

PENUNTUN PRAKTIKUM TEKNOLOGI REPRODUKSI TERNAK

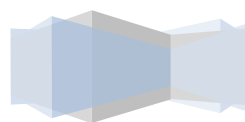
**JURUSAN ILMU PETERNAKAN
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAKASSAR
2016**

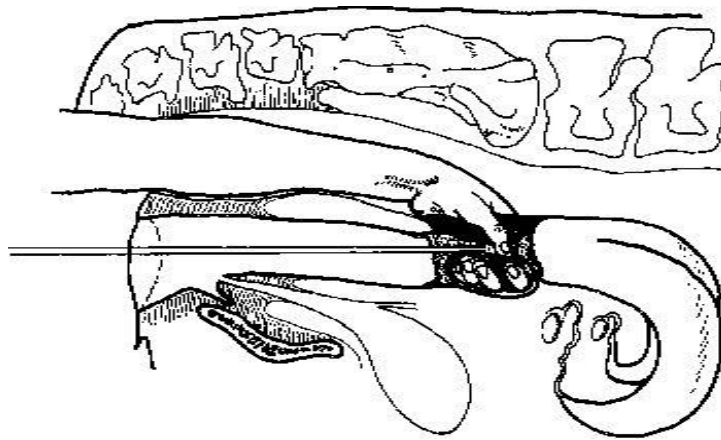
PENDAHULUAN

Kebutuhan konsumsi daging nasional cenderung meningkat setiap tahunnya. Oleh karena itu, dibutuhkan peningkatan populasi ternak terutama ternak ruminansia melalui ketercukupan penyediaan bibit baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya. Bibit yang baik umumnya dapat menghasilkan keturunan dengan produktivitas yang tinggi. Peningkatan produktivitas ternak dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, salah satunya adalah dengan menerapkan teknologi Inseminasi Buatan. Inseminasi Buatan ini diharapkan mampu meningkatkan jumlah populasi ternak yang ada sehingga kebutuhan komoditas daging sapi maupun ternak ruminansia lainnya dapat terpenuhi.

DEFINISI IB

Inseminasi Buatan (IB) adalah proses memasukkan sperma ke dalam saluran reproduksi betina dengan tujuan untuk membuat betina jadi bunting tanpa perlu terjadi perkawinan alami. Konsep dasar dari teknologi ini adalah bahwa seekor pejantan secara alamiah memproduksi puluhan milyar sel kelamin jantan (spermatozoa) per hari, sedangkan untuk membuahi satu sel telur (oosit) pada hewan betina diperlukan hanya satu spermatozoon. Potensi terpendam yang dimiliki seekor pejantan sebagai sumber informasi genetik, apalagi yang unggul dapat dimanfaatkan secara efisien untuk membuahi banyak betina (Hafez, 1993).



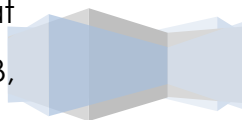


Gambar 1. Teknik Inseminasi Buatan

Namun dalam perkembangan lebih lanjut, program IB tidak hanya mencakup pemasukan semen ke dalam saluran reproduksi betina, tetapi juga menyangkut seleksi dan pemeliharaan pejantan, penampungan, penilaian, pengenceran, penyimpanan atau pengawetan (pendinginan dan pembekuan) dan pengangkutan semen, inseminasi, pencatatan dan penentuan hasil inseminasi pada hewan/ternak betina, bimbingan dan penyuluhan pada peternak. Dengan demikian pengertian IB menjadi lebih luas yang mencakup aspek reproduksi dan pemuliaan, sehingga istilahnya menjadi *artificial breeding* (perkawinan buatan). Tujuan dari IB itu sendiri adalah sebagai satu alat yang ampuh yang diciptakan manusia untuk meningkatkan populasi dan produksi ternak secara kuantitatif dan kualitatif (Toelihere, 1985).

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI IB

Penerapan bioteknologi IB pada ternak ditentukan oleh empat faktor utama, yaitu semen beku, ternak betina sebagai akseptor IB,



keterampilan tenaga pelaksana (inseminator) dan pengetahuan zooteknis peternak. Keempat faktor ini berhubungan satu dengan yang lain dan bila salah satu nilainya rendah akan menyebabkan hasil IB juga akan rendah, dalam pengertian efisiensi produksi dan reproduksi tidak optimal (Toelihere, 1997).

Permasalahan utama dari semen beku adalah rendahnya kualitas semen setelah dithawing, yang ditandai dengan terjadinya kerusakan pada ultrastruktur, biokimia dan fungsional spermatozoa yang menyebabkan terjadi penurunan motilitas dan daya hidup, kerusakan membran plasma dan tudung akrosom, dan kegagalan transport dan fertilisasi.

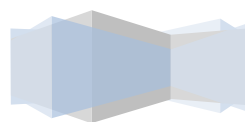
TUJUAN DAN MANFAAT

Tujuan yang ingin dicapai dalam praktikum ini :

1. Menjelaskan proses Inseminasi Buatan pada ternak
2. Menjelaskan alat dan bahan yang digunakan dalam teknologi IB
3. Mengetahui faktor-faktor keberhasilan dalam teknologi IB

Manfaat yang ingin dicapai dalam praktikum ini :

1. Mahasiswa mengetahui proses Inseminasi Buatan pada ternak
2. Mahasiswa alat dan bahan yang digunakan dalam teknologi Inseminasi Buatan
3. Mahasiswa dapat melakukan teknik teknologi IB



ALAT DAN BAHAN

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini :

- ❖ Straw
- ❖ Insemination Gun
- ❖ Plastic Sheet
- ❖ Pinset dan Gunting
- ❖ Kontainer
- ❖ Vagina Buatan
- ❖ Spekulum

Bahan-bahan yang digunakan dalam praktikum ini :

- ❖ Preparat Organ Reproduksi Sapi Betina

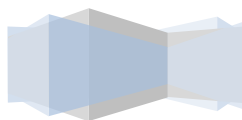
METODE KERJA

Metode yang biasa dilakukan dalam Inseminasi Buatan dan Pengenalan alat penampungan semen pada ovarium terdiri atas 3 metode, yakni :

Teknik Inseminasi Buatan

- a. Pemeriksaan Berahi
 1. Sebelum proses kerja IB dilakukan, sapi harus dalam keadaan birahi, dengan mengamati bagian vulvanya.
 2. Sapi yang birahi akan menunjukkan tanda-tanda seperti :
 - Vulva bengkak, warna lebih merah,
 - Keluar lendir bening.
 - Vulva terasa hangat dan ekornya mudah diangkat

v



b. Thawing

1. Sebelum melaksanakan prosedur Inseminasi Buatan (IB) maka semen beku harus dicairkan (thawing) terlebih dahulu dengan cara :
2. Mengeluarkan semen beku dari nitrogen cair dan memasukkannya dalam air hangat atau meletakkannya dibawah air yang mengalir.
3. Suhu untuk thawing yang baik adalah 37°C, selama 7-18 detik.
4. Setelah dithawing, straw dikeluarkan dari air kemudian dikeringkan dengan tissue.

