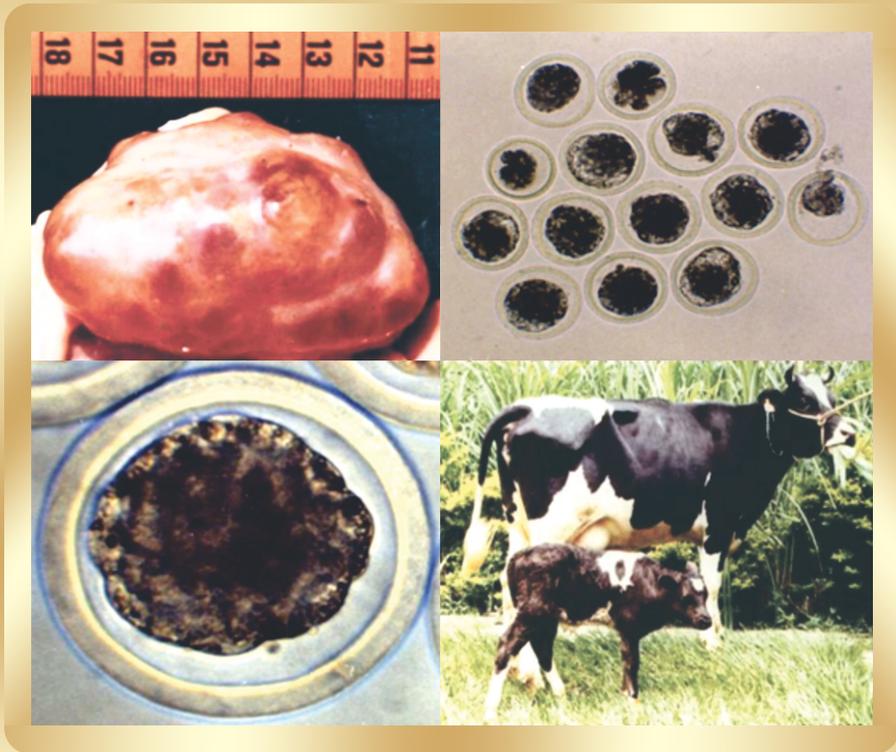


TRANSFER EMBRIO PADA TERNAK SAPI



EDISI KEDUA

IMAN SUPRIATNA



Published by
SEAMEO BIOTROP
Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology
Bogor, Indonesia
www.biotrop.org

TRANSFER EMBRIO PADA TERNAK SAPI

IMAN SUPRIATNA

**SEAMEO BIOTROP
2019**

TRANSFER EMBRIO PADA TERNAK SAPI

ISBN: 978-979-8275-58-6

Copyright © 2018 Iman Supriatna

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa ijin tertulis dari penerbit.

Diterbitkan pertama kali oleh:

SEAMEO BIOTROP

Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology

Bogor, Indonesia

Edisi Pertama: September 2013

Edisi Kedua : Oktober 2018

PRAKATA

Dalam era globalisasi industri peternakan yang sedang berkembang saat ini, telah diterapkan berbagai metoda peningkatan potensi ternak sapi melalui perbaikan mutu dan kapasitas genetiknya. Salah satu metoda bioteknologi reproduksi tingkat sel yang sudah terbukti dapat dipakai untuk mempersingkat waktu pencapaian perbaikan tingkat mutu genetik diharapkan adalah transfer embrio (TE). Keuntungan penggunaan metoda transfer embrio adalah dapat ditingkatkannya kapasitas reproduksi dari sapi betina. Meskipun sebagai *genetic tool* tidak sepotensial inseminasi buatan, transfer embrio dapat memperpendek interval generasi antara tahapan seleksi dengan dapat dihasilkannya *progeny* donor dalam persentase yang tinggi. Dalam beberapa kasus reproduksi tertentu transfer embrio dapat dipakai sebagai teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology*) dalam mengatasi infertilitas karena penyakit, luka atau penuaan (senilitas) untuk memperoleh keturunan. Di masa mendatang metoda transfer embrio dengan teknik yang terlibat dapat dikembangkan dan dipakai dalam mendukung pengembangan rekayasa struktur *deoxyribonucleic acid* (DNA) untuk pembentukan hewan transgenik serta klon yang kandungan genetiknya telah dirancang bangun sesuai tujuan tertentu (*genetically modified organism, GMO*).

Secara garis besar buku ini dibagi dalam lima bab. Bab pertama menjelaskan pemanfaatan metode transfer embrio dalam program perbaikan mutu genetik ternak sapi, perkembangan transfer embrio

internasional dan national dalam industri peternakan dan penggunaan embrio transfer di masa mendatang. Dasar penjelasan bab pertama untuk mendapatkan pengertian tentang kepentingan mempelajari embrio transfer. Bab kedua menguraikan reproduksi sapi betina yang mencakup fisiologi reproduksi, perkembangan embrio praimplantasi, hormon reproduksi dan superovulasi pada ternak sapi. Bab kedua ditujukan untuk mendapatkan basis bagian ilmu reproduksi terkait yang menjadi dasar tentang pengertian transfer embrio. Bab ketiga mendiskusikan kaji banding berbagai metoda superovulasi serta bab keempat mengenai persiapan dan penyediaan media untuk pelaksanaan program. Sedangkan prosedur dan tahapan pelaksanaan program transfer embrio secara khusus dibahas dalam bab kelima.

Sesuai dengan tujuan, manfaat, kegunaan dan bidang ilmu metoda transfer embrio, maka buku ini diprioritaskan untuk mahasiswa yang telah mempelajari Embriologi, Genetika, Fisiologi Reproduksi, Endokrinologi Reproduksi, Inseminasi Buatan, Kebidanan dan Kemajiran. Metoda transfer embrio merupakan bekal ilmu pengetahuan dan teknologi, serta keterampilan praktis yang dapat dikembangkan dalam profesi kedokteran hewan dan sains biomedis, juga dipakai sebagai alat bantu dalam menunjang pengembangan Biologi Reproduksi pada umumnya dan khususnya menunjang pengembangan Bioteknologi Reproduksi.

Pelaksanaan program peningkatan produktivitas ternak melalui metode transfer embrio, memerlukan biaya yang cukup tinggi. Buku ini juga diarahkan ke petunjuk praktis yang dapat memandu pada kelayakan

pelaksanaan program. Baik mahasiswa, dokter hewan, biolog, sarjana dan praktisi peternakan dapat memperoleh keterampilan praktis dari pengembangan latihan petunjuk tersebut. Selain itu pengelola, praktisi dan konsultan peternakan sapi dapat mengambil manfaat dari buku ini sebagai informasi untuk mengetahui kelaikan penggunaan metoda transfer embrio.

Edisi pertama buku ini diterbitkan pada tahun 2013, yang penerbitannya didukung oleh SEAMEO BIOTROP. Ilmu pengetahuan dan teknologi akan selalu tumbuh berkembang dan berjalan terus bagaikan aliran waktu dalam kehidupan sesuai dengan tuntutan kepentingan masyarakat luas. Dengan adanya perkembangan iptek dan penyesuaian akan kebutuhan pengembangan teknologi reproduksi yang cepat dalam industri peternakan maka pada tahun 2018 buku ini direvisi menjadi buku edisi kedua (*second revised edition*). Penulis menyadari akan kelemahan dan ketidak sempurnaan yang ada, sehingga buku ini masih dan akan terus memerlukan perbaikan. Data dan informasi yang penulis akan terima merupakan sumbangan yang sangat berharga bagi perbaikan dan penyempurnaan buku ini serta sangat bermanfaat bagi kemajuan dan pengembangan ilmu pengetahuan.

Bogor, 17 Agustus 2018

Prof Dr Drh Iman Supriatna

DAFTAR ISI

PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PEMANFAATAN METODE TRANSFER EMBRIO DALAM PROGRAM PERBAIKAN MUTU GENETIK TERNAK SAPI	1
1.1 Transfer Embrio dalam Industri Ternak Sapi	1
1.2 Penerapan Metoda Transfer Embrio di Indonesia	8
1.3 Metoda Reproduksi dalam Pelaksanaan Transfer Embrio	11
1.4 Program Transfer Embrio Sebagai Program Komplemen Inseminasi Buatan	22
1.5 Penggunaan dan Pengembangan Metode Transfer Embrio di Masa Mendatang	25
BAB II FISILOGI REPRODUKSI TERNAK SAPI BETINA	36
2.1 Siklus Estrus dan Gelombang Folikel	36
2.2 Perkembangan Embrio Praimplantasi	39
2.3 Hormon Reproduksi dan Superovulasi	44
BAB III KAJI BANDING METODA SUPEROVULASI	50
3.1 Superovulasi	50
3.2 Rute, Frekuensi dan Efektivitas Aplikasi Penyuntikan Gonadotropin Superovulasi	55
3.3 <i>Follicle Stimulating Hormone</i> (FSH)	59
3.4 <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i> (PMSG)	64
3.5 Superovulasi Komparatif antara PMSG dengan FSH	67

3.6 Kombinasi FSH dan PMSG	69
3.7 Antibodi (<i>Immunoglobulin</i>) Anti PMSG dalam Superovulasi	70
BAB IV PERSIAPAN DAN PENYEDIAAN MEDIA	73
BAB V PROSEDUR DAN TAHAPAN PELAKSANAAN PROGRAM	
TRANSFER EMBRIO	79
5.1 Pengelolaan Donor	79
5.2 Pengelolaan Resipien	95
5.3 Penentuan Fase Estrus Resipien Dan Donor	99
5.4 Inseminasi Donor	109
5.5 Pemanenan dan Koleksi Embrio (<i>Embryo Recovery, Flushing</i>)	117
5.6 Kegiatan Pemindahan Embrio (Transfer Embrio) ke Resipien	134
5.7 Diagnosa Kebuntingan dan Pengelolaan Resipien Bunting	144
DAFTAR PUSTAKA	149
LAMPIRAN	162
GLOSARIUM ISTILAH	172

DAFTAR TABEL

1	Jumlah ternak sapi yang diflusing dan banyaknya embrio yang dihasilkan dalam program transfer embrio di Amerika dari tahun 2002 sampai dengan 2008 (Stroud 2011)	4
2	Perkembangan, umur embrio dan waktu transportasi embrio awal praimplantasi di dalam oviduk dan uterus (modifikasi dari Senger 2005)	41
3	Formulasi media PBS yang dapat dipakai untuk pembuatan media transfer embrio	78
4	Jadwal penyuntikan hormone FSH dalam skedul superovulasi pada sapi perah dan sapi dwiguna (dual purpose breed) 75	88
5	Penggunaan berbagai macam hormon gonadotropin untuk superovulasi sapi	90
6	Borang evaluasi pemeriksaan klinis status reproduksi sebelum superovulasi dan sebelum panen embrio 79	92
7	Form pemberian hormon superovulasi inseminasi buatan (IB) pada donor	94
8	Pencatatan harian data berahi ternak berdasarkan hasil pengamatan deteksi berahi	104
9	Dua macam contoh pelaksanaan sinkronisasi estrus antara donor dan resipien	108
10	Daftar contoh urutan peringkat keunggulan dari 100 ekor pejantan elite (Top 100 TPI Bulls) diawal tahun 1986	112
11	Relevansi antara berahi, ovulasi dan waktu inseminasi	114
12	Klasifikasi embrio sapi donor yang terkoleksi pada pembilasan D7 berdasarkan penampilan umum morfologis	130
13	Kriteria baku penilaian dan klasifikasi kualitas embrio sapi menurut International Embryo Transfer Society tahun 2010 (IETS 2010)	131

