

## BAB III

### MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 20 Maret hingga 27 April 2017 di Balai Inseminasi Buatan, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Jawa Tengah yang bertempat di Sidomulyo Kabupaten Ungaran, Jawa Tengah.

#### 3.1. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen hasil dari penampungan Kambing Peranakan Etawah (PE) sebanyak 6 ekor yang berumur 5 – 7 tahun dalam keadaan sehat dan libido tinggi (Tabel 1). Kambing PE yang ditampung semennya adalah yang berada di BIB Ungaran dengan cara pemeliharaan yang sama dan proses pembuatan semen beku yang sama.

Tabel 1. Data *Recording* Identitas Ternak

Nama/ Kode Ternak	Tanggal Lahir	Umur
Bilowo/ 200928	26-04-2010	7 tahun
Irawan/ 200932	23-01-2011	6 tahun 3 bulan
Sentot/ 200936	10-06-2011	5 tahun 10 bulan
Fredy/ 201550	20-04-2012	5 Tahun
Tejo/ 201139	15-05-2011	6 tahun 11 bulan
Satrio/ 201243	05-02-2012	5 tahun 2 bulan

Bahan yang digunakan larutan *Hypo Osmotic Swelling* (HOS) yang merupakan campuran dari 0,9 g fruktosa, natrium sitrat 0,48 g dan aquabidestilata 100 ml, pH meter, larutan *formal-saline* yang terdiri dari NaCl fisiologis 0,9%

yang ditambahkan 1% formalin, N<sub>2</sub> cair, larutan AndroMed<sup>®</sup> yang terdiri dari *aquabidest, phospholipids, fructose, glycerol, buffers, citric acid, spectinomycin, gentamycin, tylosin* dan *lincomysin* (Minitüb,2001). Larutan Bioxcell<sup>®</sup> yang mengandung *carbohydrates, mineral salt, buffer, antioxidant, phospholipids, ultra pure water, glycerol*, dan *antibiotics (Gentamycin, Tylosin, lincomycin* dan *Spectinomycin)* (imv, 2014), label dan tissu.

Alat yang digunakan vagina buatan, tabung tulip dan protektor untuk menampung semen, inkubator, spektrofotometer yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi, dosis *straw* dan jumlah pengencer yang harus ditambahkan, *water bath*, beaker glass, tabung ukur, *cooling top* yang digunakan sebagai alat ekuilibrasi, *stopwath*, mikroskop untuk mengamati parameter mikroskopis, tabung *eppendorf*, pipet, *object glass* dan *cover glass* digunakan untuk preparat, *container* N<sub>2</sub>, Termometer, kamera, alat tulis dan *hand tally counter* untuk menghitung hasil pengamatan.

### **3.2. Metode**

Pelaksanaan penelitian dilakukan sebanyak lima tahapan yaitu : rancangan penelitian, tahap persiapan penelitian, tahap penelitian dan analisis data.

#### **3.2.1. Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Jumlah ternak yang digunakan adalah 6 pejantan kambing PE yang digunakan sebagai ulangan. Masing-masing ditampung sebanyak 4 kali (frekuensi 2 kali per Minggu). Proses pengacakan yaitu setiap penampungan dari masing-masing

kambing dibagi 2 dan masing-masing diberikan perlakuan pengencer. Pengacakan materi penelitian dapat dilihat di Tabel 2.

Tabel 2. Gambaran Pengacakan Materi Penelitian

Ulangan	Perlakuan	
	T1	T2
1	T1U1	T1U1
2	T1U2	T1U2
3	T1U3	T1U3
4	T1U4	T1U4
5	T1U5	T1U5
6	T1U6	T1U6

Ket : T1= AndroMed<sup>®</sup>; T2= Bioxcell<sup>®</sup>

### 3.2.2. Parameter yang diukur

Parameter pada penelitian ini adalah persentase Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) yang diamati mulai dari tahap evaluasi semen segar, paska ekuilibrase dan paska *thawing*.

**Membran Plasma Utuh (MPU).** Pengamatan MPU dilakukan dengan memaparkan spermatozoa pada larutan hipoosmosis. Semen yang akan diuji dicampur dengan larutan HOS dengan perbandingan 1 : 10 di dalam tabung *ependorf* dan diinkubasi selama 45 menit di suhu 37°C. Larutan HOS dan semen yang telah diinkubasi, diteteskan sebanyak 1 tetes ke *object glass*, ditutup dengan cover glass, dan dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, minimum 200 spermatozoa, dihitung secara acak dari 10 lapang pandang. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang sudah rusak ditandai dengan ekor lurus.