c. Masukkan semen beku ke Gun IB

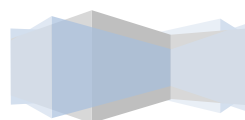
1. Kemudian straw dimasukkan dalam gun, dan ujung yang mencuat dipotong dengan menggunakan gunting bersih
2. Setelah itu Plastic sheath dimasukkan pada gun yang sudah berisi semen beku/straw.

d. Masukkan Tangan ke rektum

1. Petugas Inseminasi Buatan (IB) memakai sarung tangan (*glove*) pada tangan yang akan dimasukkan ke dalam rektum
2. Tangan dimasukkan ke rektum, hingga dapat menjangkau dan memegang leher rahim (*servix*), apabila dalam rektum banyak kotoran harus dikeluarkan lebih dahulu.

e. Suntikkan semen

1. Semen disuntikkan/disemprotkan pada badan uterus yaitu pada daerah yang disebut dengan 'posisi ke empat'.



2. Setelah semua prosedur tersebut dilaksanakan maka keluarkanlah gun dari uterus dan servix dengan perlahan-lahan.

Pengenalan Alat Teknologi Penampungan Semen

a. Container

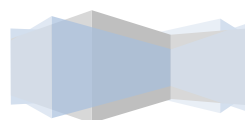
Adalah alat yang digunakan untuk menyimpan straw. Dalam container ini berisi nitrogen cair yang bersuhu -196°C sehingga sperma yang berada di dalam straw tidak mati

b. Speculum

1. Speculum merupakan suatu alat yang menyerupai bibir bebek yang digunakan untuk membuka vagina.
2. Alat ini biasanya digunakan pada domba dan kambing.
3. Tujuan penggunaan alat ini adalah untuk dapat dengan mudah melihat keadaan dan letak serviks ketika kita akan melakukan ib atau pemeriksaan kebuntingan pada kambing dan domba.

c. Straw

1. Adalah suatu alat yang digunakan untuk tempat sperma yang telah diencerkan.
2. Straw berisi sperma yang merupakan peluru dari insemination gun.
3. Straw mempunyai dua penutup yaitu factory plug yang merupakan penutup yang dibuat oleh pabrik dan laboratory plug yang di buat oleh laboratorium.
4. Pada straw ini diberi label nama pejantan, kode pejantan dan nama tempat produksi.



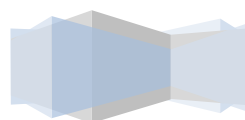
EVALUASI SEMEN

Evaluasi atau pemeriksaan semen merupakan suatu tindakan yang perlu dilakukan untuk melihat kuantitas (jumlah) dan kualitas semen. Pemeriksaan semen dibagi menjadi dua kelompok, yaitu pemeriksaan secara **makroskopik** dan pemeriksaan **mikroskopik**. Pemeriksaan makroskopik yaitu pemeriksaan semen secara garis besar tanpa memerlukan alat bantu yang rumit, sedangkan pemeriksaan mikroskopik bertujuan melihat kondisi semen lebih dalam lagi serta memerlukan alat bantu yang cukup lengkap.

Evaluasi **makroskopik** meliputi : volume semen, warna semen, bau semen, kekentalan semen, dan pH semen. Adapun pemeriksaan **mikroskopik** meliputi gerakan massa sperma, gerakan individu sperma, konsentrasi sperma dalam tiap mililiter semen, konsentrasi sperma hidup dalam setiap mililiter semen, konsentrasi sperma mati dalam setiap mililiter semen, dan persentase abnormalitas (ketidak-normalan bentuk) sperma.

1. Alat

- a. Kertas indikator pH
- b. Mikroskop cahaya dengan lensa okuler 10 kali dan lensa objektif 10, 40, dan 100 kali.
- c. Tabung penampung semen
- d. Gelas objek
- e. Gelas penutup (cover glass) ukuran 18 x 18 mm atau 25 x 25 mm.
- f. Batang pengaduk gelas
- g. Pipet tetes



- h. Kertas saring/kertas hisap atau kertas tissue
- i. Kapas
- j. Lampu spirtus

2. Bahan

- a. Semen ternak
- b. Alkohol 70 %
- c. Larutan NaCl Fisiologis
- d. Larutan NaCl 3 %
- e. Larutan Eosin 2 %

3. Kesehatan dan Keselamatan Kerja

- a. Jas Laboratorium

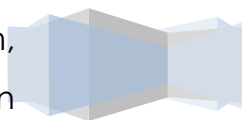
4. Langkah Kerja

A. Pemeriksaan Makroskopik

- a. Volume
 - ❖ Pakailah jas laboratorium sebelum mulai bekerja.
 - ❖ Ambil tabung semen hasil penampungan sebelumnya.
 - ❖ Amati volume semen melalui skala yang tertera pada dinding tabung penampung. Setiap kali ejakulasi sapi jantan umumnya menghasilkan 5 – 8 ml, domba 0,8 – 1,2 ml, kambing 0,5 – 1,5 ml, babi 150 – 200 ml, kuda 60 – 100 ml, dan ayam 0,2 – 0,5 ml.

- b. Warna

Warna semen dapat diamati langsung karena tabung penampung semen terbuat dari gelas atau plastik tembus pandang. Semen sapi umumnya berwarna putih sedikit krem, semen domba putih krem krem (lebih tua dari warna semen



sapi), semen babi dan kuda menyerupai larutan kanji (abu-abu encer), sedangkan semen ayam berwarna putih seperti air susu. Warna kemerahan merupakan tanda bahwa semen terkontaminasi oleh darah segar, sedang apabila warnanya mendekati coklat dapat merupakan tanda bahwa darah yang mengkontaminasi semen sudah mengalami dekomposisi. Warna kehijauan merupakan tanda adanya bakteri pembusuk.

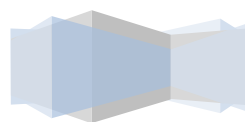
c. Bau

- ❖ Pegang tabung semen pada posisi tegak lurus. Dekatkan tabung ke bagian muka pemeriksa dan lewatkan mulut tabung tersebut di bawah lubang hidung. Pada saat tabung melewati lubang hidung, tarik nafas perlahan sampai bau semen tercium.
- ❖ Semen yang normal, pada umumnya, memiliki bau amis khas disertai dengan bau dari hewan itu sendiri. Bau busuk bisa terjadi apabila semen mengandung nanah yang disebabkan oleh adanya infeksi organ atau saluran reproduksi hewan jantan.

d. Kekentalan

Kekentalan atau konsistensi atau viskositas merupakan salah satu sifat semen yang memiliki kaitan dengan kepadatan/konsentrasi sperma di dalamnya. Semakin kental semen dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi spermanya.

x



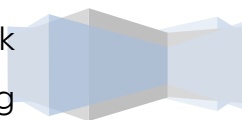
- ❖ Posisikan tabung semen sejajar dengan mata kita dengan jarak kurang lebih 30 cm. Miringkan tabung tersebut ke arah kiri atau kanan sebesar 45°. Amati gerakan cairan semen di dalam tabung. Perpindahan cairan yang lambat menandakan bahwa semen tersebut cukup kental. Sebaliknya, apabila perpindahan cairan berjalan cepat merupakan petunjuk bahwa semen tersebut encer.
- ❖ Ulangi pengamatan dengan mengembalikan posisi tabung ke posisi tegak.