14	Hasil evaluasi embrio yang terkoleksi	132
15	Form penyiapan resipien dan pelaksanaan transfer embrio hasil panen	144
16	Tingkat kegagalan reproduksi pada beberapa tahap kebuntingan	145

DAFTAR GAMBAR

1	Pedet kembar yang dihasilkan melalui aplikasi metoda inseminasi diakhir fase estrus dan dilanjutkan transfer embrio tujuh hari kemudian pada sapi yang telah diinseminasi (Imron <i>et al.</i> 2010)	11
2	Embrio yang telah di- <i>splitting</i> dan pedet kembar identik hasil pembelahan embrio (foto W. Gehring)	32
3	Pembagian skematis siklus kelamin ternak sapi berdasarkan perubahan yang terjadi dalam ovarium (Senger 2011)	37
4	Dinamika ovaria dalam siklus estrus (Senger 2011)	38
5	Ilustrasi skematis perkembangan embrio praimplantasi dalam saluran reproduksi betina (Senger 2005)	43
6	Perubahan relatif tingkat konsentrasi hormon reproduksi selama siklus estrus yang normal pada ternak sapi (dimodifikasi dari Intervet oleh Bertens 2010)	48
7	Foto laparoskop ovaria sapi hasil superovulasi pada saat estrus dan setelah pemanenan embrio (Hofmann 1982)	62
8	Ovaria sapi hasil superovulasi menggunakan PMSG (Supriatna <i>et al.</i> 1996)	66
9	Tahapan proses seleksi kelompok resipien pascatransfer embrio	98
10	Kateter <i>flushing</i> embrio dari Neustadt Aisch Neustadt/Aisch CH18 <i>Sterile</i> (Minitube GmbH)	121
11	Penempatan kateter pembilas (<i>flushing</i>) dalam kornua uteri (foto W. Gehring)	122
12	Stadia perkembangan zigot sampai dengan <i>expanding hatched blastocyst</i> (IETS 2010)	126

13	Stereo-zoom microscope dengan pembesaran 7x-45x yang dapat dipakai dalam pemeriksaan kualitas embrio secara morfologis	127 108
14	Beberapa stadia embrio praimplantasi yang laik transfer (Bó and Mapletoft 2013)	133
15	Embrio yang dipanen pada hari ke-5 (D5) setelah estrus (kiri) dan embrio yang dipanen pada D7 (kanan)	134
16	Resipien sapi FH dengan pedet black japanese hasil transfer embrio (Foto <i>Okayama Prefectural Livestock Research Centre</i>)	135
17	Peralatan pengemasan embrio, A. Micropipetter, B. Spoit tuberculin 1 cc, C. Konektor dan D. <i>Plastic mini straw</i> .	140
18	Kemasan embrio dalam <i>plastic straw</i> yang siap ditransfer	141
19	Transfer kanul (<i>transfer gun</i>) untuk mendepositkan embrio kedalam kornua uteri	142

DAFTAR LAMPIRAN

1	Daftar peralatan, obat, hormon, dan antiseptik yang diperlukan dalam pelaksanaan program transfer embrio	162
2	Prakiraan biaya pelaksanaan embrio transfer pada ternak sapi	164
3	Skedul pelaksanaan superovulasi dan <i>flushing</i> donor dan embrio transfer pada resipien	167
4	Borang dokumentasi tahapan pelaksanaan kegiatan program transfer embrio	168

BAB I

PEMANFAATAN METODE TRANSFER EMBRIO DALAM PROGRAM PERBAIKAN MUTU GENETIK TERNAK SAPI

1.1 Transfer Embrio dalam Industri Ternak Sapi

Ilmu pengetahuan dan teknologi reproduksi yang berorientasi dalam peningkatan kuantitas dan kualitas ternak/satwa untuk kesejahteraan manusia telah berkembang dari teknologi reproduksi generasi pertama yaitu pengembangan dan aplikasi inseminasi buatan (IB), ke generasi kedua yang mengembangkan metode superovulasi (MOET) dan embrio transfer (ET), ke generasi berikutnya yang ketiga, yang berkecimpung dalam pengembangan teknologi *in vitro* fertilisasi (IVF) dan produksi klon ternak (Toelihere 2006). Bahkan saat ini di negara yang maju sudah mencapai generasi keempat dan dalam taraf penelitian, yang bergerak dalam pengembangan rekayasa struktur *deoxyribonucleic acid* (DNA) untuk penciptaan hewan transgenik dan klon yang kandungan genetiknya telah dirancang bangun sesuai dengan tujuan tertentu (*genetically modified organism*, GMO).

Secara umum beberapa generasi teknologi reproduksi sudah dipakai secara luas a) sebagai teknologi reproduksi berbantuan untuk mengatasi baik infertilitas terutama di kedokteran umum atau kedokteran hewan, b) untuk peningkatan kualitas ternak dan produktivitas ternak, c) pelestarian plasma nutfah baik *insitu* atau *exsitu*. Teknologi reproduksi pada umumnya dapat dipakai secara tunggal atau dalam penerapan kombinasi untuk peningkatan produksi, menghasilkan makanan dan

produk medis. Penggunaan (bio)-teknologi reproduksi yang memberikan dampak signifikan pada perubahan genetik dan insentif ekonomi untuk produksi dalam peternakan/kedokteran hewan akan mendapatkan perhatian dari segi etika (*animal welfare*) dan aplikasi lapangan.

Salah satu teknologi reproduksi yang sudah rutin dipakai dalam upaya meningkatkan produksi ternak baik dari segi kuantitas maupun kualitasnya adalah transfer embrio (TE). Aplikasi teknologi TE merupakan salah satu teknologi unggulan untuk meningkatkan mutu genetik (produktivitas dan populasi ternak). Transfer embrio merupakan teknologi reproduksi yang dipakai dalam program pemuliaan ternak dengan memanfaatkan bibit induk betina unggul dan juga jantan unggul secara maksimal untuk peningkatan produktivitas (jumlah dan kualitas) ternak. Tujuan TE adalah peningkatan produktivitas yang terintegrasi dengan perbaikan mutu genetik ternak dalam waktu yang singkat.

Laporan pertama mengenai embrio transfer pada sapi disampaikan oleh Umbaugh (1949) dan berikutnya pedet sapi pertama hasil embrio transfer pada tahun 1951 (Willet *et al.* 1951). Kejadian penting tersebut merupakan titik tolak dalam pengembangan teknologi yang memiliki arti nyata dalam pengetahuan reproduksi dan perbaikan mutu ternak (Betteridge 1986). Penerapan embrio transfer secara komersial dimulai pada awal tahun 1970-an sebagai salah satu metoda pengembang biakan ternak sapi ketika bangsa dwiguna sapi Eropa (*dual purpose breed*) menjadi populer di Amerika Utara, Australia dan New Zealand. Biaya tinggi impor sapi Eropa dan panjangnya periode karantina memaksa untuk mereduksi jumlah sapi impor, dan menimbulkan insentif ekonomi untuk

memperbanyak jenis ternak sapi tersebut secepat mungkin. Peternak dan spekulator, terutama di Amerika Utara dan Australia, termotivasi untuk menyediakan modal yang diperlukan dalam evolusi merubah kegiatan embrio transfer secara laboratoris menjadi realitas komersial dan dilanjutkan dalam pengembangan embrio transfer skala industri. Penggiat embrio transfer yang sudah ada membentuk organisasi *The International Embryo Transfer Society (IETS)* di Denver, Colorado (USA) pada tahun 1974 sebagai forum internasional untuk tukar menukar informasi mengenai ET. Anggotanya berasal dari lebih 43 negara, sebagian besar berasal dari USA, kemudian diikuti dari Eropa, Canada dan Australia (Stringfellow dan Seidel 1990, Stringfellow dan Givens 2010).

Kalau ditinjau di negara-negara industri seperti Amerika Serikat (USA), dan Kanada di tahun 1985 sekitar 200.000 embrio dari 20.000 ekor donor ternak sapi telah ditransfer keresipien dan diperkirakan sudah menghasilkan kelahiran 100.000 pedet melalui metode transfer embrio. Seleksi donor dengan kriteria produksi dan genetik unggul mengakibatkan jumlah donor sedikit dengan perbandingan satu donor sapi perah diperoleh dari 1.500 ekor induk sapi, sedangkan donor sapi potong dapat diperoleh dari 3000 ekor sapi potong (Seidel dan Elsdon 1989). Embrio transfer pada tahun 1975-1980 berkembang dengan skala industri menjadi industri peternakan yang komersial. Produksi embrio di tahun 1988 mencapai 299.009 embrio diantaranya 140.030 embrio segar ditransfer dan 118.803 embrio lagi dibekukan. Embrio segar harus segera ditransfer dalam waktu tidak melebihi 24-30 jam *postrecovery*. Angka kebuntingan (*pregnancy rate*) dapat mencapai sekitar 50-60%.

Tabel 1 Jumlah ternak sapi yang di*flushing* dan banyaknya embrio yang dihasilkan dalam program transfer embrio di Amerika Serikat (USA) dari tahun 2002 sampai dengan 2008 (Stroud 2011).

Tahun	Jumlah <i>flushing</i>	Jumlah embrio terkoleksi	Rataan embrio/ <i>flushing</i>
2002	28.109	172.118	6,1
2003	34.896	205.441	5,9
2004	40.701	248.469	6,1
2005	48.233	305.129	6,3
2006	51.802	319.984	6,2
2007	54.080	332.486	6,1
2008	52.804	329.171	6,2

Pedet lahir hasil transfer embrio dihargai 3.000 dolar USA per ekor (Stringfellow dan Seidel 1990). Meskipun sapi potong dapat menghasilkan rataan embrio lebih banyak dari sapi perah tetapi perbedaan tersebut kecil, diperkirakan perbedaannya rata-rata satu embrio per koleksi. Di negara Amerika perkembangan produksi embrio hasil program transfer embrio dari tahun 2002 sampai dengan tahun 2008 dapat dilihat pada Tabel 1.

Di negara-negara Eropa seperti Jerman, yang program transfer embrionya mulai diperkenalkan tahun 1974, pada tahun 1985 sudah dapat diproduksi 6400 ekor anak sapi melalui metode ini. Sejak tahun 1974, mereka bekerja dalam setiap satu kesatuan yaitu tim transfer embrio. Tim TE ini sebagian besar bekerja sama dengan balai-balai atau unit inseminasi buatan daerah dalam rangka program peningkatan mutu ternak sapi. Dalam jangka tiga tahun kemudian, yaitu di tahun 1977, negara ini telah sanggup mengeksport embrio beku ke negara-negara tetangganya seperti Hongaria, Cekoslowakia dan Yugoslavia. Program ini telah berjalan dengan

dasar komersil. Pada tahun 1985 sudah mentransfer 6.374 embrio (segar dan beku). Metoda ini telah rutin diaplikasi dalam pengembangan peternakan sapi terutama sapi perah, sehingga produksi embrio sapi perah hasil pelaksanaan program embrio transfer meningkat terus dan pada tahun 2007 sudah dapat mencapai 13.929 embrio yang diransfer keresipien (Tenhumberg dan Schloesser 2009).

