

BAB III
MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3. 1 Tempat dan Waktu Penelitian.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Inseminasi Buatan, Laboratorium Kebidanan Veteriner dan Laboratorium Fertilisasi In Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang dimulai pada tanggal 8 September sampai 31 Oktober 2004.

3. 2 Bahan dan Materi Penelitian.

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari semen segar domba, medium BO *plus* BSA *plus* kafein, larutan HOST, zat pewarna Eosin Negrosin.

3.2.2 Alat Penelitian.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan, tabung sentrifus, pipet pasteur, tissue, *object glass*, *cover glass*, gelas ukur, sentrifus, mikroskop, inkubator CO₂, lemari es, pembakar bunsen, alat penghitung.

3. 3 Metode Penelitian.

3.3.1 Persiapan Alat dan Bahan.

Sebelum penelitian dimulai harus dipersiapkan semua alat dan bahan penelitian diantaranya meliputi inkubator CO₂ yang telah stabil temperaturnya dan persiapan medium BO *plus* BSA *plus* kafein serta larutan HOST.

Vagina buatan dipersiapkan untuk menampung air mani domba. Unit vagina buatan ini tersusun dari beberapa komponen yang masing-masing dapat dipisahkan untuk dibersihkan pada waktu penyimpanan. Komponen tersebut adalah selongsong karet tebal (*Heavy Rubber Cylinder*), lubang pengisi air bertutup pentil, selaput karet tipis (*Inner Liner*), gelas berskala penampung air mani, corong karet (*Rubber Funnel*) berlubang, karet pengikat (*Rubber Band*), dan batang plastik (*Plastic Rod*) untuk memberi pelicin. Setelah semua komponen dipasang dan diisi dengan air panas melalui lubang pengisi air bertutup pentil dengan suhu 50 – 55 °C sampai penuh kemudian diperiksa suhu di dalam saluran vagina buatan kurang lebih 42 – 45 °C. Selanjutnya didalam saluran vagina buatan diolesi pelicin (vaselin atau bubuk tragakan) kira-kira 1/3-1/2 panjangnya (Hardijanto dkk, 1999).

Persiapan medium BO *plus* BSA *plus* kafein dan larutan HOST dilakukan sebelum pengambilan semen. Keduanya disimpan dalam lemari es agar tidak cepat rusak dan distabilkan dalam suhu kamar saat akan digunakan.

3.3.2 Penampungan Semen.

Sebelum penampungan semen, dilakukan persiapan pada pejantan dengan mencukur bulu dan mencuci daerah sekitar preputium dengan sabun dan air hangat kemudian dikeringkan agar semen terhindar dari kontaminasi kuman, feces dan urin. Untuk memperoleh kualitas air mani yang baik diusahakan merangsang libido si pejantan dengan cara membiarkan pejantan menaiki betina tetapi dicegah agar jangan sampai terjadi ejakulasi. Rangsangan dilakukan 2–3 kali, penis yang terjulur karena ereksi diarahkan ke dalam vagina buatan untuk ditampung semennya. Semen yang ditampung dalam tabung berskala disimpan pada suhu kurang lebih

5°C dan terhindar dari sinar matahari langsung untuk menjaga kualitasnya agar tetap baik dan tidak rusak.

3.3.3 Pemeriksaan dan Evaluasi Semen.

Pemeriksaan semen pada umumnya meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi: volume, konsistensi, bau, warna dan pH. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi: konsentrasi, gerakan massa, gerakan individu, penentuan persentase spermatozoa hidup dan menghitung sel spermatozoa yang abnormal.

3.3.4 Perlakuan terhadap Semen Domba.

Hasil dari penampungan semen segera dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan dan evaluasi semen. Kemudian semen dibagi menjadi 2 tabung atau 2 kelompok perlakuan dimana masing-masing perlakuan mendapat 6 kali ulangan. Perlakuan yang jumlahnya kecil hendaknya menggunakan ulangan lebih dari 3 untuk memperkecil terjadinya kesalahan selama penelitian (Rochiman, 1989).

Perlakuan 1(P 1): semen disentrifus dengan kecepatan 363 g selama 10 menit setelah ditambahkan 2 ml medium BO *plus* BSA *plus* kafein. Perlakuan 2 (P2): semen disentrifus dengan kecepatan 878 g selama 10 menit setelah ditambahkan 2 ml medium kapasitasi BO *plus* BSA *plus* kafein.

Setelah disentrifus dibuang supernatannya sehingga diperoleh pelletnya. Kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa dengan meneteskan semen domba di atas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass*. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400X. Pellet yang tersisa di dalam tabung ditambahkan 1 ml larutan HOST. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi selama

30 menit dalam inkubator CO₂ 5 %, 37° C. Kemudian dilakukan pemeriksaan keutuhan membran sel spermatozoa dengan cara membuat preparat ulas yaitu dengan meneteskan setetes kecil larutan ke atas gelas obyek lalu ditambahkan 1 tetes zat warna Eosin Negrosin kemudian dicampur dan dibuat ulasan setipis mungkin dan difiksasi dengan pembakar bunsen lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X.

3.4 Peubah yang Diamati .

Dalam penelitian ini peubah yang diamati adalah :

1. Motilitas sel spermatozoa domba.

Penilaian dilakukan berdasarkan persentase gerakan sel spermatozoa yang bergerak aktif (progresif) dibanding seluruh sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang (Djanuar, 1990)

2. Keutuhan membran sel spermatozoa domba.

Penilaian keutuhan membran berdasarkan persentase perubahan bentuk pada ekor. Membran yang utuh ditunjukkan dengan persentase sel spermatozoa yang ekornya melingkar dibanding seluruh sel spermatozoa yang tampak dalam lapangan pandang (Supriyatna, 1992).

3. 5 Analisis Data.

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk deskriptif berupa persentase sel spermatozoa yang motil dan persentase sel spermatozoa yang ekornya melingkar. Data yang berupa persentase, pecahan dan desimal harus ditransformasikan dengan rumus $\arcsin\sqrt{\%}$ sebelum data dianalisis dengan menggunakan Uji t independen

dengan taraf signifikan 5 % (Rochiman, 1989). Analisis data dengan menggunakan *Statistical Program for Social Science (SPSS) Versi 10* (Singgih, 2001).