

Dr. Yendraliza, S.Pt, M.P  
Pajri Anwar, S.Pt, M.P  
M. Rodiallah, S.Pt, M.Sc

# Bioteknologi Reproduksi



# BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI

Dr. Yendraliza, S.Pt, M.P

Pajri Anwar, S.Pt, M.P

M. Rodiallah, S.Pt, M.Sc

Perpustakaan Nasional RI: Katalog dalam Terbitan (KDT)

**BIOTEKNOLOGI REPRODUKSI**

Dr. Yendraliza, S.Pt, M.P

Pajri Anwar, S.Pt, M.P

M. Rodiallah, S.Pt, M.Sc

Cetakan I: Oktober 2015

x + 142 Halaman; 14.5 x 21 cm

ISBN : 978-602-6791-10-8

Rancang Sampul : Agung Istiadi

Penata Isi : Iqbal Novian

***All right reserved***

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara apapun, tanpa izin tertulis dari penerbit

Diterbitkan oleh:

ASWAJA PRESSINDO

Anggota IKAPI No. 071/DIY/2011

Jl. Plosokuning V/73, Minomartani,

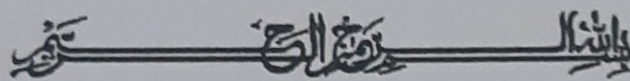
Sleman, Yogyakarta

Telp. (0274)4462377

E-mail : [aswajapressindo@gmail.com](mailto:aswajapressindo@gmail.com)

Website : [www.aswajapressindo.co.id](http://www.aswajapressindo.co.id)

## KATA PENGANTAR



*Assaalamu'alaikum Warahmatullahi wabarakaatuh*

*Alhamdulillahirobbil'alamin*, penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan karunia dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulisan Buku Bioteknologi Reproduksi dapat terselesaikan dengan baik. Sholawat dan salam untuk Nabi dan Rosul Allah, Muhammad SAW, yang telah membawa kita dari alam kebodohan ke alam yang penuh pengetahuan dan pencerahan.

Maksud diterbitkannya buku ini adalah bahwa reproduksi merupakan suatu upaya untuk meningkatkan populasi ternak dengan menggunakan teknologi-teknologi dibidang reproduksi. Buku ini berisi materi tentang Teknologi dibidang reproduksi ternak yang meliputi dengan evaluasi semen, pengenceran semen, pembekuan semen, sinkronisasi reproduksi, ovulasi, fertilisasi invitro, biologi molekuler. Sumber bacaan yang dijadikan referensi oleh penulis dalam pembuatan buku ini adalah buku yang berkaitan dengan teknologi reproduksi, jurnal ilmiah, hasil penelitian serta pengalaman-pengalaman yang dialami oleh penulis. Buku ini dibuat agar pembaca dapat

memahami dan mengerti dengan lebih mudah tentang hal-hal yang berkaitan dengan bioteknologi reproduksi.

Penulis menyadari bahwa penulisan buku ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu saran dan kritik yang sifatnya membangun, sangat diharapkan oleh penulis untuk peningkatan mutu buku ini dikemudian hari. Semoga buku ini dapat bermanfaat di dunia dan akhirat.

Pekanbaru, Agustus 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI .....	ii
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
BAB I. EVALUASI SEMEN.....	1
BAB II. PENGOLAHAN DAN PRESERVASI SEMEN .....	23
BAB III. PENGAWETAN SEMEN .....	39
BAB IV. SINKRONISASI .....	55
BAB V. FERTILISASI INVITRO .....	67
BAB VI. BIOLOGI MOLEKULER .....	77
BAB VII. SINTESA DI LUAR SEL .....	99
BAB VIII. PROTEIN SEL TUNGGAL .....	109
BAB IX. REKAYASA GENETIKA .....	115
BAB X. TEKNIK KLONING .....	127
BAB XII. TERNAK TRANSGENIK .....	137

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1.1. Sistem penilaian gerakan massa sperma menggunakan skor (Evans dan Maxwell, 1987) .....	8
1.2. Sistem penilaian gerakan individu sperma menggunakan skor .....	10
1.3. Konsentrasi sperma berdasarkan warna dan kekentalan semen .....	11
1.4. Konsentrasi spermatozoa berdasarkan jarak antar kepala sperma .....	12
2.1 Kandungan Air Tebu Varietas PS 862 Berumur $\pm$ 11 Bulan .....	29
2.2. Kandungan Bahan Kimia Kuning Telur Ayam.....	30
3.1. Penggolongan Straw Sesuai Bangsa .....	48
5.1. Lama pendewasaan Oosit pada beberapa spesies ....	70
6.1. Perbedaan DNA dan RNA.....	83
10.1. Perbedaan teknik kloning roslin dan Honolulu .....	132

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
5.1. Pengumpulan Oosit dalam Ovarium Sapi Donor .....	68
5.2. Koleksi oosit dengan cara "pemotongan" permukaan ovarium .....	69
5.3. Embrio setelah di Itur.....	71
5.4. Embrio yang memiliki Blatokista setelah di Kultur selama 7 hari.....	72
6.1. Hubungan Biologi Molekuler dengan ilmu lain .....	78
6.2. Siklus umum sel-sel organism .....	79
6.3. Rantai DNA yang di urai dari sebuah Kromosom .....	80
6.4. Struktur RNA .....	81
6.5. Struktur Protein .....	74
6.6. 20 Asam amino esensial.....	85
6.7. 20 Asam amino esensial .....	87
6.8. Central dogma biologi molekuler.....	88
6.9. Proses transkripsi oleh enzim RNA polimerase .....	89
6.10. Proses transkripsi secara keseluruhan .....	91
6.11. Tahap inisiasi translasi.....	94



6.12. Tahap elongasi translasi .....	95
6.13. Tahap terminasi translasi .....	96
7.1. Cara kerja enzim menurut teori ketepatan induksi ...	103
7.2. Cara kerja enzim menurut teori lock and key .....	104
8.1. Peralatan pengolahan protein sel tunggal .....	110
9.1. Teknik rekayasa genetika menggunakan plasmid bakteri .....	118
9.2. Pembuatan antibody monoclonal .....	119
9.3 Contoh proses pemisahan gen ( <i>gene splicing</i> ).....	120
9.4 Proses terapi gen pada manusia .....	121
10.1 Transfer Nukleus (inti) .....	129
10.2 Proses kloning ternak domba dolly .....	130
10.3 Tahapan dari proses kloning teknik Honolulu .....	132

# **BAB I**

## **EVALUASI SEMEN**

### **1.1 Semen**

Semen adalah sekresi kelamin jantan yang secara normal diejakulasikan ke dalam saluran alat kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan.

Semen terdiri dari dua bagian yaitu spermatozoa dan plasma semen. Spermatozoa atau sel-sel kelamin jantan yang bersuspensi dalam suatu cairan atau medium semi gelatinous yang disebut plasma semen. Spermatozoa dihasilkan dalam testes sedangkan plasma semen adalah campuran sekresi yang dibuat oleh epididimis dan kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap yaitu kelenjar-kelenjar vesikulares dan prostat. Produksi spermatozoa oleh testes ataupun produksi plasma semen oleh kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap kedua-duanya dikontrol oleh hormon. Testes dipengaruhi oleh FSH dan LH dari adenohypophysis sedangkan testes sendiri menghasilkan hormon testosteron yang mengontrol perkembangan sekresi kelenjar-kelenjar kelamin pelengkap.

Fungsi utama plasma semen adalah sebagai suatu medium pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat dijalankan dengan baik karena pada banyak spesies plasma semen mengandung bahan-bahan penyangga dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa baik yang dapat dipergunakan secara langsung yaitu fruktosa dan sarbitol, maupun secara tidak langsung yaitu glycerilphosphorylcholine (GPC), tetapi suatu enzim di dalam sekresi saluran kelamin betina

dapat merombak menjadi kesatuan-kesatuan yang lebih sederhana sehingga dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa.

## **1.2 Pemeriksaan Semen**

Pemeriksaan kualitas semen segar dilakukan untuk mengetahui kelayakan semen segar tersebut untuk diproses lebih lanjut. Evaluasi atau pemeriksaan semen merupakan suatu tindakan yang perlu dilakukan untuk melihat kuantitas (jumlah) dan kualitas semen. Tujuan evaluasi semen segar adalah: 1) Untuk mengetahui kualitas semen; 2) Untuk mengetahui bahan pengencer yang dibutuhkan; 3) Untuk mengetahui jumlah straw yang dapat dihasilkan dalam proses pembekuan semen.

Pemeriksaan semen dibagi menjadi dua kelompok, yaitu pemeriksaan secara **makroskopis** dan pemeriksaan **mikroskopis**. Pemeriksaan makroskopis 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 **makroskopis** meliputi: volume semen, pH (derajat keasaman) semen, konsentrasi semen, bau semen, dan warna semen. Adapun pemeriksaan **mikroskopis** meliputi: motilitas (gerakan massa sperma, gerakan individu sperma), konsentrasi sperma dalam tiap mililiter semen, persentase spermatozoa hidup, persentase abnormalitas (ketidaknormalan bentuk) sperma, membran plasma utuh, dan tudung akrosom utuh.

### **1.2.1. Pemeriksaan Mikrokopis**

#### **Volume Semen**

Menurut Toelihere (1985) seekor babi jantan dapat menghasilkan 125-500 ml per ejakulasi dan kuda menghasilkan semen antara 30-250 ml per ejakulasi. Sedangkan sapi menghasilkan volume semen yang bervariasi antara 1,0-15,0 ml. Feradis (2010), menyatakan volume semen sapi antara 5-8 ml, domba 0,8-1,2 ml, babi 150-200 ml, dan kuda 60-100 ml. Perbedaan volume semen tersebut dipengaruhi oleh : perbedaan individu, umur, bangsa ternak, nutrisi, frekuensi ejakulat, libido, dan kondisi ternak itu sendiri.

Ejakulasi yang sering menyebabkan penurunan volume dan apabila dua ejakulat diperoleh berturut-turut dalam waktu singkat maka umur ejakulasi yang kedua mempunyai volume yang lebih rendah. Dalam jenis ternak berbeda tingkat ejakulasi tergantung pada bangsa, umur, ukuran badan, tingkatan makanan, frekuensi penampungan dan faktor lainnya. Pada umumnya hewan-hewan muda dan berukuran kecil dalam satu spesies menghasilkan volume semen yang rendah.

#### **pH (Derajat Keasaman) Semen**

Derajat keasaman (pH) sangat mempengaruhi daya tahan hidup spermatozoa. Perubahan pH disebabkan oleh metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob yang menghasilkan asam laktat yang semakin meningkat. Semen yang berkualitas baik mempunyai pH sedikit asam (Bearden dan Fuquay, 1984), yaitu lebih kecil dari 7,0 dengan rata-rata 6,7. Menurut Garner dan Hafez (2000) pada umumnya semen memiliki kisaran pH netral. 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  
Perbedaan nilai pH kemungkinan disebabkan oleh perbedaan ras, perbedaan *complex buffer system* yang terdapat pada plasma semen.

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 (kertas indikator universal) dengan skala ketelitian yang cukup sempit, misalnya antara 6–8 dengan rentang ketelitian 0,1.

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.

### **Konsentrasi Semen**

Kekentalan atau konsistensi atau viskositas merupakan salah satu sifat semen yang memiliki kaitan dengan kepadatan/konsentrasi sperma di dalamnya. Semakin kental semen dapat diartikan bahwasemakin tinggi konsentrasi spermanya. Pemilihan konsentrasi atau jumlah spermatozoa per milliliter semen sangat penting, karena faktor inilah yang menggambarkan sifat-sifat semen dan dapat dipakai sebagai salah satu criteria penentuan kualitas semen (Toelihere, 1985). Konsistensi atau derajat kekentalan diperiksa dengan mengoyangkan tabung berisi semen secara perlahan-lahan. Pada sapi dan domba mempunyai konsistensi kental berwarna krem, sedangkan semen kuda dan babi cukup encer dan berwarna terang sampai kelabu. Pada sapi konsistensi kental dan berwarna krem mempunyai konsentrasi 1.000 juta sampai 2.000 juta atau lebih sel spermatozoa per ml, konsistinsi encer berwarna susu memiliki konsentrasi 500 juta sampai 600 juta sel spermatozoa per ml, semen yang cairan berawan atau sedikit kekeruhan memiliki konsentrasi sekitar 100 sampai 50 juta spermatozoa per ml (Feradis, 2010).

### **Bau Semen**

Semen yang normal, pada umumnya, memiliki bau amis khas disertai dengan bau dari hewan itu sendiri. Bau busuk bias terjadi apabila semen mengandung nanah yang disebabkan oleh adanya infeksi organ atau saluran reproduksi hewan jantan. Pemeriksaan bau semen dapat dilakukan dengan cara

memegang 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.

### **Warna Semen**

Warna semen dapat diamati langsung karena tabung penampungsemen terbuat dari gelas atau plastik tembus pandang. Semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Kira-kira 10% menghasilkan semen yang normal warna kuning kekuningan, yang disebabkan oleh riboflavin yang dibawa oleh satu gen autosom resesif dan tidak mempunyai pengaruh terhadap fertilitas (Feradis, 2010). Derajat kekeruhannya pada konsentrasi sperma. Semen yang berwarna merah gelap sampai merah muda menandakan adanya darah segar dalam jumlah berbeda. Warna coklat-kecoklatan menunjukkan adanya darah yang mengalami dekomposisi. Suatu warna coklat muda atau warna kehijau-hijauan menunjukkan kemungkinan kontaminasi dengan feses (Toelihere, 1985).

### **1.2.2. Pemeriksaan Mikrokopis**

#### **Motilitas dan Penilaian Semen**

Pemeriksaan motilitas merupakan cara pemeriksaan visual dengan bantuan mikroskop yang dinyatakan secara komparatif, sehingga memungkinkan terjadinya kesalahan dan perbedaan penafsiran setiap dilakukan

pemeriksaan. Semen segar yang baru dikoleksi dan belum diencerkan dilakukan pemeriksaan motilitas massa dan individu. Motilitas merupakan salah satu kriteria penentu kualitas semen yang dilihat dari banyaknya spermatozoa yang motil progresif dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang ada dalam satu pandang mikroskop. Menurut Evans dan Maxwell (1987) terdapat tiga tipe pergerakan spermatozoa yaitu pergerakan progresif (maju ke depan), pergerakan rotasi (gerakan berputar) dan osilator atau konvulsif tanpa pergerakan ke depan atau perpindahan posisi.

Motilitas adalah gerak maju ke depan dari spermatozoa secara progresif. Oleh karena tujuan akhir dari pengencer adalah untuk kegiatan inseminasi buatan maka daya gerak spermatozoa secara progresif (maju kedepan) menjadi patokan yang mutlak diperhitungkan. Hal ini berarti sperma yang bergerak berputar-putar atau bergerak di tempat apalagi yang tidak bergerak tidak dijadikan tolok ukur penilaian kualitas semen beku atau semen cair. Artinya parameter motilitas disamping konsentrasi sperma merupakan parameter utama dalam menilai kelayakan semen yang akan digunakan dalam kegiatan IB (Solihati dan Kuna, 2010).

Motilitas spermatozoa merupakan ciri utama dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan. Motilitas spermatozoa membantu perjalanan spermatozoa dari tempat penyimpanannya menuju ke tempat terjadinya konsepsi. Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah umur spermatozoa, maturasi spermatozoa, penyimpanan energi (ATP), agen aktif, biofisik dan fisiologi, cairan suspensi dan adanya rangsangan hambatan (Triana, 2006).



Pemeriksaan motilitas sperma merupakan satu-satunya cara penentuan kualitas semen sesudah pengenceran. Motilitas sperma kambing pada umumnya berkisar antara 75% sampai dengan 85% tetapi kisaran tersebut tidak menjadi patokan karena beberapa jenis kambing mempunyai motilitas sperma di bawah kisaran tersebut. Meskipun demikian kambing tersebut masih dapat digolongkan ke dalam jenis kambing yang mempunyai motilitas sperma cukup baik. Motilitas sperma kambing kacang 84,91% dan kambing PE 78,13% tetapi menurut Sandi *et al.*,(1989), hanya 60%. Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas sperma adalah metode penampungan semen, lingkungan, penanganan dan perawatan semen sesudah penampungan, interval antara penampungan dan evaluasi semen, variasi pejantan serta variasi musim.

### **Gerakan Massa Spermatozoa**

Gerakan massa spermatozoa merupakan petunjuk derajat keaktifan bergerak sperma (sebagai indikator tingkat atau persentase sperma hidup dan aktif) dalam semen. Menurut Toelihere (1985) gerak massa spermatozoa dapat dilihat dengan jelas dibawah mikroskop dengan pembesar kecil ( $10\times 10$ ) dan cahaya dikurangi.

- Siapkan satu buah gelas objek yang bersih. Hangatkan sampai mencapai suhu  $37^{\circ}$  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 10x10. 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 (enam) kategori seperti yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.1. Sistem penilaian gerakan massa sperma menggunakan skor (Evans dan Maxwell, 1987)

Skor	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	Bagus	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	Cukup	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 lamban.
0	Mati	Seluruh sperma mati, tidak terlihat adanya sel sperma yang bergerak

Ada pula yang menilai gerakan massa dengan menggunakan derajat gerakan dengan kriterianya adalah sebagai berikut:

1. “Sangat baik”(+++), terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif serta bergerak cepat
2. “Baik” (++) , terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas, dan agak lambat.
3. “Kurang baik” (+), jika tidak terlihat gelombang melainkan hanya gerakan individual aktif progresif.
4. “Buruk” (N/O : Neospermia), bila hanya sedikit atau tidak kelihatan.

### **Gerakan Individu Spermatozoa**

Menurut Toelihere (1985) gerakan melingkar dan gerakan mundur sering merupakan tanda-tanda *cold shock* atau media yang tidak isotonik dengan semen. Gerakan berayun atau berputar di tempat sering terlihat pada semen yang tua, apabila kebanyakan spermatozoa telah berhenti bergerak maka dianggap mati. Penilaian gerakan individu dengan sistem skor dapat dilihat pada Tabel 2.

Selain itu pengamatan yang tampak dengan menggunakan menggunakan mikroskop juga dapat dinilai dengan skala persentase. Skala persentase pergerakan 0 sampai 100% atau skala penilaian dari 0 sampai 10 merupakan alat untuk mencapai tujuan yang sama. Persentase motilitas spermatozoa sapi dibawah 40% menunjukkan penilaian semen yang kurang baik dan 50–80 % spermatozoa yang motil aktif progresif (Feradis, 2010).

Tabel 1.2. Sistem penilaian gerakan individu sperma menggunakan skor (Toelihere, 1985).

Skor	Keterangan
0	Spermatozoa imotil atau tidak bergerak
1	Gerakan berputar ditempat
2	Gerakan berayun atau melingkar, kurang dari 50% bergerak progresif, tidak ada gelombang.
3	50% sampai 80% spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan masa.
4	Pergerakan progresif yang gesit dan segera membentuk gelombang, dengan 90% sperma motil.
5	Gerakan yang sangat progresif, gelombang yang sangat cepat, menunjukkan 100% motil aktif.

### **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 beberapa cara, yaitu pendugaan melalui warna dan kekentalan semen, jarak antar kepala sperma, serta penghitugan menggunakan haemacytometer dan kamar hitung Neubauer, spektrofotometer, dan perhitungan secara elektrik.

#### **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 1.3. Konsentrasi sperma berdasarkan warna dan kekentalan semen

Skor	Warna dan kekentalan semen	Konsentrasi sperma (x 10 <sup>9</sup> 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	

**b. Pendugaan berdasarkan jarak antar 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 4 berikut :

Tabel 1.4. Konsentrasi spermatozoa berdasarkan jarak antar kepala sperma

Kriteria	Keterangan	Konsentrasi sperma (x 10 <sup>6</sup> 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	200 – 500

	satu setengah panjang kepala sampai satu panjang sperma keseluruhan	
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

**c. *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.
- 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. 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
- Bidang hitung pada 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
- 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. 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 mililiter semen yang diperiksa terdapat (X) x  $10^7$  sel sperma.

### **Persentase Sperma Hidup**

Semen yang berkualitas baik adalah semen yang memiliki kandungan sperma hidup dan bergerak maju ke depan dalam jumlah yang banyak. Penentuan persentase sperma hidup semen dapat dilakukan melalui dua metode, yaitu melalui penghitungan menggunakan pipet haemocytometer 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.

#### ***a. Penghitungan Motilitas menggunakan pipet haemocytometer 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. Sperma-sperma 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 mililiter 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 persentase sperma hidup dalam setiap mililiter 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 (film) cairan semen pada permukaan gelas objek pertama.

- Tempatkan gelas objek yang pertama di atas nyala api lampus pirtus 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 :

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

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

### **Abnormalitas Spermatozoa**

Ketidaknormalan bentuk sperma dalam satu contoh semen perlu diketahui karena tingkat ketidaknormalan tersebut akan berkaitan dengan kesuburan (fertilitas) dari pejantan yang ditampungsemennya. Tingkat abnormalitas sperma dapat diketahui melalui preparat pewarnaan diferensial yang sudah diuraikan pada bagian persentase sperma hidup.

Setiap sampel semen mengandung beberapa spermatozoa abnormal. Morfologi abnormalitas spermatozoa mempunyai hubungan yang besar dengan fertilitas. Ada korelasi positif antara morfologi normal sperma dengan abnormalitas. Pada domba, ketika terdapat 20% atau lebih spermatozoa abnormal menunjukkan ketidaksuburan atau fertilitasnya diragukan. Lebih dari 15% spermatozoa abnormal maka tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan (Ax *et al*, 2000).

Jumlah abnormalitas dihitung dari pemeriksaan sekitar 200 sel spermatozoa. Kelainan morfologi di bawah 20% masih dianggap normal (Toelihere, 1993). Semen domba yang memiliki motilitas lebih besar dari 85% dan abnormalitas kurang dari 10% menunjukkan kualitas yang baik. Namun tidak semata-mata hanya menggunakan dua parameter ini. Jumlah total spermatozoa hidup per inseminasi lebih penting dari persentase spermatozoa abnormal. Ketidakmampuan dari satu spermatozoa untuk penetrasi ke zona pelusida dari sel telur dipercaya menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi fertilisasi (Ax *et al*, 2000).

Abnormalitas bisa terjadi pada kepala, leher, badan, ekor, atau beberapa kombinasi pada bagian-bagian tersebut. Abnormalitas pada kepala termasuk kepala kembar, kepala pipih atau berbentuk buah per bulat, mengerut, membesar, menyempit, memanjang dan kepala kecil. Abnormalitas pada leher terdiri dari leher patah, dan kepala tak berekor, abnormalitas pada badan umumnya bengkok, patah, pendek, membesar, atau menebal, filiform ganda dan seperti batang, penggabungan tanpa sumbu dengan kepala. Abnormalitas pada ekor adalah melingkar, ganda, patah, menggulung (Salisbury dan Van Dernark, 1985).

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.

Menurut Toelihere (1985), mengklasifikasikan abnormalitas dalam abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer meliputi kepala yang terlampau besar (*macrocephalic*), kepala terlampau kecil (*microcephalic*), kepala pendek melebar, pipih memanjang dan piriformis; kepala rangkap, ekor ganda; bagian tengah melipat, membengkok, membesar, piriformis; atau bertaut abaxial pada pangkal kepala; dan ekor melingkar, putus atau terbelah. Abnormalitas sekunder termasuk ekor yang putus, kepala tanpa ekor, bagian tengah yang melipat, adanya butiran-butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosom yang terlepas. Setiap spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi sel telur, tanpa memandang apakah abnormalitas tersebut terjadi di dalam tubuli seminiferi, dalam epididimis atau oleh perlakuan yang tidak menguntungkan terhadap ejakulat. Selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi (Toelihere, 1993).

Metode untuk menentukan abnormalitas spermatozoa yaitu :

- Tempatkan preparat hasil pewarnaan diferensial pada meja objek mikroskop dan amati menggunakan pembesaran lensa 10x40. 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 :

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormalitas}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### **Persentase Abnormalitas spermatozoa =**

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%.

### **Membran Plasma Utuh**

Persentase MPU spermatozoa ditentukan dengan menghitung persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dengan metode *Osmotic Hypoosmotic Swelling Test* (HOST) (Bucak *et al.*, 2008). Komposisi larutan hiposmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabides hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 300 µl larutan hiposmotik ditambahkan ke dalam 30 µl semen, dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 45 menit. Setelah di inkubasi, 0,2 µl diteteskan diatas objek glass kemudian ditutup dengan penutup glass, selanjutnya dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh

ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

$$\text{MPU (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa membran plasma utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### **Tudung Akrosom Utuh**

Persentase tudung akrosom utuh (TAU) dievaluasi dengan metode pewarnaan eosin 2% yaitu eosin 2 g dalam 100 ml sodium sitrat 2,9% (Toelihere, 1993) evaluasi kelainan akrosom diambil dari satu tetes semen kemudian dicampurkan dengan eosin 2% dengan perbandingan satu banding empat. Selanjutnya di buat preparat ulas tipis dan dikeringkan diatas meja pemanas. persentase spermatozoa akrosom utuh dengan menghitung sebanyak 200 spermatozoa di bawah mikroskop fase kontras 1000 kali pembesaran. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai dengan terlihatnya garis pembungkus pada bagian kepala dan garis cincin nukleus, sedangkan yang rusak tidak tedapatnya warna lebih gelap pada bagian atas kepala spermatozoa.

$$\text{TAU (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa bertudung akrosom utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### **REFERENSI :**

- Ax, R.L.,M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez and M.E. Berlin. 2000. Semen Evaluation. In : E.S.E. Hafez. (Eds) *Reproduction in Farm Animals*.7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia.
- Bucak, M. N., and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*.73: 103–108.

- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. London: Butterworths.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reprduksi Pada Ternak. Alfabeta. Bandung.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma : E.S.E. Hafez. (Eds) Reproduction In Farm Animals. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Salisbury, G. W. dan N. L. VanDemark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. (Diterjemahkan oleh R. Djanuar).
- Toelihere, M.R. 1993. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M. R. 1985. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Triana, I. N. 2006. Pengaruh Waktu Inseminasi Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Pascainseminasi Pada Kambing. Berk. Penel. Hayati.11: 147-150.

## **BAB II**

### **PENGOLAHAN DAN PRESERVASI SEMEN**

#### **2.1. Pengenceran Semen**

Perbaikan kualitas pengencer merupakan salah satu upaya untuk mempertahankan kualitas semen seoptimal mungkin sehingga motilitas spermatozoa dan daya tahan hidup spermatozoa menjadi optimal. Pengencer harus mengandung unsur dengan fungsi yang sama dengan kandungan unsur semen. Bahan pengencer yang sifat fisik dan kimianya tidak sesuai dengan semen akan menyebabkan abnormalitas atau kerusakan fisik spermatozoa sehingga menurunkan fertilitas.

Pembuatan larutan pengencer untuk keperluan IB harus memperhatikan beberapa pertimbangan antara lain non-toksin dan baik bagi spermatozoa agar penggunaan pejantan yang bebas penyakit dan bermutu genetik tinggi secara maksimal dapat tercapai dalam program IB, dalam pelaksanaan IB sangat diperlukan bahan pengencer untuk meningkatkan volume semen, serta mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa dalam kurun waktu tertentu. Selain itu, yang tidak kalah pentingnya dalam proses pengenceran adalah tempat penyimpanan semen harus sesuai dengan suhu dan kondisi yang menunjang daya tahan semen yang mempertahankan kondisi spermatozoa selama waktu yang diinginkan untuk kemudian dipakai sesuai dengan kebutuhan (Toelihere, 1985).



## **2.2. Fungsi Bahan Pengencer**

Menurut Toelihere (1985) spermatozoa tidak dapat tahan hidup untuk waktu yang lama kecuali ditambahkan berbagai unsur kedalam semen. Unsur-unsur ini yang membentuk suatu pengencer yang baik, mempunyai fungsi sebagai berikut :

1. Menyediakan sumber makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa
2. Melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin (*cold shock*).
3. Menyediakan suatu penyangga terhadap perubahan pH akibat pembentukan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa.
4. Mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang sesuai.
5. Mencegah pertumbuhan kuman.
6. Memperbanyak volume semen sehingga banyak hewan betina dapat diinseminasi dengan satu ejakulat.

## **2.3. Syarat-syarat Pengencer**

Suatu pengencer yang baik memenuhi syarat-syarat menurut pendapat Toelihere (1985) dan Shukla (2011) sebagai berikut :

1. Bahan pengencer murah sederhana dan praktis dibuat, tetapi mempunyai daya preservasi yang tinggi.
2. Pengencer harus mengandung unsur-unsur yang hampir sama sifat fisik dan kimianya dengan semen dan tidak boleh mengandung zat-zat toksik terhadap spermatozoa atau saluran alat kelamin betina.
3. Pengencer harus isotonik dengan sel serta mempertahankan kualitas selama penyimpanan.

4. Pengencer menyediakan kandungan lipoprotein dan lesitin untuk perlindungan terhadap perubahan suhu.
5. Pengencer tidak membatasi proses fertilisasi spermatozoa dan perkembangan zigot.
6. Pengencer harus memberi kemungkinan penilaian spermatozoa sesudah pengenceran.

#### **2.4. Macam-macam Bahan Pengencer**

##### **Bahan Pengencer**

Bahan pengencer sperma merupakan larutan isotonis yang diberi tambahan bahan-bahan menyerupai kandungan alami semen serta diberi beberapa bahan tambahan untuk memelihara sperma dari perubahan pH, sebagai sumber nutrisi bagi kelangsungan hidup sperma, juga sebagai pelindung sperma dari *cold shock* pada saat sperma mengalami pemrosesan. Selain itu bahan tambahan lainnya seperti antibiotik *penicillin* dan *Sterptomycin* juga ditambahkan untuk menjaga larutan dari adanya kontaminasi bakteri yang dapat menurunkan kualitas dari sperma.

Terdapat 3 jenis pengencer yang biasa digunakan yaitu, Egg yolk tris dilution, skim dan Andromed®. Egg yolk tris dilution terdiri dari dilution A dan dilution B, dimana dilution A mengandung (Tris amino methane 1,6%, Citric acid 0,9%, Lactose 1,4%, Raffinose 2,5%, Distilled water 80%, Egg yolk 20%, Penicilin, Streptomycin) dan dilution B merupakan campuran antara dilution A ditambah dengan Gliserol 13%. Pada larutan pengencer ini, Tris amino methane berfungsi sebagai buffer pH bagi larutan untuk mencegah terjadinya perubahan pH akibat

adanya metabolisme asam laktat oleh sperma, serta untuk mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit.

Membran plasma spermatozoa kaya akan lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap peroksidasi lipid (Maxwell dan Watson, 1996). Akibat dari peroksidasi lipid adalah terbentuknya peroksid lipid, yang akan bereaksi sebagai radikal bebas dan merangsang terjadinya reaksi otokatalitik, sehingga mengakibatkan rusaknya membran plasma (Sinha *et al*, 1996). *Citric acid* berperan sebagai buffer dan juga untuk mendispersi butir-butir lemak membran plasma spermatozoa, sehingga akan mengurangi terjadinya oksidasi lipid.

Lactose dan raffinose digunakan sebagai sumber energi, sedang kuning telur berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler untuk mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa. Penambahan antibiotik diberikan untuk mencegah adanya kontaminasi mikroorganisme yang dapat menurunkan kualitas dari spermatozoa (Arifiantini dan Yusuf, 2004; Hardijanto *et al.*, 2010).

Pelarut skim digunakan untuk menggantikan Egg yolk tris dilution. Bahan pengencer ini terdiri atas skim, glukosa, egg yolk 5%, Penicilin, Streptomycin 2,5% dan aquades. Selain pengencer semen yang dibuat berdasarkan resep, terdapat berbagai pengencer kemasan yang telah beredar dan dapat diperoleh di pasaran seperti Biochiphos dan Bioexcel, juga triladyl, biladyl dan pengencer Andromed® yang menggunakan lesitin dari kacang kedelai (Arifiantini dan Yusuf, 2004).

Andromed® merupakan salah satu pengencer komersial buatan Minitube Jerman, berbahan dasar Tris yang tidak menggunakan sumber protein asal hewan yang menjadi andalan untuk pengencer semen beku sapi. Andromed® terdiri dari phospholipid, tris (hydroxymethyl) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, gliserol, lesitin, tylosine tart rat, gentamycin sulfat, spectinomycin dan lincomycin yang biasa digunakan untuk pembuatan semen beku sapi. Tatacara penggunaan dilakukan hanya dengan penambahan aquades steril (milli-Q-water) dengan perbandingan Andromed® : aquades steril = 1 : 4. (Minitub, 2001).

Sumber lesitin di dalam pengencer semen komersial Andromed® berasal dari ekstrak kacang kedelai, yang juga dapat menjalankan fungsi seperti pada lesitin kuning telur. Selain lesitin, Andromed® juga mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin dan gliserilfosforil kolin (GPC). Andromed® mengandung lesitin yang cukup tinggi yaitu sebanyak 6,76g/100ml. Seluruh bahan-bahan yang terkandung di dalam Andromed® tersebut merupakan bahan-bahan yang umum digunakan dalam menyusun pengencer semen selama ini. Lesitin berfungsi melindungi membran plasma sel dari pengaruh *cold shock* selama proses pengolahan berlangsung.

### **Keunggulan Pengencer Air Tebu**

Tanaman tebu sukrosa dihasilkan dari fotosintesis di daun pada akhirnya akan disimpan di batang. Kemampuan tebu dalam mengakumulasi sukrosa di batang

sangat bervariasi tergantung pada varietas dan cara budidayanya. *Saccharum officinarum* adalah jenis tebu yang paling banyak dikembangkan dan dibudidayakan karena kandungan sukrosa yang tinggi (Yukamgo dan Yuwomo, 2007).

Akumulasi sukrosa pada batang tebu dimulai pada saat terbentuk ruas-ruas pada batang tebu (internoda) yang sedang mengalami proses pemanjangan sampai pada internoda yang proses pemanjangannya berhenti (Rose dan Botha, 2000). Besarnya jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi pada batang sangat ditentukan oleh selisih antara proses sintesis dan degradasi sukrosa. Pada tanaman tebu aktivitas invertase merupakan kunci utama pengaturan akumulasi sukrosa pada batang (Langenkamper *et al.*, 2002).

Kadar air gula pada batang tebu mencapai 20 % mulai dari pangkal sampai ujungnya. Kadar air gula di bagian pangkal lebih tinggi dari pada bagian ujung. Bila dipotong akan terlihat serat-serat dan terdapat cairan yang manis. Kadar air berkisar antara 7,27-8,56% (bobot basa), kadar abu 2,11-2,25%, kadar lemak 0,15-0,87%, kadar protein 0,43-2,08%, kadar bagian tak larut air 0,36-1,44%, kadar gula pereduksi 1,38-2,87%, kadar sukrosa 68,10-86,19% (bobot kering) (Lesthari, 2006).

Hubungan air tebu dengan pembuatan bahan pengencer adalah sebagai nutrisi yang dibutuhkan spermatozoa, sebagai mana kita ketahui spermatozoa akan bergerak aktif bila energi yang dibutuhkan tersedia untuk dimanfaatkan untuk bergerak. Sukrosa merupakan salah satu sumber energi alternatif bagi spermatozoa yang mudah dihidrolisa oleh enzim invertase menjadi glukosa dan

fruktosa. Perombakan sukrosa disakarida akan menjadi dua unit monosakarida glukosa dan fruktosa yang berhubungan dengan ikatan Glikolisis dan dilanjutkan Siklus Krebs yang menghasilkan ATP dan AMP berfungsi sebagai energi pergerakan spermatozoa. Sukrosa juga berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler, sehingga dapat melindungi dan menunjang kehidupan spermatozoa selama proses pengolahan. Sukrosa telah terbukti mampu memperbaiki kualitas semen, seperti sukrosa pada semen beku kerbau belang (Rizal *et al.*, 2007).

Tabel. 2.1. Kandungan Air Tebu Varietas PS 862 Berumur ± 11 Bulan (Erwinda *et al.*, 2014 dan Kultsum, 2009)

pH	Kadar Air	Kadar Sukrosa	Kadar gula reduksi (invert)	Lain-lain
	.....%.....			
5,5	80,19	18,08	0,54	1,99
5,0	80,26	16,9	0,18	1,12
-	75,00	9,8	0,7	14,50

### **Keunggulan Pengencer Kuning Telur**

Keunggulan lipoprotein dan lesitin dari kuning telur pada preservasi semen dapat menstabilkan membran plasma, sehingga menjaga perubahan komposisi lipid membran plasma selama penyimpanan dan pembekuan. Kuning telur sering ditambahkan ke dalam media pengencer dan penyimpan spermatozoa. Ketertarikan pada kuning telur dimulai sejak diketahui bahwa penurunan motilitas spermatozoa setelah efek *cold shock* disebabkan karena kerusakan membran

plasma, yang diduga karena fosfolipid dan kolesterol yang hilang pada membran plasma sel (Salisbury dan VanDemark, 1985).

Protein dari kuning telur dapat menggantikan beberapa komponen lipid dan protein yang hilang atau rusak, dan dapat membentuk membran protektif menempel pada permukaan membran selama pembekuan, sehingga menjaga konsentrasi Ca di dalam sel (Munoz *et al.*, 2009 dan Moussa *et al.*, 2002). Junior *et al.*, 2009 dan Jiang *et al.*, (2007) melaporkan bahwa LDL berfungsi sebagai kriprotektan ekstraseluler membran sel terhadap perubahan suhu dengan jalan menggantikan bagian fosfolipid dan kolesterol dari membran sel spermatozoa, selain itu LDL juga berikatan langsung dengan membran sel dengan mendorong dan penambahan bagian fosfolipid dan kolesterol ke dalam membran sel spermatozoa. Sedangkan lesitin kuning telur berfungsi membatasi reaksi oksigen dengan asam lemak pada fosfolipid membran dengan jalan mendorong dan mengikat membran plasma spermatozoa, sehingga akan mengurangi terbentuknya anion superoksida yang terbentuk akibat peroksidasi asam lemak (Kmenta *et al.*, 2011).

Lipoprotein dan lesitin yang terkandung dalam kuning telur telah terbukti untuk mencegah kerusakan sel selama pendinginan dan pembekuan yang berfungsi sebagai perlindungan membran sel terhadap kerusakan yang terkait dengan perubahan pH dan kondisi osmotik. kuning telur diyakini menstabilkan membran spermatozoal yang berinteraksi dengan protein plasma seminal, sehingga menghambat kehabisan fosfolipid, mempertahankan tekanan koloid, pencegahan kehilangan kelebihan kations, mengatur lalu lintas Ca yang

dibutuhkan sel serta membatasi reaksi *Spesies Reaktif Oxygene* (Kmenta *et al.*, 2011).

Tabel 2.2. Kandungan Bahan Kimia Kuning Telur Ayam (Moussa *et al.*, 2002 dan Dong *et al.* (2011).

Komponen	Berat	Komponen	Berat
		.....%	
Air	47,5	Makromelekul :	
Lemak	33,0	LDL	68
Protein	17.4	Lipid	86-89
Karbohidrat	0.2	Protein	12,5
Elemen anorganik	1,1	Trigliserida	69
Lain-lain	0.8	Fosfolipid	26
		Kolesterol	5
		HDL	16
		Lain-lain	16

*Low density lipoprotein* menyusun sekitar 2/3 dari total bahan padat kuning telur ayam. Senyawa ini mempunyai berat jenis 0.982 g/mL, molekulnya bulat (spherical) dengan diameter 17-60 nm dan mempunyai inti lipid trigliserida nonpolar dan ester kolesterol yang dikelilingi oleh lapisan fosfolipid dan protein. Phosfolipit berperan penting dalam stabilitas struktur membrane karena LDL memiliki hubungan kekuatan yang hidrofobik. LDL tersusun atas 85- 89% lipid dan 11-17 protein. Lipit dalam LDL yang tersusun dari 69% trigliserida, 26% fosfolipid dan 5% kolesterol (Moussa *et al.*, 2002).

Kuning telur juga mempunyai sifat sebagai penyangga tekanan osmotik sehingga spermatozoa lebih toleran terhadap lingkungan yang hipotonik atau hipertonic. Hal ini karena kuning telur mengandung beberapa senyawa yang



penting untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan. Dong *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa kandungan dari LDL terdiri dari 86 % -89 % lipid dan 12,5% protein, selain itu kuning telur juga mengandung 16% HDL yang tersusun dari 10% protein globular (*livetines*), 4% phosphoproteins (*phosvitin*) dan 2% protein. LDL adalah komponen utama yang berperan protektif dari kuning telur. Salah satu sumber utama dari kerusakan selama kriopreservasi adalah ketidak stabilan membran yang terjadi akibat penurunan suhu dan perubahan transisi fase beku ke fase cair.

Proses pengolahan dan pembekuan semen padabagian lipid dan protein membran spermatozoa akan menyebabkan rusak sehingga perlu menambahkan lipid dan protein dari luar. Penambahan fraksi LDL dalam kuning telur disarankan 5-10% dari total volume media pengencer. Pada konsentrasi kurang dari 5%, LDL tidak mampu melindungi efek *cold shock* selama penyimpanan maupun pembekuan, sedangkan diatas 10% akan menurunkan berat jenis dan tekananosmotik media, sehingga mempunyai efek tidak baik terhadap spermatozoa. Dengan demikian kuning telur mengandung sekitar 50% bahan kering yang terdiri dari 6,6% kandungan LDL dari bahan kering, maka disarankan penambahan LDL antara 6-7% yang diperoleh melalui penambahan 20% kuning telur pada media preservasi (Moussa *et al.*, 2002 dan Bencharif *et al.*, 2008). Herdis *et al.*, 2005 dan Tambing *et al.*, 2008 melaporkan kombinasi kuning telur 20% dalam dari total pengencer sangat efektif mempertahankan kualitas semen beku kambing Saanen.

## **2.5. Cara Pembuatan Bahan Pengencer**

### **Pengencer Ekstrak Air Tebu**

Persiapan dalam pengambilan ekstrak air tebu yang harus dilakukan sebagai berikut :

- 1) Ekstrak air tebu adalah sebagai bahan pengencer dengan memilih batang tebu yang sehat dan bersih. Sebelum dikupas dan digiling batang tebu dibersihkan terlebih dahulu.
- 2) Batang tebu dikupas dengan cara membuang bagian kulit luar tebu sampai bersih dengan menggunakan pisau kemudian bagian batang tebu di potong-potong sepanjang 3 cm untuk mempermudah penggilingan.
- 3) Tebu digiling menggunakan mesin penggilingan tebu dengan cara memasukan potong-potongan tebu kedalam mesin penggilingan untuk mendapatkan ekstrak air tebu murni, kemudian disaring dengan saringan kasar dan dilanjutkan penyaringan dengan kertas saring beberapa kali.
- 4) Air tebu yang digunakan disaring kembali dengan menggunakan saringan mikro 20  $\mu\text{m}$  sehingga didapat ekstraksi air tebu murni yang dinamakan ekstrak air tebu.
- 5) Ekstrak air tebu yang telah ekstraksi ditempatkan dalam gelas ukur 100 ml.

### **Pengencer Kuning Telur**

Persiapan yang harus dilakukan dalam pembuatan pengencer kuning telur adalah sebagai berikut :

- 1) Satu butir telur ayam yang masih segar dibersihkan dengan air kran. Bilas menggunakan kapas yang dibasahi alkohol 70 %

- 2) Telur tersebut kemudian dipecahkan dengan jalan memotong kulitnya menjadi dua bagian. Tahan kuning telurnya pada salah satu potongan sedangkan putih telurnya 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.
- 3) Satu lembar kertas saring ukuran 12 x 10 cm disediakan untuk mengangkat sisa-sisa putih telur yang melengket pada kuning telur. Kuning telur tersebut dituangkan pada lembaran kertas saring, kemudian diguling-gulingkan agar albumen yang masih menempel pada kuning telur terserap kertas saring.
- 4) Disiapkan gelas ukur 50 ml, kemudian kuning telur ditusuk menggunakan scalpel steril dan tuangkan isinya ke dalam gelas ukur. Dijaga jangan sampai lapisan pembungkus kuning telur (*membrane vitellin*) tercampur dengan jalan menahan selaput tersebut dengan scalpel.
- 5) Disiapkan larutan ekstrak air tebu tiap praksi dalam gelas ukur 100 ml yang telah ditambahkan akuabides.
- 6) Sebanyak 20 ml kuning telur ditungkan ke dalam larutan kemudian diaduk pelan-pelan menggunakan batang pengaduk gelas sampai homogen.
- 7) Tambahkan 1000 µg/ml Penisilin dan Streptomisin ke dalam larutan ekstrak air tebu dengan kuning telur.
- 8) Kemudian dihomogenkan dengan magnetik stirer selama 15 menit.

- 9) Mulut gelas ukur ditutup menggunakan aluminium foil dan disimpan dalam pendingin bersuhu 3-5° C yang berfungsi untuk menurunkan partikel-partikel besar dari bahan pengencer yang tidak digunakan.
- 10) Pisahkan hasil endapan dari larutan dengan cara menghisap cairan diatas endapan dengan menggunakan selang dengan ditempatkan ke dalam gelas ukur 100 ml.
- 11) Terakhir mulut glass ukur ditutup lagi menggunakan aluminium foil. Larutan kuning telur dalam pengencer ekstrak air tebu kemudian diletakan dalam *water bath* bersuhu 33<sup>0</sup>C, larutan siap untuk digunakan.

## 2.6. Kadar Pengenceran

Perhitungan volume pengencer semen segar mengikuti tata cara yang dilaksanakan Shukla (2011) dengan langkah sebagai berikut :

- 1) Diawali dengan pemeriksaan semen sampai diketahui :
  - Volume semen = 2.0 ml
  - Konsentrasi Sperma Total = 1000 x 10<sup>6</sup>/ml
  - Progresif Motilitas Sperma = 70%
- 2) Kandungan Sperma Motil per ml semenditentukan sebagai berikut :
  - Tiap kandungan ml semen =  $\frac{1000 \times 10^6 \times 70}{100} = 700 \times 10^6$  motil
  - Total volume semen segar =  $2 \times 700 \times 10^6 = 1400 \times 10^6$  motil.
  - progresif tiap dosis inseminasi yang diinginkan 40 × 10<sup>6</sup> ditentukan sebagai berikut (progresif motil / dosis inseminasi)=  $\frac{1400 \times 10^6}{40 \times 10^6} = 35$  ml
  - Selanjutnya untuk 0,25 ml dosis inseminasi yang digunakan dengan motilitas progresif 40 × 10<sup>6</sup> adalah 35 ml × 0,25 ml = 8,75 ml

- Total volume yang harus ditambahkan= total volume pengencer-total volume semen segar = 8,75 ml– 2 ml = 6,75 ml.

## **2.7. Tahap Pencampuran Semen**

Persiapan tahapan pencampuran bahan pengencer ekstrak air tebu dengan kuning telur yang harus dilakukan sebagai berikut :

- 1) Disiapkan larutan pengencer yang akan digunakan dengan volume yang sudah ditentukan berdasarkan perhitungan diatas.
- 2) Disiapkan gelas ukur 100 ml untuk tempat larutan untuk pencampuran semen segar dengan pengencer.
- 3) ditambahkan pengencer sedikit-demi kedalam gelas ukur yang telah berisi semen segar. Aduk perlahan-lahan dan hati-hati sampai homogen. Lakukan penambahan pengencer bertahap-tahap dalam selang waktu 30 menit pengencer sampai mencapai volume perhitungan.
- 4) Dilakukan pengamatan meliputi secara mikroskopis meliputi motilitas, livabilitas, dan abnormalitas spermatozoa pasca diencerkan.
- 5) Selanjutnya spermatozoa pasca pengencer disimpan pada suhu 5 °C atau selanjutnya dibekukan.

### **REFERENSI :**

- Bencharif. D., L. Amirat., M. Anton., E. Schmitt., S. Desherces., G. Delhomme., M.L. Langlois., P. Barriere., M. Larrat., and D. Tainturier. 2008. The advantages of LDL (*Low Density Lipoprotein*) in the cryoservation of canien semen. *Theriogenology*. 70 : 1478-1488.
- Erwinda, M. D., and Wahono. H. S. 2014. The Effect of lime concentration additiaon and cane juice ph value on brown sugar quality. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2 (3) :54-64.

- Jiang, Z.L., W.L. Qing, Y.L. Wen, H.H. Jian, W.Z. Hong and S.Z. Shu. 2007. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing- thawing boar sperm by neutral comet assay. *J. Anim. Repro. Sci.***99**: 401–407.
- Junior, A.S. V., C.D. Corcini., R.R. Ulguim., M.V.F. Alvarenga, I. Bianchi., M.N. Corrêa., T. Lucia Jr., J.C. Deschamps. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Animal Reproduction Science.***115**: 323–327
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh variasi nira tebu (*saccharum officinarum*) dari beberapa varietas tebu dengan penambahan sumber nitrogen (n) dari tepung kedelai hitam (*glycine soja*) sebagai substrat terhadap efisiensi fermentasi etanol. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. (Skripsi Sarjana S1).
- Langenkamper, G., R.W.M. Fung, R.D. Newcomb, R.G. Atkinson, R.C. Gardner, and E.A. MacRae. 2002. Sucrose phosphate genes in plant belong to three different families. *J. Mol. Evol.* **54**: 322-332.
- Lesthari A.P. 2006. Pengaruh Waktu Tunda Giling Tebu dan Penambahan Natrium Metabisulfit Terhadap Mutu Gula Merah Tebu. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor. (Skripsi Sarjana S1).
- Moussa, M., V. Marinet., A. Trimeche., D. Tainturier., and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extract from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.***57**: 1695–1706.
- Munoz, O. V., L. A. Briand., T. Diaz., L. V. Squez., E. Schmidt., S. Desherces., M. Anton., D. Bencharif., and D. Tainturier. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (ldl) extender: comparison to triladyl1 and bioxcell. *Theriogenology.***71**: 895–900.
- Rizal, M., Herdis, Yulnawati, dan H. Maheshwari. 2007. Peningkatan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang dikriopreservasi dengan beberapa konsentrasi sukrosa. *Jurnal Veteriner.* Hal : 188-193.
- Rose, S. and F.C. Botha. 2000. Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane internodal tissues. *Plant Physiol. Biochem.* **38** :819-824
- Salisbury, G. W. dan N. L. VanDemark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. (Diterjemahkan oleh R. Djanuar).

Shukla, M.K. 2011. *Applied Veterinary Andrology and Frozen Semen Technology*. Pitam Pura. New Delhi India.

Toelihere, M. R. 1985. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa, Bandung.

Yukamgo, E dan N. W. Yuwono. 2007. Peran silikon sebagai unsur bermanfaat pada tanaman tebu. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*. **3** (1) : 1-51.

## **BAB III**

### **PENGAWETAN SEMEN**

#### **3.1. Pengawetan Semen**

Pengetahuan tentang pengenceran dan preservasi semen sangat penting dalam proses IB, sebab semen yang tidak diencerkan dan dipreservasi pada suhu kamar harus digunakan dalam waktu tidak lebih dari dua jam sesudah penampungan. Bahan pengencer yang baik adalah murah, sederhana, praktis dibuat dan memiliki daya preservasi yang tinggi. Jenis pengencer yang biasa digunakan adalah pengencer yang bersifat kimiawi sintetik dan mengandung unsur-unsur yang berfungsi sebagai sumber energi, penyangga (*buffer*), mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, melindungi terhadap pengaruh buruk kejutan dingin (*cold shock*), mencegah pertumbuhan kuman dan memperbanyak volume.

Secara umum bahan pengencer terdiri atas tiga bagian, yaitu bahan dasar, seperti kuning telur, air kelapa, air susu, bahan penyanggah, seperti natrium kalium bikarbonat, asam sitrat, tris dan bahan tambahan, seperti gliserol dan antibiotika. Fungsi bahan pengencer ialah merupakan sumber energi, melindungi sperma terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat, mencegah pengaruh yang merugikan seperti perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume semen sehingga dapat digunakan untuk inseminasi dan memproteksi sel spermatozoa selama pembekuan (Hafez 2000).



Beberapa jenis bahan pengencer yang sering digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia antara lain ialah glukosa, laktosa, sakarosa, sitrat, susu skim, dan tris. Glukosa, laktosa, dan sakarosa merupakan sumber energi sehingga spermatozoa tetap bertahan hidup selama proses pembekuan. Sitrat berperan sebagai komponen penyangga sehingga dapat mempertahankan pH semen secara fisiologi. Susu skim memiliki kelebihan sebagai media isotonik dan antikejutuan dingin karena banyak mengandung komponen yang menguntungkan untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. Tris memiliki kelebihan sebagai pengencer karena memiliki kapasitas penyangga yang baik dan mampu mempertahankan tekanan osmotik karena mengandung garam-garam dan asam amino.

Gula baik monosakarida, disakarida maupun polisakarida dapat berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa dan dapat digunakan sebagai krioprotektan ekstraseluler yang berperan dalam melindungi spermatozoa selama proses pembekuan. Fungsi gula dalam larutan pengencer adalah sebagai sumber energi bagi spermatozoa selama inkubasi, mempertahankan tekanan osmosis larutan pengencer dan bertindak sebagai krioprotektan pada proses pembuatan semen beku. Bahan pengencer yang digunakan untuk tujuan penyimpanan spermatozoa, baik dalam bentuk cair maupun beku, memegang peranan penting dalam upaya mempertahankan kualitas spermatozoa selama masa penyimpanan.

Bahan pengencer yang digunakan dalam pembekuan semen bervariasi di antara spesies hewan mamalia. Semen sapi lebih cocok menggunakan pengencer dasar susu skim (Vishwanath dan Shannon, 2000), sedangkan untuk semen kerbau

lebih cocok menggunakan laktosa karena menghasilkan persentase motilitas spermatozoa sesudah pencairan kembali lebih tinggi (65,7%) dibandingkan Tris (60,2%) dan susu skim (54,4%) (Situmorang 1993). Penggunaan susu skim sebagai pengencer dasar dalam proses pembekuan semen domba ternyata menghasilkan angka pembuahan yang lebih tinggi (50,7%) pada saat IB dibandingkan sitrat (32%), laktosa (46%), Tris (37,9%), rafinosa (35,3%), dan sakarosa (40,7%) (Salamon dan Maxwell, 1995). Pada semen kambing justru pengencer dasar Tris lebih mempertahankan viabilitas spermatozoa sesudah pencairan kembali (persentase motilitas 62,5%) dibandingkan susu skim (persentase motilitas 48 %) (Sahni dan Tiwari, 1992).