Pada tahun 2011, *the International Embryo Transfer Society's* (IETS) *Statistics* dan *Data Retrieval Committee* memiliki data embrio transfer secara global untuk dipublikasikan. Jumlah embrio sapi yang berasal dari pembuahan *in vivo* (*in vivo derived, IVD, embryos*) yang berhasil terkoleksi seluruh dunia pada tahun 2010 meningkat menjadi 732.000 embrio dibandingkan dengan tahun 2009 yang menghasilkan 702.000 embrio. Konsekuensinya jumlah embrio IVD yang ditransfer meningkat secara nyata sekitar 10,6% dari 534.000 di tahun 2009 menjadi 591.000 di tahun 2010. Semua benua dengan pengecualian Afrika, melaporkan adanya peningkatan jumlah embrio IVD yang ditransfer. Jumlah embrio beku asal IVD yang ditransfer ke resipien (di luar jumlah transfer embrio segar) sekitar 60.000 (328.000 embrio beku dan 263.000 embrio segar). Kecenderungan saat ini lebih banyak menggunakan embrio beku daripada embrio segar sudah berjalan konstan sejak pertengahan tahun 1990 ketika embrio dapat dibekukan menggunakan metoda transfer langsung. Diseluruh dunia, sekitar 61.000 donor sapi potong dan 43.000 sapi perah diflushing. Angka ini sedikit kurang tepat karena data transfer embrio sapi di Eropa tidak dipisah antara sapi potong dan perah (Stroud 2011).

Sampai saat ini sering metode TE dikaitkan dengan metode mutakhir yang disebut metode bioteknik. Secara pengertian sempit, bioteknik dalam peternakan terdefinisi sebagai tindakan biologis yang terkontrol dan terarah dari fungsi-fungsi tubuh untuk tujuan perencanaan dan pengendalian suatu proses biologis yang alamiah dalam produksi ternak. Dalam TE terdapat suatu rangkaian mata rantai dari berbagai metode-metode bioteknik yang sangat berarti dan terikat erat satu dengan yang lain. Mata rantai metode bioteknik itu antara lain superovulasi, sinkronisasi be- rahi, pembekuan embrio dan produksi kembar identik (mikromanipulasi). Metode-metode bioteknik dan pembekuan embrio dan produksi kembar identik, sebetulnya boleh dikatakan lanjutan dari metode TE.

Dari segi pengembang biakan hewan ternak terutama ternak sapi, TE mendapat arti penting mulai dua dekade tahun belakangan ini. Pada garis besarnya pelaksanaan TE secara praktis ditujukan untuk memperbesar jumlah keturunan dari bibit betina unggul yang mutunya juga sedang ditingkatkan. Karena adanya beberapa kemungkinan untuk mempercepat upaya-upaya pengembangan ternak. Dalam perencanaan terarah dari genetik suatu populasi dapat dikatakan, bahwa pengembangan mutu populasi ternak sapi dapat dipercepat, bila hanya bibit ternak sapi unggul yang terbaik dari suatu peternakan digunakan untuk penghasil keturunan melalui metode TE.

Di dalam beberapa media dan simposium sering diajukan banyak masalah mengenai TE, misalnya apakah TE dapat dijalankan dalam salah satu usaha untuk meningkatkan dan mengembangkan peternakan (di

Indonesia), dan yang mungkin lebih penting lagi menciptakan lapangan kerja baru (terutama untuk dokter-dokter hewan). Untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan tersebut, tidaklah mudah, perlu uraian yang mendasar mengenai pelaksanaan, biaya dan kegunaan dari TE sendiri dalam usaha peningkatan peternakan. Masalah ini akan lebih kompleks lagi pada negara-negara yang sedang berkembang dan tergantung pada negara-negara industri (negara produsen dan pemasok peralatan dan obat-obatan TE). Jadi masalahnya ditambah lagi dengan kebijaksanaan politik ekonomi dari negara produsen, yang akan memberikan pengaruh atau dampak negatif terhadap stabilitas harga peralatan dan obat-obatan TE itu sendiri. Selain itu juga tergantung dari bentuk dan sistim peternakan setempat (apakah peternakan rakyat, peternakan sedang atau peternakan besar). Hal-hal ini akan mempengaruhi dan menciptakan cara pelaksanaan dan organisasi tim TE itu sendiri.

Secara ringkas akan dibahas dan analisa permasalahan dalam setiap mata rantai dan metode bioteknik yang ada dalam jajaran mata rantai bioteknik TE dari segi teknis pelaksanaannya. Rangkaian pelaksanaan TE yang sering timbul atau sering dipakai dalam kegiatan rutinnya pada pokoknya dibagi dua yaitu, rangkaian primer TE yang terdiri atas : superovulasi donor, sinkronisasi resipien, pemanenan embrio (*embryo recovery*), koleksi dan klasifikasi embrio serta pemindahan embrio sedangkan rangkaian sekunder TE (tidak mutlak dilakukan) terdiri atas pembekuan embrio dan mikromanipulasi embrio diantaranya produksi kembar identik.

1.2 Penerapan Metoda Transfer Embrio di Indonesia

Sebelum krisis moneter, Indonesia telah mengimpor daging dan ternak potong (sapi potong hidup) dari negara-negara tetangga. Pada saat krisis moneter, meningkatnya nilai tukar dolar untuk pembayaran sapi impor menyebabkan pengalihan penyediaan sapi bakalan dari dalam negeri. Eksploitasi ternak potong dalam negeri menjadi salah satu jalan untuk memenuhi kebutuhan pangan hewani nasional. Hal ini ternyata berdampak secara langsung kepada produksi ternak nasional dengan menurunnya kualitas ternak potong (*low profile*) karena secara umum terjadi seleksi negatif dalam kegiatan penyediaan dan perdagangan bakalan sapi potong (Supriatna *et al.* 2005). Di beberapa daerah peternakan sapi perah rakyat, sudah terlihat ada penurunan kualitas sapi perah (Supriatna *et al.* 2007, Noor *et al.* 2008). Demikian pula pada ternak kerbau yang dipelihara rakyat di daerah sudah tampak banyaknya kerbau albino dan kerbau dengan tanduk mengarah kebawah yang merupakan indikasi adanya dampak *inbreeding* yang negatif (Sianturi 2012). Selain itu menurut hasil pendataan populasi sapi perah, sapi potong dan kerbau tahun 2011 (PSPK 2011) untuk populasi kerbau tercatat pada tahun 2003 sebanyak 1,4 juta ekor sedangkan pada tahun 2011 sebanyak 1,3 juta ekor sehingga rata-rata pertumbuhannya -0,58 persen atau berkurang rata rata sekitar 7,8 ribu. Gambaran ini diperkuat dengan adanya data mengenai konsumsi daging sapi dan kerbau per kapita penduduk setiap minggu pada tahun 2007 sekitar 8 mg. Konsumsi ini menurun sampai 6 mg pada tahun 2009 (BPS 2011). Salah satu upaya menghadapi dan menanggulangi persoalan tersebut di atas diperlukan penggunaan teknologi tepat guna diantaranya inseminasi buatan dan transfer embrio.

Transfer embrio baik pada sapi dan domba sudah dapat dijalankan oleh beberapa perguruan tinggi seperti Institut Pertanian Bogor, Universitas Gajah Mada, Universitas Brawijaya, Universitas Airlangga, lembaga-lembaga penelitian seperti Balai Penelitian Ternak, dan LIPI, perusahaan peternakan swasta, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan memiliki Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang, yang merupakan balai produsen embrio ternak (sapi). Balai Embrio Ternak (BET) mulai operasional sejak tahun 1994. Pelaksanaan TE sebenarnya sudah diperkenalkan di Indonesia sejak awal dasawarsa 1980-an, dengan keberhasilan yang variatif dan rendah, rata-rata panen 4 embrio per program superovulasi, dengan angka kebuntingan 30-40% di peternakan rakyat dan sekitar 50% pada peternakan swasta bermodal kuat. Dari perhitungan harga untuk pelaksanaan TE yang ada saat ini, harga embrio segar laik transfer Rp 0,55 juta, embrio beku Rp 0,6 juta per embrio. Harga 1 ekor pedet TE yang baru lahir dari embrio segar Rp 1,5 juta dan dari embrio beku Rp 2,4 juta. Harga pedet yang baru lahir hasil TE dari embrio beku sekitar 2 kali lebih tinggi dari hasil IB.

Selain itu kendala umum pelaksanaan TE adalah hampir seluruh peralatan, obat-obatan, hormon bahkan air yang cocok untuk dipergunakan dalam pembuatan medium *flushing* masih sangat tergantung dari pasokan luar negeri, harganya fluktuasi tergantung kurs dolar dan kadangkala peralatan dan obat-obatan yang diimpor rusak atau hilang di pelabuhan. Program TE ini cocok diterapkan pada perusahaan peternakan besar yang kuat modal atau untuk balai-balai pembibitan sedangkan untuk peternakan rakyat masih harus dipertimbangkan. Dari

hasil analisa pelaksanaan program TE di Indonesia, dijumpai kesulitan dalam penyediaan resipien yang laik transfer. Menurut Mahon dan Rawle (1987), resipien yang laik transfer hanya mencapai 44,5% sedangkan menurut Supriatna *et al.* (1995) dapat mencapai 61,3%. Selain itu Mahon dan Rawle (1987) berpendapat bahwa bangsa ternak sapi resipien memiliki pengaruh terhadap angka kebuntingan hasil transfer. Resipien *Bos indicus* memiliki CR lebih rendah dari pada persilangan *B.indicus* vs *B.taurus*. Mereka lebih memilih penggunaan resipien bangsa persilangan atau jika mungkin menggunakan resipien *Bos taurus* murni. Salah satu upaya mengatasi kesulitan penyediaan ternak resipien yang laik transfer dan juga sekaligus meningkatkan produktivitas ternak dilakukan program twinning melalui program TE. Diantaranya transfer embrio *duplet*, *splitted embryo* dan transfer embrio pada akseptor IB yang telah di inseminasi.

Balai yang telah pernah melakukan program twinning menggunakan embrio yang ditransfer ke akseptor IB yang telah diinseminasi tujuh hari setelah inseminasi sebagai resipien adalah BET Cipelang. Dari 92 ekor sapi resipien yang dipakai dalam program twinning, diperoleh kelahiran kembar sebanyak 8 pasang, kelahiran tunggal yang terdiri atas kelahiran hasil TE atau kelahiran hasil IB masing-masing sebanyak 14 ekor dan 13 ekor. Program twinning ini menghasilkan pedet 20% lebih banyak dibandingkan jika menggunakan aplikasi kelahiran tunggal menggunakan IB saja maupun ET. Peningkatan permintaan di lapangan terhadap program twinning menunjukkan bahwa program ini dapat diaplikasikan di pada kondisi lapangan dan berpotensi untuk dikembangkan (Imron *et al.* 2010).



