

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium dan unit semen beku *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga di Desa Tanjung, Kecamatan Kedamean, Kabupaten Gresik. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Agustus 2014.

3.2 Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan yaitu, 1 ekor pejantan domba Merino dan 1 ekor pejantan domba ekor gemuk yang berumur 4 tahun. Secara klinis pejantan tersebut dinyatakan sehat, alat kelamin normal, dan berlibido baik.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan Penelitian ini meliputi : semen dari domba Merino, semen domba ekor gemuk, AndroMed[®], NaCl fisiologis, alkohol 70%, aquabidest steril, vaselin, pewarna eosin negrosin dan nitrogen cair.

3.2.3 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Vagina buatan khusus domba, tabung penampung semen berskala, penutup tabung penampung semen, mikroskop binokuler, kertas lakmus, gelas objek, gelas penutup, gelas

beker, tabung erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung, *water bath*, kanister, termos pemanas air, pipet, spatula, thermometer, kertas tissue, bunsen, korek api, spektrofotometer, container nitrogen cair, mini straw, mesin *cool top*, *filling* dan *sealing machine*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Penampungan Semen

Pengambilan semen domba dilakukan 2 kali dalam seminggu yang dilakukan pada sore hari. Domba yang akan diambil semennya adalah domba dewasa yang sehat. Pengambilan semen domba dilakukan di *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.3.2 Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen

Semen yang diperoleh dilakukan pemeriksaan dan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis meliputi pemeriksaan volume (ml), konsistensi semen, warna, bau dan derajat keasaman. Pemeriksaan mikroskopis meliputi : gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi. Gerakan massa diperiksa dengan meneteskan satu tetes semen segar ke gelas obyek lalu diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Kriteria penilaian : +++ dengan gerakan massa yang paling baik yang ditandai dengan gelombang besar, banyak, bergerak cepat, dan berpindah-pindah tempat, ++ dengan gerakan massa yang baik ditandai dengan gelombang besar, tipis, jarang, dan bergerak lambat dan + dengan gerakan massa yang kurang baik ditandai dengan gelombang tipis dan sedikit jumlahnya.

Kecepatan gerak individu spermatozoa mempunyai kriteria penilaian sebagai berikut : Angka 0 bila tidak ada spermatozoa yang bergerak atau sedikit, angka 1 bila gerakan spermatozoa lambat, angka 2 bila gerakan spermatozoa sedang, angka 3 bila gerakan spermatozoa cepat, dan angka 4 bila gerakan spermatozoa sangat cepat (Susilowati dkk., 2010).

Arah gerak individu spermatozoa adalah sebagai berikut: P (progresif) gerakan maju, O (oscilatory) gerakan berputar, V (vibratoris) gerakan bergetar, C (circular) gerakan melingkar, R (reverse) gerakan mundur, dan N (nekrospermia) tidak ada gerakan dari spermatozoa (Susilowati dkk., 2010).

Dalam penelitian ini yang dinilai adalah spermatozoa yang bergerak maju ke depan (progresif) karena gerakan spermatozoa yang memenuhi syarat adalah gerakan aktif maju ke depan. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan alat yaitu spektrofotometer.

Pemeriksaan kualitas spermatozoa meliputi :

1. Pemeriksaan motilitas spermatozoa atau gerakan individu dievaluasi secara subjektif dilakukan dengan meneteskan satu tetes semen di atas gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan NaCl fisiologis, selanjutnya dihomogenkan kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali, jika hasilnya $\geq 70\%$ maka akan diproses untuk pembekuan. Untuk arah gerak diwakili gerakan progresif. Contoh gerak individu 90/4, artinya yang bergerak progresif 90% dengan kecepatan 4.

2. Pemeriksaan viabilitas dapat dilakukan dengan meletakkan satu tetes kecil semen pada gelas objek dan satu tetes besar larutan Eosin negrosin di sampingnya lalu dicampur sampai homogen. Buat preparat ulas tipis dan preparat dikeringkan di atas bunsen (proses ini harus selesai maksimal 15 detik). Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Penentuan persentase spermatozoa yang hidup dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100$$

(Susilowati dkk, 2010)

3.3.3 Pembuatan Bahan Pengencer AndroMed®

Pengencer AndroMed® dapat langsung digunakan karena sudah tersedia di pasaran dengan konsentrasi 20%, cara membuat misalnya 20 ml AndroMed® ditambahkan dengan 80 ml aquabidest (untuk pembuatan pengencer 100 ml). Semen yang sudah diketahui konsentrasi dan jumlah pengencernya dari spektrofotometer langsung dicampur pengencer AndroMed® secara perlahan – lahan. Setelah itu dimasukkan ke dalam cool top sampai suhu 3-5°C.