### **3.2. Semen Cair**

Selain teknologi semen beku, dapat pula digunakan teknologi alternatif, yaitu teknologi semen cair yang dapat digunakan secara langsung untuk perkawinan sapi, baik untuk skala industri maupun pada peternakan rakyat. Hasil penelitian pembuatan bahan pengencer semen menunjukkan bahwa biaya bahan diluter semen cair lebih murah dari pada semen beku (Rasyid *et al.*, 2002); bahan diluter juga dapat menentukan kualitas spermatozoa dan tingkat fertilitas sapi terutama dalam proses pembuatan semen cair atau beku (Hendri *et al.*, 1999). Tingkat kebuntingan pada penggunaan semen dingin/cair (54,3%) yang lebih tinggi dari pada semen beku (45,5%) (Situmorang, 2002).

### 3.3. Semen Beku

Pembekuan adalah suatu proses untuk menghentikan aktifitas sperma agar daya hidup sperma dapat diperpanjang sampai batas waktu yang lama. Apabila suatu larutan dibekukan maka pelarut air membeku menjadi kristal es dan bahan terlarut tidak bersatu dengan kristal tersebut melainkan berakumulasi dan makin pekat. Ada dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin (*cold-shock*) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es. Selain itu ada beberapa faktor tambahan, yaitu peroksidasi lipid dan faktor antibeku pada plasma semen seperti egg-yolk coagulating enzyme, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas.

Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel spermatozoa menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson 2000). Pengaruh yang ditimbulkan pada sel spermatozoa akibat pembentukan kristal es ialah penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa, peningkatan pengeluaran enzim intraseluler ke luar sel, dan kerusakan pada berbagai organel seperti lisosom dan mitokondria (Dhami dan Sahni, 1993). Lisosom yang pecah akan mengeluarkan asam hidrokortase sehingga akan mencerna bagian sel yang lain, sedangkan mitokondria yang rusak

akan menyebabkan putus rantai oksidasi. Akibatnya, pergerakan spermatozoa terhenti karena tidak ada lagi pasokan energi dari organel mitokondria yang berfungsi merangsang fungsi mikrotubula. Hal tersebut akan mengakibatkan spermatozoa tidak dapat bergerak secara bebas atau bersifat motil progresif.

Kejut dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak pada suhu tubuh sampai di bawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Fenomena kejut dingin pada sel belum diketahui secara jelas, akan tetapi kemungkinan berkaitan dengan tahap transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya tahap pemisahan dan penurunan sifat-sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologi sel hidup (Watson, 1995). Tingkat sensitivitas sel terhadap kejut dingin dipengaruhi oleh tingkat pendinginan dan interval suhu (Watson, 2000).

Mencegah kejut dingin dan pembentukan Kristal es sampai kelapisan membran sperma ditambahkan senyawa krioprotektan dalam pengencer. Krioprotektan ialah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Berdasarkan sifat kimia dan daya permeabilitas membran maka krioprotektan dibagi atas dua kelompok, yaitu krioprotektan intraseluler, dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul kecil sehingga bersifat permeabel (contoh: gliserol, etilen glikol, propanadiol), dan krioprotektan ekstraseluler, tidak dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul besar sehingga

bersifat nonpermeatif (contoh: protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, susu) (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Krioprotektan yang paling banyak digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia yaitu gliserol. Gliserol mampu mengikat air yang cukup kuat karena adanya tiga gugus hidroksil yang dimilikinya. Gliserol dapat berdifusi ke dalam sel lebih cepat, mampu mengubah kristal es yang berukuran besar dan tajam, dan melenturkan membran sel sehingga tidak mudah rapuh (Supriatna dan Pasaribu 1992). Cara penambahan gliserol tersebut harus secara bertahap dan berselang selama satu jam. Penambahan gliserol kedalam bahan pengencer sangat penting untuk proses pembekuan semen sebab penambahan gliserol dapat menyebabkan kenaikan daya hidup sperma dalam penyimpanan diatas titik beku.

Mekanisme pergerakan gliserol ke dalam sel spermatozoa belum diketahui secara pasti, tetapi kemungkinan melalui cara difusi sehingga dapat menembus dan memasuki sel spermatozoa yang digunakan spermatozoa untuk aktivitas metabolisme oksidatif. Selain itu, gliserol dapat menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit elektrolit sehingga menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya merusaknya terhadap spermatozoa dengan jalan memodifikasi kristal es yang terbentuk (Toelihere, 1985). Di dalam membran plasma, krioprotektan ini akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengatasi ketidakstabilan membran serta berinteraksi dengan membrane untuk mengikat protein dan glikoprotein sehingga menyebabkan partikel-partikel intramembran terkumpul (Park dan Graham, 1992).

Walaupun gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa, namun dapat juga merusak struktur spermatozoa selama proses pembekuan semen, menyebabkan kejutan osmotik, dan menurunkan nilai antibiotika dalam pengencer semen, serta menurunkan volume sel sperma sebanyak setengah dari volume larutan isotonik sesudah pencairan kembali. Oleh karena itu, kandungan gliserol di dalam pengencer semen bergantung pada metode pendinginan/pembekuan, komposisi pengencer, dan cara penambahan.

Dosis gliserol dalam pengencer semen bervariasi di antara jenis ternak. Dosis optimum gliserol dalam pengencer semen sapi sebesar 7% (Viswanath & Shannon 2000), semen kerbau 6% (Kumar *et al.*, 1992) dan semen kambing 6-8% (Sinha *et al.*, 1992, Das dan Rajkonwar, 1994, Tambing *et al.*, 2000).

Kriopreservasi sel spermatozoa merupakan upaya menyimpan sel spermatozoa dalam keadaan beku sehingga dapat dimanfaatkan setiap saat bila dibutuhkan dan digunakan dalam mendukung penerapan teknologi inseminasi buatan pada ternak. Oleh karena penyimpanannya dalam wadah yang mengandung nitrogen cair (suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ ) akan menyebabkan terjadi perubahan fisiologi, biologi, dan morfologi dari sel spermatozoa. Untuk meminimumkan pengaruh yang merugikan terhadap sel spermatozoa selama proses kriopreservasi, beberapa hal yang perlu diperhatikan yaitu: media pengencer, jenis dan dosis krioprotektan, jenis dan dosis antioksidan, dosis kuning telur, dan pencegahan faktor antibeku yang terdapat pada plasma semen. Dengan memperhatikan faktor-faktor tersebut diharapkan fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi tetap berjalan, dan pada akhirnya viabilitas sel spermatozoa dapat dipertahankan.

### **3.4. Penyimpanan Semen Beku**

Batas suhu terendah untuk penyimpanan semen sapi adalah pada suhu -196°C. bahan yang digunakan untuk membekukan semen tersebut adalah N<sub>2</sub> cair (Salisbury dan Van Demark, 1985). Straw yang telah terisi oleh semen dibekukan didalam mesin yang diatur penurunan suhunya oleh uap nitrogen cair dan apabila suhu -80°C sudah dicapai, semen didinginkan lebih cepat lagi sehingga mencapai suhu -196°C. pembekuan dapat pula dilakukan dengan menempatkan ampul-ampul didalam uap nitrogen cair.

Penyimpanan semen beku pada suhu beku ditujukan agar semen tersebut dapat digunakan secara optimal sebagai sarana pembuahan atau sebagai sarana untuk mempertahankan daya fertilisasi dengan jalan menghambat seminimal mungkin secara fisik dan kimiawi semua aktifitas yang penting dalam spermatozoa, sehingga proses metabolisme yang terjadi dapat dikurangi (Hardjoprاندjoto, 1991).

Penyimpanan dan pengangkutan semen beku ditempatkan pada beberapa cangkingan atau canister dan disimpan dalam bejana atau container yang berisi nitrogen cair. Bentuk straw dan pellet dapat pula ditempatkan dahulu kedalam tabung plastik pendek (goblet) sebelum ditaruh didalam canister. Container yang mengandung semen yang baik dalam bentuk ampul, straw, atau pellet, harus selalu mengandung nitrogen (Toelihere, 1985).

### **3.5. Metode Pembuatan Semen Beku**

Setelah dilakukan pengenceran semen dilanjutkan dengan penyimpanan di suhu 3-5°C selama 18-20 jam dan kemudian di tambahkan larutan tambahan gliserol. Gliserol berfungsi sebagai krioprotektan intraseluler untuk melindungi sperma selama proses pembekuan. Adanya gliserol yang berfungsi sebagai agen protektif akan menjaga keseimbangan konsentrasi fisiologik intra dan ekstraseluler dan tudung akrosom akan tetap utuh.

Gliserol akan berinteraksi dengan membran plasma. Sehingga akan mengurangi kerusakan dari membran plasma dan tudung akrosom. Pada saat terjadi perubahan struktur dari relatif cair ke padat selama pembekuan atau yang lebih penting lagi pada saat pencairan kembali. Kombinasi pemberian krioprotektan ekstraseluler dan intraseluler mendapatkan hasil yang terbaik dibandingkan dengan pemberian tunggal kedua komponen tersebut. Komponen dasar pengenceran menggunakan kombinasi *egg yolk* sebagai krioprotektan ekstraseluler dan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler sebesar 6-7%.

### **3.6. Evaluasi Semen Setelah Dibekukan**

#### **Pemeriksaan *before freezing***

*Before freezing* merupakan tahapan evaluasi spermatozoa kedua yang dilakukan setelah evaluasi pertama pada tahap semen segar. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui motilitas spermatozoa sebelum dilakukan proses *freezing*. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil sperma dari masing-masing bull menggunakan objek glass yang kemudian diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 200x. Standart minimal motilitas spermatozoa



adalah  $\geq 55\%$ . Apabila terdapat semen dengan motilitas  $< 55\%$  maka akan diafkir dan dilakukan evaluasi pada pemeliharaan, proses penampungan dan produksi. Setelah dilakukan pemeriksaan dilanjutkan dengan diproses pada proses straw printing.

### **Straw Printing**

Straw merupakan media penyimpanan semen beku yang diproduksi BBIB. Straw dapat menyimpan semen beku hingga volume 0,25 ml yang berisi sel spermatozoa berjumlah  $25 \times 10^6$  sel. Sebelum tahap filling and sealing, straw perlu dicetak dengan automatic printing. Automatic printing ini memiliki fungsi untuk mencetak label straw meliputi kode tahun pembuatan (code batch), nama pejantan, kode pejantan, nama bangsa pejantan dan pabrik yang mengeluarkan semen beku pejantan (produsen). Setelah proses printing, straw disterilisasi di dalam lemari UV selama 15 menit. Straw yang sudah steril di masukkan ke dalam *cool top* selama 5-10 menit sebelum dilakukan proses *filling* dan *sealing*.

Tabel 3.1. Penggolongan Straw Sesuai Bangsa

Jernis Ternak/Bangsa	Warna Straw	Kode pejantan
1. SAPI POTONG	Merah	01
Bali	Hijau Muda	16
Madura	Biru Tua	04
Brahma	Biru Muda	02
Ongole	Putih Transparan	06
Simmental	Merah Muda / Pink	08
Limousin	Hijau Tua	14
Brangus	Salem	17
Angus	Cokelat Tua	05
Hereford	Kuning	07

Charolies	Cokelat Muda	12
Drough Master	Jingga	10
Belmomd Red	Hijau Pupus	09
Santa Gertrudis		
2. SAPI PERAH	Abu - abu	03
FH	Abu-abu	3
FH Hongaria	Merah Anggur	
Taurindicus	Hitam	
Australian MZ		
3. KERBAU	Ungu/violet	13
4. KAMBING PE	Kuning Hitam	
5. DOMBA	Kuning	

### **Filling dan Sealing**

*Filling dan sealing* adalah proses pengisian semen yang telah dicampur dengan bahan pengencer ke dalam straw dengan menggunakan mesin otomatis filling dan sealing. Mesin akan secara otomatis memasukkan semen cair sebanyak 0,25 cc ke dalam straw dan menutup ujung straw dengan sumbat lab (laboratorium plug). Pada proses ini hal yang pertama kali dilakukan adalah memasang jarum penghisap (*neddle*) yang sudah terpasang dengan *flexible* rubber tube ke kompressor penghisap, kemudian straw diletakkan pada kompartemen tempat straw yang kemudian akan disusu oleh mesin untujarum pengisi (*neddle*) dan kemudian akan diisi dengan semen yang disalurkan melalui corong tempat semen (*dispossable typer dish for semen*).

### **Pre freezing dan freezing**

*Pre-freezing* merupakan suatu tahapan penurunan suhu straw yang sudah berisi semen dari suhu 4°C hingga -140°C secara bertahap dengan menggunakan

uap dari nitrogen cair dalam mesin *digitcool* selama 7 menit. Selama proses *Pre-freezing* kipas yang terdapat didalam mesin berputar untuk menyebarkan uap gas nitrogen cair hingga memenuhi seluruh kompartemen. Sperma memiliki *critical point* yang harus dengan cepat dilewati agar angka kematian sperma dapat diminimalisir. Pada suhu 5 sampai dengan  $-100^{\circ}\text{C}$  harus dilewati dengan cepat, karena pada *range* tersebut merupakan *critical point* sperma. Setelah proses *Pre-freezing* selesai, kemudian dilanjutkan dengan proses *freezing* semen yang dilakukan pada nitrogen cair.

Straw yang telah berisi semen yang sudah di *Pre-freezing* diletakkan pada goblet-goblet untuk kemudian direndam pada kontainer berisi nitrogen cair selama 9menit. Pada proses perendaman inilah terjadi proses *freezing* semen sampai dengan suhu  $-195^{\circ}\text{C}$ .Apabila terdapat straw yang mengambang pada saat proses perendaman, hal tersebut menandakan bahwa straw tersebut tidak berisi semen dan harus di afkir.

### **Penyimpanan dan Pengujian *Post Thawing Motility***

*Post Thawing Motility* (PTM) bertujuan untuk mengetahui motilitas spermatozoa setelah dibekukan dan diencerkan kembali. Pemeriksaan PTM dilakukan setelah 24-48 jam pasca proses *freezing* dan sebelum dilakukannya pendistribusian kepada konsumen sebagai uji mutu. Sampel yang dipakai yaitu 2 straw semen beku pada masing-masing pejantan. Presentase motilitas spermatozoa yang dipakai adalah  $\geq 40\%$  apabila persentase motilitas spermatozoa  $< 40\%$  maka akan segera dilakukan pengafkiran dan segera dicari titik kesalahannya. Straw yang diafkir didata dan dilakukan pemusnahan.

## **Pemeriksaan Kualitas Semen Beku**

Pemeriksaan semen beku bertujuan untuk menjaga dan mengetahui kualitas semen beku yang diproduksi sebelum didistribusikan atau dijual. Pemeriksaan dilakukan pada esok harinya setelah proses pembekuan atau *freezing* dengan mengambil 2 sampai 3 dosis dari masing-masing pejantan. Pemeriksaan dilakukan untuk menilai persentase hidup dan gerakan spermatozoa dengan menggunakan mikroskop. Sebelum melakukan pemeriksaan pada mikroskop diawali dengan proses *thawing*, yaitu pencairan kembali semen beku dengan cara merendam straw semen beku dalam air hangat pada suhu 37°C selama  $\pm 15$  detik. Suhu semen yang tidak konstan dapat menyebabkan sperma mati. Semen beku yang sudah di-*thawing* tidak dapat disimpan kembali, apabila semen telah di-*thawing* diperiksa dibawah mikroskop untuk mengetahui gerakan dan jumlah sperma yang akan digunakan untuk IB, serta untuk mengetahui ketahanan sperma didalam alat reproduksi betina. Karena selama pergerakan motil spermatozoa didalam saluran reproduksi betina sperma akan mengalami perubahan fisiologi untuk mempertinggi daya fertilitasnya. Proses tersebut disebut kapasitasasi. Kapasitas diperlukan karena terdapat indikasi bahwa perubahan akrosom terjadi lebih awal sebelum sperma memasuki ovum melalui zona pellucida yang berlangsung selama 4–6 jam. Untuk menjaga kualitas semen beku di Balai Inseminasi Buatan Pemeriksaan semen beku melalui 2 tahap yaitu : 1). *test after thawing*; 2) *test water incubator*.

## **RERERENSI :**

- Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. 2014. Petunjuk Teknis Preservasi Semen Beku. Malang.
- Das, K. K. dan C. K. Rajkonwar. 1994. Morphological of acrosome during equilibration and after freezing of buck semen with raffinosa egg yolk glycerol extenders. *Indian Vet J.* 71:1098-1102.
- Dhami, A. J. dan K. L. Sahni. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluent for effect on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of Taurine bull spermatozoa. *Theriogenology* 40:1269-1280.
- Gazali, M dan S. N. Tambing. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati.* 9 (1) : 27-32.
- Hafez E. S. E. 2000. *Reproduction In Farm Animals.* Edisi VII. USA: Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Hendri, Jaswadi, dan M. Mundana. 1999. Pengaruh pembekuan spermatozoa, penambahan caffeine dan heparin dalam media Brockett–Oliphant terhadap angka fertlisasi in Vitro pada sapi. *J. Penelitian Andalas.* 11 (29): 34–47.
- Kumar, S., K. L. Sahni, G. Mohan. 1992. Effect of different glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.*(2):151-156.
- Minitub. 2001. *Certificate Andromed.* Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- Parks, J. E, and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.
- Rasyid, A., L. Affandhy, P. Situmorang, D.B. Wijono, T. Sugiarti, dan Y.N. Aggraeni. 2002. Evaluasi kualitas dan pengolahan semen pada sapi potong. Laporan Loka Penelitian Sapi Potong, Grati.
- Sahni, K. L. dan S. B. Tiwari. 1992. Caprine semen evaluation, processing and artificial insemination in India. Di dalam: *Research on Goats Indian Experience.* Makhdoom-Mathura: Central Institute for Research on Goat. hlm 94-107.
- Salamon, S dan W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I: Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37:185-249.

- Sinha, S., B. C. Deka, M. K. Tamulu, B. N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender on quality of frozen goat semen. *Indian Vet J.* 69:1107-1110.
- Situmorang, P. 2002. Pengaruh kolesterol terhadap daya hidup dan fertilitas spermatozoa sapi. *JITV* 7 (4): 251–258.
- Situmorang P. 1993. Daya hidup spermatozoa kerbau sungai, kerbau lumpur dan persilangannya setelah dibekukan pada nitrogen cair. *Ilmu dan Peternakan* 6:6-10.
- Supriatna, I dan F.H. Pasaribu. 1992. *In Vitro Fertilization, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Tambing, S. N., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf, I. K. Utama. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *JITV* 5:84-91.
- Toelihere, M. R. 1985. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- Viswanath, R. dan P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-53.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.
- Watson, P.F. 1995. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7 : 871-891.
- Yukamgo, E dan N. W. Yuwono. 2007. Peran silikon sebagai unsur bermanfaat pada tanaman tebu. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan.* 3 (1) : 1-51.

## **BAB IV SINKRONISASI**

### **4.1. Prinsip Sinkronisasi**

Sinkronisasi berahi merupakan suatu cara untuk menimbulkan gejala berahi secara bersama-sama, atau dalam selang waktu yang pendek dan dapat diramalkan pada sekelompok hewan. Tujuan sinkronisasi berahi adalah untuk memanipulir proses reproduksi, sehingga hewan akan terinduksi berahi proses ovulasinya, dapat diinseminasi serentak dan dengan hasil fertilitas yang normal (Putro, 1991). Toelihere (1985) menyatakan bahwa pengendalian estrus yang dilakukan pada sekelompok ternak betina sehat dengan memanipulasi mekanisme hormonal disebut dengan sinkronisasi. Sinkronisasi akan memunculkan estrus yang sama, sehingga ovulasi dapat terjadi pada hari yang sama atau dalam kurun waktu 2 atau 3 hari setelah perlakuan dilepas. Sinkronisasi akan menghasilkan inseminasi Buatan atau kawin yang serentak.

Penggunaan teknik sinkronisasi berahi akan mampu meningkatkan efisiensi produksi dan reproduksi kelompok ternak. Sinkronisasi digunakan untuk mengoptimalisasi pelaksanaan inseminasi buatan dan meningkatkan fertilitas kelompok (Wenkoff, 1986).

### **4.2. Teknik Sinkronisasi**

Pada prinsipnya sinkronisasi bisa dilakukan karena dalam siklus estrus ada dua fase yaitu fase folikuler dan fase luteal yang sangat berbeda secara hormonal. Fase luteal memerlukan waktu yang lebih panjang dari pada fase folikuler. Terdapat dua cara sinkronisasi berahi, yang pertama dengan melisiskan CL

(*corpus luteum*) atau memperpendek fase luteal. Proses ini menggunakan Preparat:  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (prostaglandin) atau analognya yaitu Cloprostenol. Yang kedua adalah substitusi fungsi *corpus luteum* (CL) atau memperpanjang fase luteal. Proses ini menggunakan preparat progesteron ( $\text{P}_4$ ). Progesteron diberikan selama 14-21 hari (tergantung spesies). Metode pemberian Progesteron dapat berupa orally, pessaries, ear implant and intravaginal devices. Kedua proses tersebut akan menyebabkan Lisisnya *corpus luteum* yang diikuti dengan pembebasan hormon gonadotrophin yang menyebabkan berahi dan timbulnya proses ovulasinya (Peters, 1986).

Substitusi *corpus luteum* dengan pemberian progesteron eksogen akan menyebabkan penekanan pembebasan hormon gonadotrophin dari pituitari anterior. Penghentian pemberian progesteron eksogen ini akan diikuti dengan pembebasan hormon gonadotrophin secara tiba-tiba yang berakibat terjadinya berahi dan ovulasi serentak (Wenkoff, 1986).

### **Sinkronisasi menggunakan Progesteron**

Sinkronisasi menggunakan Progesteron dapat dilakukan dengan bentuk :

1. Penyuntikan Progesteron
  - a. Ismaya (1998) menyatakan bahwa Penyuntikan dapat dilakukan selama 18-20 hari dengan dosis 50mg/hari. Kelemahan prosedur ini adalah injeksi memerlukan waktu dan tenaga professional.
2. Pemberian Progesteron aktif per oral (mulut)



- a. Progesteron sintetik yang digunakan yaitu Melengestrol Asetat (MGA) dan Medroxiprogesteron (MPA).
  - b. Pemberian dilakukan lewat pakan selama 15-18 hari dan birahi terjadi 3-5 hari kemudian setelah penghentian perlakuan.
3. Pemberian Progesteron melalui Implan silastik
    - a. Implan silastik yang mengandung MGA ditanam dibawah kulit leher atau dibawah kulit luar telinga selama 22-64 hari
    - b. 36-72 jam setelah penghentian perlakuan terjadi birahi 64 % (Ismaya,1998).
4. Pemberian Progesteron Spons intravagina
    - a. Progesteron dimasukan ke vagina dengan memakai spons,diharapkan dapat menghasilkan estrus yang baik.
    - b. Pemasangan spons selama 18-21 hari dan birahi akan tampak 24-72 jam setelah pengambilan spons dari vagina.
    - c. Kelemahan: spons sering berubah tempat, kerusakan mukosa vagina dan serviks.
    - d. Progesteron releasing intra vagina device (PRID) adalah alat intravagina pelepas progesteron dengan speculum pada bagian vagina anterior (Ismaya, 1998).
    - e. Metode ini sering di kombinasikan dengan penyuntikan PMSG (750-2000 IU) sebelum dan sesudah pengeluaran spons. Hal ini ternyata dapat meningkatkan birahi dan fertilisasi (Ismaya,1998).

**Sinkronisasi Berahi dengan Prostaglandin.** Sinkronisasi berahi pada kerbau dan sapi, paling umum menggunakan prostaglandin atau senyawa analognya. Dengan tersedianya prostaglandin di pasaran, memungkinkan pelaksanaan sinkronisasi berahi di lapangan. Beberapa senyawa prostaglandin yang tersedia antara lain;

- 1) Reprodin (*Luprostiol*, Bayer, dosis 15 mg)
- 2) Prosolvin (*Luprostiol*, Intervet, dosis 15 mg)
- 3) Estrumate (*Cloprostenol*, ICI, dosis 500 µg)
- 4) Lutalyse (*Dinoprost*, Up John, dosis 25 mg)

Cara standar sinkronisasi berahi meliputi dua kali penyuntikan prostaglandin dengan selang 10–12 hari. Berahi akan terjadi dalam waktu 72-96 jam setelah penyuntikan kedua. Pelaksanaan inseminasi dilakukan 12 jam setelah kelihatan berahi, atau sekali pada 80 jam setelah penyuntikan kedua (Elmore, 1989). Sinkronisasi berahi dengan prostaglandin hanya akan berhasil pada kerbau dan sapi yang memiliki siklus berahi normal dan tidak akan meningkatkan angka konsepsi melebihi inseminasi pada berahi alam. Angka konsepsi dari inseminasi pertama dengan sinkronisasi berahi pada kerbau tidak setinggi pada sapi, tetapi hanya berkisar antara 30-40% (Rajamahendran & Thamotheeram, 1988 ; Shah *et al.*, 1989).

Prostaglandin merupakan salah satu hormon yang mempunyai sifat luteolitik dan telah berhasil dengan baik digunakan untuk penyerentakan berahi (Toelihere, 1981). Prostaglandin pertama kali ditemukan dalam semen manusia

yang dihasilkan oleh kelenjer prostat (Heath dan Olusanya, 1985). Dalam tubuh hewan, biosintesis prostaglandin terjadi dalam membrane sel sebagai hasil rangsangan yang mengaktifkan enzim fosfolifase, sehingga menyebabkan fosfolipid melepaskan precursor prostaglandin spesifik di dalam jaringan (Frandsen, 1996). Prostaglandin termasuk golongan lemak aktif dan merupakan asam hidroksil tidak jenuh yang terdiri dari 20 atom karbon. Asam arakhidonat adalah asam esensial yang merupakan precursor dari prostaglandin yang berhubungan erat dengan produksinya (Hafez, 1993). Secara alami prostaglandin dihasilkan oleh endometrium (Hafez, 2000).

Prostaglandin mempunyai bermacam-macam fungsi dan aktivitas yang luas antara lain untuk penyerentakan berahi, mengobati korpus luteum persisten, kawin berulang, anestrus dan sub estrus (Setiawan, 1985). Kadar prostaglandin yang tinggi menyebabkan regresi korpus luteum dan pengurangan sekresi progesterone (Turner dan Bagnara, 1988). Penggunaan prostaglandin terutama  $PGF_{2\alpha}$  secara luas sudah banyak digunakan pada sapi, kerbau, babi, kambing dan domba untuk mengatur dan penyerentakan berahi (Toelihere, 1981).

Prinsip dasar penyerentakan berahi dengan menggunakan  $PGF_{2\alpha}$  adalah memperpendek daya hidup korpus luteum. Hal ini berdasarkan pertimbangan bahwa pada saat tersebut baik ternak yang estrus maupun yang tidak estrus, pada penyuntikan pertama telah berada pada pertengahan fase luteal (Partodihardjo, 1982).

Siregar *et al.* (2001) melaporkan pemberian preparat PGF<sub>2α</sub> (*Estroplan*) secara IVSM pada kambing lokal dengan dosis 31,25 µg yaitu seperempat kali dosis pemberian secara intramuscular dan mendapatkan persentase berahi dan angka kebuntingan 100%. Hormon ini juga diberikan secara IVSM dan intravaginal pada sapi (Heinonen *et al.*, 1966), serta secara intrauterine pada kambing peranakan etawa (Gustari dkk., 1996). Diaz *et al.* (2001) melaporkan bahwa pemberian preparat PGF<sub>2α</sub> (*Cloprostenol*) secara IVSM yang diberikan pada kerbau di Brazil dengan dosis 250 µg dalam interval waktu 11 hari memperoleh angka kebuntingan 52,1%.