Semen ayam, domba dan sapi umumnya merupakan semen yang sangat kental sampai kental (secara berurutan), sedangkan kuda dan babi memiliki semen yang encer.

e. pH (Keasaman)

Keasaman atau pH semen perlu diukur untuk memastikan bahwa cairan semen hasil penampungan memiliki karakteristik yang normal. Pemeriksaan keasaman semen dapat dilakukan menggunakan kertas indikator pH (buatan Merck atau Sigma) dengan skala ketelitian yang cukup sempit, misalnya antara 6 – 8 dengan rentang ketelitian 0,1. Semen pada umumnya memiliki kisaran pH netral.

Penggunaan pH-meter dapat dilakukan dan memberikan hasil pengukuran yang lebih teliti. Akan tetapi mengingat ukuran batang detektor (probe) pH-meter yang cukup besar dan volume semen yang relatif kecil, terutama pada semen ayam dan domba, maka akan menyebabkan banyak semen yang terbuang karena menempel pada batang

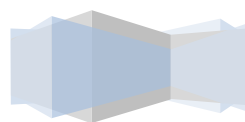


detektor pH-meter. Penggunaan pH meter akan efektif untuk mengukur pH semen kuda atau babi.

- ❖ Siapkan satu lembar kertas indikator pH. Pegang pangkalnya dan jangan sekali-sekali menyentuh bagian ujung yang mengandung bahan indikator.
- ❖ Hisap sedikit semen menggunakan pipet hisap. Lalu teteskan semen tersebut pada ujung kertas indikator pH.
- ❖ Amati perubahan warna pada kertas indikator pH kemudian cocokkan dengan skala yang tertera pada kemasan kertas indikator.

Catatan : Jangan melakukan pemeriksaan pH dengan jalan mencelupkan kertas indikator pada seluruh contoh semen dalam tabung karena bahan kimia pada ujung kertas indikator dapat meracuni sperma di dalamnya.

Semen sapi normal memiliki pH 6,4 – 7,8; domba 5,9 – 7,3; babi 7,3 – 7,8; kuda 7,2 – 7,8; dan ayam 7,2 – 7,6 (Garner dan Hafez, 2000).



B. Pemeriksaan Mikroskopik

1. Gerakan massa

Gerakan massa sperma merupakan petunjuk derajat keaktifan bergerak sperma (sebagai indikator tingkat atau persentase sperma hidup dan aktif) dalam semen.

- ❖ Siapkan satu buah gelas objek yang bersih. Hangatkan sampai mencapai suhu 37°C. Lebih baik lagi apabila mikroskop yang kita gunakan memiliki meja objek yang dilengkapi dengan pemanas yang suhunya dapat diatur.
- ❖ Teteskan satu tetes (kira-kira sebesar biji kacang hijau) semen ke permukaan gelas objek. Tempatkan gelas objek tersebut pada meja objek mikroskop.
- ❖ Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa 10 x 10. Semen yang bagus, pada pengamatan di bawah mikroskop, akan memberikan tampilan kumpulan sperma bergerak bergerombol dalam jumlah besar sehingga membentuk gelombang atau awan yang bergerak. Hasil pengamatan ini akan memberikan gambaran kualitas semen dalam 6 kategori (Evans dan Maxwell, 1987) seperti yang disajikan pada Tabel 2.

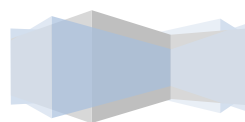
Tabel 2. Sistem penilaian gerakan massa sperma

Skore	Kelas	Keterangan
5	Sangat bagus	Padat, gelombang yang terbentuk besar-besar dan bergerak sangat cepat. Tidak tampak sperma secara individual. Contoh semen tersebut mengandung 90 % atau lebih sperma aktif.
4	B a g u s	Gelombang yang terbentuk hampir sama dengan semen yang memiliki skor 5 tetapi

		gerakannya sedikit lebih lambat. Contoh semen tersebut mengandung 70–85 % sperma yang aktif.
3	C u k u p	Gelombang yang terbentuk berukuran kecil-kecil yang bergerak/ berpindah tempat dengan lambat. Sperma aktif dalam contoh semen tersebut berkisar antara 45 – 65 %.
2	Buruk	Tidak ditemukan adanya gelombang tetapi terlihat gerakan sperma secara individual. Semen tersebut diperkirakan mengandung 20 – 40 % sperma hidup.
1	Sangat Buruk	Hanya sedikit (kira-kira 10 %) sel sperma yang memperlihatkan tanda-tanda hidup yang bergerak sangat lambat.
0	M a t i	Seluruh sperma mati, tidak terlihat adanya sel sperma yang bergerak

2. Konsentrasi sperma total

Konsentrasi sperma atau kandungan sperma dalam setiap milliliter semen merupakan salah satu parameter kualitas semen yang sangat berguna untuk menentukan jumlah betina yang dapat diinseminasi menggunakan semen tersebut. Penentuan konsentrasi sperma dapat dilakukan melalui 4 (empat) cara, yaitu pendugaan melalui warna dan kekentalan semen, jarak antar kepala sperma, serta penghitungan menggunakan haemocytometer dan kamar hitung Neubauer.



a. *Pendugaan berdasarkan warna dan kekentalan semen*

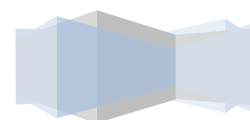
Pendugaan berdasarkan warna dan kekentalan semen lebih ditekankan penerapannya pada semen domba dan kambing. Metode ini menghasilkan 5 (lima) kriteria tingkat konsentrasi sperma dalam satu contoh semen.

Tabel 3. Konsentrasi sperma berdasarkan warna dan kekentalan semen

Skore	Warna dan Kekentalan Semen	Konsentrasi sperma (x 10 ⁹ sel) per ml	
		Rata-rata	Kisaran
5	Krem kental	5,00	4,50 – 6,00
4	Krem	4,00	3,50 – 4,50
3	Krem encer	3,00	2,50 – 3,50
2	Putih susu	2,00	1,00 – 2,50
1	Keruh	0,70	0,30 – 1,00
0	Bening encer	Tidak nyata	

Pendugaan berdasarkan jarak anta kepala sperma.

- Siapkan satu buah gelas objek yang bersih. Teteskan ke atas permukaan gelas objek satu tetes kecil semen, kemudian tutup dengan cover glass sehingga terbentuk preparat yang terdiri dari satu lapisan tipis cairan semen.
- Amati preparat di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 40.
- Tentukan konsentrasi sperma berdasarkan kriteria pada tabel berikut :



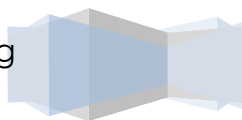
Tabel 4. Konsentrasi sperma berdasarkan jarak antar kepala Sperma

Kriteria	Keterangan	Konsentrasi sperma (x 10 ⁶ sel) per ml
Densum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain kurang dari panjang satu kepala sperma	1000 – 2000
Semi Densum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain sama dengan panjang satu kepala sperma	500 – 1000
Rarum	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain mencapai satu setengah panjang kepala sampai satu panjang sperma keseluruhan	200 – 500
Oligospermia	Jarak rata-rata antara satu kepala sperma dengan kepala sperma yang lain lebih dari panjang satu sel sperma keseluruhan	< 200
Necrospermia	Tidak ditemukan adanya sperma	0

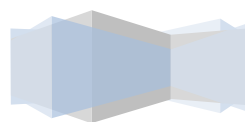
b. Penghitungan konsentrasi sperma menggunakan pipet haemocytometer dan kamar hitung Neubauer

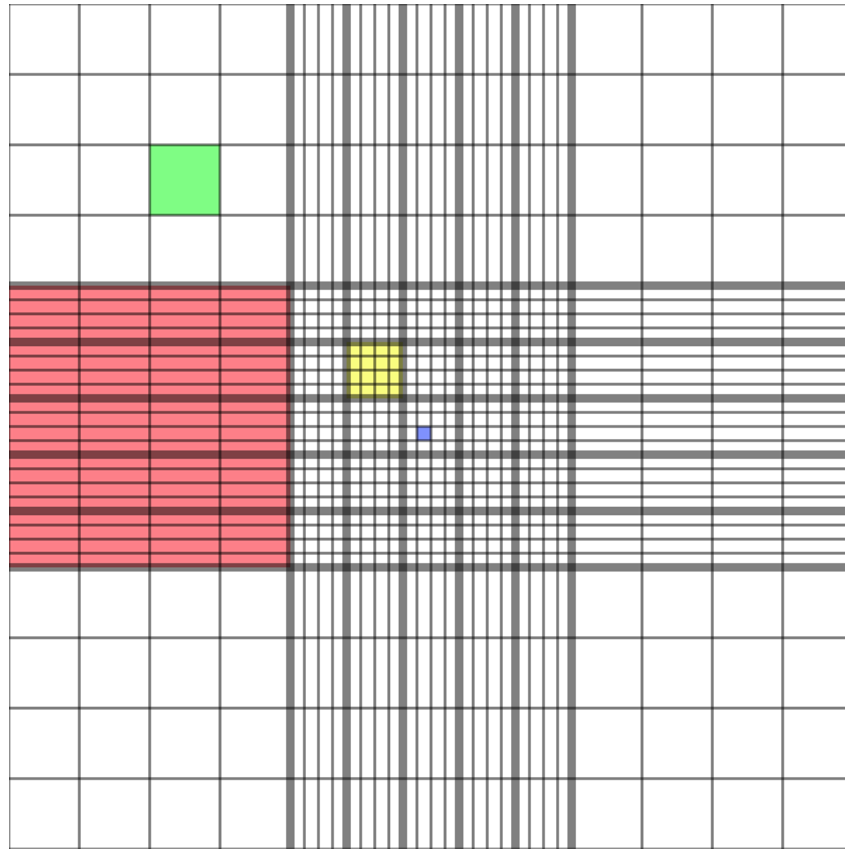
Kandungan sperma dalam satu contoh semen dapat dihitung secara lebih akurat menggunakan pipet haemocytometer (pipet untuk menghitung jumlah sel darah merah) dan kamar hitung Neubauer.

- Siapkan satu set pipet haemocytometer (pipet berbatu merah) dan kamar hitung Neubauer bersih, lengkap dengan kaca penutupnya.
- Teteskan satu tetes kecil semen (kira-kira sebesar biji kacang hijau) pada permukaan gelas objek bersih.



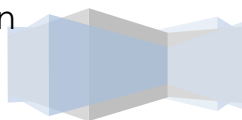
- Hisap semen tersebut ke dalam pipet haemocytometer sampai mencapai angka 0.5. Kemudian encerkan dengan larutan NaCl 3 % sampai mencapai angka 101. Keringkan bagian ujung luar pipet dari cairan dengan kertas tissue.
- Kocok larutan semen tersebut dengan gerakan angka delapan (8) supaya sperma dalam pipet tercampur secara merata tetapi sel-selnya tidak rusak karena pengocokan yang dilakukan tidak menimbulkan benturan antara sel dengan dinding pipet. Pengocokan dilakukan selama kurang lebih dua menit.
- Buang satu tetes cairan dalam pipet, lalu lanjutkan pengocokan selama satu menit.
- Siapkan kamar hitung Neubauer yang sudah diberi kaca penutup dan diletakkan di atas meja pada posisi mendatar. Alirkan larutan semen melalui celah di pinggir kiri atau kanan kamar hitung. Biarkan cairan mengalir dan menyeberang ke bidang hitung di seberangnya. (Gb. a)
- Hisap cairan yang terdapat dalam celah-celah kamar hitung menggunakan kertas hisap atau kertas tissue sampai habis. Cairan yang tersisa hanyalah pada bidang hitung yang ditutupi kaca penutup. Secara hati-hati hisap pula kelebihan cairan yang terdapat di bawah kaca penutup sampai ketebalan cairan optimal.





Gambar . Kamar hitung Neubauer dan bidang hitungnya

- Tempatkan kamar hitung Neubauer di bawah mikroskop dan amati dengan pembesaran awal 10 x 10. Temukan bidang hitung yang berupa areal yang dibatasi oleh garis-garis (Gb. b).
- Bidang hitung pada Gb. b memiliki 25 kotak kecil yang masing-masing dibatasi oleh tiga buah garis di keempat sisinya (kiri, kanan, atas, dan bawah). Di dalam setiap kotak yang dibatasi tiga garis tersebut terdapat 16 kotak yang lebih kecil lagi (Gb. c)
- Setelah bidang hitung tampak dengan jelas, ubahlah pembesaran lensa mikroskop menjadi 10 x 45 dengan jalan memutar lensa objektif dari 10 kali menjadi 45 kali.



- Pilih lima buah kotak, yaitu kotak yang berada di setiap sudut (kiri atas, kanan atas, kiri bawah, kanan bawah, dan tengah). Hitung sperma yang menyebar dalam setiap kotak dengan arah seperti yang ditunjukkan pada Gb. c. Jumlahkan sperma yang terdapat dalam kelima kotak di atas.
- Apabila dari kelima kotak yang dimaksud di atas terdapat X sel sperma, itu berarti dalam setiap milliliter semen yang diperiksa terdapat $X \times 10^7$ sel sperma.

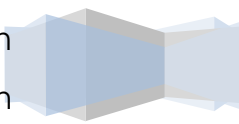
3. Konsentrasi Sperma Hidup (Motilitas Sperma)

Semen yang berkualitas baik adalah semen yang memiliki kandungan sperma hidup dan bergerak maju ke depan dalam jumlah yang banyak. Perbandingan sperma hidup dan bergerak ke depan (motil progresif) dengan konsentrasi sperma total dalam satu contoh semen dikenal dengan istilah **motilitas sperma**.

Penentuan motilitas sperma dalam satu contoh semen dapat dilakukan melalui dua metode, yaitu melalui penghitungan menggunakan pipet haema-cytometer dan kamar hitung Neubauer, atau menggunakan metode pewarnaan diferensial – yaitu suatu metode pewarnaan yang memberi kemungkinan pada kita untuk membedakan sperma yang hidup dan sperma yang mati.

- Penghitungan Motilitas menggunakan pipet haemacytometer dan kamar hitung Neubauer.*

Penentuan konsentrasi sperma hidup dalam semen dilakukan dengan prosedur yang sama dengan pada penentuan konsentrasi sperma total. Perbedaannya terletak pada cairan



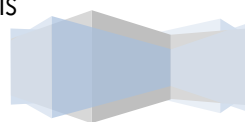
pengencer yang digunakan. Pada penentuan konsentrasi sperma hidup digunakan larutan NaCl Fisiologis, bukan NaCl 3 %. Dengan menggunakan larutan NaCl Fisiologis sebagai pengencer, maka sperma yang masih hidup akan tetap hidup dan terus bergerak, sedangkan sperma yang mati akan diam. Metode ini menggolongkan sperma yang bergerak di tempat, bergerak mundur, bergerak melingkar, dan sperma yang tidak bergerak sama sekali, sebagai sperma yang mati. Spermasperma yang mati dan berada dalam bidang hitung kamar Neubauer dihitung. Misalnya dari lima kotak terdapat Y sel sperma mati, dan itu berarti bahwa dalam setiap milliliter contoh semen tersebut terdapat $Y \times 10^7$ sel sperma yang mati. Dengan diketahuinya konsentrasi sperma total sebesar $X \times 10^7$ sel/ml semen dan konsentrasi sperma mati sebanyak $Y \times 10^7$ sel/ml semen, maka konsentrasi sperma hidup dalam setiap milliliter contoh semen dapat diketahui, yaitu : $(X - Y) \times 10^7$ sel.

b. *Penentuan motilitas sperma berdasarkan Pewarnaan Diferensial*

Sperma hidup dan sperma mati dalam satu contoh semen dapat dibedakan melalui pewarnaan diferensial.

- Siapkan dua buah gelas objek bersih
- Teteskan satu tetes larutan Eosin 2 % pada permukaan salah satu gelas objek. Kemudian tambahkan satu tetes kecil semen ke dalam larutan Eosin tersebut.
- Aduk pelan-pelan campuran tersebut dengan menggunakan gelas objek yang lain sampai rata.
- Dorong gelas objek yang terakhir ke salah satu ujung gelas objek yang pertama sehingga terbentuk satu lapisan tipis

XX



(film) cairan semen pada permukaan gelas gelas objek pertama.

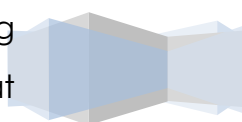
- Tempatkan gelas objek yang pertama di atas nyala api lampu spirtus sambil digerak-gerakan sampai lapisan film mengering.
- Amati preparat tersebut di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa 10 x 40. Sperma yang pada saat preparat dibuat masih dalam keadaan hidup akan berwarna putih karena tidak menyerap warna (terutama bagian kepalanya), sedangkan sperma yang mati akan berwarna merah karena menyerap warna Eosin.
- Hitung kurang lebih 200 sel sperma. Dari sejumlah sel sperma yang dihitung tersebut, berapa banyak sperma yang berwarna putih, dan berapa banyak sperma yang berwarna merah. Misalkan sperma yang berwarna putih sebanyak p sel dan sperma yang berwarna merah sebanyak q sel. Maka motilitas sperma dapat dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{MOTILITAS SPERMA} = \frac{p}{p + q} \times 100\%$$

Semen yang memiliki motilitas sperma kurang dari 60 % tidak dianjurkan untuk digunakan dalam program inseminasi buatan.

4. Abnormalitas Sperma

Ketidaknormalan bentuk sperma dalam satu contoh semen perlu diketahui karena tingkat ketidaknormalan tersebut akan berkaitan dengan kesuburan (fertilitas) dari pejanatan yang ditampung semennya. Tingkat abnormalitas sperma dapat



diketahui melalui **preparat pewarnaan diferensial** yang sudah diuraikan pada bagian motilitas sperma.

Abnormalitas sperma terdiri dari dua kelompok, yaitu abnormalitas **primer** dan abnormalitas **sekunder**. Abnormalitas primer terjadi selama proses pembentukan sperma di dalam testes, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi setelah proses pembentukan sperma, setelah keluar dari tubuh ternak jantan, serta akibat pengolahan semen.

Bentuk-bentuk abnormalitas primer adalah :

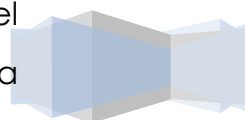
- Ukuran kepala lebih besar (macrocephalic) atau lebih kecil (microcephalic) dari ukuran normal.
- Kepala ganda atau ekor ganda
- Bentuk kepala tidak normal (penyok, benjol, pipih atau tidak beraturan)

Bentuk-bentuk abnormalitas sekunder adalah :

- Kepala pecah
- Ekor putus (pada bagian leher atau tengah-tengah)
- Ekor melipat, terpilin, atau tertekuk

Tempatkan preparat hasil pewarnaan diferensial pada meja objek mikroskop dan amati menggunakan pembesaran lensa 10 x 40. Apabila kurang jelas dapat menggunakan pembesaran 10 x 100.

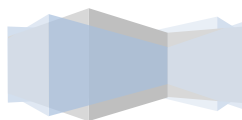
Amati sebanyak kurang lebih 200 sel sperma. Hitung berapa jumlah sperma yang bentuknya normal dan berapa yang tidak normal. Misalkan sperma yang normal sebanyak **A** sel dan yang abnormal **B** sel, maka tingkat abnormalitas sperma



dalam sampel semen yang kita periksa dapat diketahui melalui rumus :

$$ABNORMALITAS SPERMA = \frac{B}{A + B} \times 100\%$$

Semen sapi umumnya mengandung sperma abnormal antara 5 – 35 %, domba 5 – 20 %, babi 10 – 30 %, kuda 10 – 40 %, dan ayam 5 – 15 % (Garner dan Hafez, 2000). Semen untuk keperluan inseminasi buatan sebaiknya tidak mengandung sperma abnormal lebih dari 20 %.



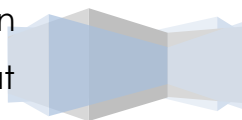
PENGECERAN DAN PENGAWETAN SEMEN

Pengenceran semen adalah satu upaya untuk memperbesar volume semen serta menurunkan kandungan sperma dalam volume tertentu sehingga akan lebih banyak dosis inseminasi dapat dibuat. Dengan demikian akan lebih banyak jumlah ternak betina yang dapat dikawini oleh seekor pejantan karena setiap ejakulatnya mampu menginseminasi banyak betina.

