

**BAB IV**  
**METODOLOGI**

## BAB IV

### METODOLOGI

#### 4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Inseminasi Buatan dan Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan mulai tanggal 1 Oktober 2005 s/d 31 Desember 2005.

#### 4.2 Materi Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sperma segar ikan mas, larutan NaCl fisiologis 0,9%, glukosa bubuk, satu vial Penisilin 3.000.000 IU, Streptomisin 1 gram, larutan eosin didalam NaCl 3% dan aquadest. Peralatan yang digunakan meliputi lap halus, tabung Eppendorf, gelas ukur, gelas objek, gelas penutup, pipet, spuit, termometer, kertas pH, haemositometer, *counter*, mikroskop, aluminium foil, styrofoam, timbangan analitik, nampan, tissue, termos es dan lemari pendingin.

#### 4.3 Metode Penelitian

##### 4.3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yaitu suatu metode yang dipakai untuk mengetahui pengaruh dari kondisi yang sengaja diadakan yaitu dengan penambahan glukosa. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan pada penelitian ini menggunakan glukosa dengan dosis

berbeda yang ditambahkan pada bahan pengencer NaCl fisiologis. Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini dibagi menjadi 7, yaitu :

G0 : Kontrol, pengencer NaCl fisiologis tanpa penambahan glukosa

G1 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 0,01%

G2 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 0,05%

G3 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 0,1%

G4 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 0,5%

G5 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 1%

G6 : Pengencer NaCl fisiologis dengan penambahan glukosa sebesar 1,6%

Hasil pengacakan dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| G5 <sub>(1)</sub> | G2 <sub>(2)</sub> | G6 <sub>(2)</sub> | G3 <sub>(3)</sub> | G1 <sub>(1)</sub> | G0 <sub>(3)</sub> | G6 <sub>(3)</sub> |
| G3 <sub>(2)</sub> | G6 <sub>(4)</sub> | G0 <sub>(1)</sub> | G2 <sub>(3)</sub> | G4 <sub>(1)</sub> | G1 <sub>(4)</sub> | G5 <sub>(4)</sub> |
| G4 <sub>(4)</sub> | G1 <sub>(3)</sub> | G5 <sub>(2)</sub> | G3 <sub>(4)</sub> | G5 <sub>(3)</sub> | G2 <sub>(1)</sub> | G4 <sub>(2)</sub> |
| G6 <sub>(1)</sub> | G0 <sub>(4)</sub> | G2 <sub>(4)</sub> | G0 <sub>(2)</sub> | G4 <sub>(3)</sub> | G1 <sub>(2)</sub> | G3 <sub>(1)</sub> |

Model percobaan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 \\ j = 1, 2, 3, 4 \end{array}$$

keterangan :

$Y_{ij}$  = Hasil pengamatan motilitas atau lama hidup spermatozoa pada perlakuan penambahan glukosa ke - i ulangan ke - j

$\mu$  = Nilai tengah umum

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan penambahan glukosa ke - i

$\epsilon_{ij}$  = Pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan penambahan glukosa ke - i ulangan ke - j

### 4.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

#### A. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilaksanakan di Laboratorium Inseminasi Buatan dan Laboratorium Pendidikan Perikanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini bertujuan untuk mencari dosis glukosa yang dapat digunakan sebagai bahan tambahan dalam media pengencer dan tidak menyebabkan kematian spermatozoa secara langsung.

Penelitian pendahuluan pertama menggunakan dosis glukosa sama dengan yang digunakan pada kambing PE yaitu 1%, 2% dan 3%. Hasil penelitian pendahuluan ini menunjukkan bahwa spermatozoa masih dapat bertahan hidup selama 6 jam penyimpanan dengan dosis glukosa 1% dan untuk penambahan glukosa 2% dan 3% mengakibatkan kematian spermatozoa secara langsung.

Fujaya (2000) menyatakan bahwa komposisi bahan organik dalam seminal plasma ikan mas yang secara umum 10 kali lebih kecil dibanding mamalia. Berdasarkan pernyataan tersebut maka dilakukan penelitian pendahuluan kedua. Penelitian pendahuluan kedua ini menggunakan dosis glukosa 10 kali lebih kecil dari dosis yang pertama yaitu 0.1%. Dosis glukosa yang digunakan adalah 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%. Hasil penelitian pendahuluan ini menunjukkan bahwa spermatozoa dapat bertahan hidup sampai 3 hari pada dosis 0,08%. Penggunaan dosis 1,6% menyebabkan spermatozoa hanya dapat bertahan selama 3 jam. Hasil penelitian pendahuluan ini digunakan sebagai dasar penambahan glukosa dalam penelitian utama

## B. Penelitian Utama

### a. Persiapan Penelitian

#### i. Pengambilan Sperma (*Stripping*)

Prosedur *stripping* adalah ikan jantan matang gonad diambil dari bak pemeliharaan induk secara hati – hati kemudian dibungkus dengan lap halus pada bagian punggung, dipegang secara terlentang dengan lubang genital menghadap ke atas. Sperma dikeluarkan dengan cara diurut pada bagian perut ikan, yaitu dimulai dari bawah *linea lateralis* (di atas sirip perut) ke arah lubang genital. Sperma yang keluar dihisap dengan spuit 1 ml dan ditutup dengan aluminium foil untuk menghindarkan semen dari sinar matahari, kemudian dimasukkan ke termos es.

#### ii. Pembuatan Media Pengencer

Media pengenceran sperma menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% yang ditambah dengan glukosa. Penentuan dosis glukosa yang digunakan disesuaikan dengan penelitian pendahuluan yaitu dengan dosis glukosa sebesar 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,6%. Glukosa ditimbang sesuai dosis yang diperlukan kemudian dicampur dengan NaCl fisiologis 0,9%. Glukosa dalam satuan % setara dengan g/100 ml. Dosis 0,01% = 0,01 g/100 ml ~ 0,0001 g/ml, sehingga glukosa yang harus ditimbang adalah 0,0001 g. Dosis glukosa yang ditimbang tersebut terlalu kecil, sehingga harus diperbesar 10 kali dan kemudian dicampur dengan 10 ml NaCl fisiologis 0,9%. Prinsip yang sama juga berlaku untuk dosis glukosa yang lain.

### iii. Pengenceran Sperma

Prosedur pengenceran sperma adalah memindahkan sperma dari spuit ke 20 buah tabung Eppendorf sebanyak 0,05 ml menggunakan spuit steril, kemudian ditambahkan pengencer NaCl fisiologis 0.9% dengan kadar glukosa 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,6% masing – masing ke dalam 4 buah tabung Eppendorf sampai volumenya mencapai 1 ml. Setelah itu menyiapkan nampan yang berisi air, kemudian tabung Eppendorf diletakkan vertikal dengan bantuan styrofoam. Nampan beserta isinya dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu penyimpanan 5°C.

### b. Prosedur Kerja Pemeriksaan Sperma

Pemeriksaan sperma terdiri dari pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, pH dan kekentalan sedangkan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas dan lama hidup spermatozoa. Penentuan konsentrasi semen dilakukan menggunakan cara thoma dan dinyatakan dalam angka (Salisbury dan VanDemark, 1985). Cara ini menggunakan pengencer berupa larutan eosin di dalam NaCl 3%. NaCl 3% berfungsi untuk mematikan spermatozoa, sedangkan eosin berfungsi untuk memberikan warna larutan yang melatarbelakangi pandangan menjadi kontras agar dapat menghitung spermatozoa dengan mudah. Prosedur pemeriksaan dengan thoma adalah sperma diambil dengan pipet sampai tanda 0,5, kemudian pipet diangkat dari cairan sperma, ujung pipet diangkat dan dibersihkan dengan tissue. Selanjutnya larutan NaCl 3% yang mengandung eosin diambil sampai angka 101. Ujung karet penghisap ditekuk kemudian pipet dikocok dengan gerakan membentuk angka delapan beberapa kali sampai larutan didalamnya homogen. Beberapa tetes ( $\pm$  5 tetes) cairan dibuang dari pipet

tersebut, lalu ujung pipet dibersihkan lagi dengan tissue. Setelah itu larutan sperma dari pipet tersebut diteteskan pada papan hitung Thoma melalui salah satu sisi gelas penutup. Spermatozoa yang terdapat dalam 5 kotak yaitu 4 kotak di sudut dan 1 kotak di tengah dihitung di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x. Jika jumlah spermatozoa dalam 5 kotak adalah X, maka konsentrasi dalam cairan tersebut adalah  $X \times 10^6$  sel / ml.

Pemeriksaan motilitas dengan menggunakan perkiraan secara visual dan dinyatakan dalam persen (%). Cara pemeriksaannya adalah sebagai berikut : satu tetes sperma diletakkan di atas gelas obyek kemudian ditambahkan satu tetes aquadest steril dan diaduk rata kemudian ditutup dengan gelas penutup serta diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x. Spermatozoa motil ditandai dengan adanya gerakan progresif yaitu gerakan aktif menuju ke depan atau menentang arus. Spermatozoa immotil ditandai dengan tidak adanya gerakan progresif dan mengikuti arus.

