

### III. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juli 2013 di Balai Inseminasi Buatan Tenayan Raya, Pekanbaru.

#### 3.2. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar sapi Bali yang ditampung langsung di Balai Inseminasi Buatan Daerah Tenayan Raya, Pekanbaru.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari wortel, kuning telur, antibiotik (streptomycin dan penicillin), gliserol, zat warna eosin dan aquabidest.

Alat-alat yang digunakan adalah vagina buatan (VB) untuk menampung semen, *waterbath*, mikroskop elektrik, photometer SMDS, transferpette, timbangan analitik, sendok spatula, gelas ukur, gelas obyek, *cover glass*, kertas lakmus, kertas saring, *refrigator*, magnetik stir, erlemeyer, *juicer*, panci, aluminium foil, tissue, spuit, kertas saring, mikronpipet, rak tabung reaksi, dan pelengkap lain.

#### 3.3. Metode

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial (sebelum dan sesudah pembekuan) dengan 4 perlakuan (A kontrol: BIB menggunakan Tris + fruktosa + asam sitrat + gliserol + kuning telur + antibiotik ; B : 20% Sari Wortel + gliserol +

antibiotik ; C: 40% Sari Wortel + gliserol + antibiotik ; D: 60% Sari Wortel + gliserol + antibiotik) dan 5 ulangan. Perlakuan dan bahan pengencer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Perlakuan dan Bahan Pengencer yang Digunakan

Bahan Pengencer	Perlakuan			
	A (Kontrol)	B	C	D
Tris (g)	3,87	-	-	-
Fruktosa (g)	1,56	-	-	-
Asam Sitrat (g)	2,17	-	-	-
Sari Wortel (ml)	-	20,00	40,00	60,00
Kuning Telur (ml)	20,00	20,00	20,00	20,00
Gliserol (%)	6	6	6	6
Penisilin (g)	0,3	0,3	0,3	0,3
Streptomycin (mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
Akuabides (ml)	100	100	100	100

#### 1.4. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1. Adapun prosedur penelitian yang terdiri dari persiapan bahan pengencer, penampungan semen, pengenceran semen, pembekuan semen dan pencairan kembali (*thawing*).

##### 1.4.1. Persiapan Bahan Pengencer

Menyiapkan bahan pengencer yaitu sari wortel dengan cara memilih wortel yang segar, sehat dan bersih. Kupas wortel dan cuci sampai bersih selanjutnya dipotong-potong kemudian diproses dengan *juicer*. Hasil proses *juicer* tersebut kemudian disaring dengan kertas saring sebanyak dua kali, selanjutnya masukan sari wortel kedalam gelas ukur.

Persiapan penyediaan sari Wortel sebanyak 120 ml dibagi atas perlakuan (0 ml, 20 ml, 40 ml, 60 ml) ditempatkan di erlemeyer. Pada perlakuan sari wortel 20 ml ditambahkan akuabides 80 ml sehingga menjadi 100 ml, selanjutnya dari 100 ml tersebut ambil 74 ml dan dicampurkan 6 ml gliserol, kuning telur 20 ml, antibiotik (penisilin 0,3 ml dan 0,4 ml) sehingga menjadi 100 ml dan dihomogenkan dengan stir magnetik, kemudian ambil 20 ml dari bahan tersebut. Perlakuan 40 ml sari wortel ditambahkan akuabides 60 ml sehingga menjadi 100 ml, selanjutnya dari 100 ml di ambil 74 ml dan dicampurkan gliserol 6 ml, kuning telur 20 ml, antibiotik (penisilin 0,3 ml dan 0,4 ml) sehingga menjadi 100 ml dan dihomogenkan menggunakan stirr magnetik, kemudian ambil 40 ml dari bahan tersebut. Perlakuan 60 ml sari wortel ditambahkan akuabides 40 ml sehingga menjadi 100 ml, selanjutnya dari 100 ml di ambil 74 ml dan dicampurkan gliserol 6 ml, kuning telur 20 ml, antibiotik (penisilin 0,3 ml dan 0,4 ml) sehingga menjadi 100 ml dan dihomogenkan menggunakan stirr magnetik, kemudian ambil 60 ml dari bahan tersebut.

#### **3.4.2. Penampungan Semen**

Semen sapi Bali ditampung dengan vagina buatan satu kali dalam seminggu pada pagi hari sekitar jam 08.00 WIB. Sebelum diambil semen diperiksa kesehatannya, dibersihkan sekitar prupetiumnya, melakukan pemancingan dengan *teaser*. Setelah semen tertampung dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikrokopis di laboratorium. Semen yang dipakai adalah kualitas baik (konsentrasi 1000 sampai 2000 juta spermatozoa/ml semen, motilitas  $\geq 70$  persen dan abnormalitas  $< 20$  persen).

#### **3.4.3. Pengenceran Semen**

Ejakulasi yang diperoleh dari satu ekor sapi bali jantan memenuhi standar minimum motilitas spermatozoa (70%) diproses pada suhu kamar (30°C). Volume semen yang didapat 8,5 ml dibagi dengan perlakuan kemudian di bagi dengan ulangan sehingga semen yang didapat yaitu 0,42 ml semen tiap ulangan. Selanjutnya masukkan 0,42 ml semen kedalam tabung reaksi tambahkan pengencer sari wortel sebanyak 3,5 ml pada tiap ulangan melalui dinding tabung. Agar larutan homogen, dilakukan pencampuran dengan cara menggoyangkan tabung reaksi secara perlahan-lahan. Volume pengencer dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\text{Jumlah Pengencer (ml)} = \frac{\text{Volume semen} \times \text{Motilitas} \times \text{Konsentrasi sperma}}{100 \text{ juta}} - \text{Volume}$$

#### 3.4.4. Pembekuan Semen

Proses pembekuan semen meliputi pendinginan (*Cooling*), pembekuan awal (*Pre freezing*), pembekuan (*Freezing*).

##### a. Pendinginan (*Cooling*)

Semen yang telah diencerkan dikemas dalam straw 0.25 ml dan diberi label. Kemudian temperaturnya diturunkan dari suhu 37°C sampai 5°C selama 4 jam didalam lemari pendingin (Mumu, 2009).

##### b. Pembekuan awal (*Pre freezing*)

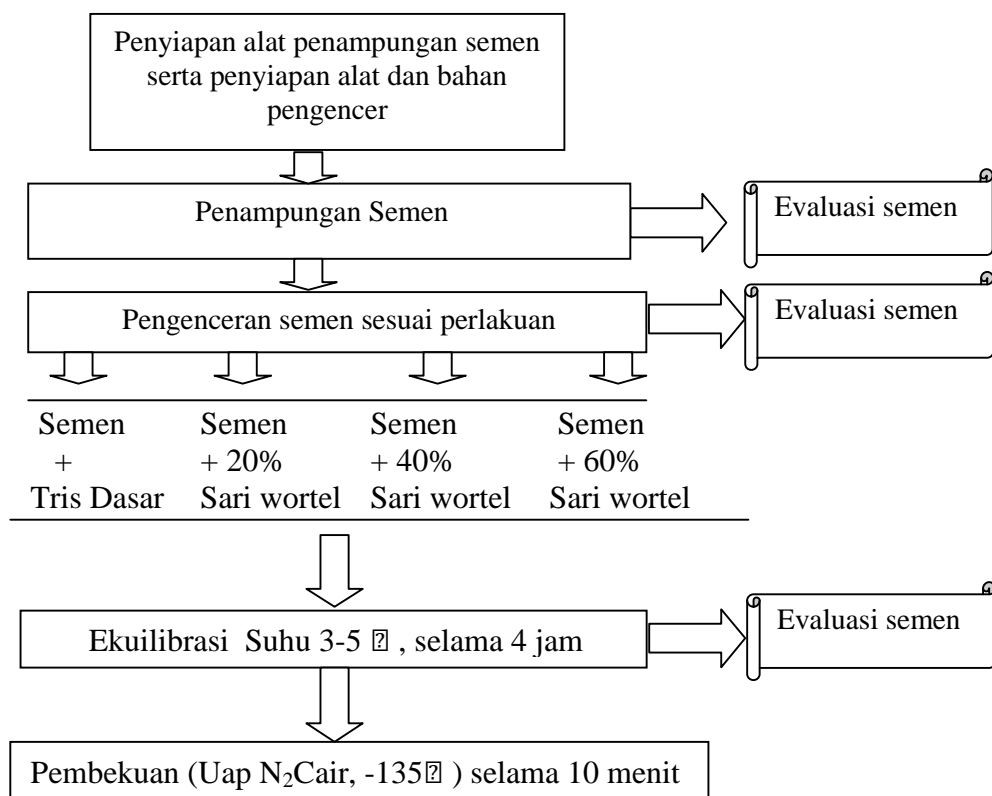
Straw yang berisi semen diatur pada rak straw dan ditempatkan dalam uap N<sub>2</sub> cair sekitar 2-3 cm diatas permukaan nitrogen cair. Pembekuan ini berlangsung selama 10-15 menit, kemudian dimasukan langsung ke dalam nitrogen cair (Tambing *et al.*, 2000).

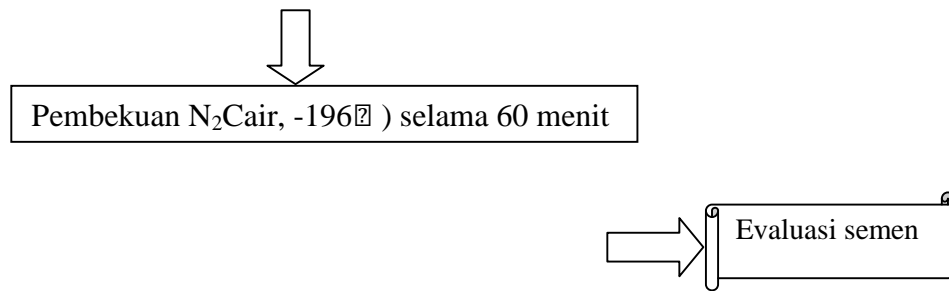
##### c. Pembekuan (*Freezing*)

Pembekuan merupakan suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati, 2000). Untuk proses pembekuan straw dimasukkan ke dalam Nitrogen cair (suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ ) dan disimpan di dalam container (Rizal *et al.*, 2006). Penyimpanan dalam container selama 60 menit selanjutnya dilakukan *thawing* (Mumu, 2009).

### 3.4.5. Pencairan Kembali (*Thawing*)

Proses *Thawing* dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menimbulkan *heat sock* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku. Teknik *thawing* terbaik yaitu pada *thawing* menggunakan air bersuhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan durasi 15 detik (Salim *et al.*, 2009).





Gambar 3.1. Prosedur Penelitian

### 3.5. Peubah yang Diukur

Peubah yang diukur dalam penelitian ini meliputi:

#### 1. Persentase motilitas.

Penentuan motilitas spermatozoa dilakukan menurut gerakan individual (Toelihere, 1993), yaitu dengan meneteskan semen pada gelas objek yang bersih dan ditutup dengan gelas penutup. Kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop pada pembesaran 45 x 10. Kemudian dihitung gerakan-gerakan individual spermatozoa.

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa motil}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

#### 2. Persentase Mortalitas

Penentuan persentase mortalitas spermatozoa dilakukan menurut pewarnaan differensial (Toelihere, 1993), yaitu dengan meneteskan satu tetes kecil semen yang sudah *dithawing* di atas gelas objek yang bersih kemudian ditetaskan zat warna eosin di atas semen dan dicampur secara merata dengan menggunakan satu batang gelas steril. Buat preparat ulas yang tipis segera dikeringkan di atas nyala api kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop pada

pembesaran 45 x 10. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna merah, sedangkan yang masih hidup akan tetap bening. Perhitungan dilakukan sekurang-kurangnya 100 sampai 200 sel spermatozoa yang hidup dan yang mati.

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa mati}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### 3. Persentase Abnormal

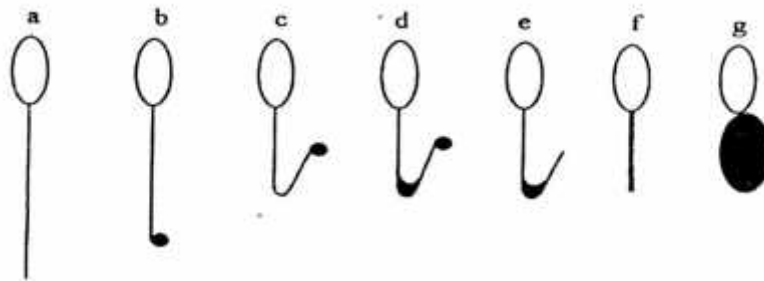
Abnormalitas spermatozoa diamati dengan membuat preparat ulas pada gelas objek dari satu tetes sperma yang dicampur dengan satu eosin-Negrosin. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Spermatozoa yang normal dan abnormal dihitung sampai 100 sampai 200 sel (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang morfologi abnormal dapat dihitung dengan rumus;

$$\text{Abnormal (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa yang normal}} \times 100\%$$

### 4. Persentase membran plasma utuh (MPU).

Dilakukan dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test*. Prosedur yang digunakan mengikuti petunjuk Jayendra *et al.* (1984) yaitu menggunakan medium Hos Test berupa NaCl hipotonik (0.031 m; terbuat dari 0.179 g NaCl yang dilarutkan dengan 100 ml akuabides). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 9.9 ml medium HOS Tes, selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C dalam water bath. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop cahaya 40 kali. Jumlah spermatozoa yang di hitung

adalah 200 dengan skala 0 sampai 100 persen. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologi bila diinkubasi pada medium hipotonik. Perubahan-perubahan yang terjadi antara lain dicirikan oleh pembengkakan pada ujung ekor (Gambar 2b – d), lengkungan pada ekor (Gambar 2c – e), ekor yang pendek dan tebal (Gambar 2f) atau pembengkakan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang di bentuk oleh ekor spermatozoa (Gambar 2d, e dan g), yang menunjukkan integritas spermatozoa yang baik.



Gambar 3.2. Skema perubahan morfologi pada spermatozoa yang diinkubasi dengan medium hipotonik; a : tidak ada perubahan; b-g: beberapa tipe perubahan pada bagian ekor (Jayendra *et al.*, 1984).

$$\text{Membran Plasma Utuh (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa dengan membran plasma utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### 3.5. Analisis Data

Data hasil pengamatan dari masing-masing perlakuan diolah secara statistik dengan menggunakan Analisis Sidik Ragam Rancangan Acak Lengkap faktorial (Mattjik dan Sumertajaya, 2006). Analisis Sidik Ragam dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Model linier yang digunakan adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + r_i + s_j + (rs)_{ij} + v_{ijk}$$



dimana :

$Y_{ijk}$  = Hasil pengamatan pada faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j dan pada ulangan ke-k

$\bar{y}$  = Nilai tengah umum

$r_i$  = Pengaruh faktor A pada taraf ke-i

$s_j$  = Pengaruh faktor B pada taraf ke-j

$rs$  = Pengaruh interaksi dari faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j

$v_{ijk}$  = Pengaruh galat dari faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j pada ulangan ke-k

Tabel 3.2 Tabel Sidik Ragam

Sumber	Derajat	Jumlah	Kuadrat	F Hitung	F Tabel		
					Keterangan	Bebas	Kuadrat
(SK)	(Db)	(JK)	(KT)				
A	a - 1	JKA	KTA	KTA/KTG	-	-	
B	b - 1	JKB	KTB	KTB/KTG	-	-	
A x B	(a-1) (b-1)	JKAB	KTAB	KTAB/KTG	-	-	
Galat	a b (r-1)	JKG	KTG	-	-	-	
T	a b r - 1	JKT	-	-	-	-	

Keterangan:

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{Y_{...}^2}{abr}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = \sum Y_{ijk}^2 - FK$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Faktor A (JKA)} = \frac{\sum y_{i.}^2}{b r} - FK$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Faktor B (JKB)} = \frac{\sum y_{.j}^2}{a r} - FK$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Interaksi Faktor A dan B \{JK(AB)\}} = \frac{\sum y_{ij}^2}{r} - FK$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat} = JKT - JKA - JKB - JKAB$$