3.3.4 Proses Penelitian

3.3.4.1 Proses Pengenceran

Semen yang memenuhi standar dicampur dengan pengencer AndroMed®. Pencampuran dilakukan pada temperatur ruang 25°C.

3.3.4.2 Waktu Equilibrasi

Semen yang masing-masing telah dicampur dengan pengencer AndroMed[®] dimasukkan ke dalam *cool top* hingga suhu mencapai 5°C. Tahap equilibrasi yakni proses adaptasi spermatozoa dengan pengencer yang mengandung gliserol dalam waktu yang berbeda yaitu P1= 1 jam, P2= 2 jam, P3= 3 jam untuk domba Merino, P4= 1 jam, P5= 2 jam P6= 3 jam untuk domba ekor gemuk pada suhu 3-5°C.

3.3.4.3 Pemeriksaan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa *Before Freezing*

Pemeriksaan motilitas dan viabilitas spermatozoa *before freezing*. Motilitas spermatozoa before freezing yang baik adalah 60-70%/3. (Susilowati dkk., 2010).

3.3.5 Pemeriksaan *Post Thawing Motility*

Straw dicairkan / thawing pada air hangat $\pm 37^{\circ}$ C selama 15 detik dengan menjepitnya memakai pinset. Standar motilitas spermatozoa *post thawing* yang baik adalah 30% dengan kecepatan gerakan individu 2 (Ditjennak, 2000).

3.4 Perlakuan

Dalam penelitian ini ada 6 perlakuan, yaitu :

1. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari semen Domba Merino (DM) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 1 jam.
2. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari semen Domba Merino (DM) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 2 jam.
3. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari semen Domba Merino (DM) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 3 jam.
4. Perlakuan 4 (P4) terdiri dari semen Domba ekor gemuk (DEG) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 1 jam.
5. Perlakuan 5 (P5) terdiri dari semen Domba ekor gemuk (DEG) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 2 jam.
6. Perlakuan 6 (P6) terdiri dari semen Domba ekor gemuk (DEG) ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 3 jam.

3.5 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel-variabel yang terdiri dari tiga variabel yaitu :

1. Variabel bebas yaitu waktu equilibrasi 1 jam, 2 jam, dan 3 jam dan pengencer yang digunakan (pengencer AndroMed[®]).
2. Variabel tergantung yaitu persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa domba Merino dan spermatozoa domba Ekor Gemuk sebelum dan sesudah pembekuan.

3. Variabel kendali berupa spesies hewan, jenis kelamin, umur, kondisi fisik hewan, dan suhu ruang penelitian.

3.6 Definisi Operasional

Waktu Equilibrase adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa untuk mengadakan keseimbangan dengan bahan pengencer yang mengandung gliserol pada rentangan waktu tertentu pada suhu diatas titik beku sebelum dilakukan pembekuan.

Motilitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa bergerak maju yang cepat atau progresif yang diamati dengan cara meneteskan satu tetes semen dan larutan NaCl fisiologis di atas gelas objek, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Viabilitas spermatozoa adalah daya tahan hidup spermatozoa yang diperiksa dengan meletakkan satu tetes kecil semen pada gelas objek dan satu tetes besar larutan Eosin negrosin di sampingnya lalu dicampur sampai homogen. Buat preparat ulas tipis dan preparat dikeringkan di atas bunsen. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Proses ini harus selesai maksimal selama 15 detik.

