

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 01 November 2017 sampai 13 Januari 2018 di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dan Institut BioSains Universitas Brawijaya Malang.

#### **3.2 Materi Penelitian**

Materi penelitian yang digunakan yaitu semen segar berkualitas rendah yang berasal dari sapi pejantan Limousin dengan umur 8-11 tahun yang dipelihara secara intensif di BBIB Singosari Malang. Penampungan semen rutin dilakukan sebanyak 2 kali dalam seminggu dengan metode vagina buatan. Pengambilan semen sapi pejantan Limousin dilakukan secara *purposive sampling*, yaitu menggunakan semen yang memiliki kriteria motilitas individu 40% hingga 50% dan motilitas massa ++ (2+). Semen segar diuji kualitas secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, pH dan konsistensi. Sedangkan kualitas secara mikroskopis meliputi motilitas individu, motilitas massa, kecepatan dan konsentrasi. Pengencer yang digunakan yaitu susu skim kuning telur dengan penambahan ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.). Biji buah pinang (*Areca catechu* L.) didapatkan dari Laboratorium Materia Medika Batu. Biji buah pinang yang digunakan yaitu buah yang masih berwarna hijau atau buah yang belum masak. Pembuatan ekstrak tepung biji buah pinang (*Areca catechu* L.) dilakukan di Laboratorium Biomol Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Brawijaya Malang dengan menggunakan pelarut

etanol 96%. Gliserol yang digunakan sebanyak 13% sebagai krioprotektan intraseluler.

### 3.2.1 Alat dan Bahan Pembuatan Pengencer Susu Skim Kuning Telur

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan pengencer susu skim kuning telur sebagai berikut:

Alat : Timbangan analitik, spatula, *magnetic stirrer*, *mikrotipe white*, mikropipet, disposable syringe, erlenmeyer, *aluminium foil*, kertas saring, timer, *beaker glass*, kompor, panci, tissue, refrigerator.

Bahan : Komposisi bahan pengencer susu skim kuning telur disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi bahan pengencer susu skim kuning telur 100 ml

| Bahan        | Konsentrasi |
|--------------|-------------|
| Susu skim    | 10 g        |
| Fruktosa     | 1 g         |
| Kuning telur | 5 ml        |
| Aquadest     | 95 ml       |
| Pennicilin   | 0,34 g      |
| Streptomicyn | 0,16 g      |

Sumber: Wiratri, Susilawati dan Wahjuningsih (2014)

### 3.2.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu L.*)

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu L.*) sebagai berikut:

- Alat : Pisau, blender, mesin bubuk, baskom, ayakan, oven, erlenmeyer
- Bahan : Biji buah pinang (*Areca catechu* L.), etanol 96%

### **3.2.3 Alat dan Bahan Pengamatan Kualitas Spermatozoa**

Alat dan bahan yang digunakan dalam pengamatan kualitas spermatozoa sebagai berikut:

- Alat : Mikroskop cahaya, *object glass*, *cover glass*, mikropipet, *yellow tip*, *refrigerator*, *cool tub*, *Hand Tally Counter* (HTC), *Spectrofotometer*, *slide warmer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kertas lakmus, alumunium foil, *waterbath*, *water jacket*, *freezer*, *cool box*, *microfile*, *Mr. Frosty*®.
- Bahan : Semen segar sapi pejantan Limousin motilitas 40 hingga 50%, pengencer susu skim kuning telur, ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.), pewarna *eosin* dan *negrosin*, gliserol, NaCl 3%, es batu.

### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan masing-masing 10 ulangan. Empat perlakuan yang dicobakan sebagai berikut:

- P0: 100% Pengencer Susu Skim Kuning Telur + 0% Ekstrak Biji Pinang

- P1: 100% Pengencer Susu Skim Kuning Telur + 1% Ekstrak Biji Pinang
- P2: 100% Pengencer Susu Skim Kuning Telur + 3% Ekstrak Biji Pinang
- P3: 100% Pengencer Susu Skim Kuning Telur + 5% Ekstrak Biji Pinang

Masing-masing perlakuan disimpan di dalam *cryo tube* yang diletakkan dalam alat *Mr. Frosty*® dan dimasukkan ke dalam *freezer* suhu -80°C. Semua perlakuan diamati pada tahap sebelum pembekuan (*before freezing*) dan setelah pembekuan (*post thawing*) setelah 24 jam.