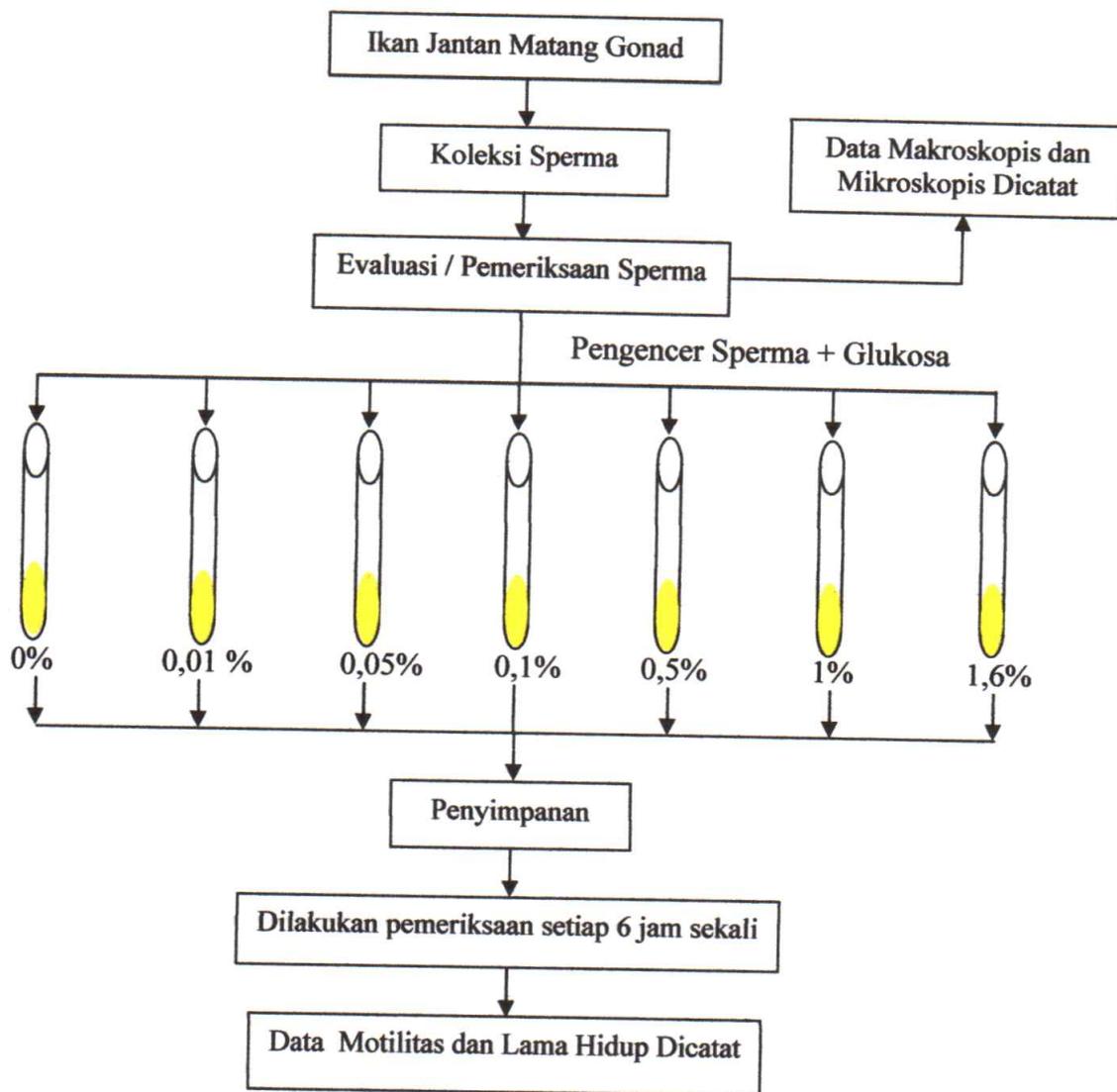
Pemeriksaan lama hidup dilakukan seiring dengan pemeriksaan motilitas yaitu dengan cara menghitung sampai berapa lama spermatozoa dapat bergerak. Pengamatan lama hidup dinyatakan dalam menit. Pemeriksaan terhadap sperma dilakukan baik pada sperma segar maupun perlakuan. Pengamatan sperma segar dilakukan untuk mengetahui kualitas sperma yang akan dijadikan sampel penelitian. Pengamatan sperma yang telah diencerkan (perlakuan) dilakukan sampai semua sel spermatozoa tidak bergerak lagi atau dengan angka kematian 95 – 100% dengan interval waktu pengamatan 6 jam sekali.

### 4.3.3 Parameter Penelitian

Parameter utama dalam penelitian ini adalah motilitas (%) dan lama hidup (hari) spermatozoa. Parameter penunjang yang juga diamati dalam penelitian ini adalah konsentrasi sperma segar (sel/ml), motilitas sperma segar (%) dan lama hidup (menit) sperma segar, derajat keasaman (pH), volume dan warna sperma.

### 4.3.4 Analisis Data

Analisis data penelitian dilakukan secara statistik dengan menggunakan Analisis Ragam (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan untuk mendapatkan perlakuan yang terbaik dilakukan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) taraf signifikansi 5% (Kusriningrum, 1990).



**Gambar 7. Bagan pelaksanaan penelitian**