

**BAB III**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

*Multi Jasa*

### BAB III

#### MATERI DAN METODE PENELITIAN

##### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di sub-laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan September hingga Oktober 2002.

##### 3.1.1 Materi Penelitian

Bahan penelitian adalah semen beku sapi *FH* dalam kemasan *straw* yang diambil dari unit semen beku TTP (Taman Ternak Pendidikan) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Media yang digunakan adalah EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) dan Percoll, sedangkan Eosin negrosin digunakan untuk pewarnaan spermatozoa.

##### 3.1.2 Peralatan

Laminar flow yang dilengkapi dengan sinar ultra violet, mikropipet, Obyek glass, gunting, pipet Pasteur, termometer, tissue, Water bath, sentrifuge, tabung sentrifuge, mikroskop yang dilengkapi dengan lensa okuler dengan skala mikrometer, container.

##### 3.2 Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

##### 3.2.1 Identifikasi Variabel

###### a. Variabel Bebas (Independent Variable)

Sentrifugasi sel spermatozoa dengan teknik kolom Percoll.

**b. Variabel Tergantung (Dependent Variable)**

- Motilitas spermatozoa
- Daya hidup spermatozoa
- Perbandingan mikrobiometri spermatozoa berkromosom X dan Y.

**3.2.2 Definisi Operasional Variabel**

Sentrifugasi sel spermatozoa adalah pemusingan dengan alat sentrifuge dengan kecepatan tertentu.

Daya hidup adalah jumlah sel spermatozoa yang hidup sebelum dilakukan sentrifus (kontrol) dibandingkan dengan sesudah disentrifus (perlakuan), berdasarkan hasil pewarnaan pada preparat ulas sel spermatozoa dengan menggunakan Eosin negrosin, dimana kepala sel spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna dan yang mati berwarna merah keunguan karena menyerap warna.

Motilitas adalah gerakan maju sel spermatozoa sapi dalam satu lapangan pandang sebelum dan sesudah perlakuan.

Perbandingan mikrobiometri sel spermatozoa berkromosom X dan Y adalah jumlah sel spermatozoa berkromosom X dan Y sebelum dan sesudah perlakuan berdasarkan ukuran kepala spermatozoa (pxl) dengan ukuran mikrobiometri ( $\mu\text{m}$ ).

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Pengambilan Sampel

Sebanyak 20 buah sampel semen beku sapi perah *I/H* dibagi menjadi dua kelompok yaitu 10 sampel untuk kontrol dan 10 sampel untuk perlakuan.

#### 3.3.2 Prosedur Penelitian

##### A. Kelompok Kontrol

Semen beku bentuk *straw* dari sapi *I/H* dicairkan pada air yang bersuhu 35<sup>0</sup> C selama 30 detik. Kemudian diteteskan 2 tetes pada obyek glass untuk pemeriksaan natif, untuk melihat motilitas dan dibuat preparat ulas dengan menggunakan pewarnaan Eosin negrosin untuk melihat hidup dan mati spermatozoa. Setelah itu mengukur panjang dan lebar kepala spermatozoa untuk melihat biometrinya. Untuk melihat motilitas dengan pembesaran 100x, dan untuk melihat hidup mati dan biometrinya dengan pembesaran 400x.

##### B. Kelompok Perlakuan

Disiapkan tabung sentrifus yang berisi Percoll dua kolom (45% dan 90%). Masing-masing satu *straw* semen beku dicairkan dalam temperatur 35<sup>0</sup>C selama 30 detik, dan dimasukkan dalam tabung sentrifus yang telah berisi media Percoll dua kolom 45% dan 90%. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan disisakan peletnya, dan ditambahkan EBSS 2 ml perlahan – lahan melalui dinding tabung. Setelah itu disentrifus lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, dibuang supernatannya, ditambah EBSS 250  $\mu$ l dan dibiarkan sebentar. Diambil dengan pipet dan diteteskan di obyek glass untuk dilihat motilitas,

daya hidup, dan mikrobiometri spermatozoa. Untuk melihat motilitas dengan pembesaran 100x, dan untuk mengukur daya hidup dan mikrobiometrinya menggunakan pembesaran 400x.

### **3.4 Rancangan Percobaan dan Analisis Data**

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah RAL ( Rancangan Acak Lengkap ) dengan dua kelompok yaitu, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang masing-masing dengan 10 ulangan.

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk deskriptif berupa persentase spermatozoa yang motil, spermatozoa yang hidup, dan ukuran mikrobiometri kepala spermatozoa. Kemudian data dianalisis dengan uji T independen (Steel and Torrie, 1989).