

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada April 2014 di Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Lampung, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung.

B. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan *freezing* (*box freezing* lengkap, kontainer nitrogen cair, rak hitung, *timer*, pinset panjang), peralatan *thawing* (pemanas air, pinset, *beaker glass* 1000 ml, *thermometer*, *timer*), dan peralatan pemeriksaan kualitas (gunting, kertas label, mikroskop, pipet tetes, *object glass*, *cover glass*, *hair dryer*, *counter number*).

C. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen Sapi Simmental; NaCl fisiologis; media pengencer Andromed[®]; aqua bidestilata; nitrogen cair untuk pembekuan dan penyimpanan semen beku; air hangat (suhu 37°C) untuk *thawing*; eosin 2% untuk membuat preparat apus dalam menentukan persentase spermatozoa hidup.

D. Rancangan Penelitian

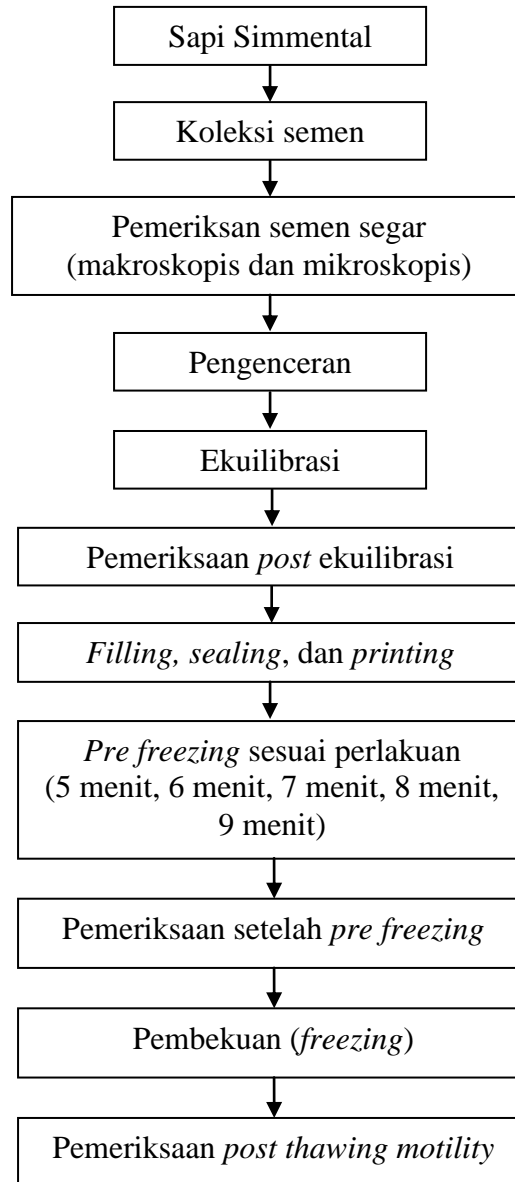
Rancangan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan taraf waktu *pre freezing* dan setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Pengambilan sampel *straw* dilakukan secara acak. Semen yang berasal dari satu ekor Sapi Simmental dibagi menjadi lima kelompok perlakuan waktu *pre freezing* (5 menit, 6 menit, 7 menit, 8 menit, 9 menit). Data yang diperoleh dari hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dilakukan analisis secara statistik. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis sidik ragam dengan taraf nyata 5% atau 1%. Apabila hasilnya berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji polinomial ortogonal pada taraf 5% atau 1% menurut Steel dan Torrie (1991).

E. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan menampung semen dari pejantan Sapi Simmental menggunakan vagina buatan (*artificial vagina*), selanjutnya dilakukan evaluasi semen segar secara makroskopis (volume, konsistensi, warna, bau) dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi). Semen segar yang memenuhi syarat kemudian diencerkan dengan pengencer Andromed[®] secara merata. Selanjutnya dilakukan ekuilibrasi terhadap semen yang telah diencerkan. Pemeriksaan *post* ekuilibrasi dilakukan setelah ekuilibrasi selesai. Semen yang memenuhi standar akan dilanjutkan proses *filling*, *sealing*, dan *printing*. Langkah selanjutnya yaitu melaksanakan sampling terhadap *straw* berisi semen sapi Simmental yang akan dibekukan. Sampel dibagi sesuai perlakuan waktu

pre freezing yang direncanakan (5 menit, 6 menit, 7 menit, 8 menit, dan 9 menit).