Penggunaan prostaglandin dapat memberikan respon pada kerbau pada hari ke-5 estrus. Lemahnya respon kerbau terhadap PGF<sub>2α</sub> kemungkinan disebabkan oleh condition body score (BCS) yang rendah, lambatnya pertumbuhan folikel (Nanda *et al.*, 2003). Selanjutnya El Beley *et al.* (1995) melaporkan bahwa pemberian 2 kali dengan selang 11 hari pada kerbau Brazil mendapat 77% berahi dan pemberian 1 kali hanya mendapatkan 25 % berahi. El-Wishy (2007) menambahkan bahwa pemberian 2 kali PGF<sub>2α</sub> dengan selang 11 hari pada kerbau murrah hanya mendapatkan 55.7% berahi. Berbagai alternative penggunaan PGF<sub>2α</sub> adalah dengan penyuntikan secara intramuskuler dan intravulvamukosa (Chohan, 1998).

### **Penggunaan GnRH**

Pemberian GnRH akan menghasilkan siklus berahi yang baik karena GnRH akan mempengaruhi aktivitas ovarium (Berber *et al.*, 2002; Baruselli *et al.*,

1994; Neglia *et al.*, 2003; Paul dan Prakash, 2005). Suntikan GnRH pada sapi dan kerbau akan menstimulasi FSH untuk merangsang perkembangan folikel dan merangsang pelepasan LH untuk ovulasi sampai terbentuk CL (Aboul-Ela El Karaby and Ches, 1983; Metwelly and El-Bawab, 1999). GnRH akan efektif merangsang pemasakan folikel (Rhodes *et al.*, 2003). Dosis GnRH yang tinggi akan menyebabkan ovulasi dan banyak terbentuk CL sedangkan dosis yang rendah menyebabkan luteolisis tanpa ovulasi (Noakes *et al.*, 2001)

Pemberian GnRH pada sapi dan kerbau pascapartum akan membantu involusi uterus dan mengurangi calving interval (Bostedt and Maurers, 1982). GnRH akan mempengaruhi pembentukan kembali siklus ovarium sehingga dapat memperpendek interval melahirkan dengan mempercepat munculnya estrus. Sehingga GnRH dapat diberikan untuk terapi pada ternak habis melahirkan yang kurang dari 40 hari (Backett and Lean, 1997). Untuk mempercepat berahi pertama setelah 14 hari postpartum pada musim dingin, Shah *et al.* (1990) memberikan dosis GnRH 250 g dan 100 g pada sapi.

Pemberian GnRH dapat memunculkan gelombang folikel baru pada sapi (Dirandeh *et al.*, 2009). Studi beberapa gelombang folikel pada sapi dengan pemberian GnRH sudah banyak dilakukan. Gelombang 2 folikel pada sapi dengan pemberian GnRH ditemukan oleh Rajamahendra dan Wilton, 1988; Ahmad *et al.*, 2001. Tiga gelombang folikel ditemukan oleh Sirois dan Fortune 1988; Savio *et al.*, 1988. Empat gelombang folikel dilaporkan oleh Rhodes *et al.*, 1995. Dan yang satu gelombang folikel ditemukan oleh Pierson and Ginther, 1987; Ginther *et al.*, 1989).

Penambahan GnRH selama siklus estrus akan menyebabkan folikel dominan regresi atau ovulasi dan muncul gelombang baru pertumbuhan folikel (Pursley *et al.*, 1995; Kohram *et al.*, 1998). Pemberian GnRH akan menghilangkan kawin berulang pada kerbau atau memperpendek calving interval, mempercepat pubertas atau dewasa kelamin dan dapat meningkatkan angka kebuntingan.

Metode penggunaan kombinasi GnRH dan PGF<sub>2α</sub> dapat memberikan 100 % estrus dan meningkatkan 100 % angka kebuntingan (Irrikura *et al.*, 2003). Metode sinkronisasi dengan menggunakan GnRH dan PGF<sub>2α</sub> telah digunakan Rao and Venkatramiah (1991). Selanjutnya Rao dan Venkatramiah (1991) melaporkan bahwa pemberian kombinasi GnRH dan PGF<sub>2α</sub> akan menghasilkan 37 % angka kebuntingan pada kerbau anestrus dan Baruselli *et al.* (1999) melaporkan metoda pemberian GnRH pada 0 days penelitian diikuti oleh pemberian PGF<sub>2α</sub> pada hari ke-7 setelah injeksi GnRH. Kemudian Pursley *et al.* (1995) menemukan teknik baru dalam IB tanpa menggunakan deteksi estrus yaitu dengan pemberian GnRH pada 0 days, PGF<sub>2α</sub> pada hari ke-7 dan GnRH lagi pada hari ke-2. 24 jam setelah itu langsung dilakukan AI.

#### **4.3. Manfaat dan Keuntungan Sinkronisasi Birahi**

Sinkronisasi atau induksi estrus adalah tindakan menimbulkan birahi, diikuti ovulasi fertil pada sekelompok atau individu ternak dengan tujuan utama untuk menghasilkan konsepsi atau kebuntingan. Sinkronisasi estrus biasanya menjadi satu paket dengan pelaksanaan IB, baik berdasarkan pengamatan birahi maupun IB terjadwal (*timed artificial insemination*). Angka konsepsi atau kebuntingan

yang optimum merupakan tujuan dari aplikasi sinkronisasi estrus ini. Manfaat dari tindakan sinkronisasi estrus pada ternak ada beberapa, antara lain:

1. Optimalisasi dan efisiensi pelaksanaan IB. Dengan teknik ini dimungkinkan pelaksanaan IB secara massal pada suatu waktu tertentu.
2. Mengatasi masalah kesulitan pengenalan birahi. *Subestrus* atau birahi tenang yang umum terjadi pada sapi perah dan potong di Indonesia dapat diatasi dengan teknik sinkronisasi estrus.
3. Mengatasi masalah reproduksi tertentu, misalnya *anestrus post partum* (anestrus pasca beranak).
4. Fasilitasi program perkawinan dini pasca beranak (*early post partum breeding*) pada sapi potong dan perah. Teknik ini dapat digunakan untuk mempercepat birahi kembali pasca beranak, pemendekkan *days open* (hari-hari kosong) dan pemendekkan jarak beranak.
5. Manajemen reproduksi resipien pada pelaksanaan transfer embrio sapi. Dalam program transfer embrio, embrio beku maupun segar (diambil dari sapi donor pada hari ke 7 setelah estrus) ditransfer ke resipien pada fase siklus estrus yang sama.

Dalam literatur lain menyebutkan manfaat sinkronisasi estrus yaitu :

1. Optimalisasi dan Efisiensi Pelaksanaan IB. Dengan teknik ini pelaksanaan IB dapat dilakukan secara massal. Kombinasi sinkronisasi estrus dan Inseminasi Buatan pada sapi bertujuan untuk meningkatkan mutu genetik, efisiensi pelaksanaan Inseminasi Buatan, adanya kelahiran pedet yang relatif sama umurnya dan meniadakan deteksi estrus.

2. Mengatasi Masalah Kesulitan Pengenalan Birahi. Subestrus atau birahi tenang yang umum terjadi pada sapi potong dapat diatasi dengan teknik sinkronisasi estrus.
3. Mengatasi Masalah Reproduksi tertentu, misalnya anestrus post partum (anestrus pasca beranak).
4. Fasilitasi Program Perkawinan Dini Pasca Beranak (early post partum breeding) pada sapi potong. Teknik ini dapat digunakan untuk mempercepat birahi kembali pasca beranak, memendekkan days open (hari-hari kosong) dan memendekkan jarak beranak.

**Beberapa Metode Sinkronisasi pada ternak :**

1. Pada Babi Bahan yang digunakan adalah bahan kimia bukan steroid yang diberikan melalui ransum selama 20 hari. Setelah itu pemberian dihentikan dan 5 hari setelah penghentian akan terjadi estrus secara serentak. Selain itu bisa juga digunakan PGF2 alpha melalui suntikan intra muskuler dengan dosis 8 mg/ekor, ini dilakukan pada hari ke 12 dari siklus berahi maka berahi akan muncul 1-3 hari kemudian.
2. Pada Domba Sinkronisasi pada domba dapat dilakukan dengan dua cara:
  - a. Pemberian progesterone dengan suntikan intra muskuler, intra vena, dan intravagina. Melalui intra vagina adalah dengan jalan mencelupkan spons yang telah berisi larutan progesterone dan dimasukkan ke dalam saluran reproduksi betina yang tidak bunting selama 14-19 hari. Spons ini berbentuk bulat panjang sebesar ibu jari dengan panjangnya sekitar 4 cm dan dibelakangnya diikat dengan tali nilon. 2 hari setelah



penarikan spons yang berisi progesterone dan diserap oleh vagina sehingga masuk keperedaran darah dan menekan kejadian berahi. Berahi akan terjadi 1-3 hari kemudian. Secara fisiologis, setelah penarikan spons maka suplai progesterone akan terhenti ini menyebabkan rangsangan pada hipofisis untuk mengeluarkan FSH dan LH, selanjutnya folikel akan tumbuh sampai taraf yang matang sehingga terjadilah estrus.

b. Pemberian PGF2 alpha. Secara umum dilakukan dengan suntikan intramuskuler dengan dosis 6-8 mg/ekor. Berahi akan muncul 1-3 hari kemudian.

3. Pada sapi sering digunakan PGF2 alpha yang berfungsi menghancurkan korpus luteum yang sedang berfungsi dan tidak efektif pada korpus luteum yang sedang tumbuh. Pada dasarnya korpus luteum tumbuh pada 0-5 hari setelah estrus dan pada hari 6-16 korpus luteum berfungsi.

Cara penyuntikan PGF2 alpha. a) Penyuntikan satu kali. Pada cara ini seekor betina yang tidak bunting disuntik dengan PGF2alpha, estrus akan terjadi 1-3 hari kemudian. Secara teori keberhasilan cara ini sekitar 75% karena diperkirakan 25% nya masih berada pada kondisi estrus sampai 5 hari setelah estrus. Untuk mendapatkan hasil 100% maka diperlukan penyuntikan kedua. b) Penyuntikan dua kali. Semua betina yang tidak bunting disuntik dengan PGF 2 alpha, kemudian penyuntikan diulangi lagi pada hari ke- sebelas (11). Berahi terjadi secara serentak 1-3

hari kemudian dan 100% berahi. Dosis PGF 2 alpha adalah 5 – 35 mg/ekor.

Salisbury (1985) menyatakan bahwa prostaglandin menyebabkan lisisnya korpus luteum, yang akan mempengaruhi siklus estrus yang sedang berlangsung. Lisisnya korpus luteum diikuti dengan penurunan progesteron yang dihasilkan, akibatnya terjadi pembebasan serentak GnRH dari hipotalamus, diikuti dengan pembebasan FSH dan LH dari pituitari anterior, sehingga terjadilah estrus dan ovulasi. Prostaglandin hanya efektif bila ada korpus luteum yang berkembang, antara hari 7 sampai 18 dari siklus estrus alami. Kemudian birahi akan muncul berkisar 24 jam, 48 jam atau 72 jam kemudian, semakin sapi tersebut bagus(sehat) maka semakin cepat pula terjadinya birahi. Bila hal ini dilakukan secara bersama-sama dalam satu kelompok ternak sapi, maka akan memunculkan birahi secara serentak. Setelah penyuntikan hormon Capriglandin sapi akan menunjukkan gejala birahi antara lain terlihat gelisah dan berusaha menaiki sapi lain, mengangkat ekor, mencium bagian belakang sapi lainnya, Vulvamembengkak, berwarna merah, keluar lendir berwarna bening, suka mendekati pejantan, diam ketika dinaiki pejantan dan terkadang nafsu makannya menurun. Keberhasilan tertinggi didapat jika inseminasi dilakukan 8-9 jam setelah birahi terlihat. Ketepatan pengamatan birahi akan menentukan ketepatan inseminasi. Produksi Bayer dengan dosis 1,25 ml/ekor secara intramuskuler.

## **BAB V. FERTILISASI *IN VITRO***

### **1. Pengertian Fertilisasi *in vitro***

Fertilisasi *in vitro* yang umum disingkat dengan IVF (*In Vitro Fertilization*, IVF) juga disebut dengan istilah “Bayi Tabung” pada manusia. Fertilisasi *in vitro* adalah proses memproduksi embrio dari oosit dengan pembuahan oleh semen dalam cawan petri. Sebagai salah satu keberhasilan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang reproduksi, IVF telah melalui proses percobaan penelitian yang panjang. Louise Brown adalah bayi pertama yang berhasil lahir dari proses IVF pada tahun 1978 dan kemudian di ikuti dengan keberhasilan pada ternak sapi pada tahun 1981 yang diberi nama Virgil. Keberhasilan ini merupakan langkah kemajuan bioteknologi reproduksi yang terus dikembangkan, dimana dari tahun 1978 hingga sekarang di Amerika Serikat saja diperkirakan lebih dari 100.000 bayi telah lahir menggunakan teknik ini.

### **2. Proses Fertilisasi *In Vitro***

Pada dasarnya, proses fertilisasi *in vitro* adalah mengambil oosit dari ovarium donor menggunakan peralatan yang disebut aspirasi folikel USG (Ultrasound Guide) lalu menempatkannya didalam incubator hingga dewasa dan dibuahi pada hari berikutnya.

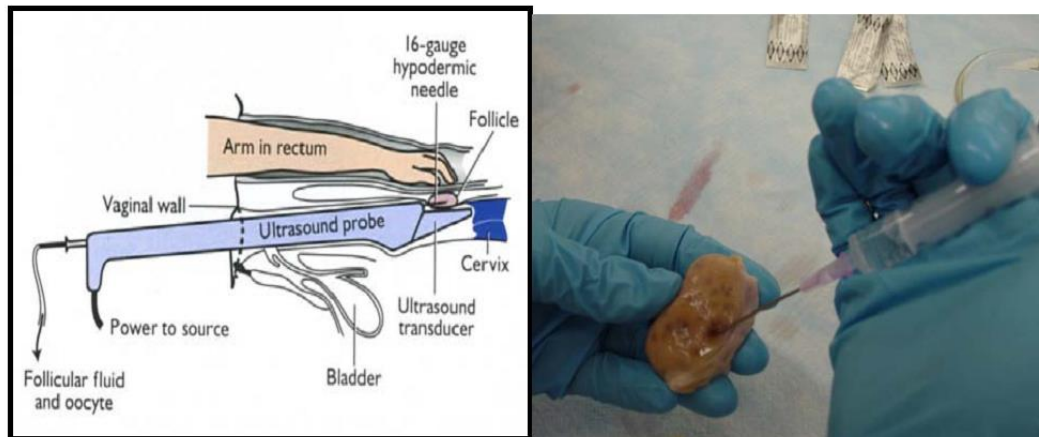
Secara umum, prosedur fertilisasi *in vitro* melibatkan 4 langkah utama sebagai berikut :

#### **a. Koleksi Oosit**

Pengumpulan Oosit dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu :

1. Pengumpulan secara langsung, teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan alat tranvaginal yang disebut aspirasi folikel USG (*Ultrasound Guide*) yang pada ujungnya berbentuk jarum suntik yang berguna untuk menyedot Oosit dalam Ovarium.

2. Pengumpulan Oosit dengan cara pembedahan dari hewan yang telah dipotong. Namun perlu diperhatikan bahwa hasil terbaik adalah Oosit yang dikumpulkan dalam waktu 4-6 jam setelah pemotongan.

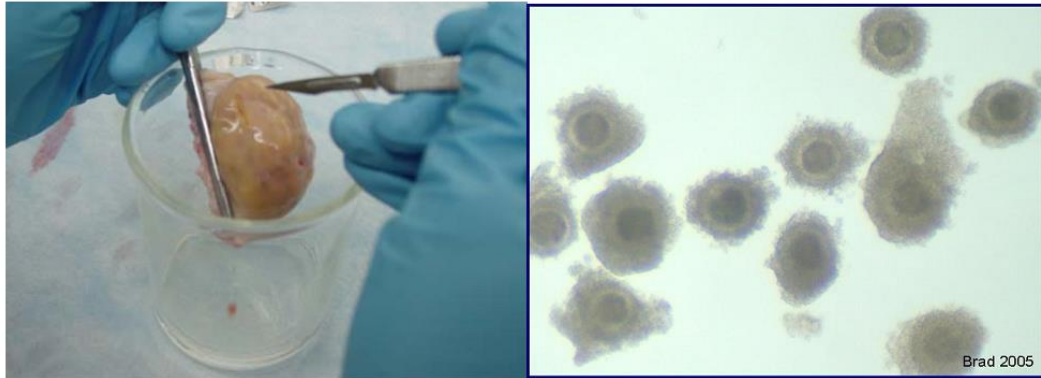


Gambar 5.1. Pengumpulan Oosit dalam Ovarium Sapi Donor. Koleksi oosit menggunakan *ultrasound-guided transvaginal aspiration* (kiri), Pengumpulan Oosit dari Ovarium Sapi donor yang telah di bedah (kanan).

Keuntungan koleksi Oosit secara langsung menggunakan alat *ultrasound-guided transvaginal aspiration* pada ternak adalah sebagai berikut :

1. Alat *Ultrasound Guide* tidak bersifat invasif yang artinya dapat digunakan secara berkala.
2. Memungkinkan penggunaan hormon perangsang birahi maupun tanpa perangsang pada ternak donor.
3. Sangat berulang, dimana Oosit dari ternak donor dapat di koleksi setiap dua minggu sekali.

Sedangkan koleksi Oosit dengan cara pemotongan tentunya Oosit hanya bisa dikoleksi satu kali saja dan tidak memungkinkan untuk dilakukan bagi skala industri peternakan.



Gambar 5.2. Koleksi oosit dengan cara "pemotongan" permukaan ovarium (panel kiri) dan beberapa kompleks kumulus-oosit sapi dewasa yang di koleksi (panel kanan).

**b. Pematangan atau Pendewasaan Oosit**

Setelah Oosit dikumpulkan dari ternak donor, Oosit dicuci beberapa kali dan ditempatkan didalam media (cawan petri) pendewasaan untuk di kultur, dimana lama proses pendewasaan tergantung pada jenis spesies (Tabel 1). Proses pendewasaan dilakukan untuk meniru apa yang terjadi seperti pada in vivo yang mengikuti lonjakan LH.

Table 5.1. Lama pendewasaan Oosit pada beberapa spesies.

<b>Spesies</b>	<b>Lama pendewasaan Oosit</b>
<b>Sapi</b>	21 – 24 Jam
<b>Babi</b>	40 – 44 Jam
<b>Kuda</b>	24 – 48 Jam
<b>Manusia</b>	28 – 36 Jam
<b>Tikus</b>	16 – 17 Jam

Selama proses pendewasaan, oosit akan melanjutkan ke fase meiosis dan berakhir di metaphase II sehingga siap untuk fertilisasi. COC juga mengalami perubahan morfologi lain selama pematangan, termasuk perluasan sel kumulus. Dalam beberapa kasus, seperti pada manusia dan kuda, hal ini lebih umum untuk memungkinkan oosit matang pada in vivo

dan kemudian mengumpulkannya untuk fertilisasi in vitro dan kultur embrio.

### **c. Pembuahan Oosit Dewasa**

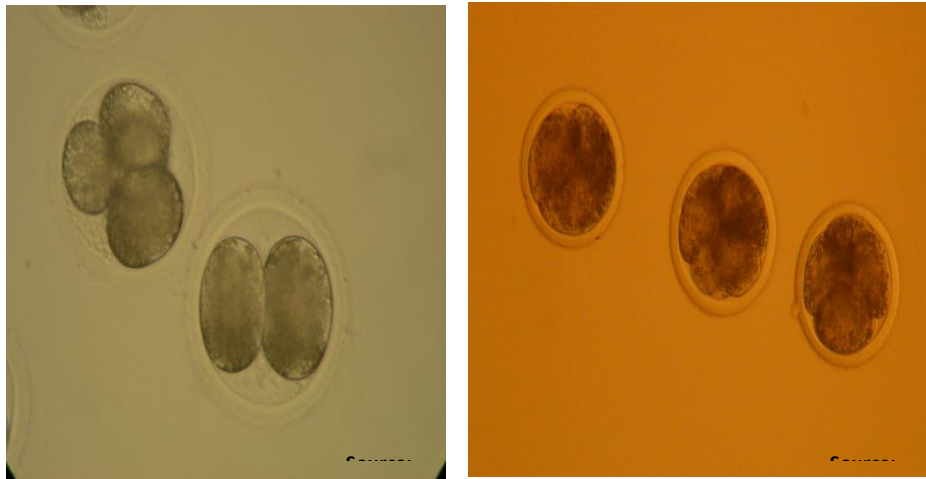
Untuk terjadinya fertilisasi in vitro, media yang digunakan harus mampu memasok sel sperma dengan nutrisi dan sinyal kimia untuk meningkatkan motilitas sperma dan induksi kapasitas, untuk memfasilitasi fusi (peleburan) gamet dan awal perkembangan embrio.

Proses fertilisasi in vitro dapat dibagi dalam tiga langkah utama:

1. Pencucian Oosit kumulus kompleks (*cumulus-oocyte complexes*, COC). Diperlukan agar hormon, nutrisi dan metabolit hadir dalam pematangan microdrop tidak dibawa ke drop fertilisasi.
2. Pemurnian sperma (*Sperm purification*), diperlukan agar sel sperma bisa dicuci dari extender (penahan) dilanjutkan dengan kriopreservasi (jika digunakan semen beku) atau plasma seminal (jika semen segar digunakan), dipilih untuk motil hidup sel sperma dan dilengkapi dengan nutrisi, buffer dan sinyal kimia untuk menginduksi kapasitas dan hiperaktivitas.
3. Pembuahan (Fertilisasi), pada titik ini sel sperma dapat ditambahkan ke sumur yang berisi COC sehingga pembuahan dapat berlangsung.

### **d. Kultur Embrio**

Kultur embrio adalah langkah yang mengikuti pembuahan. Selama tahap ini, zigot baru terbentuk akan perlu disediakan kondisi yang diperlukan untuk memulai membagi dan tumbuh dengan cara yang paling mirip dengan apa yang akan diharapkan akan terjadi dalam beberapa hari pertama kebuntingan.

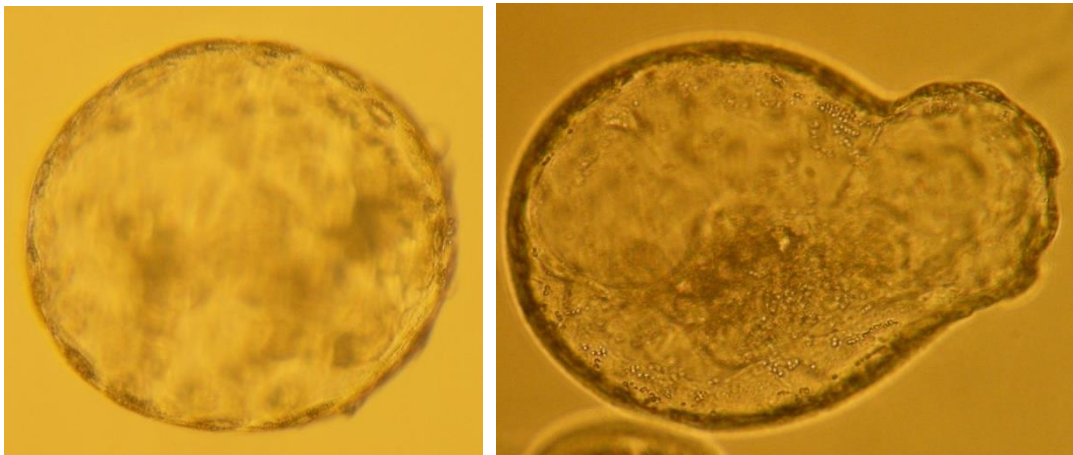


**2 4 Cells Embryos**

**4 6 Cells Embryos (2)**

Gambar 5.3. Embrio setelah di Kultur

Setelah melalui proses kultur selama tujuh hari, embrio akan mengalami perubahan membentuk blastokista (*blastocyst*) (Gambar 4) dan pada masa ini bisa dilanjutkan proses transfer ke ternak penerima (resifien) atau di bekukan untuk disimpan apabila belum digunakan.



Gambar 5.4. Embrio yang memiliki Blastokista setelah di Kultur selama 7 hari.

Ada beberapa jenis kultur embrio:

- a) *In vivo* - oosit dibuahi ditempatkan di saluran telur dari perempuan disinkronisasi dan tumbuh selama 6-8 hari. Embrio kemudian diambil dan dipindahkan ke induk definitif. Dalam beberapa kasus, jenis kultur dapat dilakukan di seluruh spesies, misalnya, sapi atau kuda embrio dapat berhasil dibudidayakan di saluran telur domba.
- b) *Co-culture* (Ko-kultur) - oosit dibuahi ditempatkan dalam kultur tetes mengandung sel-sel darisaluran telur untuk mencoba untuk meniru lingkungan induk.
- c) *Semi-defined medium* (Medium semi-ditentukan) - dibuahi oosit ditempatkan dalam kultur tetes mengandungserum. Hal ini disebut media semi-didefinisikan karena komposisi serum inivariabel dan biasanya tidak diketahui.
- d) *Defined medium* (Medium ditentukan) - oosit dibuahi ditempatkan dalam kultur tetes manakonsentrasi semua komponen diketahui, termasuk faktor pertumbuhan.
- e) *Sequential culture* (Kultur berurutan) - kebutuhan embrio berubah seperti tumbuh dan berkembang. Ide kultur berurutan adalah untuk menempatkan embrio dalam medium kultur yang mengandung nutrisi yang diperlukan untuk satu tahap perkembangan tertentu, meniru lingkungan hidup induk.

Dua media kultur yang paling umum digunakan dalam kultur embrio adalah SOF (*Synthetic Oviduct Fluid* (Cairan sintesis oviduct)) dan KSOM *Potassium Simplex Optimized Medium* (Kalium Simpleks Optimal Medium). Media-media ini berisi item seperti nutrisi (karbohidrat, asam amino) buffer, dan antibiotik.

Faktor-faktor lain yang mempengaruhi perkembangan embrio in vitro:

- a. **Gas phase** (Fase gas); kultur embrio dapat dilakukan dengan menggunakan konsentrasi gas yang ditentukan. Dua yang paling umum digunakan adalah:



- 5% CO<sub>2</sub> di udara
  - 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> dan 90% N<sub>2</sub>. Campuran gas ini memungkinkan untuk embrio yang lebih baik berkembang karena itu dianggap lebih mirip dengan kondisi yang ditemukan disaluran telur dan rahim.
- b. **pH**; pH media kultur harus antara 7,2 dan 7,4. PH dapat dipengaruhi oleh suhu dan fase gas jika tidak disangga dengan benar.
  - c. **Osmolality** (Osmolalitas); harus antara 260-280 mOsm / kg.
  - d. **Temperature**; Suhu kultur harus suhu yang sama ditemukan oleh embrio di saluran telur dan rahim. Pada sapi, temperatur normal berkisar dari 38,5 ke 39<sup>0</sup>C dan suhu ini harus digunakan selama kultur.
  - e. **Water purity** (Kemurnian air); resistivitas air harus kurang dari 18 mOhm.
  - f. **Sterility** (Sterilitas); prosedur harus dilakukan menjaga kultur steril, menggunakan teknik steril dan antibiotik jika perlu.

