

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Unit Pelayanan Tekhnis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah (UPTD-BIBD) Lampung Tengah. Kegiatan penelitian berlangsung pada Juli 2014. Penelitian ini menggunakan semen dari seekor Sapi Brahman milik Unit Pelayanan Tekhnis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah (UPTD-BIBD) Lampung Tengah.

#### **B. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **1. Alat**

Peralatan yang digunakan adalah vagina buatan, tabung penampung berskala, labu didih dan penangas, timbangan elektrik, termometer, spatula, corong, gelas ukur dan tutupnya, kertas label, kertas *whatman*, *waterbath*, *object* dan *cover glass*, spektrofotometer, *micropipet*, *beaker glass*, mesin *filling and sealing*, pH meter, boks untuk *prefreezing* dan *freezing*, mikroskop, air hangat untuk proses *thawing*, tisu, *counter number*, *stopwatch*, *hairdryer* dan kontainer, serta alat tulis.

##### **2. Bahan**

Bahan yang digunakan adalah semen segar Sapi Brahman, zat pewarna (eosin), NaCl fisiologik, NaCl 3%, bahan pengencer yang terdiri dari tris,

kuning telur, fruktosa, asam sitrat, antibiotik (*penisilin* dan *streptomisin*), gliserol, *aquabidestilata* dan nitrogen cair.

### **C. Metode Penelitian**

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima kali perlakuan dengan tiga kali pengulangan.

Perlakuan yang dicobakan adalah konsentrasi gliserol sebagai berikut :

G1 : penambahan gliserol 5% dalam bahan pengencer

G2 : penambahan gliserol 6 % dalam bahan pengencer

G3 : penambahan gliserol 7% dalam bahan pengencer

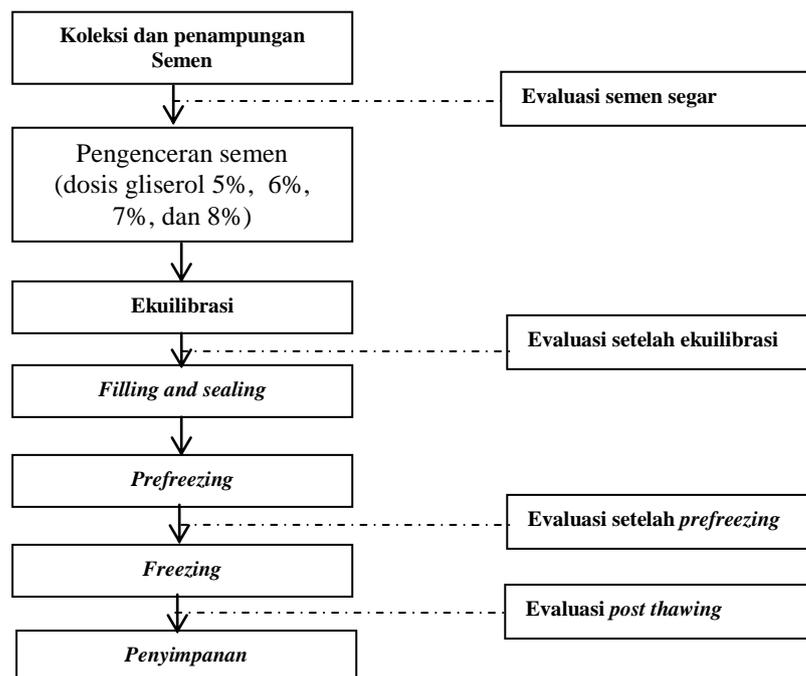
G4 : penambahan gliserol 8% dalam bahan pengencer

G5 : penambahan gliserol 9% dalam bahan pengencer.

Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan 1% dan dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal (Steel dan Torrie 1993).

