pejantan	Kode	Tanggal Lahir	Umur
1.	Bilowo	200928	26-April-2010	7 tahun
2.	Sentot	200936	10-Juni-2011	5 tahun 10 bulan
3.	Tejo	201139	15-Mei-2011	6 tahun 11 bulan
4.	Fredy	201550	20-April-2012	5 tahun
5.	Irawan	200932	23-Januari-2011	6 tahun 3 bulan
6.	Satrio	201243	5-Februari-2012	5 tahun 2 bulan

Bahan yang digunakan yaitu AndroMed<sup>®</sup> yang diproduksi Minitüb Germany dan Bioxcell<sup>®</sup> yang diproduksi IMV Prancis dan aquabidest untuk pengenceran semen, sedangkan bahan untuk pemeriksaan kualitas semen adalah NaCl fisiologis 0,9%, eosin-negrosin 0,2%, spiritus, dan korek gas. Peralatan yang digunakan di antaranya adalah tabung tulip, *water jacket*, *water bath*, inkubator, batang pengaduk, mikroskop cahaya, *object glass*, *cover glass*, spektrofotometer, kertas pH meter, pipet, gelas ukur, *beaker glass*, label, *cooling top*, *automatic filling and sealing machine*, *automatic freezing machine*, mini straw 0,25 ml, container nitrogen cair, *eppendorf*, bunsen, pinset, termometer, gunting, tisu, dan *handtally counter*.

### **3.2. Metode Penelitian**

Metode penelitian yang bertujuan untuk mengetahui kualitas semen beku yang diencerkan dengan AndroMed<sup>®</sup> dan Bioxcell<sup>®</sup> dibagi menjadi 3 tahap, yaitu penampungan dan evaluasi semen, pengenceran semen, dan pembuatan semen beku.

#### **3.2.1. Penampungan dan evaluasi semen**

Pengambilan data diawali dengan semen ditampung dua kali seminggu pada hari Senin dan Kamis pukul 06.00 WIB dengan menggunakan vagina buatan. Setelah penampungan, semen dievaluasi secara makroskopik yang meliputi volume, warna, pH, bau dan kekentalan, selanjutnya evaluasi mikroskopik seperti konsentrasi, gerakan massa, persentase motilitas, dan

persentase hidup. Semen yang akan diproses menjadi semen beku memiliki kriteria sebagai berikut, minimal persentase motilitas 40%, konsentrasi  $800 \times 10^6$  sel/ml, gerakan massa ++, dan persentase hidup 40%, sehingga semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen yang bukan umumnya digunakan dalam pembuatan semen beku atau semen yang memiliki kualitas yang kurang prima atau optimal.

### 3.2.2. Pengenceran semen

Semen yang telah memenuhi syarat selanjutnya dibagi dalam dua bagian, dan masing-masing diencerkan dengan AndroMed<sup>®</sup> (T1) dan Bioxcell<sup>®</sup> (T2). Pembuatan pengencer AndroMed<sup>®</sup> dilakukan dengan cara 20 ml AndroMed<sup>®</sup> (*stock salution*) dicampur dengan 80 ml aquabidest ke dalam tabung reaksi dan dihangatkan dalam *water bath* (37°C). Pembuatan pengencer Bioxcell<sup>®</sup> (*stock salution*) caranya sama dengan cara membuat pengencer AndroMed<sup>®</sup>. Komposisi bahan pengencer dapat dilihat pada Tabel 4. Cara pengenceran semen menggunakan pengencer AndroMed<sup>®</sup> dan Bioxcell<sup>®</sup> masing-masing secara terpisah dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah terisi semen secara perlahan-lahan dengan melewati dinding tabung reaksi, jumlah pengencer dihitung menggunakan rumus (1), kemudian dihomogenkan dengan cara digojlok secara perlahan-lahan.

$$\text{Rumus pengenceran} = \frac{VS \times KS \times PSM}{A} \times 0,25 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan : VS = Volume semen  
 KS = Konsentrasi spermatozoa  
 PSM = Persentase spermatozoa motil  
 A = Jumlah spermstozoa yang diinginkan

Tabel 4. Komposisi Bahan Pengencer Semen

Komposisi	Pengencer	
	T1	T2
AndroMed <sup>®</sup> (ml)	20	-
Bioxcell <sup>®</sup> (ml)	-	20
Aquabidest (ml)	80	80

### 3.2.3. Pembuatan semen beku

Semen yang telah diencerkan dengan AndroMed dan Bioxcell diekuilibrasikan pada suhu 3-5°C selama 4 jam di dalam *cooling top*. Ekuilibrasikan adalah waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menyesuaikan diri sebelum dilakukan pembekuan (Arifiantini dan Yusuf, 2012). Setelah ekuilibrasikan selesai, semen dikemas dalam *mini straw* ukuran 0,25 ml menggunakan *automatic filling and sealing machine* yang selanjutnya dilakukan pembekuan. Proses pembekuan diawali *mini straw* ditempatkan pada rak untuk dibekukan dengan uap nitrogen cair di dalam *automatic freezing machine* selama 10 menit, kemudian *mini straw* yang sudah beku dimasukkan ke dalam goblet dan kanister di dalam *container* nitrogen cair (-196°C). Proses pembuatan semen beku dilakukan sebanyak empat kali pada masing-masing semen kambing yang digunakan dengan jarak penampungan tujuh hari.