Pengencer semen adalah larutan *isotonis* (memiliki tekanan osmotik yang sama dengan plasma darah) yang mengandung bahan-bahan yang bersifat buffer (memelihara larutan dari perubahan pH), bahan nutrisi bagi kelangsungan hidup sperma, dan mampu memelihara sperma dari cekaman dingin (*cold shock*).

Pengawetan atau preservasi semen merupakan upaya manusia memperpanjang daya hidup dan daya fertilisasi sperma sehingga masa pakai semen tersebut dapat lebih lama.

Pengawetan semen dapat dilakukan untuk keperluan penyimpanan singkat pada temperatur 5°C dan penyimpanan semen untuk jangka waktu tidak terbatas pada temperatur -196°C . Pengawetan semen pada temperature dibawah titik beku air memerlukan bahan lain yang mampu melindungi sperma karena cekaman akibat perubahan tekanan osmotik larutan (*hypertonic stress*) dan melindungi sperma akibat pembentukan kristal es pada saat

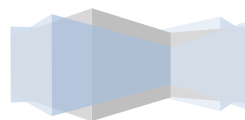


pembekuan. Bahan yang mampu ber-peran untuk kedua maksud di atas disebut sebagai agen krioprotektan – seperti glycerol.

Lembar Kerja

1. Alat

- a. Mikroskop cahaya dengan lensa okuler 10 kali dan lensa objektif 10, 40, dan 100 kali.
- b. Tabung penampung semen
- c. Gelas objek
- d. Gelas penutup (cover glass) ukuran 18 x 18 mm atau 25 x 25 mm.
- e. Timbangan analitik kapasitas 100 gram
- f. Batang pengaduk gelas
- g. Pipet tetes
- h. Labu Erlenmeyer 50 dan 100 ml.
- i. Beaker glass 50 ml
- j. Gelas Ukur
- k. Pipet Ukur
- l. Corong Gelas
- m. Thermometer
- n. Scalpel
- o. Lemari Es
- p. Pompa penghisap semen
- q. Plastic sealer (alat perekat plastik)
- r. Kotak styrofoam ukuran 30 x 40 x 40 cm
- s. Rak besi ukuran 20 x 30 cm dengan tinggi kaku 6 – 8 cm.
- t. Kotak dari logam tipis ukuran 25 x 35 x 5 cm.
- u. Container gas nitrogen cair kapasitas 10 liter.



2. Bahan

- a. Semen
- b. Kuning Telur
- c. Larutan NaCl Fisiologis
- d. Larutan Pengencer Semen (Natrium Sitrat atau Tris)
- e. Alkohol 70 %
- f. Kertas Saring
- g. Kapas
- h. Straw kemasan semen
- i. Tepung polivinyl alcohol
- j. Gas nitrogen cair

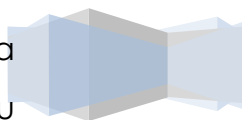
3. Kesehatan Keselamatan Kerja

- a. Jas Laboratorium
- b. Pakailah Jas Laboratorium pada saat mulai bekerja.
- c. Siapkan peralatan yang bersih dan kering

4. Langkah Kerja

a. Pembuatan Pengencer Natrium Sitrat Kuning Telur

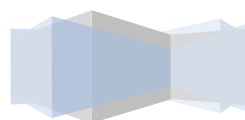
- ❖ Timbang 2,90 gram Natrium sitrat dihidrat dan 0,80 gram kristal Glukosa. Masukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Tambahkan aqua-bidestilata sampai mencapai volume 100 ml. Kocok sampai semua kristal Natrium sitrat larut. Pindahkan larutan ke dalam labu Erlen-meyer 100 ml. Tutup mulut labu dengan alumunium foil atau parafin film. Simpan larutan tersebut untuk digunakan sewaktu-waktu.
- ❖ Bersihkan satu butir telur ayam yang masih segar dengan air kran. Bilas menggunakan kapas yang dibasahi alkohol 70 %
- ❖ Pecahkan telur tersebut dengan jalan memotong kulitnya menjadi dua bagian. Tahan kuning telurnya pada salah satu



potongan sedangkan putih telurnya (albumennya) ditampung pada tempat lain atau dibuang. Pindahkan kuning telur tersebut pada potongan kulit telur yang lain sambil membuang albumen yang tersisa. Jaga jangan sampai kuning telur tersebut pecah.

- ❖ Sediakan satu lembar kertas saring ukuran 12 x 10 cm.
- ❖ Tuangkan kuning telur tersebut pada lembaran kertas saring. Gulingkan kuning telur tersebut agar albumen yang masih menempel pada kuning telur terserap kertas saring.
- ❖ Siapkan gelas ukur 20 ml yang mulutnya disambung dengan corong gelas bermulut lebar.
- ❖ Tusuk kuning telur menggunakan scalpel steril dan tuangkan isinya ke dalam gelas ukur. Jaga jangan sampai lapisan pembungkus kuning telur (membran vitellin) tercampur dengan jalan menahan selaput tersebut dengan scalpel.
- ❖ Siapkan 80 ml larutan Natrium sitrat glukosa dalam Beaker glass 100 ml.
- ❖ Tuangkan 20 ml kuning telur ke dalam 80 ml larutan Natrium Sitrat. Aduk pelan-pelan menggunakan batang pengaduk gelas sampai homogen. Pengadukan dilakukan secara hati-hati dan perlahan supaya tidak menimbulkan busa berlebihan.
- ❖ Tambahkan 100.000 international unit (i.u.) Penicillin dan 100 mg Streptomycin ke dalam larutan Natrium Sitrat Kuning Telur (1000 i.u Penicillin dan 1 mg Streptomycin untuk setiap milliliter pengencer).
- ❖ Tutup mulut Beaker glass menggunakan alumunium foil. Larutan Natrium Sitrat Kuning Telur siap digunakan.

b. Pembuatan Pengencer Tris – Kuning Telur

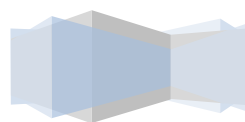


- ❖ Timbang 3,634 gram kristal Tris (hydroxymethyl) aminomethane ; 0,50 gram kristal Fruktosa; dan 1,99 gram Asam Sitrat monohidrat. Masukkan ketiga bahan tersebut ke dalam labu ukur 100 ml yang bersih. Tambahkan aquabidestilata steril sampai mencapai 100 ml. Pindahkan larutan ke dalam labu Erlenmeyer 100 ml. Tutup dengan alumunium foil atau paraffin film. Simpan larutan tersebut dengan baik untuk digunakan sewaktu-waktu.
- ❖ Siapkan 20 ml kuning telur.
- ❖ Siapkan 80 ml larutan Tris – fruktosa – asam sitrat dalam Beaker glass 100 ml. Campurkan 20 ml kuning telur, lalu aduk perlahan-lahan dan hati-hati sampai homogen.
- ❖ Tambahkan 100.000 international unit (i.u.) Penicillin dan 100 mg Streptomycin ke dalam larutan Natrium Sitrat Kuning Telur (1000 i.u Penicillin dan 1 mg Streptomycin untuk setiap milliliter pengencer).
- ❖ Tutup mulut Beaker glass menggunakan alumunium foil. Larutan Tris Kuning Telur siap digunakan.