Bagan pelaksanaan penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan pelaksanaan penelitian

Proses pembuatan semen beku sebagai berikut:

1. melakukan penampungan semen menggunakan vagina buatan;
2. melakukan evaluasi terhadap semen segar (makroskopis dan mikroskopis);

3. mencampurkan semen yang memenuhi syarat dengan pengencer Andromed[®] ke dalam *beaker glass*;
4. menutup *beaker glass* yang berisi semen yang telah diencerkan menggunakan *aluminium foil* dan memasukkannya ke dalam *cool top* bersuhu 3 – 5 °C;
5. melakukan proses ekuilibrase selama 4 jam di dalam *cool top*;
6. setelah ekuilibrase selesai dilanjutkan dengan pemeriksaan *post* ekuilibrase;
7. proses *filling*, *sealing*, dan *printing*;
8. meletakkan *straw* yang berisi semen cair di atas rak hitung yang telah diberi label sesuai perlakuan;
9. memasukkan N₂ cair sebanyak 7,5 liter ke dalam *box freezing* dengan ukuran panjang 43 cm dan lebar 27 cm;
10. melakukan *pre freezing* dengan cara memasukkan rak hitung yang berisi *straw* semen cair di atas permukaan N₂ cair dalam *box freezing* selama perlakuan waktu yang diberikan (5 menit, 6 menit, 7 menit, 8 menit, 9 menit);
11. setelah *pre freezing* selesai dilanjutkan dengan pemeriksaan setelah *pre freezing*;
12. mengambil *straw* menggunakan pinset dan mencelupkannya ke dalam nitrogen cair sampai terendam;
13. setelah pembekuan selesai, dilanjutkan dengan pemeriksaan *post thawing motility*;
14. melakukan pengumpulan data parameter yang diamati yaitu persentase motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup pada setiap pemeriksaan kualitas.

Prosedur yang dilakukan untuk melihat motilitas individu spermatozoa sebagai berikut:

1. meneteskan sampel semen diatas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass*;
2. mengamati motilitas spermatozoa menggunakan mikroskop dengan perbesaran lemah (10×10) atau perbesaran sedang (10×40);
3. menentukan persentase motilitas spermatozoa sesuai dengan kriteria penilaian gerakan individu spermatozoa menurut Toelihere (1981) sebagai berikut:
 - 0% : spermatozoa tidak bergerak;
 - 0 – 30% : gerakan berputar ditempat, pergerakan progresif;
 - 30 – 50% : gerakan berayun atau melingkar, pergerakan progresif;
 - 50 – 80% : ada gerakan massa, pergerakan progresif;
 - 80 – 90% : ada gelombang, pergerakan progresif;
 - 90 – 100% : gelombang sangat cepat, pergerakan sangat progresif;

Prosedur yang dilakukan untuk menghitung persentase spermatozoa hidup sebagai berikut:

1. melakukan *thawing*;
2. meneteskan semen beku pada salah satu ujung gelas obyek;
3. menambahkan satu tetes eosin 2% pada bagian yang sama;
4. menempelkan ujung gelas obyek yang lain pada kedua cairan sehingga keduanya bercampur, kemudian didorong ke ujung gelas obyek;
5. mengeringkan preparat ulas tersebut menggunakan *hair dryer*;
6. setelah kering, melakukan pemeriksaan spermatozoa yang hidup dan mati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran sedang (10×40) atau kuat

(10×100) , spermatozoa yang hidup tetap tidak berwarna sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah atau merah muda.

7. menghitung persentase spermatozoa hidup dengan rumus berikut.

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{jumlah sperma terhitung} - \text{jumlah sperma mati}}{\text{jumlah sperma terhitung}} \times 100\%$$

F. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah persentase motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup.