

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan pola faktorial dengan dua faktor, yaitu suhu dan lama *thawing*, dengan masing-masing perlakuan 3 kali ulangan sebagaimana dijelaskan Zenichiro (2002) bahwa pengujian setelah *thawing* maksimal dilakukan pada 3 *straw*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2011 di Laboratorium Balai Besar Insemenasi Buatan (BBIB) Singosari Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang diamati adalah sebagai berikut :

3.3.1 Variabel bebas : a. Suhu perendaman yang terdiri dari 3 taraf yaitu : 34⁰C, 37⁰C, dan 40⁰C.

b. Lama *thawing* terdiri dari 3 taraf yaitu : 30 detik, 35 detik dan 40 detik.

3.3.2 Variabel terikat : Kualitas spermatozoa meliputi : motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran.

3.3.3 Variabel kendali : Jenis semen yang digunakan adalah semen beku jenis sapi Madura

3.4 Populasi dan Sampel

Semen beku yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen beku sapi Madura yang diencerkan dengan *tris aminomethan* dan kuning telur yang berasal dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang.

3.5 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat dan bahan untuk menyimpan semen beku, *thawing*, dan pemeriksaan kualitas.

3.5.1 Menyimpan semen beku

Alat yang digunakan untuk menyimpan semen beku adalah kontainer yang telah berisi nitrogen cair.

3.5.2 *Thawing*

Alat-alat yang digunakan adalah penjepit *straw* (pinset), *thermometer*, gunting, *waterbach*, kertas tisu dan *stopwatch*, sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah semen beku (*straw*) dan air.

3.5.3 Pemeriksaan semen (motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran)

Alat : Ose, objek glass, cover glass, mikroskop, kertas label, counter, tabung reaksi, aluminium foil, inkubator dan mikropipet.

Bahan : semen yang telah dithawing, Eosin-Negrosin (dengan komposisi : Eosin 0,5 g, Negrosin 2,5 g dan Natrium sitrat 1,5 g) dan *Hypo-osmotic Swelling Test* (0,09 g NaCl/50 ml aquades)

3.6 Prosedur

Prosedur percobaan ini meliputi *thawing* dan pemeriksaan semen

3.6.1 *Thawing*

- a. Menyiapkan *waterbach* dan mengatur suhu air di dalamnya hingga suhu yang telah ditentukan.
- b. Mengambil *straw* dengan penjepit (pinset) dari kontainer dan memasukkannya ke dalam *waterbach* selama waktu yang telah ditentukan.

3.6.2 Pemeriksaan Motilitas

- a. Setelah *thawing*, *straw* diambil dan digunting pada ujung yang tidak bergabus serta membuat sedikit sobekan di bagian tengahnya.
- b. Meneteskan semen pada objek glass yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian ditutup dengan cover glass.
- c. Mengamati objek glass di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan menilai spermatozoa yang bergerak lurus ke depan.
- d. Menentukan presentasinya.

3.6.3 Pemeriksaan Viabilitas

Dalam pelaksanaan pemeriksaan ini digunakan preparat apus dengan pewarnaan Eosin-Negrosin.

- a. Eosin-Negrosin dipanasi pada suhu sekitar 37⁰C.
- b. Meneteskan semen sebanyak satu tetes (hasil *thawing* seperti prosedur di atas) pada bagian pinggir objek glass yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%.

- c. Meneteskan Eosin-Negrosin sebanyak 4-5 tetes di samping semen lalu dicampur dengan menggunakan ose hingga homogen.
- d. Membuat preparat apus tipis dengan cara menempelkan ujung objek glass lain pada campuran tersebut (posisi miring) dengan sudut kemiringan 45° .
- e. Mendorong sepanjang objek glass yang pertama sehingga diperoleh selapis semen yang telah diwarnai.
- f. Mengamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.
- g. Menghitung spermatozoa hidup dan mati.
- h. Menentukan presentasinya.

3.6.4 Pemeriksaan Abnormalitas

Pemeriksaan abnormalitas ini dilakukan dengan mengamati preparat yang telah dipakai untuk pemeriksaan viabilitas dengan menghitung jumlah spermatozoa abnormal dan normal kemudian menentukan presentasinya (Partodihardjo, 1992).

3.6.5 Pemeriksaan Integritas Membran

- a. Mencampur 0,1 ml Semen yang telah di *Thawing* dengan larutan HOS tes 1,0 ml.
- b. Menginkubasi selama 30 menit pada 37°C .
- c. Mengamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.
- d. Mengitung spermatozoa yang bengkak.
- e. Menghitung presentasinya.

3.7 Variabel Pengamatan

3.7.1 Motilitas Individu Spermatozoa

Penilaian dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa yang pergerakannya progresif maju ke depan dibandingkan dengan seluruh yang teramati (bergerak dan tidak bergerak) (Partodihardjo, 1992).

$$\% \text{ Motilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa progresif}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.7.2 Viabilitas Spermatozoa

Spermatozoa ditetaskan di atas objek glass dan ditambahkan dengan satu tetes eosin-negrosin, kemudian dibuat preparat apus dan dikeringkan, kemudian menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200 kali dan dihitung spermatozoa yang hidup (tidak menyerap warna) dan spermatozoa yang mati (menyerap warna) kemudian dicari persentasenya (Partodihardjo, 1992).

Spermatozoa yang memiliki permeabilitas baik akan menghambat masuknya warna ke dalam membran sehingga tidak dapat menyerap warna (transparan), demikian juga sebaliknya. Perhitungan viabilitas dilakukan dengan mencari proporsi spermatozoa yang tidak menyerap warna (transparan) dengan yang menyerap warna.

$$\% \text{ Viabilitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.7.3 Abnormalitas Spermatozoa

Persentase Abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan warna untuk diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan penghitungannya adalah membandingkan antara spermatozoa yang abnormal dengan spermatozoa yang normal pada luas pandang yang sama (Partodihardjo, 1992).

$$\% \text{ Abnormalitas Spermatozoa} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.7.4 Integritas Membran Spermatozoa

0,1 ml semen yang telah dilakukan *Thawing* dicampur dengan 1,0 ml larutan HOS Test, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C, dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali kemudian dihitung presentase spermatozoa bengkak diantara spermatozoa yang diamati.

Apabila kondisi membran baik, cairan dengan tekanan osmose rendah mudah masuk dan tidak dapat keluar sehingga ekor melingkar dan menggelembung, sedangkan spermatozoa dengan membran yang jelek tidak dapat bereaksi dengan larutan hypoosmotik sehingga tidak terjadi perubahan.

$$\% \text{ Integritas Membran} = \frac{\text{jumlah spermatozoa bengkak}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian di analisa dengan menggunakan pola faktorial . Jika hasilnya menunjukkan pengaruh yang signifikan, maka dilakukan uji BNT 1% untuk mengetahui perbedaan suhu dan lama *thawing* (Sastrosupadi. 2000).