### **Daftar Pustaka**

- Abubakar M., Saeed A, Kul O. 2015. The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Bavister B.D., 2002. Early history of in vitro fertilization. Review, Reproduction. **124**: 181–196.
- Block J and Agosto L. 2005. ANS 3319C Reproductive Physiology and Endocrinology Techniques for In-Vitro Embryo Production. Department of Animal Science, University of Florida.
- Elder K and Dale B., 2000. In Vitro Fertilization, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Elder K and Dale B., 2011. In Vitro Fertilization, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hunter, RHF. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Terjemahan DK Harya Putra, Bandung : Penerbit ITB.

## **BAB VI**

### **BIOLOGI MOLEKULER**

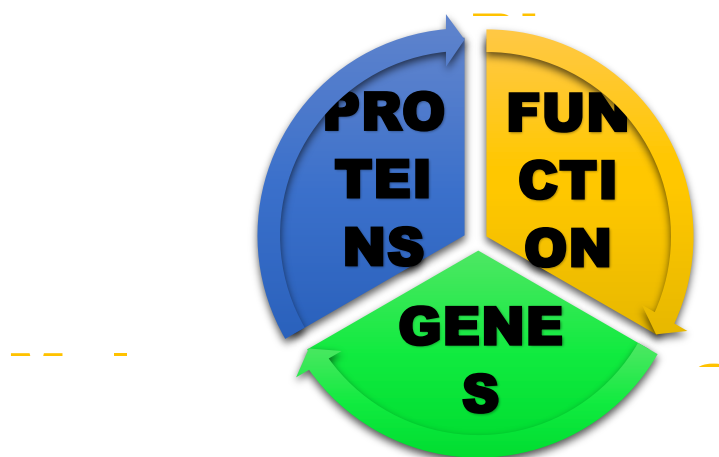
#### **6.1. Dasar-dasar Biologi Molekuler**

Biologi Molekuler adalah cabang ilmu pengetahuan yang mempelajari hubungan antara struktur dan fungsi molekul-molekul hayati serta kontribusi hubungan tersebut terhadap pelaksanaan dan pengendalian berbagai proses biokimia. Molekuler disini meliputi; asam inti (gen: DNA/RNA) dan asam amino penyusun protein struktural maupun fungsional.

Kajian utama biologi molekuler adalah :

- makromolekul hayati, khususnya asam nukleat: DNA dan RNA,
- ekspresi informasi hayati yang meliputi replikasi, transkripsi, dan translasi.

Hubungan biologi molekuler dengan bidang ilmu lainnya sangat erat kaitannya dalam ilmu biokimia, genetik dan kajian biologi pada tingkat protein dan molekul sebagaimana di ilustrasikan pada gambar 1.



Gambar 6.1. Hubungan Biologi Molekuler dengan ilmu lain.

Untuk memahami dasar-dasar biologi molekuler, sebaiknya kita mengenal terlebih dahulu proses terjadinya, dan kajian yang mendasari bidang ilmu ini yang akan dibahas secara ringkas pada poin berikut.

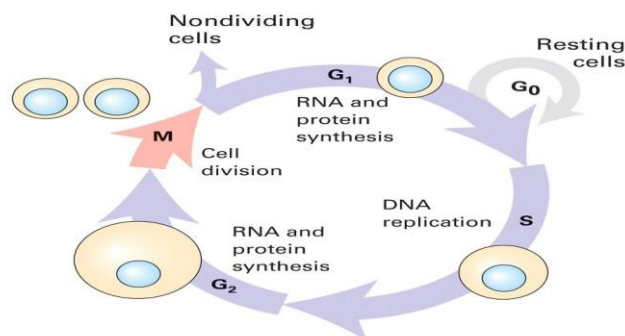
## 1. Proses terjadinya didalam Sel

Sel merupakan unit dasar dari setiap makhluk hidup, dimana setiap organisme terdiri dari salah satu dari dua jenis sel yaitu sel-sel prokariotik dan sel-sel eukariotik yang memiliki DNA didalam inti sel. Setiap sel akan mengalami proses biologis, reaksi biokimia dan proses genetik pada tingkat protein hingga molekul sehingga proses-proses inilah mendasari kajian-kajian biologi molekuler. Kajian ini juga menjadi pusat penelitian yang menarik terkait teori tentang sel dimana:

- a. Sel berasal dari sel dan berkembang biak dengan cara membelah diri.
- b. Sel adalah suatu unit struktural dan fungsional terkecil pada makhluk hidup.
- c. Sel adalah suatu unit aktifitas Biologi yang dibatasi oleh membran semipermeabel dan dapat melakukan reproduksi sendiri pada medium di luar makhluk hidup.

## 2. Semua Sel memiliki siklus umum

Siklus dalam sel terjadi dalam rangka pertumbuhan dengan melakukan proses metabolisme yang ditandai dengan protein sintesis, berkembang biak dengan cara pembelahan (mitosis), bertahan hidup hingga apoptosis (proses terjadinya kematian sel).



Gambar 6.2. Siklus umum sel-sel organism. G; Gap, S; Sintesis, M; Mitosis

### 3. Semua kehidupan tergantung pada tiga molekul penting

Proses kerja sel hingga terbentuknya individu baru diatur dengan mekanisme kode genetik yang kompleks. Pengkodean ini diatur oleh tiga molekul penting sebagai berikut :

- a. Asam Deoksiribo Nukleat (DNA, *Deoxyribonucleic acid*).

Molekul DNA berfungsi menyimpan informasi tentang cara kerja sel memiliki struktur heliks ganda (*double helix*) yang terdiri dari gugus gula, fosfat dan basa (A, C, G, T). Pada dasarnya DNA terkandung didalam kromosom, dimana pada sel eukoariota DNA dikemas dalam kromosom linear. Sedangkan pada prokariota, DNA biasanya terkandung dalam satu (*single*), melingkari kromosom.

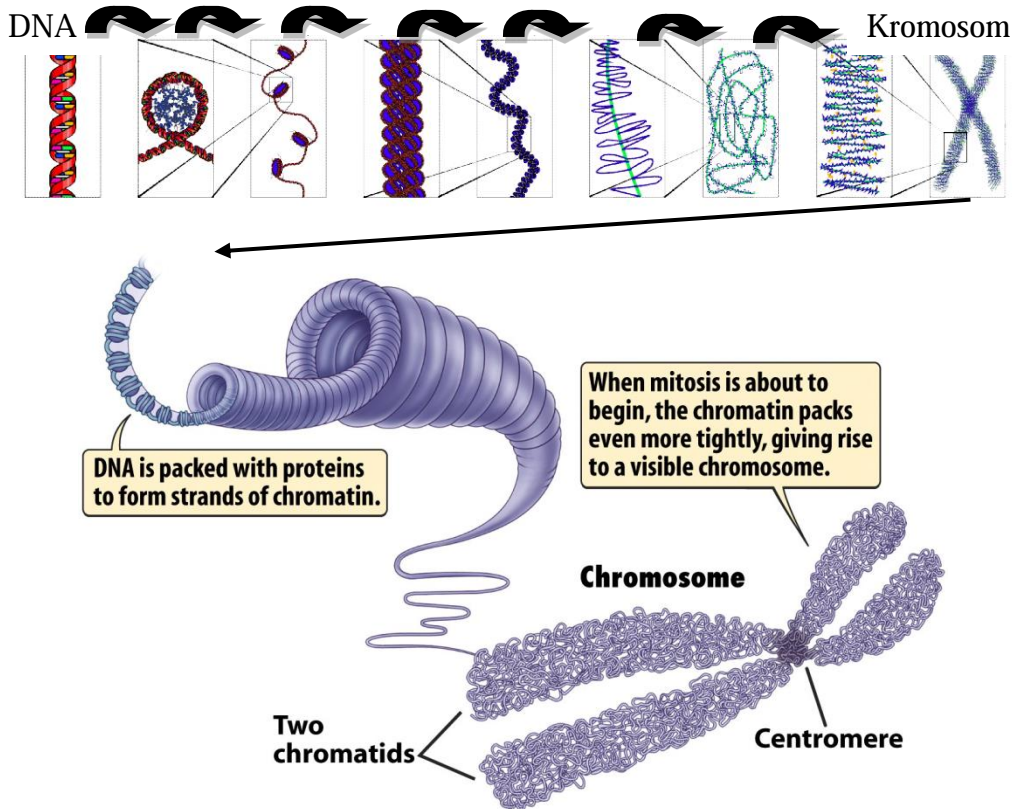


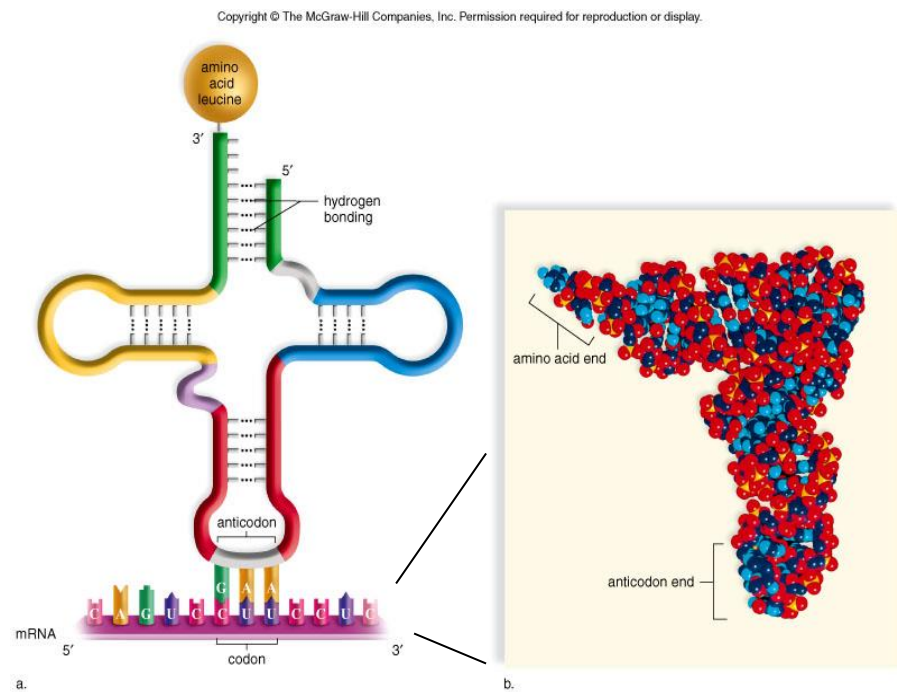
Figure 9-3 Discover Biology 3/e  
© 2006 W. W. Norton & Company, Inc.

Gambar 6.3. Rantai DNA yang di urai dari sebuah Kromosom.

b. Asam Ribo Nukleat (RNA, *Ribonucleic acid*).

Molekul RNA bertindak untuk mentransfer potongan pendek dari informasi kode genetik ke berbagai bagian sel serta memfasilitasi kegiatan mensintesis menjadi protein atau yang dikenal sebagai protein sintesis.

Struktur kimia RNA mirip dengan DNA dan biasanya hanya satu untai (*single helix*) yaitu kode T (*thymine*) pada DNA diganti dengan U (*uracil*) untuk RNA.



Gambar 6.4. Struktur RNA.

Didalam sel, RNA terdiri dari beberapa jenis yang memiliki fungsi berbeda.

RNA dibagi menjadi dua macam, yaitu :

1. RNA genetik

RNA genetik memiliki fungsi yang sama dengan DNA, yaitu sebagai pembawa keterangan genetik. RNA genetik ini hanya ditemukan pada makhluk hidup tertentu yang tidak memiliki DNA, misalnya virus. Dalam hal ini fungsi RNA menjadi sama dengan DNA, baik sebagai materi genetik maupun dalam mengatur aktivitas sel.

## 2. RNA non genetic

RNA non-genetik tidak berperan sebagai pembawa keterangan genetik sehingga RNA jenis ini hanya dimiliki oleh makhluk hidup yang juga memiliki DNA. Menurut fungsi kerjanya, RNA non genetik terbagi menjadi tiga jenis berikut :

- mRNA (*messenger* RNA) atau ARNd (ARN duta),
  - mRNA merupakan RNA yang urutan basanya komplementer (berpasangan) dengan salah satu urutan basa rantai DNA.
  - RNA jenis ini merupakan polinukleotida berbentuk pita tunggal linier dan disintesis oleh DNA di dalam nukleus. Panjang pendeknya mRNA berhubungan dengan panjang pendeknya rantai polipeptida yang akan disusun.
  - Urutan asam amino yang menyusun rantai polipeptida itu sesuai dengan urutan kodon yang terdapat di dalam molekul mRNA yang bersangkutan.
  - mRNA bertindak sebagai pola cetakan pembentuk polipeptida. Adapun fungsi utama mRNA adalah membawa kode-kode genetik dari DNA di inti sel menuju ke ribosom di sitoplasma.
  - mRNA ini dibentuk bila diperlukan dan jika tugasnya selesai, maka akan dihancurkan dalam plasma.
- tRNA (*transfer* RNA) atau ARNt (ARN transfer),
  - RNA jenis ini dibentuk di dalam nukleus, tetapi menempatkan diri di dalam sitoplasma.

- tRNA merupakan RNA terpendek dan bertindak sebagai penerjemah kodon dari mRNA.
- Fungsi lain tRNA adalah mengikat asam-asam amino di dalam sitoplasma yang akan disusun menjadi protein dan mengangkutnya ke ribosom.
- Bagian tRNA yang berhubungan dengan kodon dinamakan antikodon.
- rRNA (*ribosomal* RNA) atau ARNr (ARN ribosomal),
  - RNA ini disebut ribosomal RNA karena terdapat di ribosom meskipun dibuat di dalam nukleus.
  - RNA ini berupa pita tunggal, tidak bercabang, dan fleksibel.
  - Lebih dari 80% RNA merupakan rRNA.
  - Fungsi dari RNA ribosom adalah sebagai mesin perakitan dalam sintesis protein yang bergerak ke satu arah sepanjang mRNA.
  - Di dalam ribosom, molekul rRNA ini mencapai 30-46%.

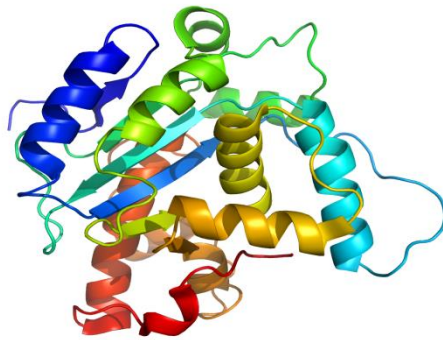
Perbedaan RNA dan DNA dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 6.1. Perbedaan DNA dan RNA

DNA		RNA
Deksiribo ( <i>Deoxyribose</i> )	Gula ( <i>Sugar</i> )	Ribo ( <i>Ribose</i> )
A, T, C, G	Basa Nitrogen ( <i>Nitrogen Bases</i> )	U, A, G, C
Ganda ( <i>Double</i> )	Untai tunggal atau ganda ( <i>Double or single strand</i> )	Tunggal ( <i>Single</i> )
Nukleus ( <i>Nucleus</i> )	Lokasi ( <i>Location</i> )	Dimana saja dalam sel

c. Protein

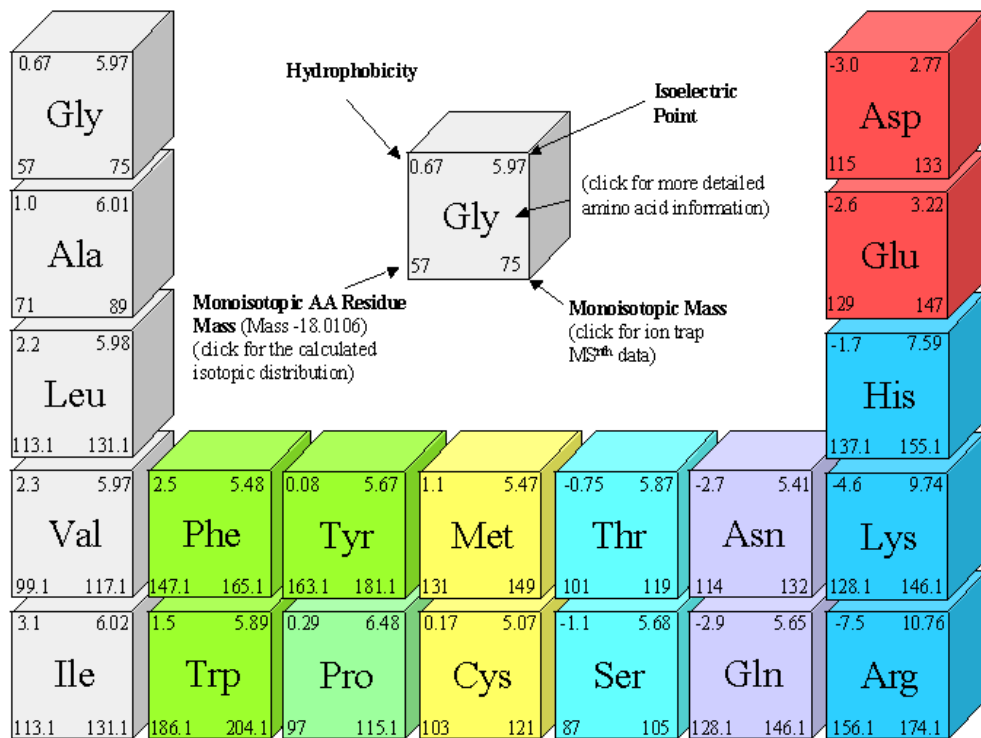
Protein merupakan suatu bentuk enzim yang mengirimkan sinyal ke sel lain dan mengatur aktivitas gen. protein juga merupakan komponen utama pembentuk tubuh. Struktur protein dibentuk dari polipeptida (*string* (deretan) residu asam amino) yang mewakili urutan 20 asam amino esensial. Satu protein bisa mencapai panjang khas dari 50 hingga 1000 residu asam amino.



Gambar 6.5. Struktur Protein

Sifat kimia yang berbeda menyebabkan rantai protein melipat menjadi spesifik struktur tiga dimensi yang mendefinisikan fungsi tertentu dalam sel yang disusun oleh 20 asam amino berbeda.





IonSource, LLC Copyright 2000-2006

Gambar 6.6. 20 Asam amino esensial.

Protein melakukan semua pekerjaan penting untuk sel seperti :

- Membangun struktur seluler;
- Mencerna nutrisi;
- Melaksanakan fungsi metabolisme;
- Menengahi arus informasi dalam sel dan di antara komunitas seluler;
- Protein bekerja sama dengan protein lain atau asam nukleat sebagai "molekul mesin".

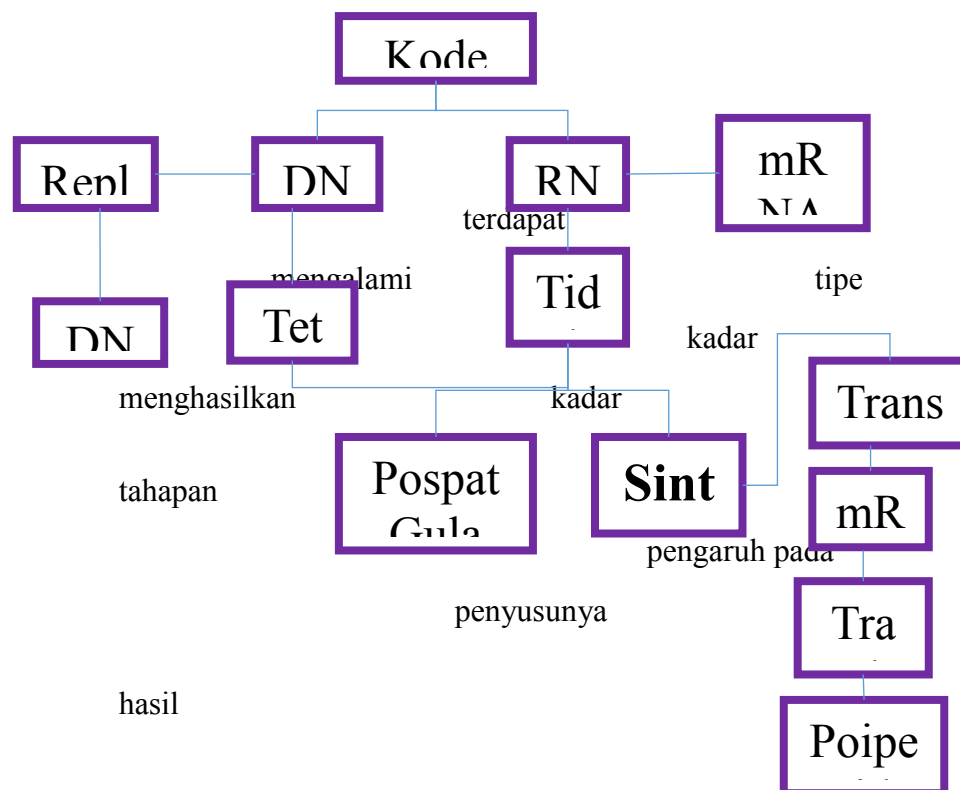
Sedangkan tipe-tipe protein menurut fungsi dapat dikelompokkan sebagai berikut :

- 1) Enzim (*Enzymes*); Katalisator reaksi-reaksi biokimia di dalam sel.
- 2) Struktural (*Structural*); kolagen, elastin, keratin, dsb.
- 3) Pergerakan (*Motility*); aktin, miosin, tubulin, dsb.
- 4) Pengatur (*Regulatory*); Pengatur ekspresi gen (replikasi DNA, transkripsi, translasi).

- 5) Nutrisi dan penyimpanan (*Nutrient and Storage*); ovalbumin, kasein, dsb.
- 6) Hormonal (*Hormonal*); insulin, nerve growth factor (NGF), dsb.
- 7) Reseptor (*Receptors*); hormon and neurotransmitter.
- 8) Pengangkut (*Transport*); membawa molekul-molekul kecil dan besi.
- 9) Pertahanan (*Defence*); imunoglobulin dan antibody.

### A. Protein Sintesis

Protein sintesis adalah proses pembentukan protein dari monomer peptida yang diatur susunannya oleh kode genetik.



Gambar 6.7. Peta konsep protein sintesis.

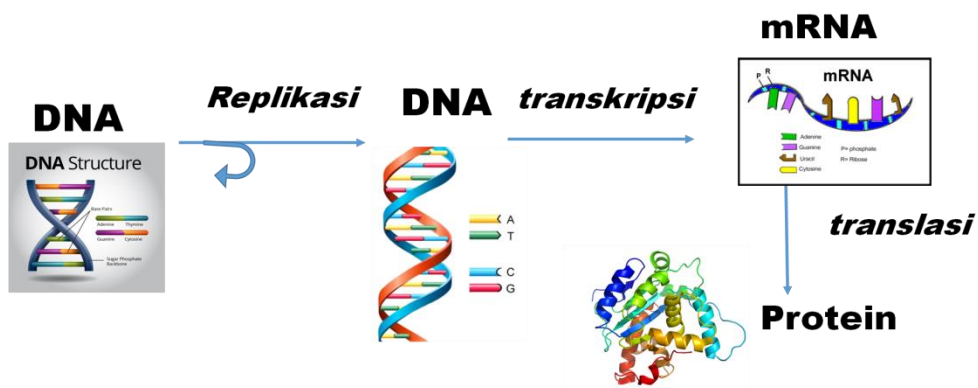
Ada tiga aspek penting mekanisme sintesis protein yang perlu diketahui yaitu :

1. Lokasi berlangsungnya sintesis protein terjadi pada sel;
2. Merupakan mekanisme berpindahnya informasi atau hasil transformasi dari DNA ke tempat terjadinya sintesis protein;
3. Merupakan mekanisme asam amino penyusun protein pada suatu sel berpisah membentuk protein-protein yang spesifik.

Pada ilmu biologi molekuler dikenal istilah “central dogma” yang dipopulerkan oleh James Watson dan Francis Crick pada tahun 1953 yaitu pada sel terjadi sebuah proses replikasi DNA membentuk DNA baru, dan tahap transkripsi yang dilanjutkan dengan translasi membentuk protein. Pada tahap transkripsi dan translasi inilah terjadi proses protein sintesis yang akan dibahas selanjutnya.

Untuk memahami proses protein sintesis, maka perlu diketahui beberapa hal berikut :

1. Bahwa DNA mencetak mRNA,
2. Kemudian mRNA meninggalkan inti menuju ke ribosom yg terdapat dalam sitoplasma,
3. Dilanjutkan dengan RNA datang membawa asam amino yang sesuai dengan kode yang dibawa oleh mRNA,
4. Asam-asam amino akan berderet dalam urutan yang sesuai dengan kode sehingga terbentuklah protein yang diharapkan,
5. Protein terbentuk merupakan enzim yang mengatur metabolisme sel.



Gambar 6.8. Central dogma biologi molekuler. Proses ini merupakan struktur dasar proses protein sintesis.

## 1. Transkripsi

Transkripsi merupakan konversi informasi dari DNA menjadi mRNA. Proses transkripsi ini difasilitasi oleh enzim RNA polimerase yang berjalan mirip seperti proses replikasi DNA. Transkripsi dimulai dari ujung 5' ke 3' pada daerah promotor dan berakhir di daerah terminator seperti yang terlihat pada gambar 9.

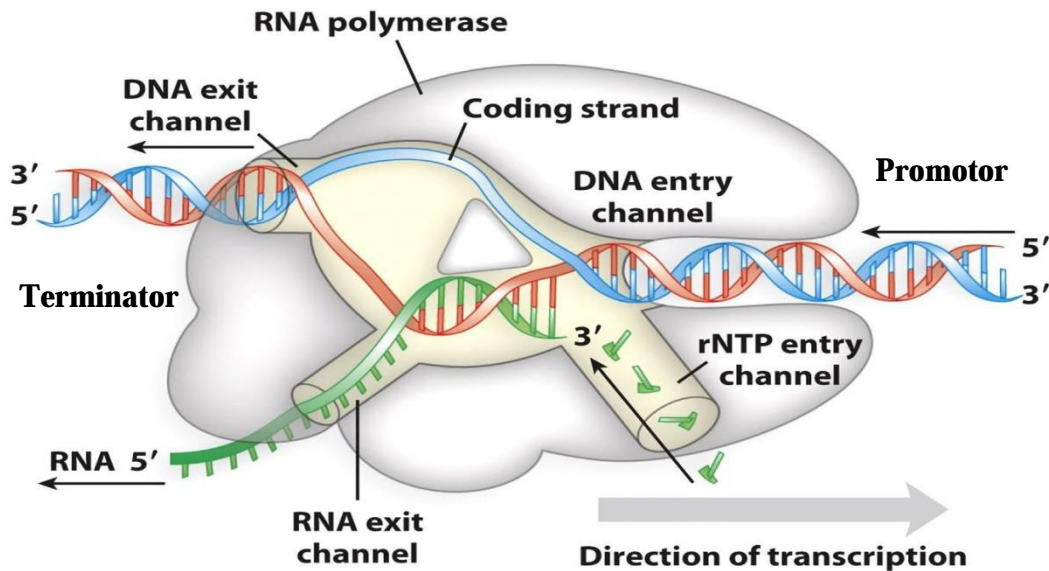


Figure 15-14  
Molecular Biology: Principles and Practice  
© 2012 W. H. Freeman and Company

Gambar 6.9. Proses transkripsi oleh enzim RNA polimerase.

Komponen utama dalam proses transkripsi meliputi urutan DNA yang akan ditranskripsi; membutuhkan enzim RNA polimerase; factor-faktor dalam transkripsi; dan energi untuk proses berupa ATP.

### a. Tahap-tahap transkripsi

#### 1. Tahap Inisiasi (permulaan)

Tahap ini merupakan daerah dimana RNA polimerase melekat dan mengawali transkripsi disebut promotor. Suatu promotor mencakup titik

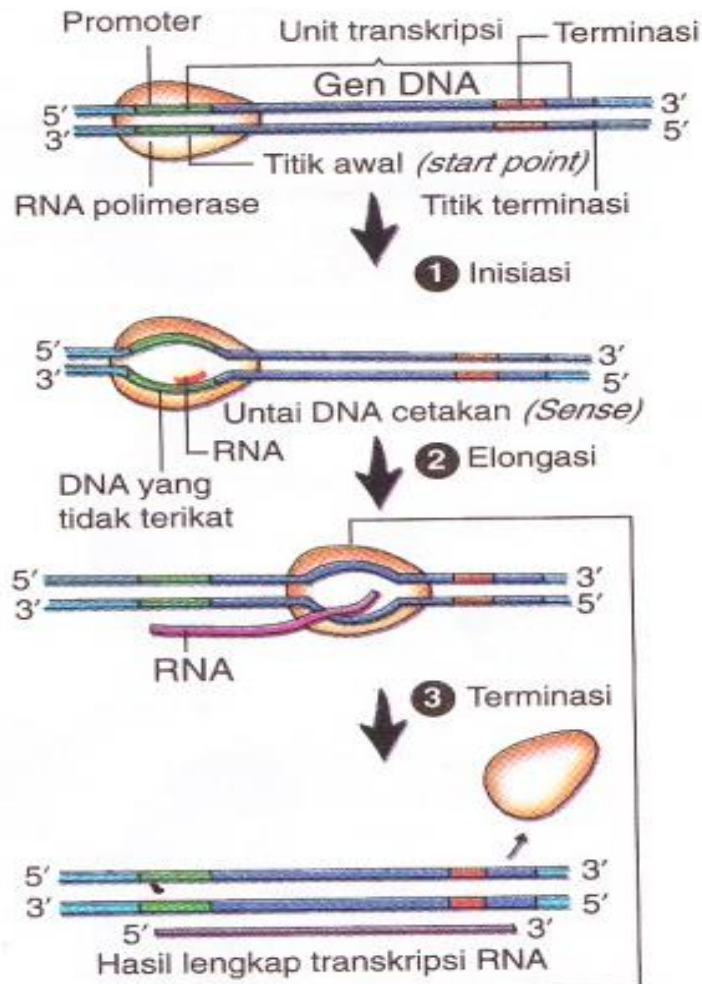
awal (*start point*) transkripsi. Selain menentukan dimana transkripsi dimulai, promoter juga menentukan yang mana dari kedua DNA yang digunakan sebagai cetakan (*template*).

## 2. Tahap Elongasi (pemanjangan)

Pada saat RNA bergerak di sepanjang DNA, pilinan heliks ganda DNA tersebut terbuka secara berurutan kira-kira 10 hingga 20 basa DNA sekaligus. Enzim RNA polimerase menambahkan nukleotida ke ujung 3' dari molekul RNA yang sedang terbentuk di sepanjang heliks ganda DNA tersebut. Setelah sintesis RNA berlangsung, DNA heliks ganda terbentuk kembali dan molekul RNA baru akan lepas dari cetakan DNA-nya.

## 3. Tahap Terminasi (pengakhiran)

Transkripsi berlangsung sampai RNA polimerase mentranskripsi urutan DNA yang disebut terminator. Terminator merupakan suatu urutan DNA yang berfungsi menghentikan proses transkripsi. Pada sel prokariotik, transkripsi biasanya berhenti tepat pada saat RNA polimerase mencapai titik terminasi. Sebaliknya pada sel eukariotik, RNA polimerase terus melewati titik terminasi pada titik lebih jauh yakni kira-kira 10 hingga 35 nukleotida.



Gambar 6.10. Proses transkripsi secara keseluruhan.

b. Mekanisme transkripsi pada prokariotik

1. Inisiasi

Terjadi pembentukan kompleks promotor tertutup dan kompleks promotor terbuka, lalu diikuti dengan penggabungan beberapa nukleotida awal. Pada akhirnya dilakukan pelepasan sub unit  $\sigma$  dan perubahan konformasi holoenzim menjadi *core enzyme*.

2. Elongasi

Nukleotida ditambahkan secara kovalen pada ujung 3' molekul RNA yang baru terbentuk (RNA baru terbentuk dengan arah 5' ke 3')

menggunakan ikatan fosfodiester. Nukleotida RNA yang ditambahkan bersifat komplementer dengan nukleotida untai DNA cetakan.

### 3. Terminasi

Pada prokariotik terdapat dua terminator yaitu :

- Terminator yang tergantung pada protein *rho*, protein *rho* membuat destabilisasi ikatan RNA-DNA pada daerah terminasi sehingga melepaskan RNA dari DNA templat dan mengakhiri proses sintesis.
- Terminator yang tidak tergantung pada protein *rho*, terjadi pada urutan DNA kaya basa GC, diikuti urutan yang kaya AT dan urutan ekor poli A. Komplemen signal terminasi tersebut mengakibatkan produk RNA membentuk struktur loop yang diakhiri dengan urutan poli U pada ujung 3'. Urutan ini menyebabkan RNA polimerase melambat dan mengakhiri proses sintesis RNA.

#### c. Mekanisme transkripsi pada eukariotik

Pada dasarnya menyerupai mekanisme transkripsi pada prokariotik. Namun, mekanismenya jauh lebih kompleks daripada mekanisme pada prokariotik. Transkripsi pada sel eukariotik dikatalisis oleh 3 jenis RNA polimerase:

- ❖ RNA polimerase I mentranskripsi gen rRNA unit besar,
- ❖ RNA polimerase II mentranskripsi gen yang mengkode protein,
- ❖ RNA polimerase III mentranskripsi RNA-RNA kecil (tRNA dan 5S rRNA).

Sebelum RNA polimerase menempel di promotor, ada faktor transkripsi yang memandu RNA polimerase ke TATA box. Setelah itu baru terjadi proses elongasi dan berhenti sampai bertemu dengan terminator.

Adapun perbedaan utama antara transkripsi dibandingkan dengan replikasi adalah sebagai berikut:

- Hanya memproduksi molekul dengan ukuran relatif pendek,
- Hanya satu utas DNA yang ditranskripsi,
- Prosesnya lebih sederhana karena mRNA dapat disintesa secara berkesinambungan dgn menggunakan satu enzim saja (RNA polimerase),
- Tidak diperlukan primer seperti pada proses replikasi.

## 2. Translasi

Translasi adalah proses penerjemahan kode basa nukleotida ke asam amino, dimana setiap 3 basa (triplet / codon) menyandikan 1 asam amino. Pada tahap translasi ini mRNA membawa informasi sekuen asam amino dari protein yang harus diproduksi dalam bentuk kode genetika. Contoh untuk kode UUU yang berarti *Phenilalanine* (Phe), UUA berarti *Leucine* (Leu) dan UAA yang berarti *Stop* sehingga proses trnaslasi akan berhenti.

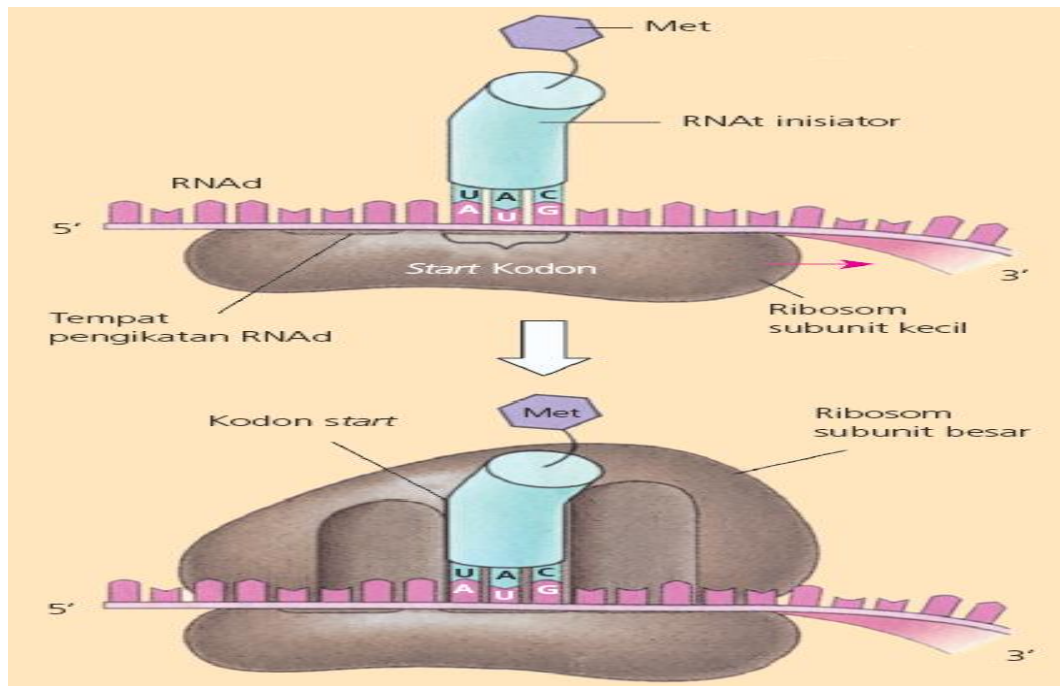
Kode genetik DNA ditransfer ke mRNA dalam bentuk kode (*code*) terdiri dari sederetan basa nukleotid ribosom bergerak sepanjang molekul mRNA dan "membaca" urutan sekuensnya sebanyak 3 nukleotid (codon) sekaligus dari arah 5' ke 3'. Sebagai contoh 5'-AAACGTCGTACCTGT-3' dan 3'-TTTGCAGCATGGACA-5'.

Sama halnya dengan transkripsi, proses translasi juga dibagi menjadi tiga tahap diantaranya :

### 1. Inisiasi

Ketika proses translasi dimulai, ribosom kecil mengikat diri pada mRNA dan tRNA inisiator. Ribosom melekat pada salah satu ujung mRNA dimana didekat pelekatan tersebut terdapat kodon *start* (memulai) AUG. Kodon ini memberikan sinyal dimulainya proses translasi.

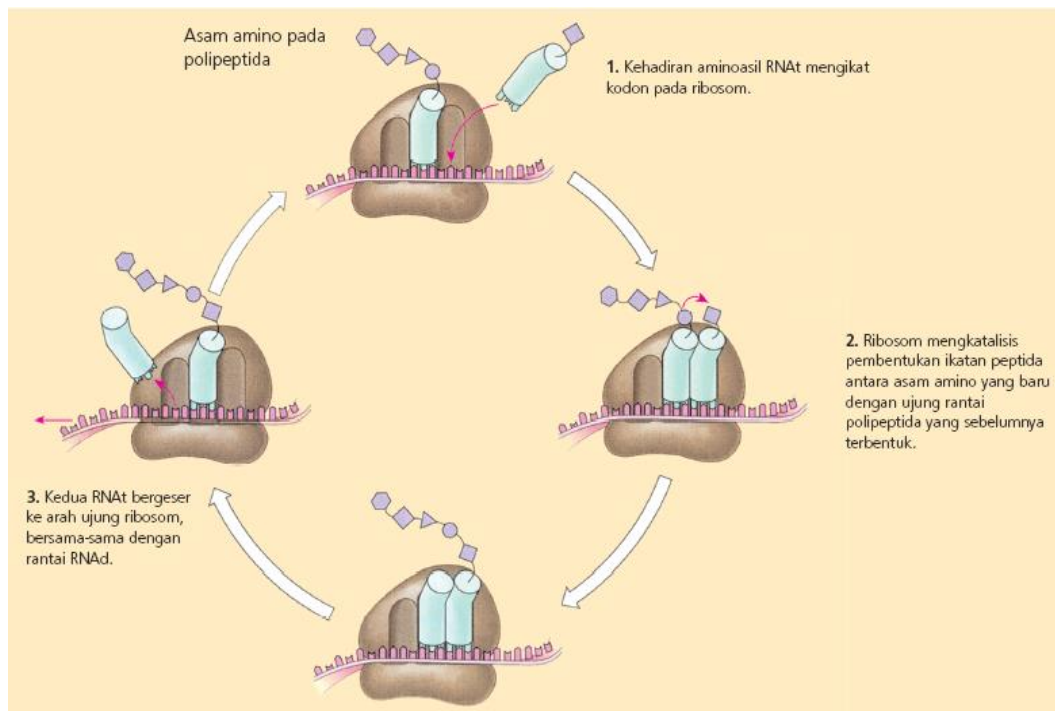




Gambar 6.11. Tahap inisiasi translasi.

## 2. Elongasi

Molekul rRNA dari ribosom subunit besar yang berfungsi sebagai enzim mengkatalis membentuk ikatan peptida yang mengabungkan polipeptida ke asam amino yang dibawa tRNA. Setelah itu tRNA keluar dari ribosom. Ribosom dan mRNA bergerak dengan arah yang sama, kodon demi kodon, peristiwa ini berlangsung sampai terbentuk polipeptida.



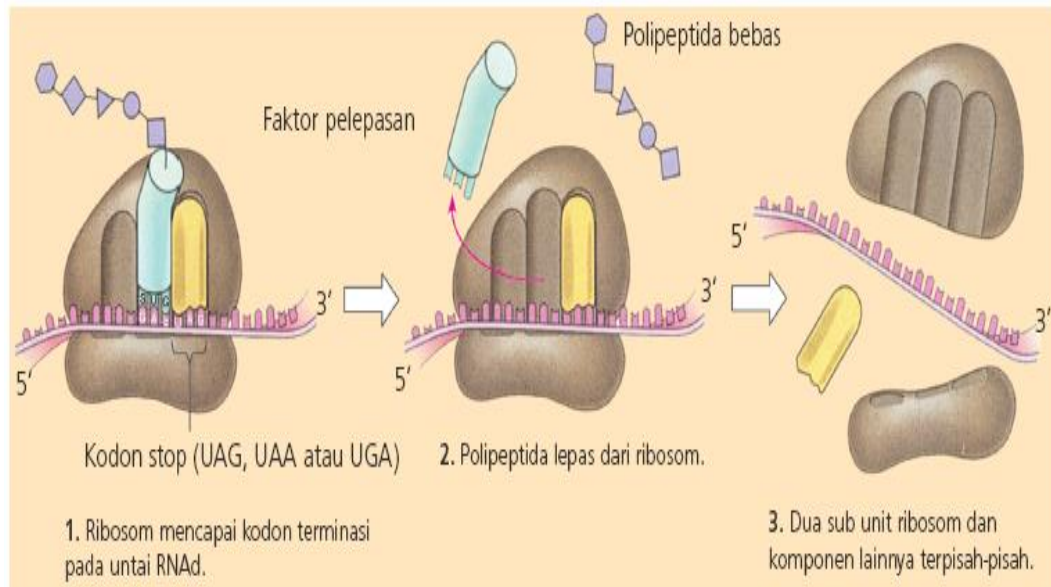
Gambar 6.12. Tahap elongasi translasi.

Selama proses elongasi RNA disintesis menurut DNA/RNA berdasarkan aturan pasangan:

**A** (DNA) — **U** (RNA)  
**G** (DNA) — **C** (RNA)  
**T** (DNA) — **A** (RNA)  
**C** (DNA) — **G** (RNA)

### 3. Terminasi

Elongasi akan berhenti setelah ribosom mencapai kodon stop. Triplet kodon stop yaitu UAA, UAG, UGA. Kodon stop bertindak sebagai sinyal untuk menghentikan translasi, selanjutnya polipeptida yang terbentuk lepas dari ribosom.



Gambar 6.13. Tahap terminasi translasi.

Produk akhir dari proses protein sintesis adalah struktur primer dari sebuah protein yang berbentuk sebuah untaian asam amino saling berikatan melalui ikatan peptida.

### Daftar Pustaka

- Cox MM., Doudna JA and O'Donnell M. 2012. *Molecular Biology: Principles and Practice*, 1st Edition. W. H. Freeman and Company. ISBN-13: 9780716779988.
- Crick F., 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. **227**: 561-563.
- Engelhard M., Hagen K, and Boysen M. 2009. *Genetic Engineering in Livestock*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Glick B. R and Pasternak J. J. 2003. *Book Review: Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA*. Third edition, ASM (American Society for Microbiology) Press: Washington, D. C. ISBN 1-55581-224-4.
- Kratz RF. 2009. *Molecular and Cell Biology For Dummies*. Wiley Publishing, Inc., Indianapolis, Indiana.
- Schleif R. 1993. *Genetics and Molecular Biology*; Second Edition. Department of Biology The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.

## BAB VII SINTESA DILUAR SEL

### 7.1 Pengertian sintesa diluar sel

Sintesa di luar sel adalah proses reaksi kimia dari satu zat atau lebih yang membentuk suatu zat baru yang terjadi di alam (di luar sel). Dalam proses sintesa di luar sel dibantu dengan enzim untuk mempercepat reaksi kimia.

### 7.2 Sejarah penemuan enzim



Wilhelm Kühne

Pada tahun 1878, ahli fisiologi Jerman Wilhelm Kühne (1837–1900) pertama kali menggunakan istilah “enzyme“, yang berasal dari bahasa Yunani ενζυμων yang berarti “dalam bahan pengembang” (ragi), untuk menjelaskan proses ini. Kata “enzyme” kemudian digunakan untuk merujuk pada zat mati seperti pepsin, dan kata “ferment” digunakan untuk merujuk pada aktivitas kimiawi yang dihasilkan oleh organisme hidup.

Pada tahun 1897, Eduard Buchner memulai kajiannya mengenai kemampuan ekstrak ragi untuk memfermentasi gula walaupun ia tidak terdapat pada sel ragi yang hidup. Pada sederet eksperimen di Universitas Berlin, ia menemukan bahwa gula difermentasi bahkan apabila sel ragi tidak terdapat pada campuran.



Eduard Buchner

Ia menamai enzim yang memfermentasi sukrosa sebagai “zymase” (zimase). Umumnya, untuk mendapatkan nama sebuah enzim, akhiran -ase ditambahkan pada nama substrat enzim tersebut (contohnya: laktase, merupakan enzim yang mengurai laktase) ataupun pada jenis reaksi yang dikatalisasi (contoh: DNA Polimerase yang menghasilkan polimer DNA).

### 7.2 Pengertian Enzim

Enzim adalah biokatalisator organik yang dihasilkan organisme hidup di dalam protoplasma, yang terdiri atas protein atau suatu senyawa yang berikatan dengan protein. Enzim mempunyai dua fungsi pokok yaitu mempercepat atau memperlambat reaksi kimia dan mengatur sejumlah reaksi

yang berbeda-beda dalam waktu yang sama. Molekul yang bereaksi di dalam suatu reaksi yang dikatalisis oleh enzim disebut substrat, dan molekul yang dihasilkan disebut produk.

## **8 Struktur dan Kerja Enzim**

Enzim bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul substrat untuk menghasilkan senyawa intermediet melalui suatu reaksi kimia organik yang membutuhkan energi aktivasi lebih rendah, sehingga percepatan reaksi kimia terjadi karena reaksi kimia dengan energi aktivasi lebih tinggi membutuhkan waktu lebih lama.

### **a. Struktur enzim**

Enzim umumnya merupakan protein globular dan ukurannya berkisar dari hanya 62 asam amino pada monomer 4-oksalokrotonat tautomerase, sampai dengan lebih dari 2.500 residu pada asam lemak sintase. Terdapat pula sejumlah kecil katalis RNA, dengan yang paling umum merupakan ribosom; Jenis enzim ini dirujuk sebagai RNA-enzim ataupun ribozim. Aktivitas enzim ditentukan oleh struktur tiga dimensinya (struktur kuaterner). Walaupun struktur enzim menentukan fungsinya, prediksi aktivitas enzim baru yang hanya dilihat dari strukturnya adalah hal yang sangat sulit.

Kebanyakan enzim berukuran lebih besar daripada substratnya, tetapi hanya sebagian kecil asam amino enzim (sekitar 3–4 asam amino) yang secara langsung terlibat dalam katalisis. Daerah yang mengandung residu katalitik yang akan mengikat substrat dan kemudian menjalani reaksi ini dikenal sebagai tapak aktif. Enzim juga dapat mengandung tapak yang mengikat kofaktor yang diperlukan untuk katalisis. Beberapa enzim juga memiliki tapak ikat untuk molekul kecil, yang sering kali merupakan produk langsung ataupun tak langsung dari reaksi yang dikatalisis. Pengikatan ini dapat meningkatkan ataupun menurunkan aktivitas enzim. Dengan demikian ia berfungsi sebagai regulasi umpan balik.

Sama seperti protein-protein lainnya, enzim merupakan rantai asam amino yang melipat. Tiap-tiap urutan asam amino menghasilkan struktur pelipatan dan sifat-sifat kimiawi yang khas. Rantai protein tunggalkadangkadang dapat berkumpul bersama dan membentuk kompleks protein. Kebanyakan enzim dapat mengalami denaturasi (yakni terbuka dari lipatnya dan menjadi tidak aktif) oleh pemanasan ataupun denaturan kimiawi. Tergantung pada jenis-jenis enzim, denaturasi dapat bersifat reversibel maupun ireversibel.

#### b. Mekanisme Kerja Enzim

Enzim mengkatalis reaksi dengan meningkatkan kecepatan reaksi. Meningkatkan kecepatan reaksi dilakukan dengan menurunkan energi aktivasi (energi yang diperlukan untuk reaksi). Penurunan energi aktivasi dilakukan dengan membentuk kompleks dan substrat. Secara sederhana kerja enzim digambarkan sebagai berikut:

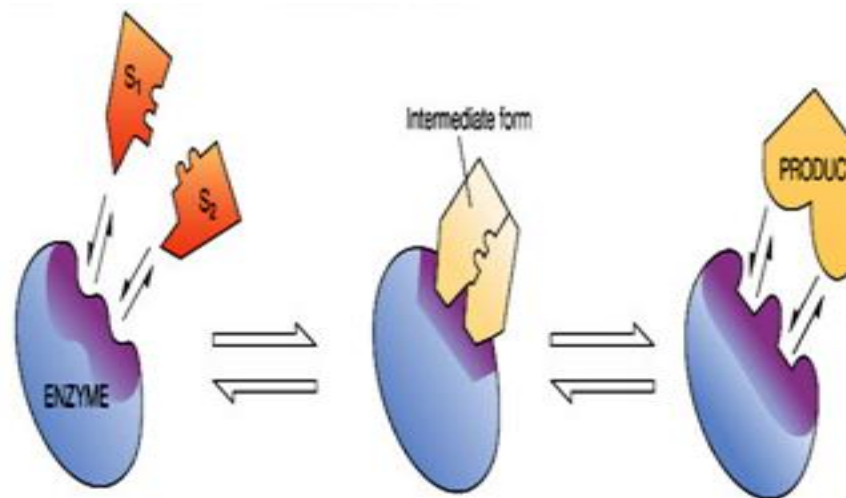
Substrat + enzim  $\rightarrow$  kompleks enzim  $\rightarrow$  substrat  $\rightarrow$  enzim produk

Setelah produk dihasilkan dari reaksi, enzim kemudian dilepaskan. Enzim bebas untuk membentuk kompleks yang baru dengan substrat yang lain. Ada dua teori yang menjelaskan mengenai cara kerja enzim yaitu:

##### 1) Teori Ketepatan Induksi (*Induce Fit*)

Pada tahun 1958, Daniel Koshland mengajukan modifikasi model kunci dan gembok, oleh karena enzim memiliki struktur yang fleksibel, tapak aktif secara terus menerus berubah bentuknya sesuai dengan interaksi antara enzim dan substrat. Akibatnya, substrat tidak berikatan dengan tapak aktif yang kaku. Orientasi rantai samping asam amino berubah sesuai dengan substrat dan mengijinkan enzim untuk menjalankan fungsi katalitiknya. Pada beberapa kasus, misalnya glikosidase, molekul substrat juga berubah sedikit ketika ia memasuki tapak aktif. Tapak aktif akan terus berubah bentuknya sampai substrat

terikat secara sepenuhnya yang mana bentuk akhir dan muatan enzim ditentukan.

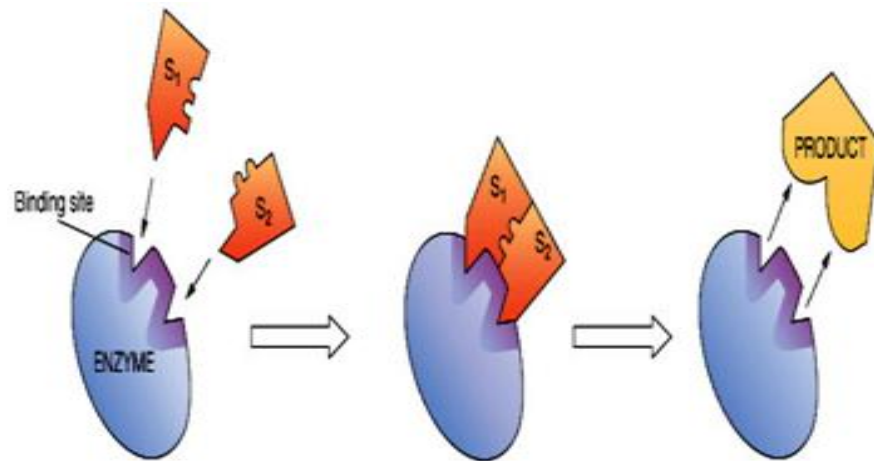


Gambar 7.1. Cara kerja enzim menurut teori ketepatan induksi.

Teori yang mendasarkan bahwa struktur enzim pada binding site nya adalah lentur dan secara spesifik mampu menyesuaikan dengan struktur substrat yang tepat. substrat terikat pada binding site enzim (bentuk substrat tidak harus sesuai dengan bentuk binding site enzim) rekasi akan dapat berjalan.

## 2) Teori Kunci dan Gembok

Teori ini diusulkan oleh Emil Fischer pada 1894. Menurut teori ini, enzim dan substrat akan bergabung bersama membentuk kompleks, seperti kunci yang masuk ke dalam gembok. Di dalam kompleks, substrat dapat bereaksi dengan energi aktivasi yang rendah. Setelah bereaksi, kompleks lepas dan melepaskan produk serta membebaskan enzim. Model ini telah dibuktikan tidak akurat dan model ketepatan induksi lah yang sekarang paling banyak diterima.



Gambar 7.2. Cara kerja enzim menurut teori lock and key.

Teori yang mendasarkan pada kesesuaian bentuk antara enzim dan substrat sehingga memungkinkan untuk berikatan secara spesifik sebagaimana antara gembok dan kunci. substrat terikat pada posisi tertentu pada enzim dengan tepat sesuai (dinding site) bentuknya dan kemudian melakukan reaksi disitu hingga terbentuk produk.

## 9 Faktor yang mempengaruhi kerja enzim

### 1) Perubahan Suhu dan pH

Pada umumnya enzim memiliki aktivitas optimum pada temperatur 30-40°C dan pH 6,5-7,4. Pada temperatur rendah (<20°C) aktivitas enzim sangat rendah karena tidak cukup energi untuk melakukan reaksi. Pada temperatur tinggi enzim mengalami denaturasi (perubahan konformasi) sehingga menjadi tidak aktif.

### 2) Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi enzimatik berbanding langsung dengan konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim, kecepatan reaksi semakin tinggi.