### **3.3.1 Penampungan Semen**

Penampungan semen sapi pejantan Limousin dilakukan sebanyak 2 kali dalam seminggu. Semen ditampung menggunakan metode vagina buatan yang dilakukan oleh petugas khusus. Penampungan semen sapi pejantan Limousin menggunakan *teaser* atau pemancing sesama pejantan dari bangsa yang sama. Vagina buatan dilengkapi dengan tabung gelas berskala yang diselimuti dengan kain hitam. Bagian vagina buatan antara selubung dalam dan luar diisi menggunakan air dengan suhu 45°C dan sepertiga bagian depan selubung diolesi menggunakan vaselin (Arifiantini, 2012).

### **3.3.2 Pemeriksaan Kualitas Semen Segar**

Pemeriksaan kualitas semen segar meliputi pemeriksaan secara makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan secara mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas dan abnormalitas).

Pemeriksaan makroskopis meliputi:

1. Volume : Volume semen dinilai dengan melihat skala pada tabung penampung semen (Arifiantini, 2012)
2. pH : Derajat keasaman semen mamalia antara 6-7,5. Derajat keasaman diukur menggunakan alat pH meter atau menggunakan pH *indicator paper* (Arifiantini, 2012)
3. Konsistensi : Cara menilai konsistensi semen dengan memiringkan tabung penampung yang berisi semen dan mengembalikan pada posisi semula. Konsistensi dilihat berdasarkan kecepatan semen kembali ke dasar tabung. Konsistensi semen sapi berkisar antara encer sampai sedang (Arifiantini, 2012)
4. Warna : Warna semen dapat dilihat secara langsung pada tabung yang berisi semen. Warna semen yang normal yaitu putih susu, krem, krem kekuningan (Arifiantini, 2012)

Pemeriksaan mikroskopis meliputi:

1. Motilitas Massa : Satu tetes semen diletakkan diatas *object glass* yang bersih dan diamati secara langsung menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X. Kriteria penilaiannya yaitu +++

(3+) apabila gelombang massa tebal dan cepat berpindah, ++ (2+) apabila gelombang massa tebal tetapi lambat berpindah, + (1+) apabila gelombang massa tipis dan 0 apabila tidak ada gelombang massa (Arifiantini, 2012)

2. Motilitas Individu : Satu tetes kecil semen diletakkan diatas *object glass* dan ditambahkan larutan fisiologis, dihomogenkan dan ditutup menggunakan *cover glass*. Diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X (Arifiantini, 2012)

3. Konsentrasi : Diambil semen sebanyak 3 mikroliter dan dimasukkan ke dalam *cuvet* yang berisi cairan NaCl 3% sebanyak 3 ml. *Cuvet* dimasukkan ke dalam lubang di dalam alat *spectrofotometer*, ditekan tombol *start* dan dilihat angka yang muncul (Instruksi Kerja BBIB Singosari).

4. Viabilitas : Pengamatan viabilitas dilakukan dengan menggunakan preparat ulas. Pembuatan preparat dengan mengambil satu tetes semen dan diletakkan diatas *object*

*glass*, ditambahkan *eosin negrosin* dan dihomogenkan. Diambil *object glass* kedua lalu disinggungkan ujungnya dan ditarik ke arah berlawanan. Preparat ulas dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 400X. Perhitungan persentase viabilitas menggunakan rumus sebagai berikut (Arifiantini, 2012):

$$\text{Persentase Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

5. Abnormalitas : Pengamatan abnormalitas dilakukan dengan menggunakan preparat ulas. Pembuatan preparat dengan mengambil satu tetes semen dan diletakkan diatas *object glass*, ditambahkan *eosin negrosin* dan dihomogenkan. Diambil *object glass* kedua lalu disinggungkan ujungnya dan ditarik ke arah berlawanan. Preparat ulas dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 400X. Perhitungan persentase abnormalitas

menggunakan rumus sebagai berikut (Arifiantini, 2012):

$$\text{Persentase Abnormalitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal} \times 100\%}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}}$$