c. Pembuatan Semen Cair (Chilled Semen)

i. Pengenceran Semen

- Lakukan pemeriksaan semen sampai diketahui :
 - Volume semen (**V**), misalnya : 3,00 ml
 - Konsentrasi Sperma Total (**KT**), misalnya 3 milyar sel/ml
 - Motilitas semen (**M**), misalnya 90 %
- Tentukan Kandungan Sperma Motil (KSM) dalam setiap dosis inseminasi (misalnya : 100 juta sel)
- Tentukan volume inseminasi (volume semen untuk setiap dosis inseminasi, misalnya : 0,50 ml)



$$\begin{aligned}
 \text{Perhitungan Jumlah Dosis} &= \frac{V \times KT \times M}{KSM} \\
 &= \frac{3,00 \times 3000 \text{ juta} \times 0,90}{100 \text{ juta}} \\
 &= 81 \text{ dosis}
 \end{aligned}$$

Perhitungan Volume Pengencer dan Semen

= Jumlah Dosis x Volume Inseminasi

= 81 dosis x 0,50 ml

= 40,50 ml.

Perhitungan Volume Pengencer yang harus ditambahkan

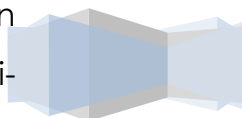
= (Volume Pengencer dan Semen) – (Volume Semen)

= 40,50 ml – 3,00 ml

= 37,50 ml

ii. *Pencampuran Semen dengan Pengencer*

- Siapkan larutan pengencer yang akan digunakan dengan volume yang sudah ditentukan berdasarkan perhitungan di atas.
- Siapkan labu Erlenmeyer 100 ml.
- Tambahkan sedikit-demi sedikit pengencer semen menggunakan pipet tetes ke dalam tabung semen melalui dinding tabung. Aduk perlahan-lahan dan hati-



hati sampai homogen. Lakukan penambahan pengencer sampai volume 10 ml karena kapasitas tabung penampung semen hanya 12 – 15 ml.

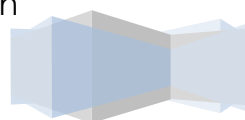
- Pindahkan larutan semen dari tabung penampung semen ke dalam labu Erlenmeyer bersih secara hati-hati.
- Bilas beberapa kali tabung semen menggunakan sisa pengencer, dan pindahkan hasil bilasan tersebut ke dalam labu Erlenmeyer yang sudah berisi semen.
- Periksa daya hidup sperma dalam semen hasil pengenceran. Siapkan satu objek glass bersih. Teteskan satu tetes semen cair di atasnya, tutup dengan kaca penutup lalu amati di bawah mikroskop
- Tutup labu Erlenmeyer tersebut menggunakan aluminium foil atau parafin film.
- Simpan semen cair dalam lemari es yang bersuhu 5°C. Semen cair tersebut dapat tahan sampai waktu 72 jam.

d. Pembuatan Semen Beku (Frozen Semen)

Semen yang diawetkan dalam bentuk beku dan disimpan dalam gas Nitrogen cair (N₂ cair) memiliki ketahanan tak terbatas. Pembuatan semen beku merupakan kelanjutan dari pembuatan semen cair dengan sedikit modifikasi pada saat penyiapannya. Modifikasi yang dimaksud adalah :

1. Perhitungan kandungan sperma motil (**KSM**) dalam setiap dosis inseminasi harus diduakalilipatkan karena terjadi kematian/kerusakan sperma selama proses pembekuan dan

XXX



pencairan kembali (*thawing*) semen beku – sesaat sebelum semen tersebut diinseminasikan.

2. Pengencer semen harus ditambah agen krioprotektan untuk mengu-rangi tingkat kerusakan sperma pada proses penurunan suhu. Agen krioprotektan yang umum dipakai dan mudah diperoleh adalah gliserol. Kadar gliserol dalam pengencer semen adalah **7 %**.
3. Sebelum memasuki proses pembekuan (penurunan suhu ke – 196°C) sperma harus menjalani proses penyiapan untuk memasuki suhu yang lebih dingin. Proses penyiapan tersebut dikenal dengan istilah EQUILIBRASI. Proses EQUILIBRASI dilakukan pada suhu 5o C selama 2 – 4 jam.

Langkah-langkah pembuatan semen beku adalah sebagai berikut :

i. Pengenceran Semen

- Lakukan pemeriksaan semen sampai diketahui :

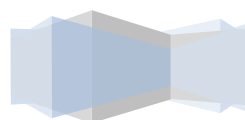
Volume semen (**V**), misalnya : **3,00 ml**

Konsentrasi Sperma Total (**KT**), misalnya 3 milyar sel/ml

Motilitas semen (**M**), misalnya 90 %

- Tentukan Kandungan Sperma Motil (**KSM**) dalam setiap dosis inseminasi (misalnya : 100 juta sel)
- Tentukan volume inseminasi (volume semen untuk setiap dosis inseminasi, misalnya : 0,50 ml)

$$\begin{aligned} \text{Perhitungan Jumlah Dosis} &= \frac{V \times KT \times M}{2 \times KSM} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 &= \underline{3,00 \times 3000 \text{ juta} \times 0,90} \\
 & \quad 2 \times 100 \text{ juta} \\
 &= \mathbf{40,5 \text{ dosis}}
 \end{aligned}$$

Mengingat tidak mungkin ada dosis inseminasi kurang dari satu, maka jumlah dosis harus dibulatkan ke bawah (menjadi 40 dosis) karena apabila dibulatkan ke atas (menjadi 41 dosis) kandungan sperma motil per dosis inseminasi menjadi kurang dari 100 juta sel.

Perhitungan Volume Pengencer dan Semen

$$\begin{aligned}
 &= \text{Jumlah Dosis} \times \text{Volume Inseminasi} \\
 &= 40 \text{ dosis} \times 0,50 \text{ ml} \\
 &= 20,00 \text{ ml.}
 \end{aligned}$$

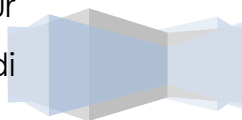
Perhitungan Volume Pengencer yang harus ditambahkan

$$\begin{aligned}
 &= (\text{Volume Pengencer dan Semen}) - (\text{Volume Semen}) \\
 &= 20,00 \text{ ml} - 3,00 \text{ ml} \\
 &= 17,00 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

ii. *Penyiapan Pengencer dan Pengenceran*

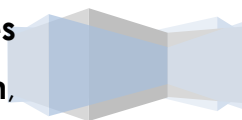
Siapkan **2** (dua) buah Beaker glass 50 ml.

