

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 7—13 April 2014, di 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 depo lengkap, kontainer nitrogen cair, rak hitung, *timer*, pinset panjang, sarung tangan kulit), 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*).

C. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen Sapi Limousin, nitrogen cair, air hangat, dan eosin 2%.

D. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan pertama jarak *straw* 2 cm selama 9 menit, perlakuan kedua jarak *straw* 4 cm selama 9 menit, perlakuan ketiga jarak *straw* 6 cm selama 9 menit, perlakuan keempat jarak *straw* 8 cm selama 9 menit, dan perlakuan kelima jarak *straw* 10 cm selama 9 menit.

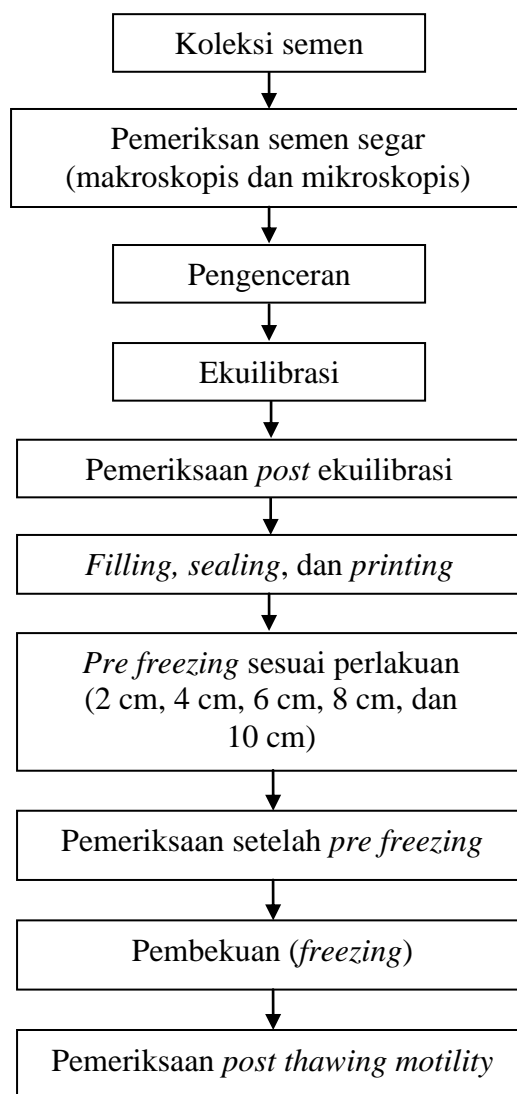
Pengambilan sampel *straw* dilakukan secara acak. Jumlah *straw* yang digunakan sebanyak 20 *straw*. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dilakukan analisis secara statistik. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis sidik ragam dengan taraf nyata 5% atau 1%. Apabila hasilnya berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal pada taraf 5% atau 1% menurut petunjuk Steel dan Torrie (1991).

E. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan menampung semen dari pejantan Sapi Limousin menggunakan vagina buatan (*artificial vagina*), selanjutnya dilakukan evaluasi semen segar secara makroskopis (volume, konsistensi, warna, pH) dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi). Semen segar yang memenuhi syarat kemudian diencerkan dengan pengencer *Andromed*[®] secara merata. Selanjutnya dilakukan ekuilibrisasi terhadap semen yang telah diencerkan dengan tujuan untuk menyesuaikan diri sebelum dilakukan proses pembekuan. Pemeriksaan *before freezing* dilakukan setelah ekuilibrisasi selesai. Semen yang

memenuhi standar akan dilanjutkan proses *filling*, *sealing*, dan *printing*. Langkah selanjutnya yaitu melaksanakan sampling terhadap *straw* berisi semen Sapi Limousin yang akan dibekukan. Sampel dibagi sesuai dengan perlakuan jarak *straw* saat proses *pre freezing* (2 cm, 4 cm, 6 cm, 8 cm, dan 10 cm).

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*[®] yang disimpan dalam *water bath* suhu 27⁰C;
4. menutup *beaker glass* yang berisi semen yang telah diencerkan menggunakan *aluminium foil* dan memasukkannya ke dalam *cool top* bersuhu 3—5⁰C;
5. melakukan proses ekuilibrasi selama 4 jam di dalam *cool top*;
6. setelah ekuilibrasi selesai dilanjutkan dengan pemeriksaan *post* ekuilibrasi;
7. proses *filling*, *sealing*, dan *printing*;
8. meletakkan *straw* yang berisi semen cair di atas rak hitung yang telah diberi label sesuai perlakuan;
9. melakukan *pre freezing* dengan cara memasukkan rak hitung yang berisi *straw* semen cair di atas permukaan N₂ cair dengan volume N₂ 7,5 liter dalam *box freezing* berukuran 43 x 27 cm selama perlakuan jarak yang diberikan (2 cm, 4 cm, 6 cm, 8 cm, dan 10 cm);
10. setelah *pre freezing* selesai dilanjutkan dengan pemeriksaan setelah *pre freezing*;
11. mengambil *straw* menggunakan pinset dan mencelupkannya ke dalam nitrogen cair sampai terendam;
12. setelah pembekuan selesai, dilanjutkan dengan pemeriksaan *post thawing motility*;

13. melakukan pengumpulan data parameter yang diamati yaitu persentase motilitas *spermatozoa* dan persentase *spermatozoa* hidup pada setiap pemeriksaan kualitas.

Prosedur yang dilakukan untuk melihat penilaian motilitas individu *spermatozoa* sebagai berikut:

1. meneteskan sampel semen di atas *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass*;
2. mengamati motilitas *spermatozoa* menggunakan mikroskop dengan perbesaran lemah (10 x 10) atau pembesaran sedang (10 x 40);
3. menentukan persentase *motilitas spermatozoa* sesuai dengan kriteria yang ada.

Menurut Toelihere (1985), penilaian gerakan individu *spermatozoa* yang terlihat pada mikroskop adalah sebagai berikut:

- | | |
|-----------|---|
| 0% | : <i>spermatozoa</i> 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 melakukan pemeriksaan *spermatozoa* hidup sebagai berikut:

1. melakukan *thawing*;
2. meneteskan semen beku pada salah satu ujung gelas obyektif;
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. Jumlah *spermatozoa* yang dihitung minimal 210 sel;
7. menghitung persentase *spermatozoa* hidup dengan rumus berikut.

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

F. Peubah yang Diamati

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