Gambar 1 Pedet kembar yang dihasilkan melalui aplikasi metoda inseminasi diakhir fase estrus dan dilanjutkan transfer embrio tujuh hari kemudian pada sapi yang telah diinseminasi (Imron *et al.* 2010).

1.3 Metoda Reproduksi dalam Pelaksanaan Transfer Embrio

Pelaksanaan kegiatan transfer embrio merupakan rangkaian prosedur kerja biologis yang berkesinambungan bertahap kronologis teratur dengan mengaplikasikan metoda-metoda reproduksi. Seluruh kegiatan yang dilakukan sebelum atau sampai panen embrio (*embryo recovery, flushing*) dan transfer embrio merupakan kegiatan rangkaian primer. Kegiatan primer ini harus dilakukan. Prosedur kerja selanjutnya merupakan kegiatan pascapanen disebut kegiatan rangkaian sekunder. Kegiatan sekunder ini sifatnya optional yang tergantung situasi tuntutan kebutuhan tindakan yang diperlukan.

1.3.1 Rangkaian Primer

Dalam pelaksanaan TE faktor yang sangat menentukan adalah superovulasi diharapkan akan diperoleh seoptimal mungkin sel telur yang terbuahi (embrio). Hasil koleksi embrio yang pernah tercatat berkisar

antara 0 sampai dengan 70 sel oosit. Rata-rata per ekor akan diperoleh 12 sel oosit. Faktor yang mempunyai peranan dan menentukan superovulasi adalah bukannya jumlah (kwantitas) embrio yang terseleksi, tetapi adalah mutu (kwalitas) dari embrio itu sendiri. Dalam seleksi dan klasifikasi embrio akan diberi suatu penilaian apakah embrio dapat ditransfer (*transferable embryo*) atau tidak (*untransferable embryo*) atau embrio diragukan untuk ditransfer. Hanya embrio dengan nilai cukup atau sangat baik dapat ditransfer. Juga harus diperhitungkan bahwa rata-rata 15% - 20% dari sel telur yang terkoleksi tidak terbuahi (*unfertilized ova*) dan sekitar 15% - 20% terdiri dari sel telur telah rusak (degenerasi) atau embrio tidak berkembang lebih lanjut (*retarded*). Jadi dari keseluruhan embrio yang terkoleksi, praktis 30%-40% merupakan embrio yang tidak dapat ditransfer (*untransferable embryo*) ke resipien. Dari sekali pemanenan embrio diperoleh rata-rata 5-6 embrio yang laik transfer tetapi dinegara Australia rata-rata perolehan embrio adalah 6-7 embrio per panen (*per flushing*).

Biasanya embrio akan dikoleksi dari donor dengan jalan pembilasan pada hari ke-6, 7, atau 8 (umumnya pada hari ke-7 dari suatu siklus berahi). Pada hari ke-7, penyebaran sel telur yang terovulasi dalam saluran kelamin betina sebagai berikut: 10% masih berada dalam saluran telur (tuba fallopii), 70% berada sekitar 10 cm tersebar di daerah tanduk rahim (apex cornua uteri) dan 20% tersebar sekitar dekat cabang tanduk rahim (bifurkatio uteri). Praktis sebetulnya dengan metode pembilasan yang lazim tanpa bedah akan diperoleh kurang dari 90% sel telur yang terovulasi. Rata-rata akan diperoleh dengan pembilasan yang biasa sekitar

70% dari sel telur yang terovulasi (Foote dan Onuma 1970). Pada dasarnya dapat diketahui, bahwa 25%-30% dari sapi yang dijadikan donor, tidak atau kurang bereaksi (dengan kata lain kurang dari 5 ovulasi) terhadap pemberian hormon untuk superovulasi.

Di negara Republik Federal Jerman, pada tahun 1984 dari 12 balai IB atau Institut yang melaksanakan TE (yang tercatat), tim TE telah melakukan superovulasi dan membilas sebanyak 1.485 ekor sapi. Rata-rata embrio yang dapat ditransfer 4,8. Persentase kebuntingan yang berasal dari embrio segar, yang langsung ditransfer ke resipien sebesar 58,4% (5884 resipien bunting). Di Australia, rata-rata setiap pembilasan dapat diperoleh 6-8 embrio normal yang dapat ditransfer (*transferable embryo*) dengan angka kebuntingan 50%. Kalau ambil mudahnya dari setiap ekor sapi donor yang disuperovulasi akan diperoleh rata-rata 3-4 ekor anak sapi dari setiap pembilasan. Jika per tahun dilakukan 3 kali panen embrio maka akan dapat dihasilkan 9-12 ekor anak sapi dari seekor sapi bibit unggul.

Dalam penyiapan sapi donor untuk superovulasi, paling baik dimulai pada pertengahan siklus berahi dengan penyuntikan hormon gonadotropin disertai luteolitik hormon. Hormon gonadotropin yang biasa tersedia, terdapat dalam 2 preparat yang berbeda yaitu: 1) pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) dengan daya kerja yang cukup lama (waktu paruh 40-120 jam) dan 2) *follicle stimulating hormone* (FSH) dengan pengaruh kerja yang singkat (waktu paruh: 2-5 jam). Selain itu dapat juga digunakan human menopause gonadotropin (hMG) (Alcivar *et al.* 1984).

Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) misalnya dalam bentuk perdagangan dengan nama Intergonan dan Brumegon. Untuk superovulasi cukup diberikan dalam satu kali satu dosis. Untuk menghindari waktu paruh yang lama, dapat diberikan lagi anti-PMSG dan berdasarkan hasil lapang dapat menunjang perbaikan hasil superovulasi. Saat ini anti-PMSG masih tersedia sebagai preparat penelitian. Hormon gonadotropin yang paling sering digunakan dewasa ini adalah FSH-P (Burns-Biotec), untuk superovulasi. Pemberian FSH-P sebanyak 40-50 mg, kalau tidak dengan dosis tetap terbagi merata dalam delapan kali suntikani atau dengan dosis turun bertahap secara kontinyu, dimulai dengan dosis awal yang tinggi 8 mg dan direduksi terus sampai 3 mg pada pemberian hari terakhir. Interval pemberian 12 jam. Perbedaan signifikan dari dua macam pemberian FSH-P ini tidak dapat diharapkan (Donaldson 1984).

Akhirnya untuk superovulasi dapat juga digunakan Pergonal. Pergonal merupakan preparat dagang human Menopause Gonadotropin (hMG). Diberikan selama empat hari berturut-turut, terbagi dalam delapan kali penyuntikan pagi dan sore. Hasil superovulasi dengan hMG dinilai sebagai lebih dari rata-rata. Akan tetapi pemakaian hMG masih sangat terbatas karena harganya yang mahal (Medowan *et al.* 1983).

Superovulasi dengan preparat FSH dan *PMSG* merupakan pemberian preparat yang perlu dipikirkan dan dipertimbangkan lebih lanjut. Berdasarkan pengalaman lapang yang ada, tampaknya penggunaan FSH lebih menguntungkan terhadap siklus berahi berikutnya dan juga terhadap kesediaan menerima konsepsi pada hewan yang telah disuperovulasi (Elsden *et al.* 1978).

Koleksi embrio dapat dilakukan secara bedah dan tanpa bedah. Koleksi embrio dengan cara tanpa bedah tidak berbahaya, murah dan dalam pelaksanaannya hampir tidak ada problem, bahkan dapat dilakukan dalam kandang. Untuk pencucian kedua tanduk rahim sapi, paling cocok menggunakan kateter karet, yang tersedia di pasaran dalam berbagai macam tipe. Pada prinsipnya, semua macam kateter karet, bagian depannya (sebelum ujung) memiliki balon manset yang dapat ditiupkan udara dari luar, yang berfungsi selain memfiksir juga mencegah mengalirnya kembali medium pembilas ke arah badan rahim. Penggunaan jenis kateter ini berbeda-beda di beberapa negara. Misalnya di Jerman Barat operator lebih senang menggunakan kateter karet model Neustadt a.d. Aisch karena penggunaannya yang praktis. Kateter ini dapat dipakai untuk 12 kali pembilasan. Di Amerika lebih sering digunakan kateter Foley yang hanya sekali pakai. Jepang banyak menggunakan flushing catheter Nippon Fujihira.

Sebagai medium pembilas untuk koleksi embrio digunakan modifikasi *phosphate buffered saline* (PBS) + 1% *fetal calf* serum (FCS). Medium ini dapat diramu sendiri atau dapat dibeli dalam kemasan yang telah jadi. Media ini dapat disimpan dalam lemari pendingin dan tahan sampai dua minggu.

Seleksi dan klasifikasi embrio, dapat dilaksanakan setelah medium pembilas yang diperoleh kembali telah dibiarkan mengendap atau dengan cara penyaringan menggunakan suatu filter khusus yang biasa disebut *embryo collector*. Medium yang telah mengendap dipipet sebanyak 5 ml atau sisa medium yang tersaring dituangkan ke dalam gelas petri atau gelas

khusus yang digunakan untuk pemeriksaan embrio. Pemeriksaan, pencarian, seleksi dan klasifikasi embrio dilakukan di bawah stereo-mikroskop dengan pembesaran 20-40 kali. Adanya sumber cahaya yang difus akan mempermudah pencarian embrio.

Peranan yang menentukan dalam hasil transfer dikemudian hari adalah sifat-sifat kualitatif dari embrio yang terkoleksi. Penentuan kualitas embrio kadang-kadang sulit, dan sebenarnya sebagai patokan tanda-tanda kualitas baru dapat dibuktikan dalam perkembangan *in vitro* atau *in vivo*. Tanda-tanda kualitas ini mempunyai arti yang penting terutama didalam penilaian embrio beku yang telah dicairkan. Seleksi atas dasar penilaian morfologis telah terbukti dapat dipakai dalam penentuan kualitas embrio. Hal ini dapat dengan jelas dilihat dari hasil-hasil yang diperoleh di berbagai stasiun transfer.

Sebagai sapi resipien dapat dipakai sapi dara atau sapi induk, dengan syarat harus sehat dan subur. Terutama yang lebih baik adalah tersedianya sapi dara *Bos taurus*, dengan umur antara 18 sampai 24 bulan dengan berat badan sekitar 200-250 kg. Sapi dara sebagai resipien mempunyai keuntungan, karena ditinjau dari segi higienis dan teknis pelaksanaan kerja pemindahan embrio itu sendiri. Sapi-sapi resipien ini harus sinkron siklusnya dengan siklus berahi sapi donor. Untuk itu dapat diberikan 1-2 kali penyuntikan prostaglandin (PGF_{2α}) dan tergantung dari keadaan siklus berahi dari resipien itu sendiri. Perlu diperhatikan aplikasi prostaglandin pada resipien harus diberikan 12 sampai 24 jam sebelum aplikasi prostaglandin pada donor, karena berahi pada donor akibat pemberian gonadotropin 24 jam lebih awal daripada resipien. Penyimpangan \pm 24 jam

dari siklus berahi yang telah disinkronisasikan antara donor dan resipien tidak menimbulkan perbedaan hasil transfer yang nyata.

Metode pemindahan embrio dulu dilakukan secara bedah pada resipien dalam keadaan berdiri setelah mendapat lokal anastesi. Dalam tahun-tahun terakhir ini telah berkembang dengan pesat pemindahan embrio tanpa bedah, sehingga banyak tim TE menolak metoda dengan bedah. Untuk pemindahan embrio tanpa bedah sering digunakan alat transfer (*transfer gun*) model Hannover. Penggunaan kanul transfer ini mirip dengan penggunaan alat IB.