1. Siapkan 17 ml larutan pengencer (Natrium Sitrat Kuning Telur atau Tris Kuning Telur). Pengencer tersebut dibagi menjadi



dua bagian, masing-masing 8,50 ml dan masukkan ke dalam Beaker glass yang terpisah – Beaker glass A dan Beaker glass B. Tutup Beaker glass dengan alumunium foil Pengencer dalam Beaker glass B diambil sebanyak 1,19 ml dan diganti dengan 1,19 ml gliserol (yaitu 7 % dari 17 ml).

2. Campurkan sedikit demi sedikit pengencer dalam Beaker glass A dengan 3 ml semen. Aduk perlahan-lahan sampai homogen. Pindahkan semen yang sudah tercampur tersebut ke dalam Beaker glass A. Tutup kembali dengan alumunium foil.
3. Masukkan Beaker glass A dan B ke dalam lemari es yang bersuhu 5o C. Setelah suhu larutan semen mencapai 5o C, biarkan selama 2 – 4 jam pada suhu tersebut. Selama periode tersebut sperma di dalam Beaker glass A menjalani proses EQUILIBRASI.
4. Setelah melewati proses EQUILIBRASI, tambahkan $\frac{1}{4}$ volume pengencer dari Beaker glass B ke dalam Beaker glass A. Ulangi penambahan $\frac{1}{4}$ volume pengencer dari Beaker glass B setiap 15 menit sampai seluruh volume pengencer dalam Beaker glass B habis. Proses penambahan pengencer dalam Beaker glass B (yang mengandung gliserol) ke dalam larutan semen dalam Beaker glass A disebut dengan proses GLISEROLISASI. Proses gliserolisasi memerlukan waktu 45 menit.
5. Setelah proses gliserolisasi selesai, semen cair siap untuk dikemas. Bentuk kemasan semen beku dapat berupa **pellet**, **ampul**, atau **straw**. Pada saat ini kemasan straw lebih populer digunakan karena alasan **kemudahan proses pembuatan, kepraktisan penyimpanan-an** dan **pengangkutan**,



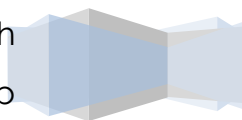
serta **kemudahan penggunaan**. Mengingat hal itu maka dalam Modul ini hanya akan dibahas mengenai semen beku dalam kemasan straw.

iii. *Pengemasan Semen (Filling and Sealing)*

Kemasan straw untuk semen beku yang selama ini banyak digunakan adalah kemasan model (dan buatan) IMV – Perancis dengan volume tiap *straw* sebesar 0,25 ml. Pengemasan semen ke dalam straw dilakukan di dalam lemari es supaya temperaturnya tetap 5^o C, atau kalau ada, di atas meja khusus (*cool top*) yang suhunya diatur pada 5^o C.

1. Susun straw dalam rak straw. Kemudian sambungkan ujung straw yang memiliki sumbat kapas dengan slang plastik penghisap. Ujung slang plastik yang satu lagi sudah disambungkan dengan pompa penghisap.
2. Tuangkan semen dari Beaker glass A ke dalam cawan plastik khusus untuk pengisian straw.
3. Hidupkan pompa penghisap.
4. Celupkan ujung straw yang bebas ke dalam cawan plastik yang berisi semen cair dan biarkan cairan semen memasuki straw sampai penuh.
5. Tutup ujung bebas straw dengan tepung polyvinyl alcohol atau dijepit menggunakan plastic sealer (besi panas khusus untuk merekat plastik).

Selain kemasan model Perancis, akhir-akhir ini mulai banyak instansi yang menggunakan kemasan straw model Landshut dengan volume 0,50 ml/straw dari Mini Tub, Jerman. Kemasan model terakhir ini memerlukan perlengkapan yang lebih sederhana, praktis dan juga lebih murah. Metode Mini Tub



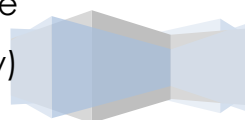
tersebut memiliki perbedaan yang mendasar dibanding dengan model Perancis. Perbedaan tersebut adalah :

- Ukuran straw lebih pendek tetapi volumenya lebih besar (0,50 ml).
- Straw ditutup dengan bola metal pada kedua ujungnya.
- Pencampuran semen dengan pengencer dilakukan satu tahap.
- Gliserolisasi dan pengemasan dilakukan pada suhu kamar.
- Proses equilibrasi dilakukan setelah peengemasan.

iv. Pembekuan Semen

Penurunan suhu semen dari 50 C ke – 196o C dilakukan secara bertahap. Tahap pertama dilakukan melalui penguapan semen oleh uap nitrogen cair, baru setelah itu dicelupkan (direndam) dalam gas Nitrogen cair di dalam Container.

1. Siapkan kotak styrofoam, tempatkan kotak logam pada dasarnya. Kemudian rak besi diberdirikan di atas kotak logam.
2. Susun straw di atas rak besi. Atur jangan sampai bertumpuk.
3. Tuangkan 2,5 liter gas nitrogen cair ke dalam kotak logam secara hati-hati menggunakan corong plastik besar yang disambung dengan selang plastik.
4. Penuangan gas nitrogen dilakukan lewat sisi dalam kotak styrofoam supaya gas cair tersebut tidak menciprati straw.
5. Biarkan gas nitrogen menguapi straw, yang berjarak sekitar 3 - 5 cm dari permukaan cairan, selama 7 – 8 menit. Suhu uap nitrogen pada saat itu antara –80^oC sampai –100^oC.
6. Masukkan straw-straw yang sudah membeku tersebut ke dalam goblet (wadah plastik yang memuat sejumlah straw)



menggunakan pinset. Kemudian goblet-goblet tersebut masukan ke dalam canister (silinder logam bertangkai sebagai tempat untuk merendam straw di dalam container nitrogen cair).

7. Masukkan canister ke dalam container yang sudah berisi nitrogen cair. Cantolkan ujung tangkai canister pada lekukan bibir container, kemudian pasang tutup container.
8. Setelah semen terendam selama 30 menit, ambil satu straw dari dalam container menggunakan pinset. Rendam straw tersebut dalam air hangat (38°C) selama 30 detik. Gunting ujungnya dan teteskan isinya pada gelas objek bersih, lalu tutup dengan kaca penutup. Amati daya hidupnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Hafez, E.S.E. 1993. Artificial insemination. In: HAFEZ, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th.
- Toelihere, M.R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak. Edisi ke-2. Angkasa, Bandung. 292 hal.
- Toelihere, M.R. 1997. Peranan Bioteknologi Reproduksi Dalam Pembinaan Produksi Peternakan di Indonesia. Disampaikan pada Pertemuan Teknis dan Koordinasi Produksi (PERTEKSI) Peternak Nasional T.A. 1997/1998, Ditjennak di Cisarua-Bogor 4-6 Agustus 1997