### **D. Prosedur penelitian**

Penelitian ini menguji penggunaan dosis gliserol yang berbeda pada pengencer tris kuning telur terhadap kualitas spermatozoa. Kegiatan penelitian ini terbagi dalam beberapa tahap kegiatan yaitu proses koleksi atau penampungan semen, evaluasi semen segar, proses pengenceran dengan dosis gliserol yang berbeda, ekuilibrasi (diikuti evaluasi semen), *filling* dan *sealing*, *prefreezing* (diikuti evaluasi semen), *freezing* (evaluasi semen *post thawing*), dan penyimpanan semen beku. Prosedur penelitian ini dijelaskan pada gambar di bawah ini :



Gambar 4. Prosedur kerja

### 1. Koleksi dan penampungan semen

Proses koleksi semen diawali dengan persiapan alat koleksi semen berupa vagina buatan serta persiapan pejantan pemancing. Proses koleksi pejantan dilakukan secara kompleks dengan upaya yang terkoordinasi oleh kolektor. Pejantan pemancing yang digunakan harus diikat di dalam kandang jepit agar ketika digunakan sebagai pemancing tidak akan lari dan mengurangi *stress* saat proses penampungan. Usaha untuk meningkatkan libido pejantan dengan melakukan pengekangan (*false mount*) sebanyak 2--3 kali sebelum semen ditampung. Selain itu Salisbury dan VanDenmark (1985) menyatakan bahwa rangsangan seksual akan menambah spermatozoa yang akan ditampung. Pejantan donor akan menaiki pejantan pemancing dan akan berejakulasi ketika penis mulai dimasukkan

ke dalam vagina buatan. Segera setelah ditampung semen yang telah dikoleksi segera dibawa ke laboratorium untuk diperiksa dan diproses lebih lanjut.

## **2. Evaluasi semen segar**

Layak atau tidaknya semen agar dapat diolah menjadi semen beku harus melalui tahapan kualitas yang telah ditentukan sesuai dengan standar kualitas kontrol yang ada. Kualitas semen ditentukan melalui tahap pengamatan berupa pengamatan mikroskopis dan makroskopis. Uji secara makroskopis yaitu volume, warna, konsistensi semen segar dan pH semen. Uji mikroskopis berupa motilitas massa, motilitas individu dan konsentrasi sperma

## **3. Pengenceran semen**

Hafez (1993) menyatakan bahwa proses pengenceran dilakukan dalam tabung reaksi secara steril. Volume bahan pengencer dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Jumlah pengencer (ml)} = \frac{\text{Volume semen} \times \% \text{ Motilitas} \times \text{Konsentrasi}}{100 \text{ juta}/0,25(\text{dosis straw ib})} - \text{Volume}$$

Semen diencerkan dengan menggunakan bahan pengencer tris sitrat kuning telur.

Bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari kuning telur, asam sitrat, fruktosa, antibiotik (penisilin dan streptomisin), aquabides serta gliserol yang berbeda. Komposisi bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2. Komposisi bahan pengencer berikut ini :

Tabel 2. Komposisi bahan pengencer

Bahan	Perlakuan				
	G1	G2	G3	G4	G5
<i>Tris Aminomethan</i> (g)	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
<i>Citric Acid</i> (g)	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
Fruktosa (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Gilserol (ml)	5	6	7	8	9
Penisillin (100.000 IU/100 ml )	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Streptomisin (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Kuning telur (ml)	20	20	20	20	20
Aquabides (ml)	80	80	80	80	80

(BIB Poncowati, 2012)

Keterangan :

G1= Gliserol 5%, G2= Gliserol 6%, G3= Gliserol 7 %, G4= Gliserol 8%

G5= Gliserol 9%

Proses pembuatan bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari dua tahap yakni pembuatan larutan *stock solution* dan pengenceran. Pembuatan larutan *stock solution* dilakukan dengan cara menambahkan *tris aminomethan, citric acid, fruktosa, aquabides* dengan dosis yang telah ditentukan. Proses pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan larutan  $\pm 74\%$  *stock solution*,  $\pm 20\%$  kuning telur, gliserol (dengan dosis yang telah ditentukan), streptomisin dan penisilin. Setelah larutan tercampur, dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan bahan pengencer (BIB Poncowati, 2012).

#### 4. Ekuilibrase

Proses ekuilibrase dilakukan setelah semen dicampur dengan bahan pengencer. Ekuilibrase dilakukan selama 4 jam di dalam *cooltop*. Waktu ekuilibrase adalah waktu yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian sperma yang berlebihan dapat dicegah. Semen harus berada di dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5 °C (Toelihere, 1981).

### **5. Evaluasi *post* ekuilibrasi**

Evaluasi dilakukan setelah semen melewati proses ekuilibrasi selama 4 jam.

Evaluasi semen meliputi pengamatan motilitas massa dan motilitas individu dari sampel tersebut.