### 3) Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat hanya berpengaruh pada peningkatan kecepatan reaksi di awal saja pada konsentrasi enzim yang konstan, yaitu pada konsentrasi



substrat yang rendah. Semakin tinggi konsentrasi substrat kecepatan reaksi akan semakin tinggi hingga pada batas tertentu dan mencapai maksimum. Apabila reaksi terjadi dengan penambahan substrat yang berlebihan akan menyebabkan penjumlahan enzim sehingga reaksi berjalan konstan. Dengan penambahan konsentrasi enzim akan tingkat kejuhannya akan naik sehingga akan meningkatkan kecepatan reaksinya.

#### 4) Faktor Inhibitor (penghambat)

Inhibitor merupakan senyawa kimia yang bersifat menghambat kerja enzim. Inhibitor terbagi dua kelompok yaitu, inhibitor kompetitif dan inhibitor non kompetitif. Pada inhibitor kompetitif, inhibitor menyerupai substrat, yang dapat bereaksi dengan sisi aktif aktif enzim. Jika sisi aktif enzim sudah terisi oleh inhibitor kompetitif, maka substrat tidak dapat berikatan dengan enzim. Sedangkan pada inhibitor nonkompetitif, Inhibitor melekat pada bagian selain sisi aktif (sisi alosterik), akibatnya bagian sisi aktif enzim sulit berikatan dengan substrat dan enzim tidak dapat mengubah substrat menjadi produk.

### **10 Fungsi utama enzim dalam reaksi**

Fungsi utama enzim dalam reaksi adalah sebagai berikut :

- a. Menurunkan energi aktivasi dengan menciptakan suatu lingkungan yang mana keadaan transisi terstabilisasi (contohnya mengubah bentuk substrat menjadi konformasi keadaan transisi ketika ia terikat dengan enzim).
- b. Menurunkan energi keadaan transisi tanpa mengubah bentuk substrat dengan menciptakan lingkungan yang memiliki distribusi muatan yang berlawanan dengan keadaan transisi.
- c. Menyediakan lintasan reaksi alternatif. Contohnya bereaksi dengan substrat sementara waktu untuk membentuk kompleks Enzim-Substrat antara.
- d. Menurunkan perubahan entropi reaksi dengan menggiring substrat bersama pada orientasi yang tepat untuk bereaksi. Menariknya, efek

entropi ini melibatkan destabilisasi keadaan dasar dan kontribusinya terhadap katalis relatif kecil.

### **Daftar Pustaka**

- Agarwal PK (November 2005). Role of protein dynamics in reaction rate enhancement by enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (43): 15248–56.
- Poedjiadi, Anna dan F.M Titin Supriyanti. (2005). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Pers.
- Sustainable Development. (2001). *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*. France: OECD.
- Yatim, Wildan. (1991). *Revolusi Bioteknologi*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.

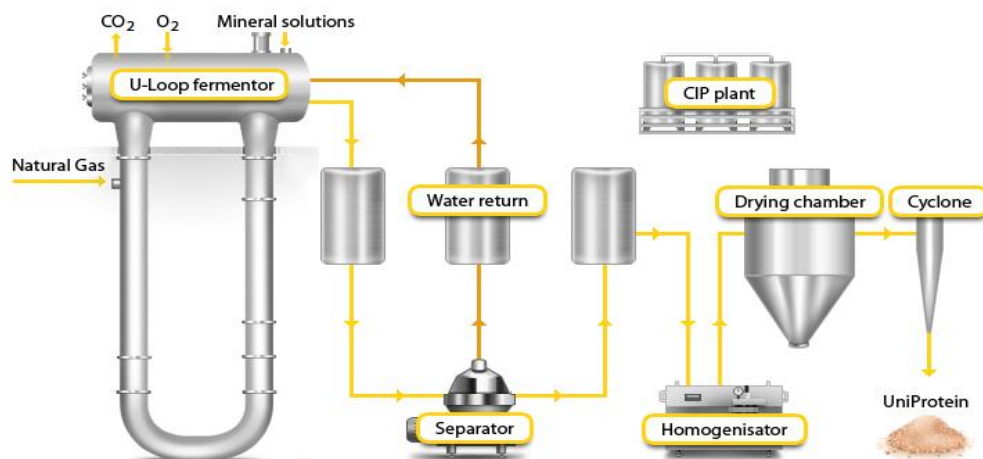
## BAB VIII

### PROTEIN SEL TUNGGAL

Protein sel tunggal merupakan produk pengembangan bahan makanan berkadar protein tinggi yang berasal dari mikroba melalui mekanisme bioteknologi. Istilah protein sel tunggal (PST) digunakan untuk membedakan bahwa protein sel tunggal berasal dari mikro organisme bersel tunggal atau banyak, contohnya seperti bakteri atau alga. Pemanfaatan mikroorganisme tersebut dilakukan untuk menghasilkan kualitas produk makanan berprotein tinggi.

Sejarah penggunaan protein sel tunggal secara komersial dimulai pada era Perang Dunia pertama di negara Jerman dengan memproduksi khamir torula. Operasi utama dalam memproduksi protein sel tunggal adalah dengan cara fermentasi yang bertujuan untuk mengoptimalkan konversi substrat menjadi massa mikrobial.

Contoh penggunaannya antara lain Mikroprotein dari *Fusarium*, Substrat: tepung gandum dan ketan erta *Spirulina* dan *Chlorella*. Contoh diatas dipilih oleh para ilmuwan dalam mengembangkan protein sel tunggal isebabkan kadar protein lebih tinggi dari protein kedelai atau hewan dan memiliki pertumbuhan yang cepat dan tepat.



Gambar 8.1. Peralatan pengolahan protein sel tunggal.

Kejadian kekurangan pangan dan malnutrisi di dunia pada tahun 1970 telah meningkatkan perhatian para ilmuwan biologi pada pemanfaatan sel tunggal. Sebagian besar dari bobot kering sel dari hampir semua spesies memiliki kandungan protein yang tinggi. Oleh karena itu, bobot kering sel tunggal memiliki nilai gizi yang tinggi untuk dikembangkan sebagai alternatif makanan baru.

#### 1. Pertimbangan pembuatan protein sel tunggal

Mikroorganisme yang dibiakkan untuk protein sel tunggal dan digunakan sebagai sumber protein untuk hewan atau pangan harus mendapat perhatian secara khusus. Mikroorganisme yang cocok antara lain memiliki sifat tidak menyebabkan penyakit terhadap tanaman, hewan, dan manusia. Selain itu, nilai gizinya baik, dapat digunakan sebagai bahan pangan atau pakan, tidak mengandung bahan beracun serta biaya produk yang dibutuhkan rendah.

#### 2. Mikroorganisme yang umum digunakan

Protein sel tunggal yang berasal dari kapang berfilamen disebut mikroprotein. Di Amerika Serikat, mikroprotein telah diproduksi secara komersial bernama quorn. Quorn dibuat dengan cara menanam kapang ditempat peragian yang berukuran besar. Setelah membuang air dari tempat peragian, makanan berharga yang tertinggal dicetak menjadi balok-balok yang mudah dibawa.

Beberapa jenis mikroorganisme yang umum digunakan untuk pembuatan protein sel tunggal yaitu : alga *Chlorella*, *Spirulina*, dan *Scenedesmus*; dari khamir seperti : *Candida utilis*; dari kapang berfilamen *Fusarium gramineum*; maupun dari bakteri.

#### 3. Faktor pendukung pengembangbiakan mikroorganisme

Ada dua faktor pendukung pengembangbiakan mikroorganisme untuk protein sel tunggal, yaitu:

- a. laju pertumbuhan sangat cepat jika dibandingkan dengan sel tanaman atau sel hewan dan waktu yang diperlukan untuk penggandaan relatif singkat;

- b. berbagai macam substrat yang digunakan bergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan.
4. Langkah-langkah produksi protein sel tunggal
- Langkah-langkah produk protein sel tunggal adalah sebagai berikut:
- a. Pemilihan dan penyiapan sumber karbon, beberapa perlakuan fisik dan kimiawi terhadap bahan dasar yang diperlukan,
  - b. Penyiapan media yang cocok dan mengandung sumber karbon, sumber nitrogen, fosfor, dan unsur-unsur lain yang penting,
  - c. Pencegahan kontaminasi media,
  - d. Pembiakan mikroorganisme yang diperlukan,
  - e. Pemisahan biomassa microbial dari cairan fermentasi,
  - f. Penanganan lanjut biomassa.
5. Kelebihan protein sel tunggal

Laju pertumbuhan mikroorganisme sangat cepat yaitu dalam ukuran jam dan masih bisa ditingkatkan lagi sehingga dapat diproduksi secara singkat dan jumlah yang tinggi. Pembuatan produk dapat menggunakan bermacam-macam media atau substrat. Sehingga bisa memanfaatkan media yang tidak bersaing dengan kebutuhan manusia dan harga lebih murah. Produksi protein sel tunggal tidak bergantung pada iklim dan musim, dimana proses pembuatan bisa dilakukan didalam ruangan atau media tertutup. Hasil produk memiliki kandungan protein lebih tinggi daripada hewan dan tumbuhan, dimana untuk produksi saat ini lebih mengarah kepada suplemen makanan dan banyak digunakan oleh binaragawan atau suplemen olahraga.

### **Daftar Pustaka**

- Doelle HW. 1994. *Microbial Process Development*. World Scientific. p. 205.
- Ivarson KC, Morita H. 1982. "Single-Cell Protein Production by the Acid-Tolerant Fungus *Scytalidium acidophilum* from Acid Hydrolysates of Waste Paper.". *Appl Environ Microbiol*. 43 (3): 643–647.

- Jean Marx (ed.). *A Revolution in Biotechnology* (see Ch. 6 Litchfield). Cambridge University Press. pp. 1–227.
- Vrati S. 1983. Single cell protein production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluents of biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19: 199–202
- Wu M and Singh AK. Single-cell protein analysis. 2011. *Current Opinion in Biotechnology*. 23:1–6.

## **BAB IX**

### **REKAYASA GENETIKA**

#### **9.1 Pengertian dan sejarah perkembangan rekayasa genetika**

Rekayasa genetika adalah nama dari sekelompok teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi, meniru, memodifikasi dan mentransfer materi genetik dari sel, jaringan atau organisme lengkap. Rekayasa genetika merupakan penerapan teknik-teknik biologi molekular untuk mengubah susunan genetik dalam kromosom atau mengubah sistem ekspresi genetik yang diarahkan pada kemanfaatan tertentu.

Perkembangan penelitian genetika mulai populer melalui penelitian Gregor Johann Mendel (1865), beliau melakukan analisis yang cermat dengan interpretasi yang tepat atas hasil-hasil percobaan persilangannya pada tanaman kacang ercis. Dan di kenal sebagai “Bapak Genetika”. Pada tahun 1875, Oscar Hertwig mulai melakukan penelitian menggunakan mikroskop guna mengamati sperma landak memasuki sel telur dan dua inti fusi. Upaya pengembangan terus dilakukan dengan dimulainya membangun peta genetik yang dikenalkan oleh A.H. Sturtevant tahun 1913.

Dunia sains dibidang rekayasa genetik semakin meningkatkan kemajuan dengan penelitian ke tingkat yang lebih mendalam. Penelitian tingkat molekul dilakukan, James Watson dan Francis Crick (1953) mempopulerkan teori yang disebut “centra dogma” yang mendasari bidang ilmu biologi molekuler. Dengan ditemukannya model struktur molekul DNA kemudian disebut genetika molekuler.

Penelitian pada ternak melalui teknik rekayasa genetika terus ditingkatkan, seperti teknik fertilisasi invitro menggunakan ternak kelinci pada tahun 1954, Domba kembar lahir melalui pemisahan embrio buatan pada tahun 1962 dan mulai diproduksi insulin dengan teknik rekayasa genetika pada tahun 1979. Pada tahun 1980, berhasil dilakukan transgenik pertama (rekayasa genetika) tikus.

Pada tahun 1983, Kary Mullis, ahli biokimia menemukan reaksi *polymerasein* atau *polymerase chain reaction* yang merupakan teknik yang memungkinkan para ilmuwan untuk mereproduksi potongan DNA yang lebih cepat dari sebelumnya. (Mullis dianugerahi Hadiah Nobel untuk ini pada tahun 1993). Sedangkan teknik kloning pada ternak mulai menunjukkan hasil dimana Ian Wilmut dan rekan, Roslin Institute, Skotlandia (1997) mengumumkan kelahiran domba (Dolly) kloning dengan transfer inti sel menggunakan domba dewasa sebagai donor inti dan ovum enukleasi domba lainnya sebagai penerima. 11 Februari 2001: Publikasi di jurnal Nature dan Science dari draft pertama dari genom manusia diperkirakan antara 26.000 dan 40.000 gen yang menunjukkan perkembangan ilmu biologi kepada level genetik dan molekuler.

## **9.2. Komponen dalam rekayasa genetika**

Ada dua komponen yang terlibat dalam rekayasa genetika, antara lain:

### 1) Plasmid

Plasmid adalah gen yang melingkar menyerupai cincin yang terdapat dalam sel, tak terikat pada kromosom. Keuntungan penggunaan plasmid adalah dapat di pindahkan dari satu sel ke sel yang lain, misalnya melalui cara transformasi.

### 2) Enzim

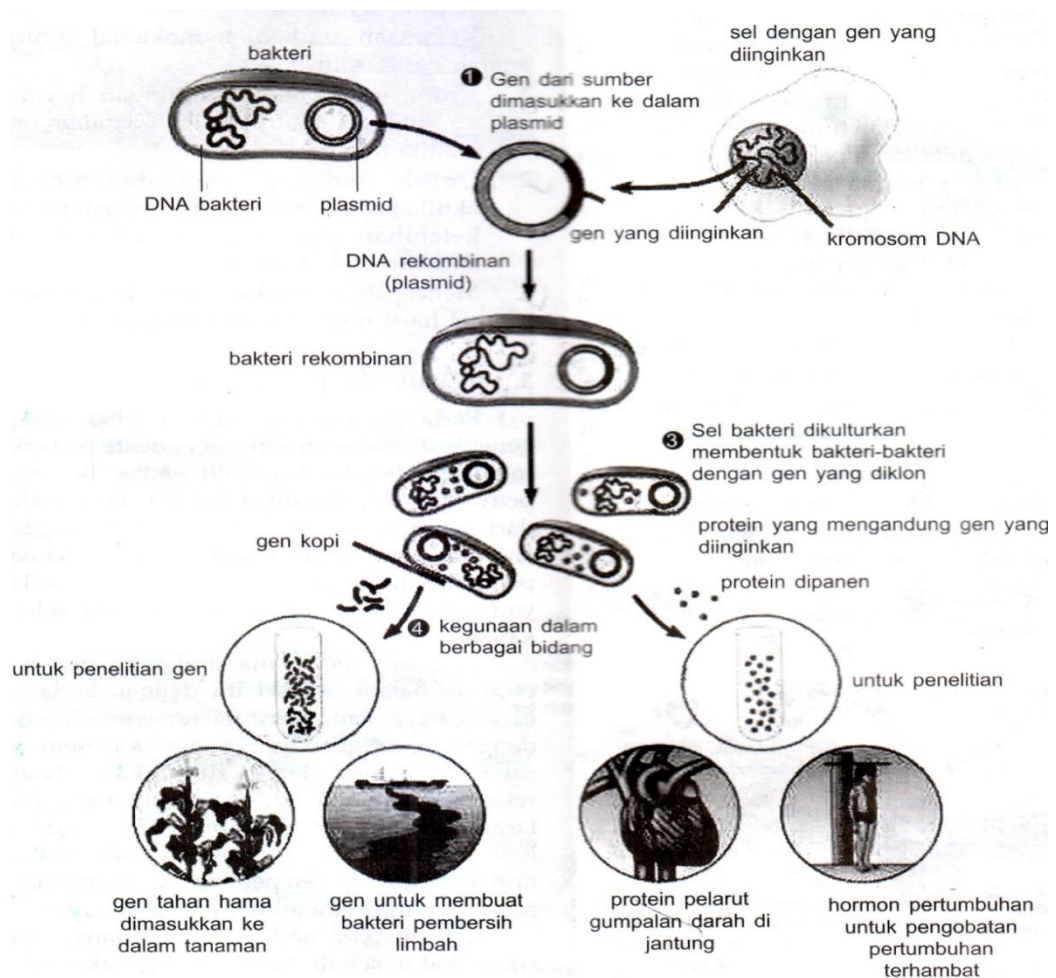
Dalam rekayasa genetika dikenal dua macam bahan kimia yang berperan penting. Kedua macam bahan kimia tersebut adalah enzim pemutus (retriksi endonuklease) dan enzim perekat (ligase). Enzim retriksi endonuklease merupakan enzim khusus dari bakteri yang berguna sebagai alat pertahanan tubuh. Misalnya untuk melawan DNA asing yang menyusup masuk, seperti yang berasal dari virus. Dalam dunia rekayasa genetika, enzim tersebut bertindak sebagai gunting biologi yang berfungsi untuk memotong/ menggunting rantai DNA pada tempat- tempat khusus.



### 9.3. Teknik rekayasa genetika

#### a. Teknik Plasmid

Melalui teknik plasmid dalam rekayasa genetika tersebut, para ahli di bidang bioteknologi dapat mengembangkan tanaman transgenik yang resisten terhadap hama dan penyakit, adaptif terhadap kekeringan dan kondisi tanah yang tidak subur dan lain-lain. Teknik ini dilakukan dengan cara mengambil plasmid dari bakteri tertentu lalu disisipkan gen yang diinginkan dari kromosom DNA menggunakan enzim pemotong. Setelah itu ditempatkan kedalam sel bakteri rekombinan yang telah dikeluarkan plasmid untuk kemudian dibiakkan dengan cara kultur sel.



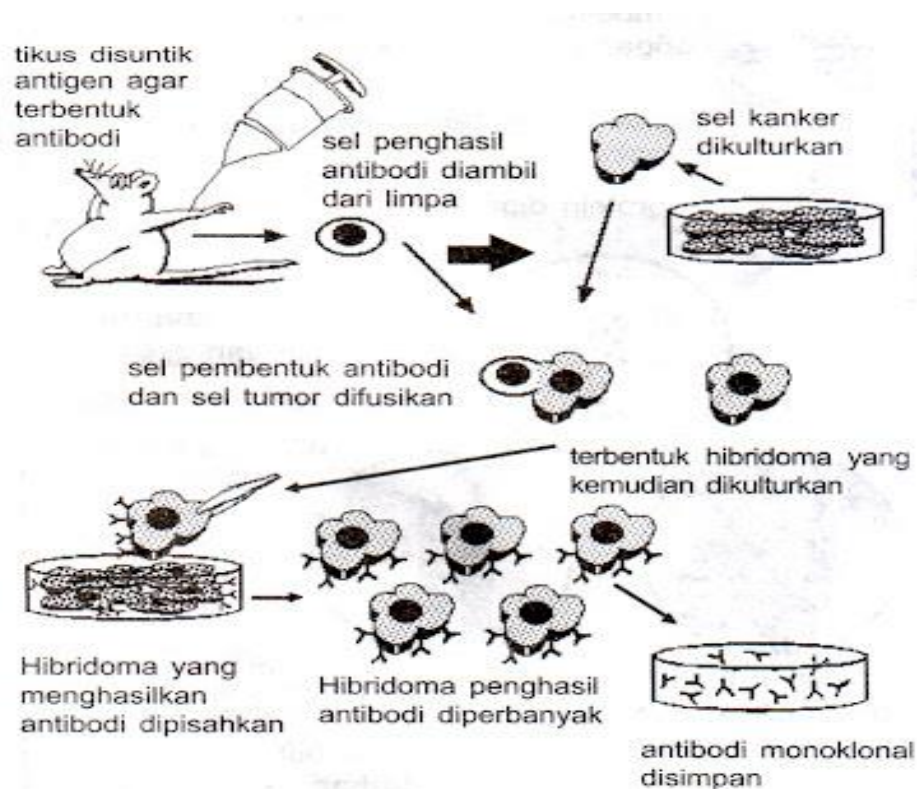
Gambar 9.1. Teknik rekayasa genetika menggunakan plasmid bakteri.

b. Teknik Hibridoma

Teknik hibridoma adalah teknik pembuatan sel yang dihasilkan dari fusi antara sel limfosit B yang menghasilkan antibodi dengan sel kanker yang memiliki karakter cepat membelah. Sifat dari sel hibridoma ini adalah imortal. Contohnya dalam pembuatan antibiotik monoklonal.

Adapun tahapan-tahapan teknik hibridoma adalah sebagai berikut:

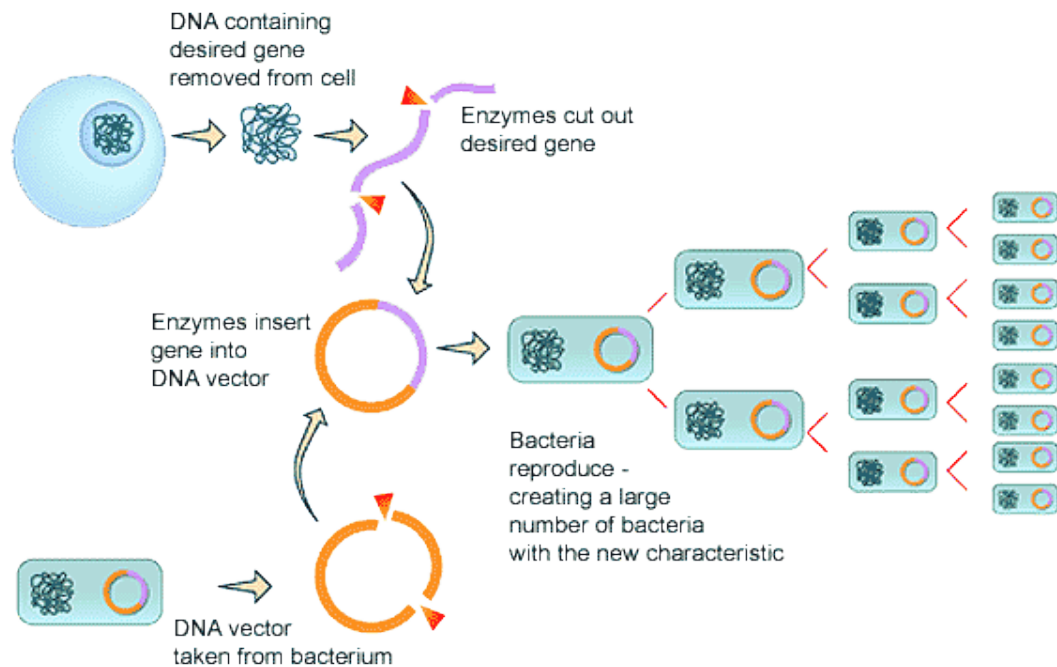
- Menginjeksikan antigen ke tubuh kelinci atau tikus, kemudian limpanya dipisahkan.
- Dilakukan peleburan sel-sel limpa dengan mieloma (sel kanker), sehingga sel limpa ini akan menghasilkan sel plasma hingga sel antibiotik.
- Kemudian sel antibiotik ini dikembangkan dan disuntikkan kembali pada hewan yang akan dikembangkan dengan kultur agar dihasilkan lebih banyak antibiotik.



Gambar 9.2. Pembuatan antibody monoklonal.

c. *Gene Splicing* (Pemisahan Gen)

Pemisahan gen (*gene splicing*) Adalah proses di mana fragmen DNA dari satu atau lebih mikroorganisme yang berbeda digabungkan untuk membentuk rDNA (DNA rekombinan) dan dibuat untuk berfungsi dalam sel organisme inang.



Gambar 9.3. Contoh proses pemisahan gen (*gene splicing*).

d. Terapi gen

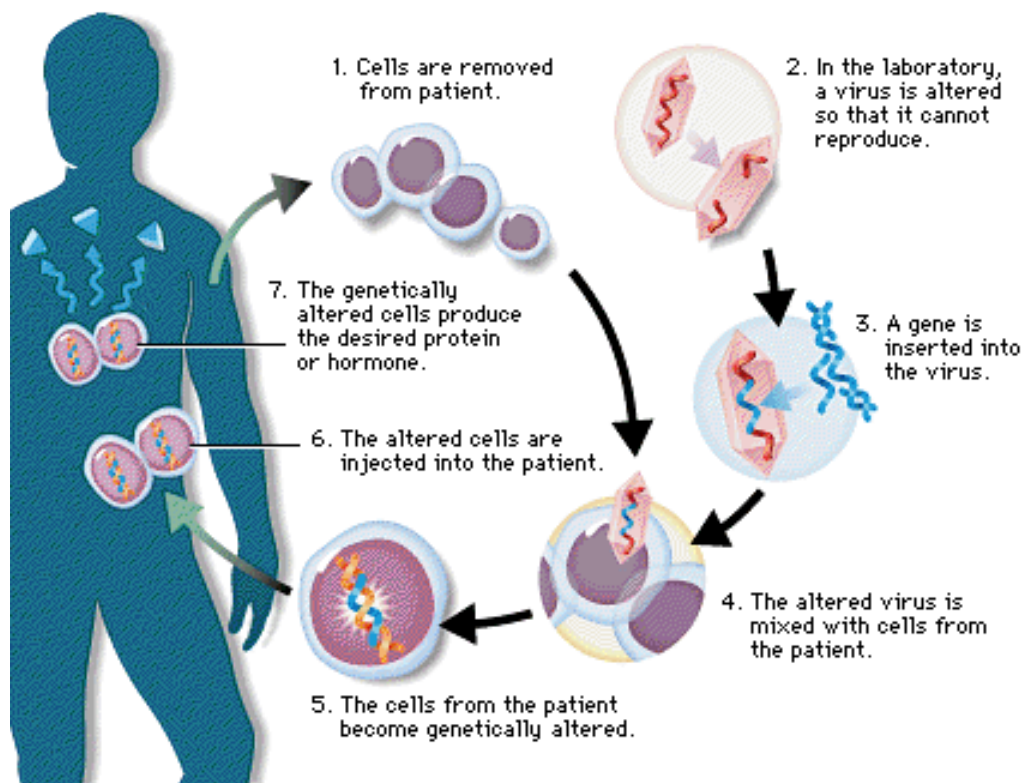
Terapi gen adalah teknik untuk mengoreksi gen-gen yang cacat yang bertanggung jawab terhadap suatu penyakit atau perbaikan kelainan genetik yang terjadi karena mutasi pada satu gen, seperti penyakit fibrosis sistik, dengan mempernaiki gennya. Penggunaan terapi gen pada penyakit tersebut dilakukan dengan memasukkan gen normal yang spesifik ke dalam sel yang memiliki gen mutan.

Terapi gen pertama dilakukan pada tanggal 14 September 1990. Ashanti DeSilva dirawat untuk SCID, Dokter menghapus/ membuang sel darah putihnya, dimasukkan gen yang hilang ke dalam WBC dan kemudian menempatkan mereka kembali ke dalam aliran darahnya. Ini

memperkuat sistem kekebalan tubuh, tapi itu hanya bekerja selama beberapa bulan.

Tahapan-tahapan teknik terapi gen adalah sebagai berikut :

- 1) Menambahkan gen-gen normal ke dalam sel yang mengalami ketidaknormalan.
- 2) Melenyapkan gen abnormal dengan gen normal dengan melakukan rekombinasi homolog.
- 3) Mereparasi gen abnormal dengan cara mutasi balik selektif, sedemikian rupa sehingga akan mengembalikan fungsi normal gen tersebut.
- 4) Mengendalikan regulasi ekspresi gen abnormal tersebut, lebih ke arah gagasan mencegah diekspresikannya gen-gen yang jelek atau abnormal, dikenal dengan istilah gene silencing.