Membran plasma utuh dihitung dengan satuan persen (%) menggunakan rumus:

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

keterangan:

A = Membran Plasma Utuh (%)

P = Jumlah Membran Plasma Utuh

Q = Jumlah spermatozoa yang dihitung

**Tudung Akrosom Utuh (TAU).** TAU dapat diamati dengan cara mencampurkan semen yang akan diuji dengan larutan *formal saline* dengan perbandingan 1 : 4 ke dalam tabung *ependorf*, dibiarkan beberapa saat dan diteteskan diatas *object glass* lalu ditutup dengan cover glass. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop fase kontras menggunakan pembesaran 400x sebanyak 10 lapang pandang diacak dengan jumlah minimal 200 spermatozoa. Persentase TAU spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai dengan ujung kepala yang berwarna hitam apabila dipaparkan di dalam larutan NaCl fisiologi yang mengandung 1% formalin sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 40 (Rizal, 2006).

Tudung akrosom utuh dihitung dengan satuan persen (%) menggunakan rumus:

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

keterangan:

A = Tudung Akrosom Utuh (%)

P = Jumlah Tudung Akrosom Utuh

Q = Jumlah spermatozoa yang dihitung

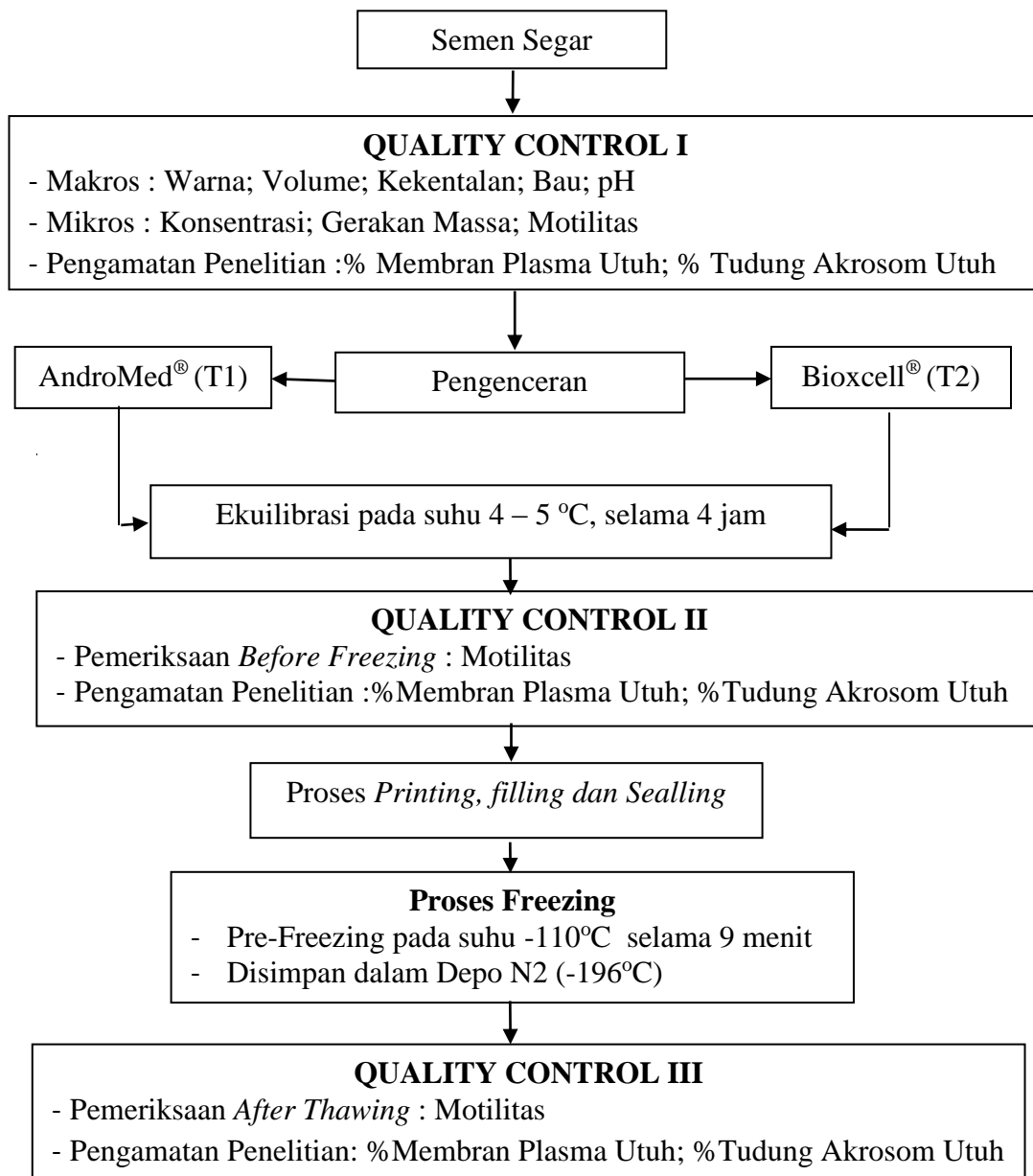
### 3.2.3. Tahap penelitian

**Persiapan penelitian.** Dimulai dengan survey ke Balai Inseminasi Buatan melihat proses pemeliharaan, penampungan dan proses produksi mulai dari uji kualitas hingga diproses menjadi semen beku, serta berdialog dengan pihak BIB tentang kendala yang dialami BIB dalam memproduksi semen beku. Dilanjutkan penyusunan konsep penelitian, kemudian persiapan alat dan bahan.

**Pelaksanaan penelitian.** Meliputi evaluasi semen segar, perlakuan pengenceran, evaluasi semen cair hingga menjadi semen beku dengan uji kualitas Membran Plasma Utuh dan Tudung Akrosom Utuh (Ilustrasi 1). Terdapat 6 ekor kambing PE yang masing-masing diulang sebanyak 8 kali pengulangan.

**Pelaksanaan penampungan semen.