1.3.2 Rangkaian Sekunder

Pada tahun 1972 di Inggris telah berhasil usaha membekukan embrio hewan menyusui. Embrio mencit berumur empat hari telah dibekukan, dicairkan kembali, ditransfer pada seekor induk dan telah tumbuh menjadi seekor mencit yang sehat. Begitu pula seekor anak sapi pertama yang berasal dari embrio beku telah dilahirkan di Inggris.

Dengan lahirnya anak sapi dari embrio beku yang telah dicairkan dan ditransfer secara bedah berarti telah diperoleh metode pengawetan embrio dalam jangka panjang melalui metode pembekuan. Akan tetapi metode-metode yang tertulis dan telah dipublikasi tentang teknik pembekuan embrio hewan menyusui saat ini belum menunjukkan hasil yang memuaskan. Yang banyak dicoba dengan teknik pembekuan adalah embrio dari hewan laboratorium, misalnya mencit dan tikus. Embrio ini dapat merupakan model dari suatu penelitian. Model penelitian ini pada garis besarnya ditinjau dari dua segi yaitu, 1) finansial dan waktu, 2) dari

segi bentuk anatomi dan fungsi fisiologis yang mirip dengan embrio hewan besar seperti sapi. Sejak berhasilnya penelitian pertama untuk membekukan embrio mencit, diusahakan dan dikembangkan metode pembekuan melalui perubahan metode, untuk meningkatkan daya tahan hidup dari embrio yang dibekukan dan untuk menyederhanakan seluruh proses dari metode pembekuan embrio, terutama diarahkan untuk menciptakan metode yang matang dan dapat diterapkan di lapang.

Pengawetan embrio melalui metode pembekuan, saat ini dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai teknik. Semua teknik pembekuan ini meliputi: adaptasi embrio di dalam pemberian pelindung terhadap pengaruh-pengaruh negatif pembekuan baik fisik maupun fisiologis sebelum prosesi penyesuaian antara kecepatan pembekuan dan pencairan serta pengenceran medium pembeku selama dan setelah pencairan. Adanya kombinasi yang cocok antara medium pembeku dengan kecepatan pembekuan dan pencairan serta pengenceran yang sesuai dari medium pembeku setelah pencairan mempunyai arti penting di dalam meningkatkan daya tahan hidup embrio yang telah dicairkan. Dari hasil pengalaman kerja beberapa peneliti (tim kerja TE), dapat disimpulkan bahwa pelaksanaan pembekuan embrio dapat merupakan rangkaian primer transfer embrio dan tidak dapat dipisahkan dari rangkaian program transfer embrio.

Kalau dilihat dari hasil pembilasan (*flushing*) atau *embryo recovery*, dari hasil superovulasi pada ternak sapi yang pernah dilakukan diperoleh dengan kisaran antara 0 sampai 70 sel oosit dan atau embrio. Sampai saat ini belum ada orang yang dapat meramalkan dan menentukan, berapa

jumlah embrio dapat terkoleksi dan dikemudian hari, pada awal pemberian hormon untuk superovulasi, sehingga tidak dapat disiapkan dengan pasti berapa jumlah resipien yang harus disediakan. Sesuai dengan rata-rata jumlah sel telur yang umumnya dapat terkoleksi, biasanya dipersiapkan 10 ekor resipien dan hal ini pun harus diperhitungkan berapa resipien yang benar-benar dapat dipakai sebagai resipien (biasanya resipien dengan kualitas baik sekitar 5-6 ekor). Jika kita mendapat sel telur melebihi dari jumlah resipien mau tidak mau kita harus membekukannya.

Seperti telah diketahui bahwa pada umumnya pemilikan ternak sapi di Indonesia merupakan peternakan sapi rakyat. Peternakan rakyat umumnya memiliki 3-4 ekor sapi. Mereka hanya dapat mungkin menyediakan 1-2 ekor sebagai resipien. Di negara-negara yang maju seperti Jerman Barat, sistem peternakan umumnya adalah peternakan sapi perah sedang (sekitar 20-25 ekor sapi yang berlaktasi) dan mereka dapat menyediakan resipien rata-rata 10 ekor. Jika mereka dalam satu tahun menginginkan dilakukan dua kali program transfer embrio, maka program pembekuan embrio merupakan program yang tidak dapat dielakkan dalam pelaksanaan transfer embrio. Sehingga sampai saat ini hampir semua balai transfer yang bergerak dalam bidang komersil, selalu menggunakan usaha pengawetan embrio melalui metode pembekuan. Pengawetan embrio dengan sendirinya merupakan bagian integral dari program transfer embrio yang tidak dapat dipisahkan dalam kegiatan pelaksanaannya.

Angka hasil transfer dengan embrio beku sapi masih saja terletak 10%-20% lebih rendah dari hasil transfer dengan embrio segar. Dengan

adanya kemungkinan pengenceran satu kali pada embrio beku yang telah dicairkan di dalam medium pengencer yang mengandung sukrosa, telah mengarahkan pada penemuan baru metode transfer untuk embrio beku. Metode ini dapat disebut metode satu tahap (*one step method*) untuk transfer embrio beku. Embrio yang berada di dalam medium pembeku yang mengandung glyserol dalam jerami plastik dibekukan dan dicairkan bersama-sama dengan medium pengencer. Dengan jalan menggoyang jerami plastik terjadi pencampuran antara medium pembeku yang berisi embrio dengan medium pengencer. Setelah waktu tunggu tertentu, jerami plastik dimasukkan ke dalam ujung transfer gun. Pelaksanaan transfer pada resipien berjalan tidak lebih lama seperti pada inseminasi buatan.

Metode satu tahap untuk transfer embrio beku, memungkinkan dilakukannya program transfer embrio di peternakan-peternakan sapi terutama di peternakan rakyat, karena metode ini tidak banyak menggunakan peralatan laboratorium yang pada umumnya sangat rumit. Selain itu embrio beku dapat dicairkan kapan saja dalam waktu-waktu tertentu, sesuai dengan tersedianya resipien, misalnya pada sapi yang mendapat berahi alami. Dalam hal ini tidak perlu adanya sinkronisasi ataupun pengeluaran biaya tambahan untuk penyuntikan PGF_{2α} untuk menimbulkan berahi pada resipien. Akan tetapi sampai saat ini metode ini belum siap untuk dilakukan di lapang.

Untuk pembekuan embrio terdapat beberapa alat pembeku otomatis yang terkendali oleh komputer. Peralatan ini tersedia di pasaran (luar negeri) yang harganya cukup tinggi. Alat pembeku ini juga memerlukan nitrogen cair dalam kerjanya membekukan embrio. Ada juga

peralatan yang ditawarkan di pasaran, harganya cukup memadai dan bekerja dengan sistim lemari es. Alat ini memerlukan alkohol dalam kerjanya. Sampai saat ini belum memungkinkan untuk mengambil penilaian akhir terhadap kedua jenis alat ini. Beberapa peneliti lain mencoba membekukan embrio mencit, dengan metode untuk pembekuan sperma sapi, tanpa menggunakan peralatan tersebut diatas dan hasilnya adalah sama. Berdasarkan data yang ada timbul pendapat, bahwa perkembangan di bidang pembekuan embrio belum tertutup. Paling tidak pengawetan embrio melalui metode pembekuan akan terus memberikan impuls terhadap pelaksanaan TE, terutama di dalam pembentukan bank-bank embrio dan juga penyediaan bahan genetik (reservasi gen) yang dalam kebutuhan dapat diperoleh atau tersedia dengan cepat.

Dalam pelaksanaan rutin TE di lapang, secara praktis kadangkala terjadi, bahwa jumlah embrio yang terkoleksi lebih kecil dari jumlah resipien yang tersedia. Misalnya dari suatu pembilasan diperoleh 2 embrio, sedangkan telah tersedia 6 ekor resipien. Secara teoritis selain mentransfer 2 embrio segar dapat juga mentransfer 4 embrio beku. Jalan pemecahan lain yang merupakan alternatif yang dapat dipakai yaitu dengan jalan membagi dua embrio menjadi empat. Metode ini disebut bedah mikro- atau mikromanipulasi untuk memproduksi kembar identik. Paling sedikit masih dapat dimanfaatkan sisa dari resipien yang tidak ditransfer dan telah tersedia.

Teknik untuk produksi kembar identik termasuk dalam metode mikromanipulasi. Untuk tujuan ini dipergunakan mikromanipulator. Sejak

empat tahun yang lalu metode ini sudah dilakukan untuk memproduksi anak sapi kembar identik dalam program TE komersil. Pelaksanaan operasi pembelahan embrio dilakukan dengan penuh konsentrasi, ketelitian dan ketrampilan yang tinggi, untuk menghindari kerusakan atau matinya embrio yang mempunyai nilai genetik tinggi. Selain harga manipulator yang mahal, juga diperlukan pelatihan khusus dalam penguasaan teknik ini oleh operator. Mikromanipulasi ini sebaiknya dilakukan oleh seorang operator yang trampil dan terbiasa menggunakan alat ini. Perubahan pasangan alat atau pecahnya jarum gelas akan memakan waktu yang lama dalam menyelesaikan operasi pembelahan embrio. Untuk penghematan waktu biasanya alat ini hanya dioperasikan di laboratorium saja, jarang operasional dibawa ke lapang. Pada umumnya alat ini masih digunakan untuk keperluan penelitian, sedikit sekali untuk tujuan komersil.

1.4 Program Transfer Embrio Sebagai Program Komplemen Inseminasi Buatan

Jika ditinjau kebelakang, pertama kali program IB dijalankan di tahun limapuluhan, telah banyak memberantas penyakit menular dan sekaligus meningkatkan produksi ternak. Hal ini sangat mendukung tersedianya bahan makan berasal dari hewan untuk penduduk dan menunjang kesehatan masyarakat. Jaminan pengamanan makanan dan pemeliharaan kesehatan masyarakat merupakan latar depan dari penelitian metode-metode baru reproduksi. Transfer embrio telah menjadi suatu metode bioteknik dengan arti yang selalu tetap meningkat dan menjadi penting. Dapat dicatat, bahwa pelaksanaan transfer embrio yang rumit dan

memerlukan biaya yang banyak, sehingga penyebaran transfer embrio tidak akan mempunyai arti yang sama dengan pelaksanaan program inseminasi buatan.

Disamping kemungkinan-kemungkinan penggunaan praktis transfer embrio telah banyak membawa pengetahuan-pengetahuan ilmiah di bidang biologi reproduksi. Pertumbuhan sel telur, peristiwa pembuahan dan perkembangan sigot dalam minggu pertama setelah pembuahan pada hewan menyusui banyak menunjukkan kesamaan-kesamaan biologi, karenanya dapat dilakukan penelitian pada hewan laboratorium sebagai model penelitian dan merupakan pembanding yang mempunyai arti penting. Dalam kaitan ini dapat disimak, bahwa pembuahan in vitro yang berhasil pada sel telur manusia dan dilanjutkan dengan transfer adalah baru dimungkinkan oleh penelitian-penelitian terdahulu oleh peneliti-peneliti dari bidang kedokteran hewan. Jika sampai saat ini, di Indonesia telah lebih dari 1000 bayi dilahirkan dari tindakan terapeutis kedokteran, sering sumbangan ilmu pengetahuan dari kedokteran hewan terlupakan.