### **3.3.3 Pembuatan Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu* L.)**

Prosedur pembuatan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) yaitu buah pinang dibersihkan dari kotoran lalu dipisahkan antara biji dan kulit buah. Biji pinang dipecah menjadi kecil-kecil. Kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven. Ukuran partikel diperkecil dengan menggunakan mesin penggiling agar menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan. Serbuk biji pinang dimaserasi dengan menggunakan etanol 96% selama 48 jam. Sampel disaring dan filtrat yang diperoleh ditampung sedangkan residu diekstraksi lagi sebanyak 3 kali. Larutan dievaporasi menggunakan rotator evaporator pada suhu 37°C hingga diperoleh ekstrak biji pinang yang pekat (Sabile, Latief, Yusuf, Firmiaty, Idrus, Zulkharnain dan Nasriyanto, 2016; Ismail, dkk., 2012; Instruksi Kerja Laboratorium Materia Medika Batu, 2017).

### **3.3.4 Pembuatan Pengencer Susu Skim Kuning Telur**

Prosedur pembuatan pengencer susu skim kuning telur yaitu ditimbang semua bahan seperti susu skim, fruktosa, *penicillin*, *streptomycin* dan kuning telur. Aquabidest dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan hingga suhu 37°C. Susu skim dan fruktosa



dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi aquadest. *Magnetic* dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian di *stirer* dengan skala 6 selama 15-20 menit. Larutan susu skim dipanaskan selama 10 menit atau sampai mengembun. Larutan skim didinginkan sampai suhu 37°C. *Penicillin*, *streptomycin* dan kuning telur dimasukkan secara berurutan kemudian di *stirer* selama 15-20 menit. Pengencer susu skim kuning telur didiamkan di dalam *refrigerator* selama 3 hari, atau di sentrifuge kecepatan 1500 rpm selama 30 menit sebanyak 2x.

### **3.3.5 Pembuatan Pengencer Perlakuan**

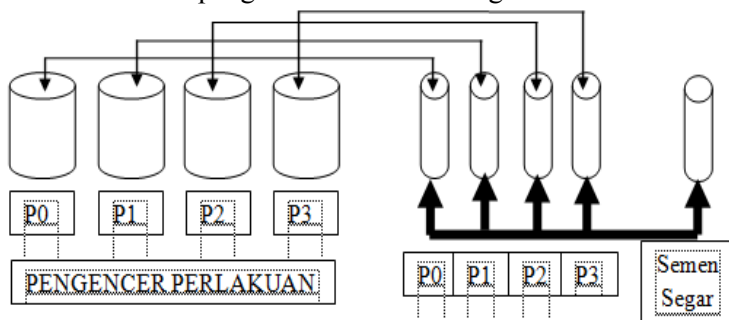
Prosedur pembuatan *stock* pengenceran ekstrak biji pinang yaitu ditimbang ekstrak biji pinang sebanyak 0,2 gram, kemudian dicampurkan dengan 10 ml aquabides untuk mengurangi kepekatan pengencer ekstrak biji pinang yang dapat menghalangi pergerakan spermatozoa. Ekstrak biji pinang dihomogenkan dan dihaluskan menggunakan mortar, kemudian dihomogenkan kembali menggunakan *stirrer magnetic* selama 15-20 menit. Larutan ekstrak pinang didiamkan selama 3 hari untuk memisahkan endapan dan supernatan. Supernatan tersebut yang akan ditambahkan ke dalam pengencer susu skim kuning telur (Aulanni'am, Akmal dan Rosmaidar, 2007).

Pengencer susu skim kuning telur dipersiapkan 3 hari sebelum perlakuan. Pengencer perlakuan dipersiapkan pagi hari sebelum dilakukan proses pengenceran. Pengencer susu skim kuning telur dipisahkan antara supernatan dan endapan. Cairan yang digunakan dimasukkan ke dalam 4 erlenmeyer yang telah diberi label perlakuan P0, P1, P2 dan P3 dengan volume yang sama. Erlenmeyer perlakuan

P1 ditambah dengan ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.) sebesar 1% dari volume pengencer, erlenmeyer perlakuan P2 ditambah dengan ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.) sebesar 3% dari volume pengencer dan erlenmeyer perlakuan P3 ditambah dengan ekstrak biji buah pinang (*Areca catechu* L.) sebesar 5% dari volume pengencer. Pengencer perlakuan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 menit. Pengencer yang sudah homogen diletakkan di dalam *waterbath* 37°C dan siap digunakan.