** Penampungan semen diawali dengan mendekatkan pejantan kambing PE ke pemacek atau *teaser*. Kolektor semen bersiap disebelah kanan pejantan yang akan ditampung, kolektor memegang vagina buatan dengan telapak tangan kanan dengan sudut 30-45<sup>0</sup>. Semen ditampung setelah kambing jantan dan *teaser* mengalami *false mount* sebanyak 2-3 kali. Ketika mounting ke-3, 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.

Proses penampungan semen ini dilakukan oleh petugas kandang Kambing PE Balai Inseminasi Buatan Ungaran.



Ilustrasi 4. Skema Pelaksanaan Penelitian

**Evaluasi semen segar.** Sebelum pengamatan parameter Membran Plasma Utuh dan Tudung Akrosom Utuh, dilakukan pengamatan secara makroskopis dan

mikroskopis, proses ini adalah tahap *Quality Control* I. Penagamatan makroskopis meliputi volume, bau, warna, kekentalan, dan pH, :

**Volume**, dilakukan dengan melihat volume semen melalui skala angka yang tercantum di tabung tulip.

**Warna**, menggunakan indikator warna putih, kuning dan krem.

**pH**, diukur menggunakan kertas pH meter

**Bau**, bau dideteksi dengan indra penciuman dengan jenis bau spermin (amis) atau tidak.

**Konsistensi**, dapat diamati dengan memiringkan tabung tulip ke kanan dan ke kiri dengan perlahan untuk melihat kekentalannya.

**Motilitas**. Pengamatan motilitas dilakukan dengan mengamati gerak masa dan gerak individu. Gerak masa diamati dengan meneteskan semen hasil penampungan diatas *object glass* sebanyak 1 tetes menggunakan pipet atau spatula, diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali. Pernentuan nilai pergerakan massa yaitu + (jika pergerakan masa putih); ++ (pergerakan seperti awan abu – abu; dan +++ (jika pergerakan seperti awan hitam). Gerak individu diamati dengan meneteskan semen dengan pipet sebanyak 1 tetes dan ditambahkan NaCl Fisiologis 0,9% diatas *object glass* (ketika semen segar), lalu ditutup dengan *cover glass*, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pernentuan nilai pergerakan individu yaitu dengan melihat jumlah spermatozoa yang bergerak aktif progresif (bergerak kedepan) dan membandingkan dengan spermatozoa yang tidak bergerak yang dinyatakan dalam satuan persen (%).

