

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah di laksanakan pada bulan Januari-Februari 2014 di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato Payakumbuh Sumatra Barat.

3.2. Sampel Semen

Sampel semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen cair yang berasal dari BIB Tuah Sakato Payakumbuh Sumatra Barat. Ternak kerbau jantan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kerbau berumur 3 tahun.

3.3. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen cair kerbau yang berasal dari BIB Tuah Sakato Payakumbuh Sumatra Barat menggunakan pengencer Andromed, Aquadest, Nitrogen cair, Natrium sitrat, Fruktosa, asam sitrat, Alkohol, Gliserol, *Vaselin*, air hangat, dan Eosin untuk pengamatan sperma hidup dan mati.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, vagina buatan, kandang jepit, mikroskop (Olympus CH 20), *water bath*, *countainer*, *object* dan *cover glass*, kertas lakmus, beaker gelas, termometer, tisu, tabung *Eppendorf*, mikropipet, meja pemanas, *straw*, kulkas/lemari pendingin, gunting, pinset, timbangan analitik, *sterilizer 27⁰ C*.

3.4. Metode

Penelitian ini dilakukan secara Experimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial, dua faktor dengan 3 perlakuan dan 5 ulangan. Faktor pertama adalah waktu ekuilibrase yang terdiri dari waktu ekuilibrase 3 jam, 4 jam dan 5 jam. Faktor kedua adalah waktu Hipoosmotik yang terdiri dari waktu hipoosmotik 15 menit, 30 menit dan 45 menit, menggunakan pengencer Andromed dengan perbandingan 4:1.

Sebagai data pendukung dari penelitian ini untuk menghitung motilitas dan abnormalitas maka dipergunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuannya adalah waktu ekuilibrase 3 jam, 4 jam dan 5 jam.

3.5. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Bahan Pengencer

Mempersiapkan bahan pengencer yaitu bahan pengencer andromed komersial. Pengencer andromed dari minitube German mengandung yaitu: aquabides, fruktosa, gliserol, asam sitrat, fosfolipid dan penambahan antibiotic (*Spectinomycin* 30,0 mg, *Lincomysin* 15,0 mg dan *Gentamycin* 25,0 mg) dengan pengenceran antara andromed dan aquabides 1:4. Cara pembuatan pengencer andromed adalah sebagai berikut: andromed 20% (20 ml) dicampurkan dengan aquabides sebanyak 80% (80 ml) lalu dihomogenkan.

2. Penampungan Semen

Penampungan semen kerbau jantan dilakukan dengan metode vagina buatan, persiapan vagina buatan adalah sebagai berikut: vagina buatan terdiri dari selongsong karet tipis yang dimasukkan ke dalam silinder karet tebal. Lipat dan kaitkan karet tipis pada masing-masing ujung silinder karet yang tebal dengan menggunakan gelang-gelang karet yang dipasang 5 cm dari ujung silinder.

Sebuah corong penampungan dari karet tipis dipasang pada salah satu ujung vagina buatan dan dieratkan dengan karet gelang. Pada ujung corong penampung dipasang sebuah tabung pengumpul semen berskala, lalu diikat pula dengan karet gelang. Air panas dengan suhu 50 sampai 70°C dimasukkan kedalam ruang antara silinder dan selongsong karet yang tipis melalui lubang pada silinder dengan volume setengah sampai dua pertiga penuh. Suhu vagina buatan dipertahankan pada waktu penampungan berkisar antara 40 sampai 52°C.

Udara ditiupkan melalui pentil silinder yang gunanya untuk menambah tekanan pada vagina buatan. Kemudian dengan sebatang ebonite atau gelas yang steril oleskan bahan pelicin sampai setengah panjang batang vagina buatan.

Setelah vagina buatan disiapkan, pejantan kerbau yang akan ditampung semennya dibawa ke kandang penampungan yang telah tersedia betina pemancing. Penampung berada disebelah kanan betina pemancing sambil memegang vagina buatan dengan kemiringan 45° dari tanah. Semen ditampung ketika ejakulasi terjadi, yang ditandai dengan

adanya dorongan yang kuat dari penis yang berereksi dengan sempurna pada vagina buatan

3. Semen hasil penampungan di analisis secara

a. Makroskopis

- Volume : Semen yang ditampung dapat langsung dilihat volumenya pada skala tabung penampung.
- Bau Semen yang sudah di tampung didekatkan ke hidung untuk mengetahui baunya, umumnya semen kerbau berbau amis.
- Warna Semen kerbau berwarna krem pucat atau kekuning-kuningan.
- pH Ditentukan dengan kertas pH universal, perubahan warna pH dicocokkan dengan warna standar.
- Konsistensi Derajat kekentalan dapat langsung di ketahui dengan menggoyangkan tabung penampung semen secara perlahan-lahan konsistensi semen biasanya berhubungan dengan warna, misalnya semen warna krem biasanya konsistensi pekat atau kental, sedangkan yang warnajernih atau terang biasanya konsistensinya encer.

b. Mikroskopis

- Gerakan massa Diamati dengan cara meneteskan satu tetes semen diatas objek *glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 dan cahaya yang dikurangi

kemudian dilihat gelombang-gelombang yang di timbulkan oleh gerakan spermatozoa.

- Motilitas adalah daya gerak spermatozoa yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan.
- Konsentrasi Pemeriksaan konsentrasi bertujuan untuk mengetahui jumlah sperma didalam setiap cc semen dengan menggunakan alat Spectrophotometer atau Spectronic. Teteskan 0,05 cc semen ke dalam yang berisi 9,95 cc NaCl, campurkan lalu masukkan ke dalam Spertrophotometer, lihat jarum menunjukkan angka berapa, kemudian dikonversikan dengan tabel konsentrasi sperma.
- Abnormalitas adalah penyimpangan morfologi dari bentuk spermatozoa normal.
- Membran plasma utuh Dihitung spermatozoa yang memiliki membran plasma yang masih utuh,

4. *Filling and sealing*

Semen dimasukkan kedalam *straw* (0,25 ml) dengan menggunakan spuit kemudian ujung *straw* di jepit dengan pinset yang telah dipanaskan terlebih dahulu.

5. Ekuilibrasi

Straw kemudian disimpan pada suhu 5°C dan diekuilibrasi selama 3 jam, 4 jam dan 5 jam. Kemudian melakukan pemeriksaan motilitas dan abnormalitas.

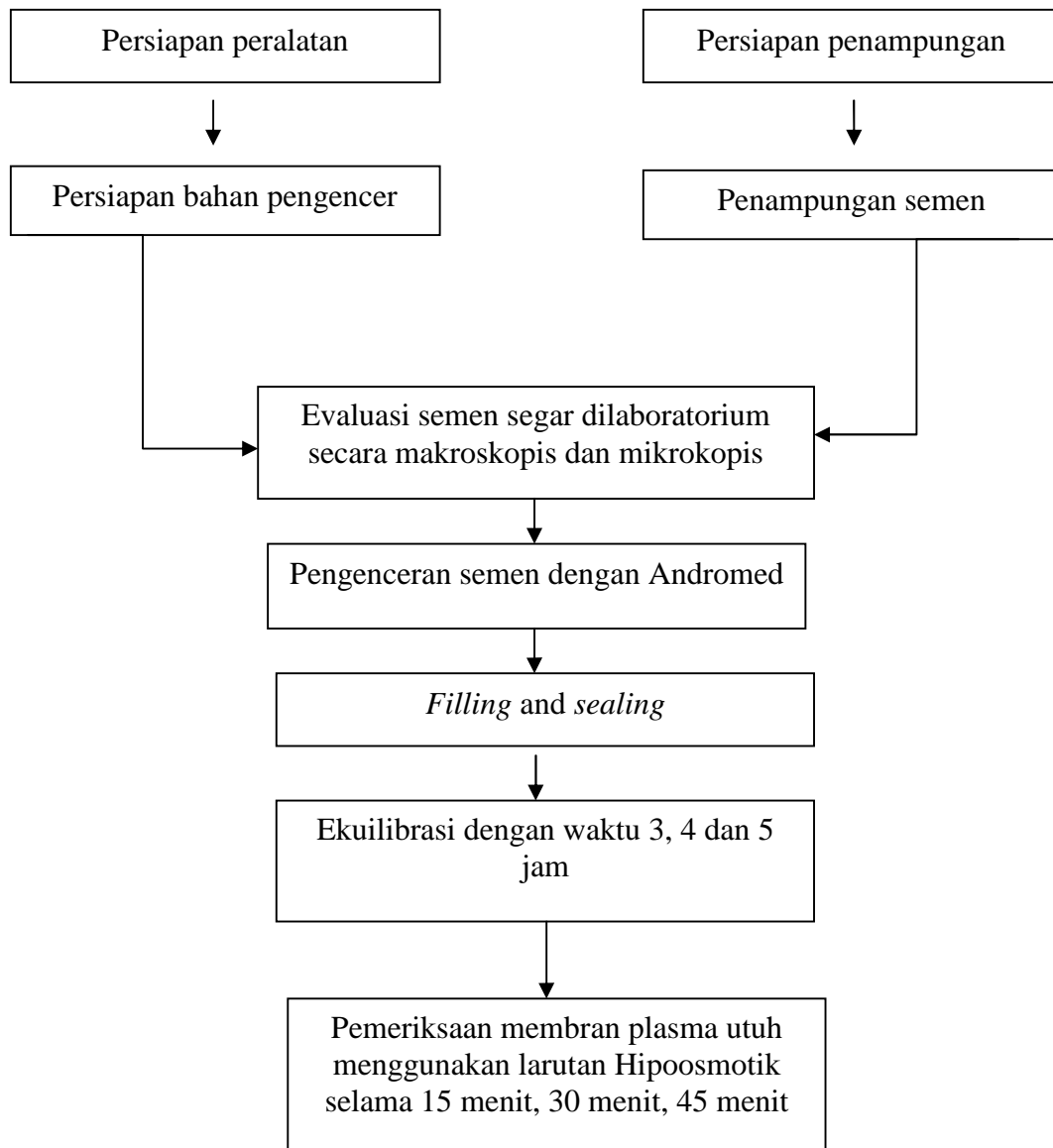
6. Pemeriksaan Keutuhan Membran Plasma Menggunakan Larutan Hipoosmotik

a. Cara Pembuatan Larutan Hipoosmotik.

Larutan yang digunakan adalah 2,7 gr fruktosa yang dilarutkan kedalam 100 ml aquadest dan 1,47 gr natrium sitrat yang dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest. Kedua larutan tersebut dicampur sehingga diperoleh larutan hipoosmotik dengan volume total 200 ml.

Tabung reaksi yang berisi 9,9 ml larutan hipoosmotik, kemudian dicampurkan dengan 0.1 ml semen. Campuran tersebut diinkubasikan dalam inkubator dengan temperatur 37 °C, selama masing-masing 15 menit, 30 menit dan 45 menit dengan kelembaban jenuh 100 %.

Setelah diinkubasi sesuai jangka waktu tersebut di atas campuran tersebut diteteskan pada *object glass*, lalu tutup dengan *cover glass* dan lihat di bawah mikroskop (Olympus CH 20) dengan perbesaran 40×10 , hitung spermatozoa yang normal dan yang telah bereaksi dengan larutan hipoosmotik pada 10 lapang pandang, untuk mendapatkan data HOS *test* pada menit ke-5, menit ke-30 dan menit ke-45. Jumlah spermatozoa yang mengalami pembengkakan dicatat dan dihitung persentasenya terhadap spermatozoa total yang diamati.



gambar 3.1.Prosedur Penelitian

3.6. Peubah yang diukur

Peubah yang diukur dalam penelitian ini adalah motilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa Kerbau.

a. Motilitas Spermatozoa (Partodiharjdo, 1992)

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan meneteskan satu tetes semen pada objek glass kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10x10 pada gelas objek dengan ditutup dengan gelas penutup .

Penilaian persentase motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan pergerakan dibandingkan dengan yang tidak bergerak. Jumlah spermatozoa yang bergerak dihitung dan dinyatakan dalam persen dengan menggunakan rumus:

$$\text{Motilitas} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa bergerak maju}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

b. Abnormalitas Spermatozoa (Toelihere, 1993)

Pengamatan abnormalitas dilakukan dengan membuat preparat ulas yang tipis dengan mencampurkan satu tetes zat pewarna eosin. Selanjutnya sperma dievaluasi dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10, kemudian dihitung spermatozoa yang berubah morfologinya akan terlihat seperti ekor menggulung, ekor terputus dan bagian tengah terlipat. Menghitung spermatozoa normal dan abnormal dengan menggunakan rumus :

$$\text{Abnormalitas Spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Abnormalitas}}{\text{jumlah Spermatozoa Abnormalitas}} \times 100\%$$

c. Membran Plasma Utuh Spermatozoa (Herdis, 1999)