### 3.3.6 Proses Pengenceran Semen

Prosedur pengenceran semen sebagai berikut:



Gambar 1. Proses pengenceran semen

Pengenceran semen dilakukan di suhu ruang dengan pengencer berada di dalam *waterbath*. Pengencer yang ditambahkan meliputi pengencer volume A (VA) dan volume B (VB). Volume pengencer A didapat dari volume total dibagi dua dikurangi volume semen. Volume pengencer A ditambahkan secara langsung karena proses pengenceran dilakukan hanya dalam satu hari. Pengencer A dimasukkan terlebih dahulu ke dalam tabung reaksi yang

berada didalam *waterbath* suhu 37°C, kemudian dimasukkan semen segar ke dalam tabung yang berisi pengencer A. Tabung reaksi yang telah berisi semen dan pengencer A dimasukkan ke dalam *water jacket* dan dimasukkan ke dalam *cool tube* dan ditunggu suhu turun hingga 5°C. Volume pengencer B (VB) dapat ditambahkan ketika suhu sudah mencapai 5°C. Volume pengencer B didapat dari volume total dibagi dua. Pengencer B merupakan pengencer perlakuan yang telah ditambahkan 13% gliserol.

### **3.3.7 Ekuilibrasi**

Ekuilibrasi dilakukan ketika sampel semen dan pengencer telah tercampur homogen dan telah ditambahkan dengan VB. Proses ekuilibrasi berlangsung selama 2 jam di dalam *refrigerator* suhu 5°C. Setelah proses ekuilibrasi selesai dilakukan uji kualitas sebelum pembekuan (*before freezing*) meliputi motilitas individu, viabilitas dan abnormalitas dibawah mikroskop perbesaran 400X.

### **3.3.8 Filling and Sealing**

Semen yang telah diuji *before freezing* (BF) dimasukkan ke dalam *cryo tube* ukuran 1 ml dengan spermatozoa motil sebanyak 100 juta per *cryo tube*. Pengisian semen ke dalam *microfile* dilakukan di dalam refrigerator suhu 5°C untuk menjaga suhu agar tidak berubah. *Cryo tube* yang telah berisi semen diberi label dan dimasukkan ke dalam *Mr. Frosty*®. Saat *cryo tube* dimasukkan ke dalam *Mr. Frosty*®, *Mr. Frosty*® harus berada pada suhu 5°C agar tidak terjadi penurunan suhu,

kemudian *Mr. Frosty*® dimasukkan ke dalam *freezer* suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.9 Pembekuan**

Pembekuan yang dilakukan menggunakan metode pembekuan lambat. Semen yang berada di dalam *Mr. Frosty*® dimasukkan ke dalam *freezer* suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Keberhasilan pembekuan dapat dievaluasi minimal 85 menit setelah pembekuan karena prinsip kerja dari *Mr. Frosty*® yaitu setiap penurunan suhu  $1^{\circ}\text{C}$  membutuhkan waktu 1 menit.

### **3.3.10 Post Thawing**

*Cryo tube* yang disimpan di dalam *Mr. Frosty*® dilakukan pengamatan kualitas setelah pembekuan minimal 85 menit setelah penyimpanan. Proses *thawing* dengan merendam *cryo tube* ke dalam air hangat suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit karena lapisan *cryo tube* yang tebal. Setelah semen cair kembali dilakukan pengamatan setelah pembekuan meliputi motilitas individu, viabilitas dan abnormalitas menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400X.

## **3.4 Variabel Penelitian**

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Analisis Semen Segar
  - a. Uji Makroskopis: pH, warna, volume dan konsistensi

b. Uji Mikroskopis: Motilitas massa, persentase motilitas individu, persentase viabilitas, persentase abnormalitas dan konsentrasi.

2. Analisis Semen Setelah Pembekuan

Uji Mikroskopis: Persentase motilitas individu, persentase viabilitas dan persentase abnormalitas.