**Mortalitas (hidup mati).** Diamati dengan cara meneteskan sampel semen dan dicampurkan dengan 1 tetes eosin 2%, lalu buat ulasan tipis di *object glass* dengan cover glass dalam keadaan miring membentuk sudut  $45^0$ . Kemudian hasilnya dikeringkan diatas api bunsen dengan cara digoyangkan ke kanan dan ke kiri selama kurang lebih 2 menit. Preparat yang sudah siap, diamati dengan mikroskop perbesaran 400 kali, sperma yang hidup akan berwarna putih karena sperma tidak menyerap eosin, sedangkan sperma dalam keadaan mati akan terlihat berwarna merah karena menyerap warna merah eosin.

Mortalitas atau persen hidup spermatozoa dihitung dengan menggunakan rumus:

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

keterangan:

A = %Hidup spermatozoa

P = Jumlah spermatozoa yang hidup

Q = Jumlah spermatozoa yang dihitung

**Perlakuan pengenceran.** Semen segar yang telah lolos *quality control* 1 akan dilanjutkan pengenceran, dengan ditambahkan pengencer sesuai volum extender yang ditunjukkan spektrofotometer. Terdapat 2 pengencer, yaitu pengencer 1 terdiri dari larutan AndroMed<sup>®</sup> yang ditambahkan aquabidest dengan perbandingan 1 : 4, pengencer 2 terdiri dari larutan Bioxcell<sup>®</sup> yang dicampurkan dengan aquabidest dengan perbandingan 1 : 4. Setelah dicampurkan antara semen segar dan larutan pengencer lalu dihomogenkan di dalam tabung ukur, dan



dimasukkan ke media *water jacket* dengan suhu 27°C, kemudian dimasukkan ke *cooling top*.

**Before freezing.** Semen yang telah dihomogenkan dengan larutan pengencer akan diekuilibrasikan di dalam *cooling top* bersuhu 4-5°C selama 4 jam, 30 menit pertama setelah dimasukkan ke *cooling top*, *water jacket* akan dilepas. Setelah 4 jam berada di dalam *cooling top*, akan diambil sampel untuk pengujian *Quality Control II*, meliputi pengujian motilitas, persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh. Semen yang telah diuji dan memenuhi persyaratan akan dimasukkan ke dalam *straw* mini melalui tahap *printing*, *sealing* dan *filling*. Selanjutnya masuk tahap *pre-freezing*, semen yang telah dikemas dalam *straw* dimasukkan di *box pre-freezing* dengan jarak 5cm dari Nitrogen cair selama 9 menit, kemudian akan dimasukkan dalam container berisi Nitrogen cair dengan suhu -196°C.

**After freezing/ post thawing,** *Quality control III* akan dilaksanakan 24 jam setelah *straw* semen dimasukkan ke dalam container nitrogen cair. Pengujian akan dilakukan terhadap parameter Motilitas, MPU dan TAU.

#### 3.2.4. Analisis data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan analisis t-test dengan ketelitian mencapai  $p < 0,05$ , menurut Mas (2009), rumus yang digunakan adalah :

- Rumus uji-t

$$S_g = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2)-2}} \dots\dots\dots(1)$$

$$t\text{-test (Asumsi Ragam sama)} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{Sg \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \dots\dots\dots(2)$$

t-Tabel dicari pada tabel t dengan (DB) Derajat Bebas =  $n_1 + n_2 - 2$  dengan peluang  $(1 - \frac{1}{2} \alpha)$

Keterangan :

- DB : Derajat Bebas
- $\bar{X}$  : Rata – rata sampel
- n : Jumlah sampel
- S : Ragam atau Varians

### 3.2.5. Hipotesis

$H_0$  :  $\tau_0 = \tau_1 = \tau_2 = 0$  (tidak ada pengaruh yang nyata dari penambahan AndroMed<sup>®</sup> maupun Bioxcell<sup>®</sup> terhadap keutuhan membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa kambing PE).

$H_1$  :  $\tau_i \neq 0$  untuk  $i = 1,2$  (ada pengaruh yang nyata dari penambahan AndroMed<sup>®</sup> maupun Bioxcell<sup>®</sup> terhadap keutuhan membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa kambing PE).

Cara pengambilan keputusan hipotesis adalah :

Jika  $t\text{-hitung} \leq t\text{-tabel } 5\%$ , maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak yang artinya perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata.

Jika  $t\text{-hitung} > t\text{-tabel } 5\%$ , maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima yang artinya perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata.