III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah di laksanakan pada bulan Desember 2014 sampai dengan Januari 2015 di Balai Inseminasi Buatan Tenayan Raya, Pekanbaru.

3.2. Bahan dan Alat

Materi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah spermatozoa sapi Bali yang ditampung dengan vagina buatan yang terdapat di Balai Inseminasi Buatan Tenayan Raya, Pekanbaru.

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini adalah andromed, kuning telur, tris susu skim, gliserol, cairan eosin, nitrogen cair, antibiotik (streptomycin dan penicillin), dan aquabidest. Alat-alat yang akan digunakan adalah vagina buatan dan perangkatnya, kandang jepit, termometer, cool tab, gelas ukur, stopwatch, photometer SMD 5, kertas saring, straw, tissue, inkubator, mikroskop, gunting, objek glass, cover glass, pipet tetes, gelas ukur, tabung reaksi dan aluminium foil.

3.3. Metode

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor (A dan B) dalam 3 perlakuan dan 3 ulangan dengan rincian sebagai berikut :

Faktor A :	Faktor B :
A_1 Andromed 20% + Aquabides 80%	B_1 Waktu ekuilibrasi 2 jam
A_2Aquabides 80% + Tris Kuning Telur 20%	B_2 Waktu ekuilibrasi 4 jam
A_3 Aquabides 15%+ Tris Susu Skim 85 %	B_3 Waktu ekuilibrasi 6 jam

Dan kombinasi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.1 di bawah ini:

Tabel 3.1. Kombinasi perlakuan 2 faktor :

A/B	B_1	B_2	B_3
A_1	A_1B_1	A_1B_2	A_1B_3
A_2	A_2B_1	A_2B_2	A_2B_2
A_3	A_3B_1	A_3B_2	A_3B_3

Semua kombinasi ini diulang masing-masing 3x.

3.4. Prosedur kerja :

3.4.1 Pembuatan bahan pengencer :

a. Tris kuning telur

1. Menimbang 3,028 gram Kristal Tris (hydroximethyl) aminomethan: dan 1,7 gram asam sitrat monohidrat, masukkan kedalam labu ukur 100 ml, tambahkan aquabides sampai mencapai 100 ml. Homogenkan selama 15 menit.
2. Menyiapkan 20 ml kuning telur
3. Menyiapkan 80 ml larutan dalam beaker glass 100 ml, campurkan 20 ml kuning telur, kemudian aduk perlahan hingga homogen, selama 15 menit.
4. Menambahkan 0.3 ml penicillin dan 0.4 ml streptomicyn kedalam larutan diatas.
5. Menghomogenkan selama 15 menit, simpan pada suhu 37°C, siap digunakan.

6. Menambahkan gliserol 6% pada saat pengencer digunakan.

b. Andromed

1. Ambil andromed sebanyak 20 %
2. Lalu dilarutkan kedalam aquabides sebanyak 80 %
3. Kemudian larutan pengencer tersebut sebelum digunakan sebaiknya dimasukan kedalam lemari pendingin supaya mudah dalam penggunaan nya.

c. Tris susu skim

1. Terlebih dahulu lakukan penimbangan susu skim sebanyak 10 g.
2. Kemudian dimasukkan kedalam gelas Erlenmeyer.
3. Lalu dilarutkan dengan aquabides sebanyak 100 ml.
4. Lalu dihomogenkan, setelah homogen selanjutnya dipanaskan, secara tidak langsung pada pemanasan air sampai suhu mencapai 92-95 ^{O}C.
5. Lakukan penimbangan tris sebanyak 3.028 gram
6. Lalu dilarutkan ke dalam aquabides sebanyak 100 ml
7. Sebelum digunakan terlebih dahulu ditambahkan Gliserol sebanyak 6 % dan 0,4 ml Streptomisin dan 0,3 ml penesilin.

3.4.2. Penampungan semen

Penampungan semen sapi Bali 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 penampung dari aret 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 70^0C dimasukkan ke dalam 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 52^0C. 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 sapi Bali 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 450 dari tanah. Untuk mempertinggi libido pejantan diusahakan dengan mengadakan *false mounts* yaitu pengekangan yang dilakukan terhadap pejantan dengan tidak menampung semen pada penunggangan pertama ataupun kedua. Semen ditampung ketika ejakulasi terjadi, yang ditandai dengan adanya dorongan yang kuat dari penis yang berereksi dengan sempurna pada vagina buatan.

3.4.3. Evaluasi Semen

a. Makroskopis

1. Volume : semen yang ditampung dapat langsung dilihat volumenya pada skala tabung penampung.
2. Bau : semen yang sudah ditampung didekatkan ke hidung untuk mengetahui baunya, umumnya semen sapi yang normal berbau amis khas.