Di negara-negara yang sudah berkembang, transfer embrio merupakan kegiatan rutin dalam pengembangan industri peternakan. Organisasi pelaksanaan transfer embrio merupakan kerja sama antara tim TE, balai IB, persatuan peternak setempat dan dokter hewan daerah. Tim TE ini umumnya merupakan pegawai dari balai IB setempat atau kadangkala dari kalangan perguruan tinggi. Akhir-akhir ini dokter-dokter hewan swasta pun mencoba membuka praktek transfer embrio.

Ternak sapi yang akan disuperovulasi, merupakan ternak sapi bibit yang mempunyai nilai mutu genetik unggul dan terbaik dari persatuan

peternak setempat. Jika tidak, keturunannya tidak akan diakui. Superovulasi, sinkronisasi resipien dan inseminasi buatan pada donor biasanya dilakukan oleh dokter hewan daerah, sedangkan pembilasan atau pemanenan embrio, koleksi dan evaluasi, transfer dan pembekuan embrio dilakukan oleh tim transfer embrio. Tim TE ini sebenarnya berfungsi sebagai otak penggerak yang mengorganisir dari seluruh proses pelaksanaan transfer embrio. Jika ditelaah lebih lanjut, bahwa pelaksanaan transfer embrio tidak terlepas dari kegiatan inseminasi buatan. Transfer embrio ini akan menjadi kegiatan rutin dan bukan kegiatan sesaat jika dimasukkan ke dalam kegiatan rutin inseminasi buatan. Dari segi pelaksanaan, TE mirip pelaksanaan IB, bahkan balai IB sudah memiliki peralatan, bahan dan personel yang terampil.

Untuk mendapatkan bukti yang dapat dipertanggung jawabkan, keturunan sapi hasil transfer embrio harus menjalani pemeriksaan darah. Dari hasil test darah dapat ditentukan dengan pasti asal-usul yang pasti dari keturunan tersebut. Test darah ini dilakukan oleh laboratorium tertentu dari suatu perguruan tinggi.

Banyak sudah penelitian-penelitian tentang transfer embrio sejak puluhan tahun belakangan ini baik yang dilakukan di negara-negara tropis maupun sub-tropis, yang telah dipublikasi. Untuk pelaksanaan transfer embrio di negara yang sedang berkembang, dapat digunakan metode-metode yang telah rutin dijalankan. Transfer teknologi TE ini harus disesuaikan dengan bentuk industri peternakan setempat dan berkembang saat ini. Dalam konteks tersebut tidaklah perlu dilakukan penelitian-penelitian awal lagi tentang transfer embrio. Biaya yang ada

untuk penelitian dapat sekaligus dijalankan bersama-sama kegiatan rutin dari suatu balai inseminasi buatan. Adalah sangat disayangkan bila suatu kegiatan berhenti karena masa kerja penelitian telah berakhir. Salah satu alternatif yang mungkin dijalankan adalah memasukkan kegiatan transfer embrio ini dalam kegiatan inseminasi buatan karena kegiatan inseminasi buatan yang rutin telah menyebar luas, terutama seluk beluk sistim pengembangan IB ini telah dikuasai oleh balai-balai IB daerah, dengan perkataan lain TE menjadi program komplemen dan lanjutan dari program pelaksanaan IB.

1.5 Penggunaan dan Pengembangan Metode Transfer Embrio di Masa Mendatang

Bila dikaji, banyak penemuan dan penelitian ilmiah dalam bidang transfer embrio yang dapat digunakan untuk meningkatkan populasi ternak dan memecahkan berbagai masalah reproduksi dan kendala di dunia kedokteran. Di bidang kedokteran metoda transfer embrio dapat dipakai sebagai teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology*). Penggunaan yang potensial dari metode transfer embrio adalah sebagai berikut:

1.5.1 In vitro Fertilisasi (IVF)

Di bidang kedokteran umum, dapat dijumpai kasus adanya pasangan usia subur tidak memiliki keturunan. Jika sebagai terapi jalan keluar harus menggunakan metode TE, maka tindakan IVF biasanya tidak dapat dihindari. Untuk itu pasien wanita akan mendapatkan stimulasi ovari

dengan pemberian hormon (misalnya hMG dan Clomifen). Setelah ovum masak dalam folikel akan dilakukan pungsi (*ova pick up*). Oosit ini akan dibuahi dengan spermatozoa suami yang telah berkapasitasi. Sigit yang dihasilkan ditransfer kembali kepada resipien atau pasien.

Dalam pemanfaatan oosit dari ovaria ternak yang telah dipotong, misalnya di rumah potong hewan dapat dilakukan koleksi oosit dari ovaria (*ova pick up*). Oosit yang terkoleksi dapat dibuahi *in vitro*. Jika oosit berasal dari bibit unggul, setelah diperoleh embrio hasil *in vitro* fertilisasi dapat dilakukan transfer embrio pada resipien yang cocok untuk mendapatkan ternak berkualitas. Oosit yang berasal dari ternak biasa, sapi hasil transfer embrio dapat digunakan sebagai bakalan untuk penggemukan dan masuk kerantai makanan konsumen.

1.5.2 Pemupukan Oosit atau Embrio Secara *In Vitro*

Salah satu syarat berhasilnya TE adalah umur embrio yang ditransfer harus sesuai dengan siklus resipien. Begitu pula salah satu syarat berhasilnya IVF adalah sel oosit harus matang. Jadi untuk tujuan tersebut diperlukan pemupukan. Oosit dapat dipupuk *in vitro* menjadi oosit matang secara inti dan sitoplasma (*matured oocyte*). Sedangkan untuk penyesuaian umur embrio, dapat dilakukan pemupukan. Selain itu sistem pemupukan *in vitro* dari oosit atau embrio dapat digunakan untuk tujuan penelitian medis diantaranya teratology dan farmakologi misal penelitian mengenai daya kerja dan efek obat terhadap perkembangan daya tumbuh embrio serta efek teratologisnya.

Sampai saat ini dalam program keluarga berencana (KB) masih dicari obat yang efektif untuk kontrasepsi. Tentu dengan adanya sistim pemupukan oosit in vitro, dapat diuji efektivitas suatu obat terhadap kemampuan kontrasepsinya. Juga dapat dilakukan penelitian mengenai pengaruh obat-obat penghambat pertumbuhan seperti antikanker, anti-imun dan obat-obat yang bersifat teratogenik.

1.5.3 Peningkatan Keturunan (*Progeny*) dari Bibit Betina Unggul

Rata-rata reproduksi yang rendah dari sapi perah akan membatasi pendayagunaan bibit betina unggul. Biasanya seekor induk seumur hidupnya diharapkan melahirkan empat ekor pedet melalui perkawinan yang konvensional. Melalui metoda TE, dapat diperoleh beberapa pedet dalam sekali perkawinan, sehingga intensitas seleksi dapat ditingkatkan. Melalui anak jantan, seekor induk sapi dapat mempengaruhi genetik dari beberapa ribu ternak sapi keturunannya. Penggunaan selektif metoda TE pada bibit betina unggul untuk mencari pejantan telah banyak disarankan oleh beberapa pakar genetika diantaranya Bradford dan Kennedy (1980).

Transfer embrio dapat digunakan untuk meningkatkan produksi susu, dengan jalan menggunakan donor ternak sapi yang memiliki genetik unggul dari suatu perusahaan. Sedangkan resipien diperoleh dari betina yang kurang produktif. Sebagai program perbaikan genetik dapat diatasi dengan perkawinan selektif donor dengan tiga atau empat pejantan unggul.

1.5.4 Pengembang Biakan Bangsa Sapi yang *Exotic*

Mengimpor ternak sapi dalam jumlah besar kedalam negeri (dari suatu tempat ketempat lain yang berbeda) akan menimbulkan berbagai kesulitan. Faktor-faktor yang dapat mempersulit diantaranya, tidak ekonomis (mahal), perbedaan iklim, daya tahan terhadap beberapa penyakit yang berbeda pada lingkungan yang baru dan stress. Untuk mengatasi kesulitan tadi dapat dilakukan impor ternak dalam jumlah kecil yang dikembang biakan dengan cara transfer embrio. Keturunan yang diperoleh melalui metoda ini akan cepat beradaptasi dengan lingkungan dan stress penyakit karena keturunan ini melalui periode kebuntingan penuh dalam induk ternak asli pribumi yang telah beradaptasi dengan lingkungannya baik iklim maupun penyakit setempat.

1.5.5 Reduksi Interval Generasi

Salah satu penggunaan yang potensial dari metoda TE (dalam taraf penelitian) adalah penyingkatan interval generasi dan *progeny test* dari betina prepuber sebagai induk prospektif dari pejantan. Hal ini dapat diperoleh dengan melakukan superovulasi dari ternak sapi betina prepuber dan mentransfer embrio yang diperoleh darinya kepada resipien dewasa kelamin. Beberapa peneliti berhasil dengan superovulasi pada sapi prepuber dan peneliti lainnya bahkan memperoleh sukses sampai terjadi kebuntingan yang berasal dari embrio yang diperoleh dari sapi prepuber akan tetapi, fertilitas dan rata-rata koleksi (*recovery rates*) dari sapi prepuber yang disuperovulasi adalah sangat rendah.

1.5.6 Kembar

Grup Cambridge adalah grup yang pertama mendemonstrasikan kebuntingan kembar dengan angka konsepsi (*pregnant rate*) yang tinggi (>70%). Kebuntingan kembar diperoleh dengan mentransfer setiap tanduk rahim dengan satu embrio (transfer embrio duplet). Kemudian grup Irlandia berhasil menginduksi kembar melalui TE, terutama mempunyai nilai proporsi ekonomik dalam industri ternak sapi potong, karena dapat meningkatkan panen pedet tanpa penanaman modal yang besar. Grup Irlandia menggunakan dua metoda dalam produksi kembar. Metoda pertama resipien di IB dan seminggu kemudian di TE, tentu pada tanduk uteri yang kontralateral. Sedangkan metoda kedua adalah TE pada setiap tanduk uteri dengan satu embrio. Satu faktor pembatas pada peternakan sapi perah, yaitu sekitar 95% dari sapi-sapi dara berasal dari kelahiran kembar dengan pedet jantan adalah freemartin dan karenanya steril.

Transfer embrio untuk menghasilkan kembar melalui transfer embrio duplet (masing-masing uterus didepositkan satu embrio) dan mentransfer akseptor IB yang telah diinseminasi tujuh hari setelah estrus, dapat dipakai dalam peternakan sapi potong. Keturunan hasil transfernya selain memiliki pertumbuhan bobot badan harian yang tinggi juga jumlah hasil transfernya lebih banyak dari pada transfer embrio secara tunggal. Menurut Imron *et al.* (2010), hasil panen pedet 20% lebih tinggi daripada hanya menggunakan inseminasi atau transfer embrio saja.

1.5.7 Pengawetan Embrio dalam Jangka Waktu Lama (*Longterm storage of Embryos, Embryo Cryopresevation*)

Metoda transfer embrio yang rutin dipakai dalam kegiatan produksi peternakan sering mendapatkan problema-problema yang hanya dapat diatasi dengan metoda pengawetan embrio melalui metoda pembekuan (*cryopreservation*). Metoda ini telah memperoleh arti yang penting pada dekade tahun akhir-akhir ini dan telah memperbanyak perbendaharaan sistim serta memperluas dimensi yang baru dalam metoda TE. Metoda pembekuan antara lain memungkinkan pilihan termin yang bebas untuk panen pedet, penyediaan resipien yang tidak tergantung pada status donor dan penyederhanaan ekspor-impor material genetik yang berharga diseluruh dunia.

Selain itu dengan adanya pengawetan embrio melalui kriopreservasi dapat didirikan bank embrio sebagai reservasi material genetik dan sebagai cadangan suatu populasi ternak. Dari data yang ada dapat ditarik kesimpulan, bahwa perkembangan di bidang pembekuan belum tertutup. Paling tidak, program pengawetan embrio melalui metoda kriopreservasi akan terus memberikan impuls terhadap pelaksanaan TE, terutama dalam memperluas pengetahuan di bidang kriobiologis melalui penelitian-penelitian pembekuan embrio.

1.5.8 Transportasi Internasional (Ekspor-Impor Embrio)

Dahulu sebelum metoda kriopresrvasi embrio, secara ilmiah belum dapat dijamin, dapat dipakai sebagai suatu teknik pengawetan embrio, maka embrio ditransportasi melalui penyimpanan dalam media in vitro

ataupun disimpan dalam tuba fallopii dari kelinci. Dengan adanya teknik kriopreservasi embrio, maka embrio beku berbagai bangsa sapi ditawarkan keseluruh penjuru dunia untuk dijual. Keuntungan yang dapat diperoleh melalui metoda pembekuan embrio untuk transportasi interkontinental adalah, reduksi biaya transport, kontrol seleksi genetik dari embrio beku, mengurangi risiko penyakit exotic, adaptasi yang cepat dari keturunan terhadap lingkungan negara pengimpor dan minimal penipisan bibit unggul dari negara pengeksport. Akan tetapi juga terdapat pembatasan ekspor-impor embrio beku, yaitu adanya kemungkinan penyebaran penyakit seperti *Foot and Mouth Disease*, *Blue Tongue* dan lain sebagainya.

1.5.9 Manipulasi Embrio

1.5.9.1 Pembelahan Embrio (*Splitting dan Slicing Embryo*)

Pembelahan embrio menggunakan metoda *splitting* dan *slicing* ditujukan untuk menghasilkan kembar identik. Pada umumnya produksi kembar identik dipakai untuk tujuan penelitian. Selain itu itu dapat juga dipakai untuk memperbanyak jumlah embrio yang akan ditransfer dalam rangka mengatasi kelebihan resipien yang disediakan dalam penyiapan resipien TE.

Metoda transfer embrio telah memungkinkan pembuatan kembar monosigotik. Produksi kembar identik ini diperoleh dengan mikrosurgeri, memisahkan blastomer, atau membelah embrio dengan sayatan mikro atau pemisahan blastomer, kemudian memasukkan masing-masing belahan embrio kedalam zona pelusida kosong dan diinkubasi sampai

blastomer tadi menjadi embrio stadium tertentu misal morula atau blastosis akhirnya ditransfer ke resipien. Kembar identik dan quadruplets telah berhasil dilakukan pada biri-biri dan sapi. Embrio (blastomer) yang terbelah melalui *splitting* atau *slicing embryo* dimasukkan kedalam zona pelucida kosong kemudian ditransfer atau langsung ditransfer ke resipien tanpa zona pelucida. Diharapkan dari *splitted* atau *sliced embryo* yang ditransfer dapat menghasilkan kebuntingan dan dapat melahirkan pedet yang kembar identik (Gambar 2).

Pembelahan embrio melalui metoda *slicing* atau *splitting* akan menghasilkan dua embrio dengan jumlah dua kali lipat embrio semula. Metoda ini dapat mengatasi permasalahan kekurangan embrio yang laik transfer (jumlah embrio lebih sedikit dari resipien yang tersedia).



Gambar 2 Embrio yang telah *displitting* dan pedet kembar identik hasil pembelahan embrio (foto W. Gehring).

1.5.9.2 Seleksi Kelamin Embrio (*Sexing of Embryos*)

Kemungkinan lain adalah kemampuan lain untuk prapenentuan jenis kelamin dari pedet, sehingga peternak dapat menyeleksi pejantan atau sapi dara. Keberhasilan prapenentuan jenis kelamin dan transfer embrio sapi berumur 2 minggu, memungkinkan melakukan sex kontrol melalui TE.

Ada tiga metoda untuk prapenentuan jenis kelamin embrio mamalia:

- 1) Identifikasi sex kromatin. Sex kromatin adalah suatu bentuk kondensasi dari salah satu X kromosom dan hanya terlihat dalam sel yang memiliki lebih dari satu X kromosom (betina). Untuk mengamati sebagian kecil dari embrio (9-15 hari) diperlukan penyayatan jaringan menggunakan teknik mikrosurgeri dan diperiksa ada tidaknya sex kromatin. Untuk sapi teknik ini tidak dapat diandalkan.
- 2) Karyotyping atau analisa sex kromosom. Dalam metoda ini, sebagian kecil embrio diambil secara mikrosurgeri dan diproses untuk diperiksa karyotipenya. Untuk sapi, tampaknya metoda ini agak dapat dipakai walaupun secara praktis masih memerlukan pertimbangan khusus.
- 3) Deteksi H-Y antigen. H-Y antigen adalah protein yang dihubungkan dengan jenis kelamin embrio, ditentukan ada atau tidaknya H-Y antigen, dengan menggunakan antibodi berlabel. Absennya H-Y antigen pada membran sel menunjukkan prapenentuan jenis kelamin adalah betina.

Diawal tahun millennium kedua, bidang spermatologi telah berhasil memisahkan sperma X dan sperma Y. Balai inseminasi buatan (BIB) Singosari pada tahun 2008 sudah mendistribusikan *sexed sperm* beku keseluruh Indonesia dan juga telah diekspor ke Srilangka dan Malaysia (BBIB Singosari 2009 dan 2010). *Sexed sperm* ini dapat dipakai dalam inseminasi oosit dalam program IVF atau produksi embrio in vivo melalui program transfer embrio (inseminasi hasil superovulasi dengan *sexed sperm*) dan embrio yang dihasilkannya sudah dapat langsung diketahui jenis kelaminnya berdasar sperma X atau sperma Y yang dipakai dalam inseminasi.

1.5.9.3 Cloning

Clone adalah sekelompok sel atau organisma dengan pembiakan aseksual, sedemikian rupa sehingga semua individu didalam clone memiliki konstitusi genetik atau genotipe yang sama. Pada mamalia misal sapi, *clone* dapat dibuat dengan cara transplantasi *nucleus* kedalam sigot yang telah dibuang pronukleusnya ataupun dengan transplantasi blastomer sebagai individu clone kedalam zona pelusida kosong.

1.5.9.4 Chimera

Chimera adalah organisme yang berasal dari gabungan dua jenis organisma dengan konstitusi genetik (genotipe) yang berbeda. Ada dua metoda yang dapat dilakukan untuk memperoleh chimera. Pertama adalah tukar silang blastomer atau *inner cell mass* dua embrio dari jenis organisme yang memiliki genotipe berbeda.

1.5.9.5 One Sperm Injection

Usaha ini merupakan metoda yang baru dijajagi. Tujuannya adalah untuk penghematan sel gamet dan memilih atau menentukan jenis kelamin dari sigot. Oosit yang telah masak, difertilisasi dengan satu sperma (sperma X atau sperma Y) yang telah dikapasitasi. Fertilisasi ini dilakukan dengan jalan penyuntikan menggunakan mikropipet kedalam vitelus oosit.

1.5.9.6 Transfer Gen

Pada tahun 1983, ilmuwan di Univeristas Pensylvania dan Washington telah berhasil setapak lebih jauh. Mereka telah dapat memindahkan gen hormon pertumbuhan yang berasal dari manusia kedalam embrio tikus. Setelah dewasa tikus itu menjadi dua kali lebih besar dari tikus normal (*supermouse*). Selain itu juga Nature, suatu jurnal ilmiah, melaporkan keberhasilan transfer gen untuk hormon pertumbuhan dari tikus ke mencit, yang menghasilkan *giant mice*. Aplikasi praktis dari transfer gen ini dapat dilakukan, jika identifikasi gen sudah dikuasai. Gen-gen penyebab defek dapat diperbaiki selama perkembangan embrional. Secara teoritis, jika gen produksi susu dapat diisolasi, maka usaha peningkatan produksi susu dapat dilakukan dengan metoda ini.

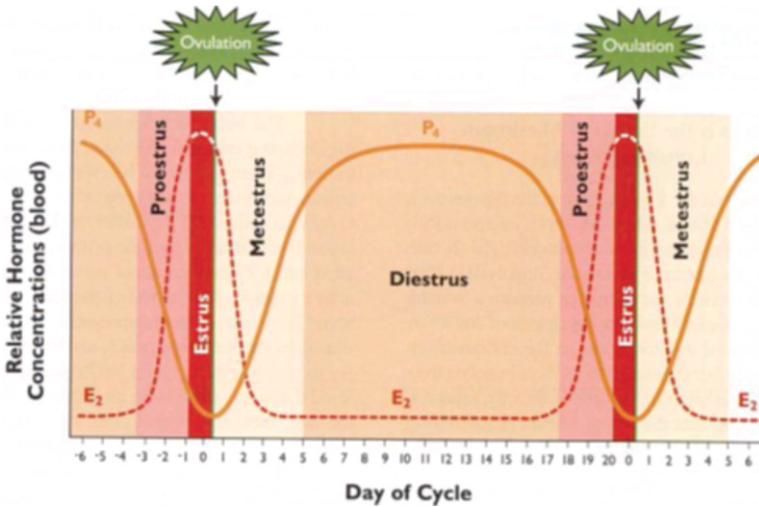
BAB II

FISIOLOGI REPRODUKSI TERNAK SAPI BETINA

2.1 Siklus Estrus dan Gelombang Folikel

Estrus merupakan suatu fase kegiatan fisiologis pada hewan betina tidak bunting yang dimanifestasikan dengan memperlihatkan gejala keinginan kawin atau suatu fase hewan betina mau menerima pejantan secara seksual dan estrus dapat dikatakan suatu tanda hewan betina mau ovulasi. Interval antara timbulnya periode estrus kepermulaan periode estrus berikutnya pada hewan tidak bunting disebut siklus estrus (Hafez dan Hafez 2000). Lebih lanjut Hafez dan Hafez (2000) menyatakan bahwa lama waktu timbulnya estrus pada berbagai ternak berbeda. Pada ternak sapi (*Bos taurus*) siklus estrus berkisar antara 18 sampai 24 hari (rata-rata 21 hari) dengan lama estrus 18 sampai 19 jam. Siklus estrus dibagi menjadi empat fase, yakni fase estrus atau periode seksual (D0) diikuti dengan fase metestrus atau postovulasi (D1-D5), fase diestrus (D5-D18) sesuai dengan fase luteal dan proestrus (D18- D20) yang merupakan periode sebelum estrus (Gambar 3).