Larutan yang digunakan adalah 2,7 gr fruktosa yang dilarutkan kedalam 100 ml aquadest dan 1,47 gr natrium sitrat yang dilarutkan ke dalam 100 ml aquadest. Kedua larutan tersebut dicampur sehingga diperoleh larutan hipoosmotik dengan volume total 200 ml. Tabung reaksi yang berisi 9,9 ml larutan hipoosmotik, kemudian dicampurkan dengan 0.1 ml semen. Campuran tersebut diinkubasikan dalam inkubator dengan temperatur 37°C dengan kelembaban jenuh 100 %. Setelah diinkubasi sesuai jangka waktu tersebut di atas campuran

tersebut ditetaskan pada *object glass*, lalu tutup dengan *cover glass* dan lihat di bawah mikroskop (Olympus CH 20) dengan perbesaran 40×10 , hitung spermatozoa yang normal dan yang telah bereaksi dengan larutan hipoosmotik pada 10 lapang pandang. Spermatozoa yang memiliki membrane plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggelembung, sedangkan spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak ditandai oleh ekor yang lurus. Menghitung spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dengan menggunakan rumus:

$$\text{MPU Spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah MPU Spematozoa}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

3.7. Analisis data

Data penelitian akan diolah secara statistic dengan menggunakan dua Rancangan, yaitu Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Lengkap (RAL) factorial (Steel dan Torrie, 1991). Perbedaan pengaruh perlakuan diuji dengan Duncan's multiple range test (DMRT).

Rancangan pertama yaitu Rancangan Acak Lengkap, Model linier rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i, dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah rataan

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} : Pengaruh galat dari perlakuan ke-i ulangan ke-j

Tabel analisis sidik ragam rancangan acak lengkap dapat dilihat pada

Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Analisis ragam

SK	Db	JK	KT	F hitung	F table	
					5%	1%
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTG/KTG	-	-
Galat	t(r-1)	JKG	KTG	-	-	-
Total	t.r-1	JKT	-	-	-	-

Sumber: Steel dan Torrie (1991)

Keterangan :

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

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

$$\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum (Y_{.i})^2}{r} - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

$$\text{Kuadrat Total Perlakuan (KTP)} = \frac{\text{JKP}}{t-1}$$

$$\text{Kuadrat Total Galat (KTG)} = \frac{\text{JKG}}{n-t}$$

$$\text{F.hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}}$$

Bila hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

$$\text{UJD}\alpha = R\alpha(\rho; db) \times \sqrt{\frac{\text{KTG}}{\text{Ulangan}}}$$

Keterangan :

: Taraf Uji Nyata

R : Nilai dari Tabel Uji Jarak Duncan

: Banyaknya Perlakuan

Rancangan kedua yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial (Steel dan Torrie, 1992). Model matematik analisis ragam adalah sebagai berikut:

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

Dimana:

Y_{ijk} : Hasil pengamatan pada factor A pada taraf ke-I dan factor B pada taraf ke-j dan pada ulangan ke-k.

μ : Nilai tengah umum (*population mean*)

α_i : Efek faktor A pada taraf ke-i

β_j :Efek faktor B pada taraf ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efek dari faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j pada ulangan ke-k

ϵ_{ijk} : Pengaruh galat dari faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j pada ulangan ke-k

Tabel analisis sidik ragam rancangan acak lengkap pada pola factorial dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Analisis Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel	
					0,05	0,01
A	$a - 1$	JKA	KTA	KTA/KTG	-	-
B	$b - 1$	JKB	KTB	KTB/KTG	-	-
AB	$(a - 1)(b - 1)$	JKAB	KTAB	KTAB/KTG	-	-
Galat	$ab(r - 1)$	JKG	KTG	-	-	-
Total	$abr - 1$	JKT	-	-	-	-

Sumber: Steel dan Torrie (1991)

Perhitungan:

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{(y_{...})^2}{rab} \\ \text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= (Y_{ijk})^2 - FK \\ \text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} &= \frac{\sum(Y_{ij})^2}{r} - FK \\ \text{Jumlah Kuadrat Galat} &= JKT - JKP \\ \text{JK(A)} &= \frac{\sum(ai)^2}{rb} - FK \\ \text{JK(B)} &= \frac{\sum(bi)^2}{r} - FK \\ \text{JK(AB)} &= JKP - \text{JK(A)} - \text{JK(B)} \\ \text{KT(A)} &= \text{JK(A)} / (a-1) \\ \text{KT(B)} &= \text{JK(B)} / (b-1) \end{aligned}$$

Bila hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

$$UJD\alpha = R\alpha(\rho; db) \times \sqrt{\frac{KTG}{Ulangan}}$$