### **6. *Filling and sealing***

Proses tersebut merupakan proses pengisian dan pengemasan semen yang telah diencerkan karena telah memenuhi syarat setelah proses ekuilibrasi. Semen dikemas di dalam mesin *cool top* dengan suhu 5--6 °C secara otomatis dan diisi ke dalam *straw* yang berisi 0,25 ml semen dengan konsentrasi sperma  $25 \times 10^6$  sel/dosis (BIB Poncowati, 2012).

### **7. Proses *prefreezing***

Proses *prefreezing* semen dilakukan dengan cara meletakkan *straw* menggunakan boks diatas uap nitrogen selama 9 menit pada kisaran suhu mencapai -140°C. Boks yang digunakan untuk proses *prefreezing* diisi dengan nitrogen cair dengan batas ketinggian 10 cm. Sedangkan, jarak permukaan nitrogen cair dalam boks dengan *straw*  $\pm 6$  cm. Proses *prefreezing* dilakukan dalam kondisi tertutup dengan tujuan untuk mengurangi proses penguapan nitrogen cair di dalam *boks* (BIB Poncowati, 2012).

### **8. Evaluasi *prefreezing***

Evaluasi *prefreezing* merupakan pengujian kualitas semen untuk mengetahui motilitas massa dan motilitas individu serta daya tahan hidup sperma setelah proses *prefreezing*.

## **9. Proses *freezing***

Proses *freezing* atau pembekuan dilakukan setelah proses *prefreezing*. Menurut Toilehere (1981), pembekuan adalah suatu proses sperma setelah mengalami proses ekuilibrase dan dimasukkan ke dalam kontainer berisi nitrogen cair bersuhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Straw* yang telah berisi semen beku dimasukkan di dalam *goblet* dan dalam kanister. Setelah *straw* siap barulah dimasukkan ke dalam kontainer dengan kondisi nitrogen cair telah diisi penuh. Semen beku tersebut siap disimpan dalam kontainer dan dapat digunakan sesuai kebutuhan.

## **10. Evaluasi *post thawing***

Evaluasi semen beku setelah pencairan kembali (*post thawing*) merupakan pengujian kualitas terakhir dalam pengolahan semen beku.

Menurut SNI 4869. 1-2008, semen beku sesudah dicairkan kembali (*post thawing*) pada suhu antara  $37^{\circ}\text{C}$  dan  $38^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik sampai dengan 30 detik harus menunjukkan motilitas spermatozoa minimal 40 %, dan derajat gerakan individu spermatozoa minimal 2 (dua).

## **E. Peubah Yang Diamati**

### **1. Motilitas spermatozoa**

Motilitas spermatozoa dapat dilihat melalui pengamatan secara mikroskopis. Semen yang diperoleh diletakan dalam preparat yang dibuat diatas gelas obyek kemudian diamatai di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 10. Preparat semen tersebut dinilai untuk mengetahui gerakan individu spermatozoa di dalam semen.

Standar penilaian gerakan individu yang terlihat pada mikroskop adalah

- 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,

(Toelihere, 1981).

## **2. Persentase spermatozoa hidup**

Proses perhitungan sel yang hidup dilakukan dengan cara membuat preparat ulas menggunakan pengecatan eosin sebesar 2%. Pada gelas obyek larutan eosin ditetaskan kemudian dicampur dengan satu tetes semen hingga homogen. Setelah itu dibuat menjadi preparat ulas tipis dengan cara menempelkan ujung kaca penutup pada kedua cairan sehingga cairan tersebut tercampur homogen. Setelah itu dorong gelas penutup ke ujung gelas obyek sehingga terbentuk lapisan tipis dan keringkan menggunakan pengering.

Proses evaluasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 10 x 40 (40 kali). Spermatozoa yang mati dan hidup memiliki perbedaan diantaranya spermatozoa hidup akan terlihat tidak berwarna dan untuk spermatozoa mati akan berwarna merah muda atau merah karena dindingnya menyerap warna akibat permeabilitas dindingnya meningkat. Proses pengamatan dapat dilakukan dengan membedakan sel yang hidup dan mati dengan jumlah

minimal sel yang diamati sebanyak 200 sel. Perhitungan spermatozoa hidup dapat dilakukan dengan cara :

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

(Kristanto, 2004).