3. Warna : semen sapi yang normal memiliki warna keputihan sampai krem keputihan atau agak kekuningan.
4. pH : ditentukan dengan kertas pH universal, perubahan warna pH dicocokkan dengan warna standar.
5. Konsistensi atau 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 konsistensinya pekat atau kental, sedangkan yang warna jernih atau terang biasanya konsistensinya encer.

b. Mikroskopis

1. 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 ditimbulkan oleh gerakan spermatozoa. Kualitas spermatozoa yang baik dapat ditentukan dengan memberi tanda sebagai berikut :

+++ (sangat baik) : gelombang yang terbentuk besar-besar, seperti awan, banyak dan gelap serta aktif.

++ (baik) : gelombang yang terbentuk kecil, tipis dan kurang banyak serta gerakannya lambat.

+ (cukup) : tidak terlihat gelombang melainkan gerak individual yang progresif.

0 (buruk) : bila hanya sedikit gerakan atau bahkan tidak ada gerakan individual.

2. Motilitas Spermatozoa

   Adalah daya gerak spermatozoa yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan

3. Persentase Hidup Spermatozoa (Mortalitas)

   Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan cara pewarnaan differensial (Toelihere, 1993)

4. Abnormalitas Spermatozoa

   Adalah penyimpangan morfologi dari bentuk spermatozoa normal.

5. Membran Plasma Utuh (MPU)

   Dihitung spermatozoa yang memiliki membran plasma yang masih utuh.

3.4.4 Filling dan sealing straw

Setelah melakukan pengenceran dengan 3 pengencer (Andromed, tris susu skim, tris kuning telur) tersebut maka proses selanjut nya yaitu memasukkan semen ke dalam straw (0.25 ml) dengan menggunakan mesin filling dan sealing .

3.4.5. Ekuilibrasi

Straw kemudian disimpan pada suhu 5^0C selama 2 jam, 4 jam dan 6 jam . Kemudian di evaluasi motilitas, mortalitas, abnormalitas spermatozoa dan membran plasma utuh (MPU).

3.5. Peubah Yang Di ukur

1. Motilitas spermatozoa

Motilitas adalah daya gerak yang di jadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk Inseminasi Buatan. Satu tetes semen diteteskan pada kaca objek yang di tutup dengan kaca penutup untuk menipiskan dan mencegah penguapan, selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 kemudian dengan pembesaran 40 x 10. Penilaian persentase motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan pergerakan dibandingkan dengan yang tidak bergerak dengan menggunakan rumus :

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa motil}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} x100\%$$

2. Mortalitas Spermatozoa

Penentuan persentase mortalitas spermatozoa dilakukan menurut pewarnaan differensial (Toelihere, 1993), yaitu dengan meneteskan satu tetes kecil semen di atas gelas objek yang bersih kemudian diteteskan 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.

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa mati}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} x100\%$$

3. Abnormalitas spermatozoa

Pengamatan dilakukan dengan meneteskan zat warna eosin pada ujung sebuah kaca objek yang bersih, kemudian ambil sedikit semen lalu diaduk dengan batang pengaduk supaya bercampur dengan zat warna eosin sampai homogen. Kemudian dibuat preparat ulas yang tipis dan segera keringkan preparat ulas tersebut. Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 45. Spermatozoa yang berubah morfologinya akan terlihat seperti ekor menggulung, ekor terputus dan bagian tengahnya terlipat. Kemudian dihitung sel spermatozoa normal dan abnormal dengan menggunakan rumus :

$$\text{Abnormal (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Abnormal}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

4. Membran Plasma Utuh (MPU)

Persentase MPU dievaluasi dengan metode *Hypoosmotik Swelling Test.* Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas : 0.1 ml semen + 9.9 ml medium Hos Test yang dilarutkan dengan aquadest hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37^0C selama 45 menit. Buat preparat ulas tipis pada gelas objek kemudian diamati di bawah mikroskop pembesaran 45 x 10 terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus. Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang membran plasmanya utuh.

$$\text{Membran Plasma Utuh (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa dengan MPU}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang di Hitung}} \times 100\%$$

3.6. Analisis Data

Data motilitas, abnormalitas dan MPU diolah secara statistik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial menurut Steel and Torrie, (1991). Dengan model matematis Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial adalah sebagai berikut :

Model linier yang digunakan adalah:

$$Y_{ijk} = « + \sim_{i} + \quad_{j} + (\sim \quad)_{ij} + £_{ijk}$$

dimana :

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

« = Nilai tengah umum

$\sim_{i}$ = Pengaruh faktor A pada taraf ke-i

$_{j}$ = Pengaruh faktor B pada taraf ke-j

~ = Pengaruh interaksi dari faktor A pada taraf ke-idan faktor B pada taraf ke-j

$£_{ijk}$ = Pengaruh galat dari faktor A pada taraf ke-idan faktor B pada taraf ke-j pada ulangan ke-k

Tabel 3.2 Analisis Sidik Ragam

Sumber Keterangan (SK)	Derajat Bebas (Db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel	
					0.05	0.01
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:

Faktor Koreksi (FK) = $\frac{Y_{...}^{2}}{a\,b\,r}$

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

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

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

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

Jumlah Kuadrat Galat = JKT – JKA – JKB – JKAB

Bila hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) (Steel & Torrie, 1992).