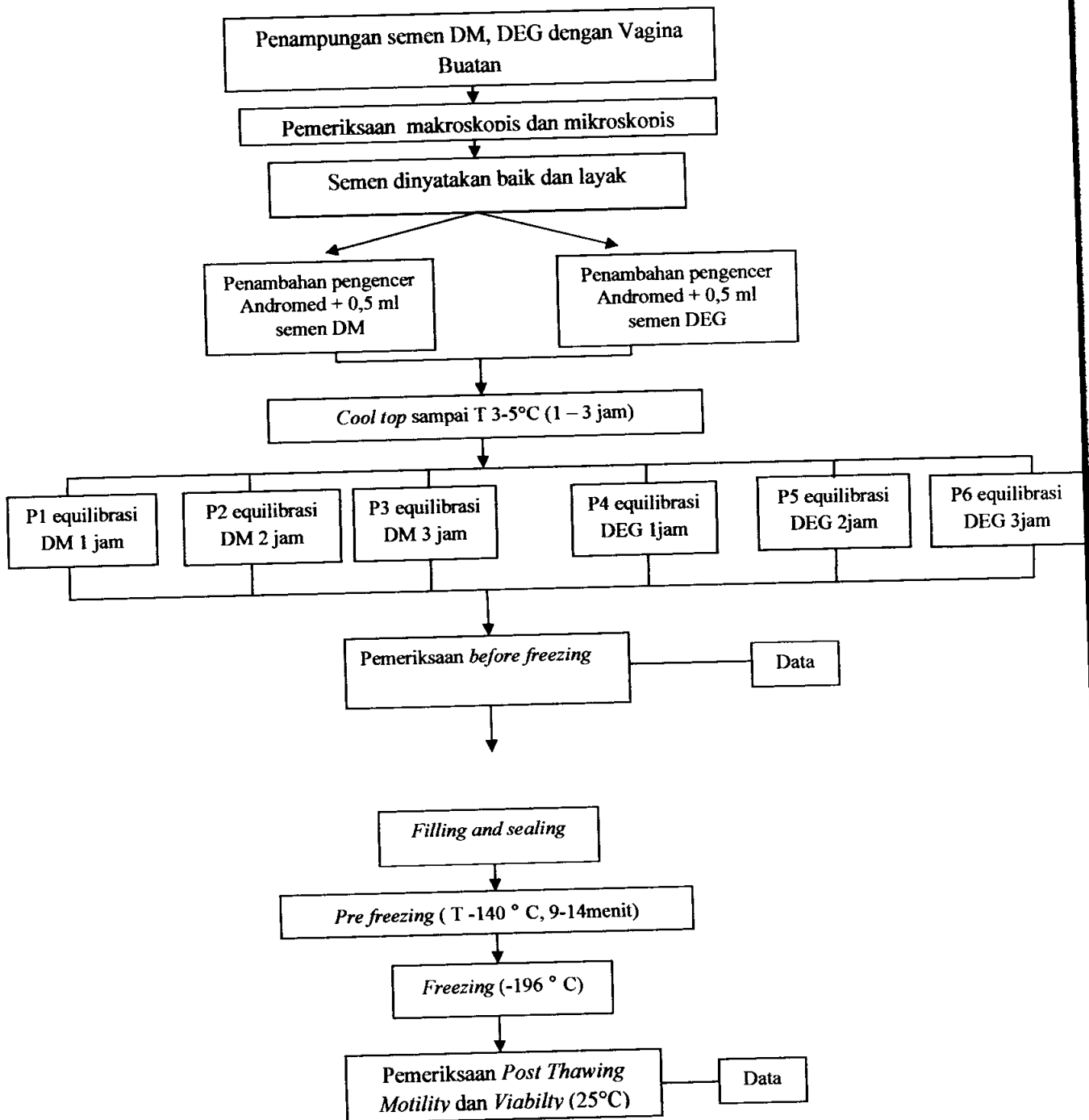
3.7 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) pola faktorial. Menggunakan 6 macam perlakuan, yaitu semen domba Merino yang ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 1 jam, 2 jam, 3jam. Semen domba ekor gemuk yang ditambah pengencer AndroMed[®] dengan waktu equilibrasi 1 jam, 2 jam, 3 jam. Masing – masing perlakuan dilakukan sebanyak 4 ulangan.

3.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan adalah *Analisis of Varian* (ANOVA) (Kusningrum, 2010).

3.8 Skema Penelitian



Gambar 3.8 Diagram alir prosedur penelitian