### 3.5 Analisis Data

Data dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan analisis ragam. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan, diantaranya yaitu P0: 100% susu skim kuning telur + 0% ekstrak biji pinang; P1: 100 % susu skim kuning telur + 1% ekstrak biji pinang; P2: 100% susu skim kuning telur + 3% ekstrak biji pinang dan P3: 100% susu skim kuning telur + 5% ekstrak biji pinang.

Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali. Selanjutnya, apabila terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD). Adapun model matematis untuk RAL adalah:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

$y_{ij}$  = Respon pengamatan hasil penelitian

$\mu$  = Rata-rata populasi respon hasil pengamatan

$\alpha_i$  = Pengaruh perlakuan ke-1

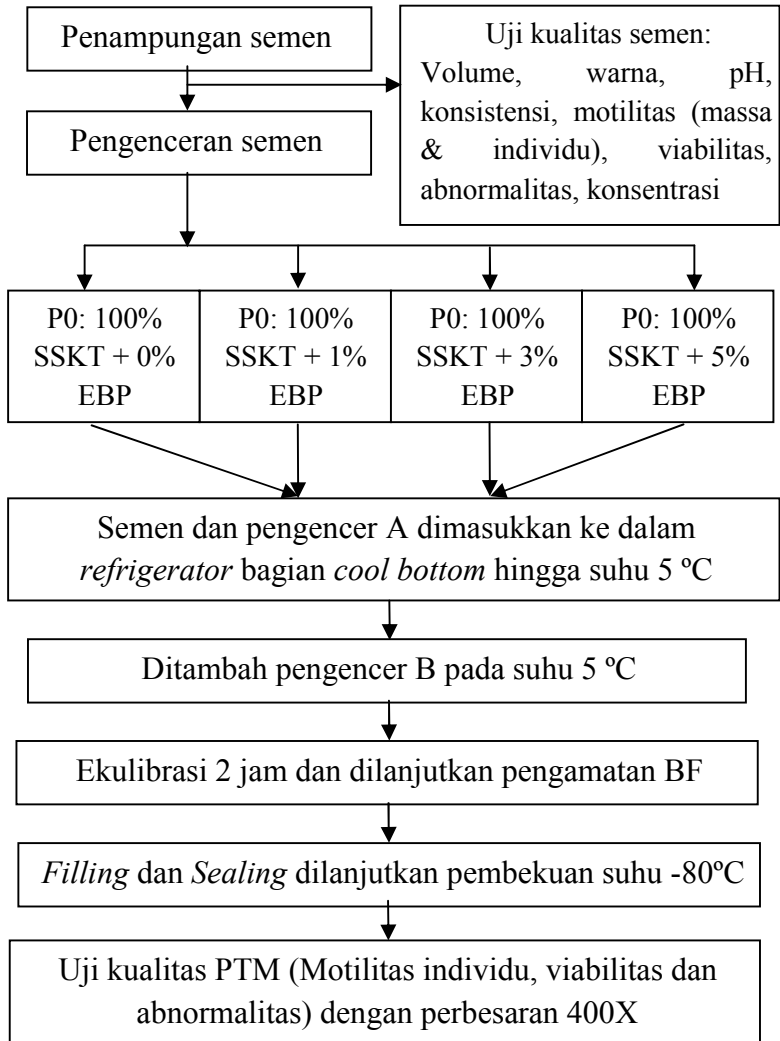
$\varepsilon_{ij}$  = Galat acak percobaan

### 3.6 Batasan Istilah

- Semen : Hasil ejakulasi pejantan berupa suspensi cairan sel yang berisi seminal plasma semen dan spermatozoa (Susilawati, 2011).
- Antioksidan : Antioksidan merupakan senyawa yang mampu memadamkan reaksi radikal bebas dan mengakhiri siklus reaksi radikal bebas (Feradis, 2009).
- Mr. Frosty*® : Alat yang digunakan sebagai wadah dengan penambahan isopropil alkohol 100% pada kontainer dan di simpan pada *freezer* dengan penurunan suhu secara bertahap (1°C/menit).
- Ekstrak : Sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Mamonto, dkk., 2014).

### 3.7 Kerangka Operasional

Kerangka operasional penelitian disajikan pada Gambar 5.



Gambar 2. Kerangka operasional penelitian