### 3.2.4. Parameter Penelitian

Dalam usaha untuk mengetahui kualitas semen yang diencerkan AndroMed<sup>®</sup> dan Bioxcell<sup>®</sup> parameternya adalah motilitas dan persentase hidup spermatozoa kambing PE.

- **Motilitas**

Pengamatan motilitas pada saat semen segar dilakukan dengan meletakkan satu tetes semen pada *object glass* dan ditambahkan NaCl fisiologis 0,9% sedangkan pada saat *post equilibration* dan *post thawing* tidak ditambahkan dengan NaCl fisiologis 0,9%, kemudian sampel semen ditutup dengan *cover glass*. Setelah itu, diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10×40 dan dilakukan oleh dua orang. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati banyak sedikitnya pergerakan progresif spermatozoa yang bergerak maju pada 5 lapang pandang yang berbeda dan dinilai dalam persentase dengan rentang 0-100%. Skor motilitas bernilai 1) < 20% jika gerakan hanya berputar di tempat; 2) 20-50% jika gerakan berayun atau melingkar; 3) 51-80% jika sperma bergerak progresif dan menghasilkan gerakan masaa; 4) 81-90% jika pergerakan progresif yang gesit dan membentuk gelombang; 5) 91-100% jika gerakan sangat progresif dan gelombang sangat cepat (Toelihere, 1993).

- **Persentase hidup**

Pengamatan persentase hidup pada saat keadaan semen segar mamupun *post equilibration* dan *post thawing* dengan cara diteteskan sebanyak satu tetes pada *object glass* dan ditambah satu tetes larutan eosin 2% lalu dihomogenkan. Selanjutnya, membuat preparat ulas pada *object glass* yang lainnya dan dipanaskan di atas bunsen. Setelah itu, preparat ulas diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10×40. Spermatozoa yang hidup akan berwarna transparan

pada bagian kepalanya sedangkan spermatozoa yang mati bagian kepalanya akan berwarna merah.

$$\% \text{ Hidup spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{total spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### 3.2.5. Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan akan dianalisis uji *paired sample t* test namun sebelumnya diuji normalitas *one-sample Kolmogorov-Smirnov* menggunakan SPSS versi 16.0. Menurut Ghozali (2006) dasar pengambilan keputusan dari *one-sample Kolmogorov-Smirnov* adalah :

1. Jika hasil *one-sample Kolmogorov-Smirnov* di atas tingkat signifikansi 0,05 menunjukkan pola distribusi normal, maka model regresi tersebut memenuhi asumsi normalitas; dan
2. Jika hasil *one-sample Kolmogorov-Smirnov* di bawah tingkat signifikansi 0,05 tidak menunjukkan pola distribusi normal, maka model regresi tersebut tidak memenuhi asumsi normalitas.

Data yang telah diuji normalitas *one-sample Kolmogorov-Smirnov* dan memenuhi asumsi normalitas, maka dilakukan uji *paired sample t* test lebih lanjut. Menurut Santoso (2010) dasar pengambilan keputusan dari uji *paired sample t* test adalah :

- Berdasarkan perbandingan t hitung dengan t tabel

1. Jika statistik hitung (angka t output) > statistik tabel (tabel t), maka  $H_0$  ditolak; dan
  2. Jika statistik hitung (angka t output) < statistik tabel (tabel t), maka  $H_0$  diterima.
    - Berdasarkan nilai probabilitas
1. Jika probabilitas (Sig. 2 tailed) > 0,05, maka  $H_0$  diterima; dan
  2. Jika probabilitas (Sig. 2 tailed) < 0,05, maka  $H_0$  ditolak.

### 3.2.6. Hipotesis

Hipotesis statistik dari penelitian ini yaitu :

$H_0$  :  $\tau_1 = \tau_2 = 0$  (tidak ada pengaruh penggunaan AndroMed<sup>®</sup> maupun Bioxcell<sup>®</sup> terhadap motilitas dan persentase hidup).

$H_1$  :  $\tau_i \neq 0$  untuk  $i = 1,2$  (ada pengaruh penggunaan AndroMed<sup>®</sup> maupun Bioxcell<sup>®</sup> terhadap motilitas dan persentase hidup).

Kriteria pengambilan keputusan hipotesis di atas adalah :

Jika t hitung  $\leq$  t tabel 5%, maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak yang artinya pengaruh perlakuan tidak berbeda nyata

Jika t hitung > t tabel 5%, maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima yang artinya pengaruh perlakuan berbeda