Gambar 9.4. Proses terapi gen pada manusia.

Pada terapi gen, vektor A memberikan gen terapeutik ke dalam sel target pasien. Lalu sel target terinfeksi dengan vektor virus kemudian materi genetik vektor dimasukkan ke dalam sel target. Protein fungsional yang dibuat dari gen terapeutik menyebabkan sel untuk kembali ke keadaan normal.

## 10. Transfer dalam rekayasa genetika

Metode transfer dalam rekayasa genetika secara umum dibagi menjadi tiga teknik yaitu:

### a. Transfer Gen

Transfer gen atau juga dikenal dengan kloning ini dilakukan dengan menyisipkan potongan gen yang dikehendaki dari suatu spesies lain sehingga spesies ke spesies lain sehingga spesies yang di klon tadi akan memiliki sifat tambahan sesuai dengan gen yang telah di sisipkan ke dalam sel tubuhnya.

Meskipun konsep transfer gen relatif sederhana, pelaksanaannya kenyataannya sangat susah dilakukan. Biokimia Amerika Paul Berg (1926), sering disebut sebagai "bapak rekayasa genetika". Ia mengembangkan metode untuk menggabungkan DNA dari dua organisme yang berbeda, virus monyet yang dikenal sebagai SV40 dan virus yang disebut *lambda fag*. Para ahli biokimia Amerika Stanley Cohen (1922-) di Stanford University, dan Herbert Boyer (1936) di Universitas California dan San Francisco, menemukan enzim yang sangat meningkatkan efisiensi prosedur Berg.

### b. Transfer Embrio

Transfer embrio ini dilakukan dengan jalan mengambil ovum kemudian membuahnya dengan sperma, setelah terjadi zigot yang akan berkembang menjadi embrio, embrio- embrio ini di transfer atau ditanam dalam rahim individu betina sampai lahir menjadi individu dewasa.

c. Transfer Inti

Prinsip dari transfer inti yaitu dengan memasukkan inti sel (nukleus) dari satu spesies ke dalam sel spesies lain yang sebelumnya inti selnya telah dibuang atau dikosongkan.

## 11. Manfaat rekayasa genetika

Rekayasa genetik dapat meningkatkan keragaman genetik, dan menghasilkan alel varian lagi yang juga bisa menyeberang dan ditanamkan ke spesies lain. Rekayasa genetika juga ketika ada suatu penyakit bisa dicegah dengan mendeteksi orang yang secara genetik rentan terhadap penyakit keturunan tertentu, dan mempersiapkan diri untuk tak terelakkan.

Guna mencegah penyakit-penyakit menular, dengan metode rekayasa genetika dapat diobati yaitu menanamkan gen yang kode untuk protein antivirus spesifik untuk setiap antigen. Hewan dan tumbuhan dapat 'dibuat' untuk menunjukkan karakteristik yang diinginkan. Gen-gen juga bisa dimanipulasi di pohon misalnya, untuk menyerap lebih banyak CO<sub>2</sub> dan mengurangi ancaman pemanasan global.

Disamping manfaat rekayasa genetika sebagai buah dari perkembangan ilmu pengetahuan, namun ada beberapa pertimbangan yang bisa menjadi dampak negatif bagi alam dan manusia. Alam adalah rantai yang saling terkait sangat kompleks yang terdiri dari banyak spesies terkait dalam rantai makanan. Beberapa ilmuwan percaya bahwa memperkenalkan gen yang dimodifikasi secara genetik mungkin memiliki efek ireversibel dengan konsekuensi yang belum diketahui.

Garis perbatasan rekayasa genetika pada banyak isu-isu moral, khususnya yang melibatkan agama, yang pertanyaan apakah manusia memiliki hak untuk memanipulasi hukum dan tentu saja alam.

## **Daftar Pustaka**

- Abubakar M., Saeed A, Kul O. 2015. The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Engelhard M., Hagen K, and Boysen M. 2009. Genetic Engineering in Livestock. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Montaldo HH. 2006. Genetic engineering applications in animal breeding. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, Vol.9 No.2.
- Morgan RM. 2006. The genetics revolution : history, fears, and future of a life-altering science. British Library, United States of America.
- Peacock KW. 2010. Biotechnology and genetic engineering. Infobase Publishing, United States of America
- Primrose SB and Twyman RM. 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics; Seventh Edition. Blackwell Publishing, Australia.

## **BAB X**

### **TEKNIK KLONING**

#### **10.1. Pengertian Kloning**

Kloning berasal dari kata "Klon" dalam bahasa Yunani yang berarti ranting yang dapat mereplikasi sendiri dan akhirnya tumbuh menjadi pohon. Kloning terjadi secara alami dalam banyak jenis tanaman yaitu dengan cara vegetatif. kloning adalah cara bereproduksi secara aseksual atau untuk membuat salinan atau satu set salinan organisme mengikuti fusi atau memasukan inti diploid kedalam oosit.

Kloning dalam biologi adalah proses menghasilkan populasi serupa genetik individu identik yang terjadi di alam saat organisme seperti bakteri, serangga atau tanaman bereproduksi secara aseksual . Secara definisi, klon adalah sekelompok organisme hewan maupun tumbuhan melalui proses reproduksi aseksual yang berasal dari satu induk yang sama. Setiap anggota klon tersebut memiliki jumlah dan susunan gen yang sama sehingga kemungkinan besar fenotifnya juga sama. Kloning pada hewan dilakukan mula-mula pada hewan amfibi (kodok), dengan mengadakan transplantasi nukleus ke dalam telur kodok yang dienukleasi atau dihilangkan inti selnya. Sebagai donor, digunakan nukleus sel somatik dari berbagai stadium perkembangan. Ternyata donor nukleus dari sel somatik yang diambil dari sel epitel usus kecebong pun masih dapat membentuk embrio normal.

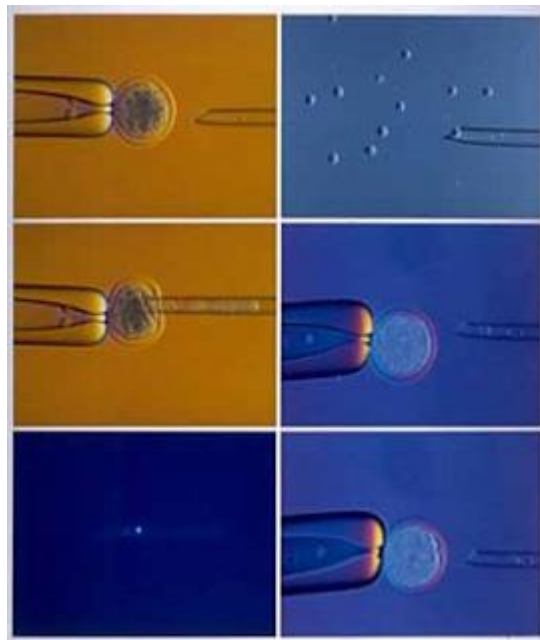
#### **10.2. Teknik-teknik dalam kloning**

Transfer nukleus pada dasarnya membutuhkan dua sel, yaitu satu sel donor dan satu lagi sel oosit atau sel telur. Telur matur sebelum dibuahi dibuang intinya atau nukleusnya. Proses pembuangan nukleus tadi dinamakan proses enukleasi. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan informasi genetisnya. Ke dalam telur yang telah dienukleasi tadi kemudian dimasukkan nukleus (donor) dari sel somatik. Penelitian membuktikan bahwa sel telur



akan berfungsi terbaik bila berada dalam kondisi anfertisasi, sebab hal ini akan mempermudah penerimaan nukleus donor seperti dirinya sendiri.

Hans Spemann (1928), melakukan eksperimen dengan embrio salamander dengan melakukan percobaan dengan tehnik transfer inti sel embrio salamander ke sel tanpa inti atau tanpa nukleus. Di dalam telur, inti sel donor tadi akan bertindak sebagai inti sel zigot dan membelah serta berkembang menjadi blastosit. Blastosit selanjutnya ditransfer ke dalam uterus induk pengganti (*surrogate mother*). Jika seluruh proses tadi berjalan baik, suatu replika yang sempurna dari donor akan lahir. Jadi sebenarnya setelah terbentuk blastosit in vitro, proses selanjutnya sama dengan proses bayi tabung yang tehnologinya telah dikuasai oleh para ahli obstetri ginekologi.



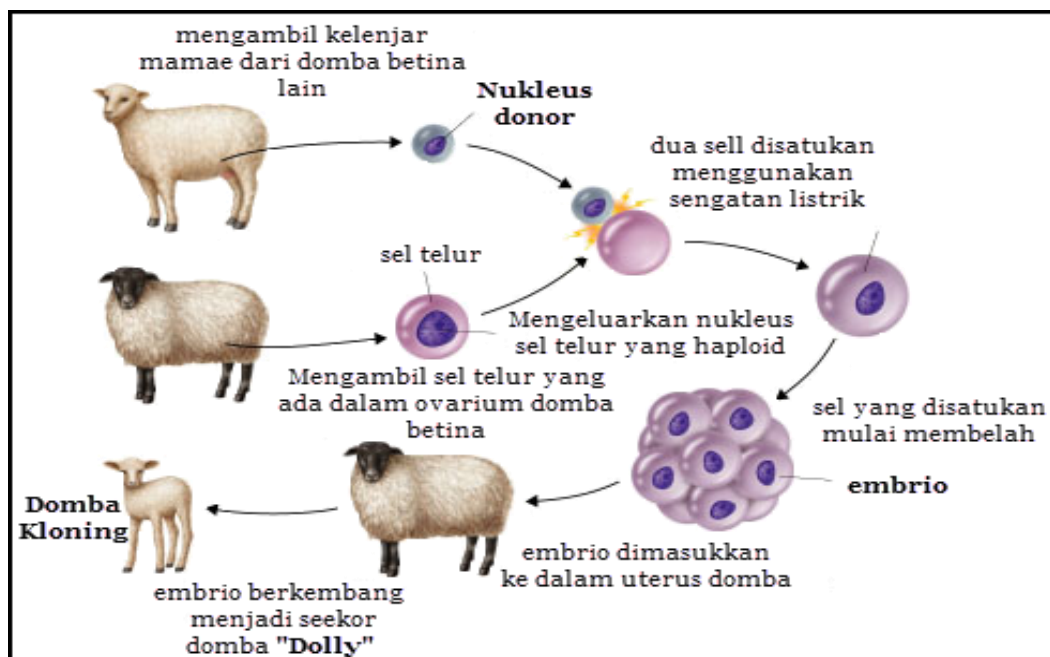
Gambar 10.1. Transfer Nukleus (inti)

Ada beberapa tehnik kloning yang dikenal, antara lain tehnik Roslin dan Tehnik Honolulu yang selanjutnya akan dibahas mengenai tehnik-tehnik kloning tersebut.

a. Teknik Roslin

Kloning domba Dolly merupakan peristiwa penting dalam sejarah kloning. Pada domba dolly langkah kloning dimulai dengan pengambilan sel puting susu seekor domba. Sel ini disebut somatis (sel tubuh). Dari domba betina lain diambil sebuah ovum (sel telur) yang kemudian dihilangkan inti selnya. Proses berikutnya adalah fusi (penyatuan) dua sel tersebut dengan memberikan kejutan listrik yang mengakibatkan 'terbukanya' membran sel telur sehingga kedua sel bisa menyatu. Dari langkah ini telah diperoleh sebuah sel telur yang berisi inti sel somatis. Ternyata hasil fusi sel tersebut memperlihatkan sifat yang mirip dengan zigot, dan akan mulai melakukan proses pembelahan.

Sebagai langkah terakhir, 'zigot' tersebut akan ditanamkan pada rahim induk domba betina, sehingga sang domba tersebut hamil. Anak domba yang lahir itulah yang dinamakan Dolly, dan memiliki sifat yang sangat mirip dengan domba donor sel puting susu tersebut di atas. Gambar proses kloning pada domba dolly dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 10.2. Proses kloning ternak domba dolly.

b. Teknik Honolulu

Pada Juli 1998, sebuah tim ilmuwan dari Universitas Hawaii mengumumkan bahwa mereka telah menghasilkan tiga generasi tikus kloning yang secara genetik identik. Teknik ini diakreditasi atas nama Teruhiko Wakayama dan Ryuzo Yanagimachi dari Universitas Hawaii. Yanagimachi menciptakan tiga generasi berturut-turut. Sebelum keberhasilan ini, diperkirakan bahwa tahap awal di mana embrio genom hewan mengambil lebih (dua-sel pada tikus) menyulitkan nukleus pemrograman ulang terjadi. Tikus adalah salah satu yang untuk melakukan kegiatan mengkloning tidak seperti domba. Pada tikus, sel telur melai melakukan mitosis segera setelah proses pembuahan terjadi, sehingga menyebabkan peneliti hanya memiliki sedikit waktu untuk memprogram ulang inti baru.

Teknik baru ini memungkinkan untuk melaksanakan penelitian lebih lanjut tentang bagaimana tepatnya sebuah telur memprogram ulang sebuah nukleus. Tikus bereproduksi dalam kurun bulanan, jauh lebih cepat dibanding dengan domba. Hal ini menguntungkan dalam hasil penelitian jangka panjang. Kloning juga sedang diterapkan pada spesies lain. Sebagai contoh, pada awal tahun 2000, Akira Onishi dan koleganya di Jepang, mencoba untuk mengkloning babi dengan menggunakan teknik Honolulu (Buchana, F., 2000).

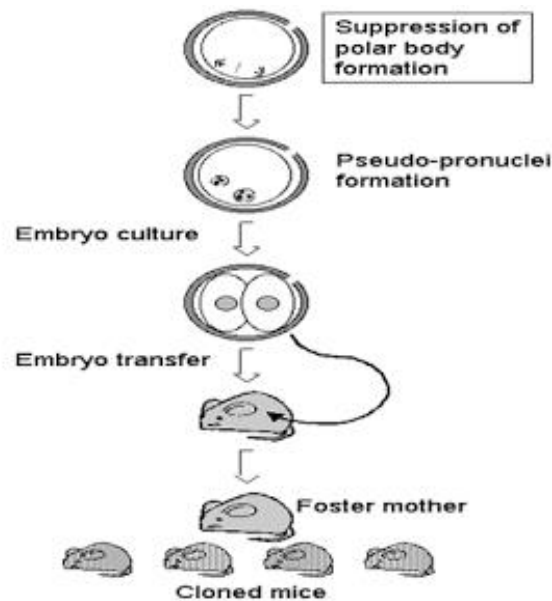
Para pendukung teknologi kloning berpendapat bahwa teknologi kloning dan penelitian akan meningkatkan kualitas ilmu pengetahuan dan kehidupan dengan menjawab permasalahan-permasalahan biologi secara kritis, dan memajukan dunia peternakan, genetika dan ilmu medis. Alasan utama di balik kegunaan kloning adalah bahwa dengan menghasilkan salinan genetik yang hampir identik dari suatu organisme, hasil yang diperoleh lebih cepat dan lebih dapat diprediksi dibandingkan dengan teknik reproduksi sebelumnya seperti inseminasi buatan, yang membutuhkan biaya yang mahal (Tong, W F., 2002). Ada beberapa

perbedaan mendasar antara tehnik kloning Roslin yang diterapkan oleh Ian Walmut dan tehnik Honolulu yang dilakukan oleh Wakayama. Perbedaannya dapat dilihat pada Tabel berikut:

Tabel 10.1. Perbedaan tehnik kloning roslin dan Honolulu.

<b>Perbedaan</b>	<b>Tehnik Roslin</b>	<b>Tehnik Honolulu</b>
Objek Penelitian	Domba <i>Scottish Blackface</i>	Tikus
Sel yang Digunakan	Sel oosit Sel donor: sel kelenjar <i>mammae</i>	Sel oosit Sel donor: sel otak dan sel kumulus
Proses	Kejutatan energi listrik digunakan untuk menggabungkan dua sel	Tidak menggunakan kejutatan energi listrik
Perlakuan Terhadap Sel	Sel dipaksa untuk berada dalam fase G0	Sel tidak dipaksa untuk berada dalam fase G0
Hasil Kloning	Domba Dolly, hanya berumur 6 Tahun.	Menciptakan kloning dari kloning dengan total lima puluh kloning tikus.
Persentase Keberhasilan	0,361%.	3 %

Sedangkan untuk lebih jelasnya mengenai proses kloning Honolulu dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 10.3. Tahapan dari proses kloning teknik Honolulu.

## 11. Dampak Kloning

Teknologi reproduksi yang dikembangkan oleh manusia bertujuan untuk memberi keuntungan atau meningkatkan kesejahteraan manusia. Namun, teknologi reproduksi juga tidak lepas dari dampak negatif yang dapat ditimbulkannya. Oleh karena itu, setiap teknologi reproduksi yang ditemukan atau dikembangkan oleh para ahli saat ini selalu menimbulkan pro dan kontra baik di kalangan para ahli sendiri maupun kalangan masyarakat.

### a. Dampak positif teknik kloning

- Menumbuhkan individu baru yang bebas penyakit keturunan seperti diabetes, leukimia, parkison dan obesitas.
- Pengklonan sel kloning dapat menghasilkan sel, jaringan, atau organ yang sesuai untuk pengobatan beberapa penyakit yang disebabkan oleh kegagalan atau kerusakan fungsi suatu organ.
- Pengkloningan akan sangat bermanfaat dilakukan pada hewan ternak untuk memenuhi kebutuhan pangan. Misalnya pengkloningan kembar pada sapi untuk menghasilkan keturunan yang lebih banyak selama

satu periode kelahiran dengan tujuan untuk meningkatkan produksi protein asal daging sapi.

- Alternatif untuk melestarikan hewan langka, sehingga keberadaan hewan - hewan langka terus bisa dilestarikan.

b. Dampak negatif teknik kloning

- Dapat disalahgunakan untuk menciptakan spesies atau ras baru dengan tujuan tertentu yang bertentangan dengan nilai kemanusiaan.
- Kloning pada hewan belum sepenuhnya sempurna, contohnya domba Dolly ternyata menderita berbagai penyakit yang akhirnya memaksa para ilmuwan untuk melakukan eutanasi.
- Terjadi kekacauan kekerabatan dan identitas diri dari hasil kloning maupun induknya.
- Individu hasil kloning tidak akan mendapatkan imunitas bawaan, sehingga individu hasil kloning tersebut akan mudah terserang penyakit karena tidak mendapatkan imunitas bawaan sebagai pertahanan pertama terhadap infeksi penyakit.
- Berkurangnya keanekaragaman suatu spesies, karena individu yang dihasilkan dari proses pengkloningan sama persis dengan DNA maupun sifat dan fisik induknya.
- Individu hasil kloning sel - selnya diperoleh dari induknya. Ini berarti umur sel - sel hasil kloning pun sama dengan umur sel - sel induknya. Oleh karena itu, individu hasil kloning pun akan memiliki umur sama dengan induknya.

Kemajuan pesat bioteknologi dan rekayasa kloning hewan/ternak akan berdampak sangat menguntungkan di masa datang dalam menunjang potensi dan pengembangan lanjut bidang pertanian, peternakan, biomedik, farmasi dan riset-riset dasar serta kriopreservasi material genetik dari spesies hewan langka atau unggul secara maksimal. Produk utama yang diharapkan dari kloning adalah peluang menghasilkan individu superior hasil manipulasi genetik.

## Daftar Pustaka

- Beyhan Z., Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, dan First NL. 2007. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Molecular Reproduction and Development*. 74: 18-27.
- Ciptadi,G. 2007. Pemanfaatan teknologi kloning hewan untuk konservasi sumber genetik ternak lokal melalui realisasi bank sel somatis. *J. Ternak Tropika*. 6(2): 60-65.
- Garry FB., Adams R, McCann JP, Odde KG. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear J. *Ternak Tropika* Vol. 6, No. 2; 60-65, 2007 55 transfer cloning. *J. Theriogenology* 1996; 45: 141 – 152.
- Martin M., Adams C, dan Wiseman B. 2004. Pre-weaning performance and health of pigs born to cloned (fetal cell derived) swine versus non-cloned swine. *Theriogenology*. 62: 113-122.
- Morgan RM. 2006. *The genetics revolution : history, fears, and future of a life-altering science*. British Library, United States of America.
- Panarace M., Aguero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Pontes J.E.F, Junio J.C.E, Mower S, dan Medina M. 2007. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*. 67: 142-151.
- Rudenko L., Matheson JC, dan Sundlof SF. 2007. Animal cloning and the FDA-- the risk assessment paradigm under public scrutiny. *Nat Biotechnol*. 25: 39-43.
- Shiga, K., Fujita T, Hirose K, Sasae Y and Nagai T. 1999. Production of Calves by Transfer of Nuclei From Cultured Somatic Cells Obtained From Japanese Black Bull. *J. Theriogenology* 52: 527 – 535, 1999. Renard, J.P., Qi Zhou, D. LeBourhis, P. Chavate-Palmer, L. Hue, Y Heyman and X. Vignon. 2002. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *J. Theriogenology*. 57 (1): 203 – 222.

Tome D., Dubarry M, dan Fromentin G. 2004. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells* 6: 172-177.



## **BAB XI**

### **TERNAK TRANSGENIK**

#### **11.1. Pengertian Transgenik**

Transgenik berasal dari dua kata yaitu, “trans” yang artinya pindah dan “gen” artinya membawa sifat. Transgenik adalah memindahkan gen dari satu makhluk hidup ke makhluk hidup lainnya, baik dari satu tanaman ketanaman lainnya, atau dari gen hewan ke tanaman. Prinsip yang mendasari dalam produksi hewan transgenik adalah pengenalan gen asing (gen disisipkan disebut transgen). Gen yang mempunyai potensi untuk menghasilkan ternak transgenik adalah GH(*growth hormone*) dan *Growth hormone-releasing hormone* (GHRH) serta *Insulin like Growth Factor I* (IGF I).

#### **11.2. Metode transgenik**

Hewan transgenik dapat diproduksi dengan menggunakan tiga metode dasar yaitu:

1. Mikroinjeksi DNA

Tikus adalah hewan pertama yang menjalani transfer gen sukses menggunakan mikroinjeksi DNA. Metode ini melibatkan transfer dari konstruk gen yang diinginkan dari anggota lain dalam spesies yang sama atau berbeda ke dalam pronukleus dari sel reproduksi. Kemudian, hasil transfer akan menjadi kultur in vitro sampai mencapai fase embrio, kemudian ditransfer ke penerima perempuan.

2. Retrovirus-dimediasi transfer gen

Sebuah retrovirus adalah virus yang membawa materi genetik dalam bentuk RNA daripada DNA. Metode ini melibatkan sebuah retrovirus yang digunakan sebagai vektor untuk mentransfer materi genetik ke dalam sel induk, sehingga chimera, organisme yang terdiri dari jaringan atau bagian dari konstitusi genetik yang beragam. Chimera yang bawaan untuk

sebanyak 20 generasi sampai homozigot (membawa transgen yang diinginkan di setiap sel) keturunan transgenik dilahirkan.

### 3. Induk embrio sel (Stem sel)-dimediasi transfer gen

Metode ini melibatkan isolasi sel batang totipoten (stem sel yang dapat berkembang menjadi jenis sel khusus) dari embrio. Gen yang diinginkan dimasukkan ke dalam sel-sel ini. Sel mengandung DNA yang diinginkan dimasukkan ke dalam embrio inang, sehingga menghasilkan hewan chimeric.

## 11.3. Produksi ternak transgenik

Ada tiga alasan umum mengapa hewan transgenik tetap diproduksi pada Produksi Peternakan, diantaranya:

- 1) Pemanfaatan teknologi transgenik memungkinkan diperolehnya ternak dengan karakteristik unggul, misalnya untuk meningkatkan produksi.
- 2) Ternak transgenik digunakan sebagai suatu cara memodifikasi anatomi dan fisiologi ternak itu sendiri. Ini dilakukan dengan melakukan perubahan pada rangkaian DNA genom.
- 3) Ternak transgenik dibuat khusus untuk memproduksi protein manusia, yang dapat saja berupa enzim atau hormon.

Seekor ternak dapat dikatakan sebagai ternak transgenik bila memenuhi kriteria:

- Integrasi dari gen yang ditransfer ada pada semua sel-sel somatik.
- Transmisi dari gen yang ditransfer stabil pada semua keturunan
- Ekspresi dari gen yang ditransfer DNA > mRNA > protein.
- Aktivitas biologi dari protein hasil ekspresi gen yang ditransfer.

Isu terkait dengan teknologi transgenik adalah kondisi mengaburkan garis antara spesies dengan menciptakan kombinasi transgenik. Mungkin ada risiko kesehatan yang berhubungan dengan transgenik. Mungkin juga ada efek jangka panjang terhadap lingkungan ketika hewan transgenik dilepaskan ke lapangan. Berbagai bioetika berpendapat bahwa itu adalah salah untuk

menciptakan hewan yang akan menderita sebagai akibat dari perubahan genetik.

#### **11.4. Ternak-ternak hasil transgenik**

##### a. Ikan transgenik

###### - Superfish

Peningkatan pertumbuhan dan ukuran gen hormon pertumbuhan dimasukkan ke dalam telur yang telah dibuahi. Salmon transgenik tumbuh sekitar 10 - 11 kali lebih cepat dari ikan normal.

###### - ikan glo

GM zebra ikan air tawar (*Danio rerio*) menghasilkan dengan mengintegrasikan gen protein fluorescent dari ubur-ubur menjadi embrio ikan.

##### b. Tikus transgenik

###### - Tikus Alzheimer

Dalam otak pasien Alzheimer, sel-sel saraf mati yang terjerat dalam protein disebut amiloid. Tikus dibuat dengan memperkenalkan amyloid gen prekursor ke dalam telur dibuahi tikus.

###### - Tikus Pintar

Model biologis direkayasa untuk overexpress reseptor NR2B di jalur sinaptik. Hal ini membuat tikus belajar lebih cepat seperti remaja sepanjang hidup mereka.

##### c. Sapi transgenik

Sapi transgenik Sapi transgenik yang dibuat untuk menghasilkan protein laktoferin dan interferon dalam susu mereka. Prion sapi bebas tahan terhadap penyakit sapi gila.

##### d. Sapi transgenik penghasil ASI

Para peneliti berhasil menyisipkan gen laktoferin manusia ke dalam embrio sapi. Embrio tersebut berkembang menjadi “HERMAN “ sapi

jantan transgenik dan telah menjadi bapak dari 8 ekor anak sapi betina transgenik yang dapat menghasilkan produksi air susu mirip dengan air susu ibu.

### **Daftar Pustaka**

- Blanchard A and Kelly M. 2005. Transgenic Animals. An Interactive Qualifying Project Report, Faculty of Worcester Polytechnic Institute.
- Engelhard M., Hagen K, and Boysen M. 2009. Genetic Engineering in Livestock. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Houdebine LM. 2009. Methods to Generate Transgenic Animals. Genetic Engineering in Livestock. Available from: <http://www.springer.com/978-3-540-85842-3>.
- Montaldo HH. 2006. Genetic engineering applications in animal breeding. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458, Vol.9 No.2.
- Salamone D., Bevacqua R, Bonnet FP, Gambini A, Canel N, Hiriart MI, Vichera G, Moro L and Jarazo J. Recent advances in micromanipulation and transgenesis in domestic mammals. Acta Scientiae Veterinariae. 39(Suppl 1): s285 - s293.
- Xiangyang Miao (2012). Recent Advances and Applications of Transgenic Animal Technology, Polymerase Chain Reaction, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/recent-advances-and-applications-of-transgenicanimal-technology>.