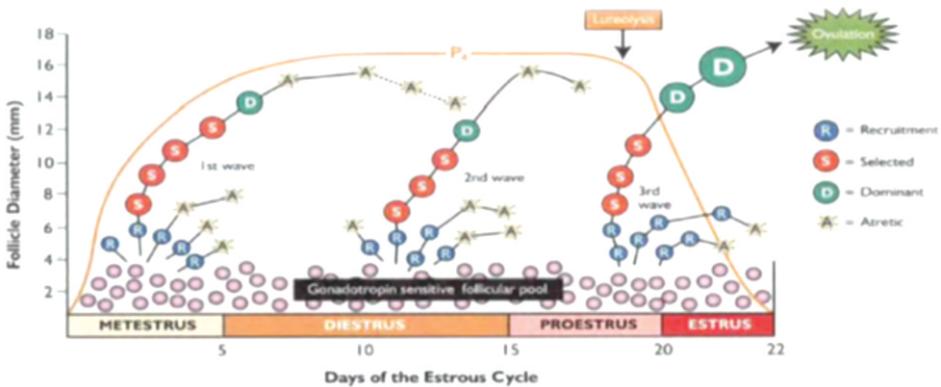
Proestrus dikarakterisir dengan meningkatnya estradiol (E_2). Ketika estradiol mencapai konsentrasi tertentu sapi betina menjadi estrus. Setelah ovulasi, folikel tumbuh berkembang menjadi corpus luteum selama fase metestrus. Diestrus dikarakterisir adanya CL fungsional dan tingginya konsentrasi progesterone (P_4).



Gambar 3 Pembagian skematis siklus kelamin ternak sapi berdasarkan perubahan yang terjadi dalam ovarium (Senger 2005).

Dalam satu siklus estrus dapat terjadi dua sampai empat gelombang folikel. Umumnya pada ternak sapi terjadi 2-3 gelombang folikel. Dalam setiap gelombang folikel akan direkrut sekitar 10-15 folikel. Folikel-folikel yang direkrut tersebut akan diseleksi menjadi sekitar 3-4 folikel yang berkembang terus dan yang lainnya akan berdegenerasi menjadi folikel atretik. Salah satu folikel yang paling besar dari kelompok 3-4 folikel yang terus berkembang akan menjadi folikel matang atau folikel dominan (dulu disebut folikel de Graaf). Folikel dominan ini akan menekan perkembangan folikel lainnya yang lebih kecil yang disebut dengan folikel subordinat. Folikel dominan yang terbentuk pada fase metestrus atau fase diestrus tidak dapat ovulasi tetapi akan regresi menjadi folikel atretik. Folikel dominan yang terbentuk pada fase proestrus saja yang secara fisiologis dapat melanjutkan keproses ovulasi (Gambar 4).

Proses ovulasi merupakan suatu proses pelepasan sel telur dari folikel matang (folikel dominan) atau folikel de Graaf (McDonnald 1980). Selanjutnya (Hafez dan Hafez 2000) menjelaskan bahwa untuk proses ovulasi akan disekresikan hormon $PGF_{2\alpha}$ dan PGE_2 . Hormon PGE_2 tersebut merangsang plasminogen aktivator dan $PGF_{2\alpha}$ menyebabkan peretakan lisosom pada apeks epitel. Terjadinya kedua faktor tersebut diperkuat dengan adanya teka kolagenase dan oedema pada folikel akan menyebabkan terbentuknya stigma, kemudian $PGF_{2\alpha}$ menyebabkan kontraksi ovarium dan folikel sehingga mengakibatkan pecahnya folikel dominan dan terlontarnya oosit keluar dari folikel.



Gambar 4 Dinamika ovaria dalam siklus estrus (Senger 2005).

Marawali (1997) mengatakan bahwa ovulasi bukan merupakan proses peletusan yang ganas melainkan terjadi secara perlahan-lahan. Ovulasi mungkin terjadi oleh pelepasan LH yang membebaskan histamin yang menyebabkan hiperemia pada ovarium. Lebih lanjut disebutkan bahwa hiperemia ini mungkin menstimulir pelepasan enzim-enzim

proteolitik, seperti kolagenase ke dalam cairan folikel yang mungkin bertanggung jawab atas pemisahan kumulus dari sisi folikel. Enzim-enzim inilah yang melemahkan dinding folikel dan terjadi suatu daerah avaskuler atau stigma dan ovulasi terjadi pada daerah penonjolan superfisial dimana dinding folikel tidak ditunjang oleh stroma ovarium.

Setelah ovulasi, corpus luteum (CL) terbentuk pada bekas folikel yang telah pecah dan mulai mensekresi progesteron. Selama CL tetap aktif menghasilkan progesteron, kadar sekresi FSH dari adenohipofise tetap rendah dan kadar sekresi LH dari adenohipofise berada pada level terendah dan statis. Corpus luteum dapat bertahan dalam ovarium 8 sampai 14 hari jika tidak terjadi kebuntingan (McDonnald 1980). Lebih lanjut dijelaskan uterus yang tidak disertai kebuntingan maka CL akan regresi oleh agen luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ dari endometrium. Jika terjadi kebuntingan maka CL yang terbentuk akan terus berfungsi yang disebut CL graviditatum. Pada sapi CL ini akan terus berfungsi sampai akhir masa kebuntingan, terutama dalam pemeliharaan kehidupan blastosis sebelum implantasi. CL merupakan sumber penghasil hormon progesterone terbesar yang dibutuhkan oleh pemeliharaan kebuntingan. Progesteron menghambat sel limfosit T yang berfungsi untuk menolak jaringan asing dan memiliki aktivitas *immunosuppresif* alami yang mencegah penolakan induk terhadap calon anak.

2.2 Perkembangan Embrio Praimplantasi

Setelah terjadi proses fertilisasi akan terbentuk zigot. Pronukleus jantan dan betina mengalami fusi (*syngami*) dan zigot yang terbentuk akan

berkembang menjadi embrio. Definisi embrio adalah organism pada tahap awal perkembangan. Pada umumnya embrio tidak memiliki bentuk definitif yang dapat dikenali secara spesifik dari hewan tertentu. Sedangkan fetus adalah keturunan organism tertentu yang masih dalam uterus dan sudah dapat dikenali sebagai bagian hewan yang bersangkutan. Fetus merupakan perkembangan lanjutan dari embrio. Terminologi embrio, fetus dan konseptus sering dipakai seara bersamaan untuk menjelaskan perkembangan organism. Konseptus didefinisikan sebagai hasil dari konsepsi. Hal ini termasuk 1) embrio selama embrio tahap awal, 2) embrio dan membrane ekstraembrionik selama tahap praimplantasi, 3) fetus dan plasenta selama fase post implantasi.

Adanya pronukleus jantan dan betina dalam sitoplasma oosit menunjukkan perkembangan awal dari oosit yang baru dibuahi. Jika pronukleus jantan dan betina dapat diobservasi, sel dapat disebut ootid. Ootid ini merupakan salah satu sel tunggal terbesar dalam tubuh dan dapat karakterisasi dengan volume sitoplasma yang relatif lebih banyak dari volume inti. Karakter ini sangat penting karena pembelahan sel berikutnya dalam zona pelusida terbatas akan membagi sitoplasma dalam pembelahan secara terus menerus menjadi unit-unit yang lebih kecil.

Penggabungan berikutnya dari kedua jenis pronukleus dari satu sel embrio ini disebut sebagai sigot. Segera sigot yang terbentuk akan mengalami serangkaian pembelahan mitosis yang disebut *cleavage*. Pembelahan *cleavage* pertama akan menghasilkan 2-sel embrio, yang terdiri atas 2 sel blastomer. Setiap blastomer dari 2-sel embrio memiliki ukuran yang sama besar dan merupakan representasi separuh dari single

sel sigot. Setiap blastomer akan mengalami pembelahan mitosis berikutnya, menjadi 4, 8 dan 16 sel blastomer. Jumlah blastomer meningkat disertai dengan penurunan ukuran dari blastomer. Selama mengalami pembelahan cleavage embrio tahap awal praimplantasi akan ditransport dari oviduk kearah koruna uteri. Perkembangan dan umur embrio praimplantasi, rute transportasi dalam oviduk kearah kornua uteri serta waktu transportasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Perkembangan, umur embrio dan waktu transportasi embrio awal praimplantasi di dalam oviduk dan uterus (modifikasi dari Senger 2005).

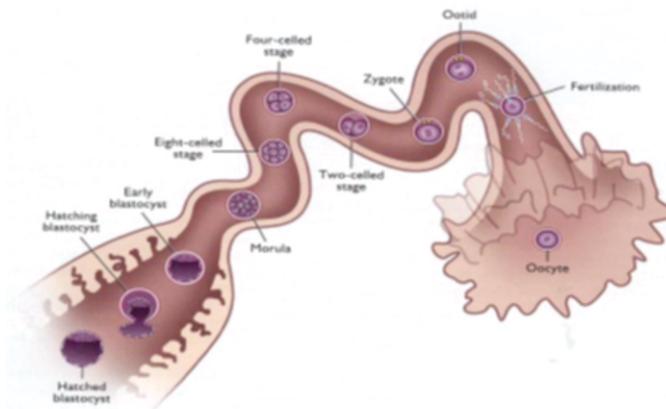
Tahap sel embrio	Umur embrio (hari)	Lokasi
2-sel	1	Oviduk
4-sel	1,5	Oviduk
8-sel	3	Oviduk
Morula	4-7	Cornua uteri
Blastosis	7-12	Cornua uteri
<i>Hatching</i> blastosis	9-11	Cornua uteri

Dalam tahap awal embriogenesis, setiap blastomer memiliki potensi berkembang menjadi keturunan organisme asal yang utuh dan sehat. Blastomer dari 2-, 4- dan 8- sel embrio adalah totipotensi. Totipotensi ini merupakan terminology yang digunakan untuk menjelaskan kemampuan sel tunggal (blastomer) berkembang menjadi individu yang sempurna. Totipotensi tidak dapat didemonstrasikan kemampuannya pada sel embrio lebih lanjut dari tahap 16-sel.

Jika sekelompok sel terbentuk dan blastomernya sudah tidak dapat dihitung secara tepat, tahap embrio awal ini disebut morula. Jika morula terbentuk, sel-sel bagian luar mulai menjadi lebih kompak dari pada bagian tengah. Selama tahap morula, sel-sel mulai memisah menjadi dua kelompok sel yang berbeda, bagian dalam dan luar. Sel-sel bagian dalam morula mengembangkan *gap-junction*, yang memungkinkan komunikasi interselular dan mempertahankan sel tetap dalam kelompok kluster. Sel-sel bagian luar morula mengembangkan perlekatan antar sel yang dikenal dengan *tight junction*. *Tight junction* ini menyebabkan perubahan permeabilitas sel-sel bagian luar. Setelah *tight junction* terbentuk cairan mulai terakumulasi dalam embrio. Akumulasi cairan ini disebabkan karena adanya *active sodium pump* dari sel-sel bagian luar morula yang memompa ion-ion natrium kebagian dalam morula. Penumpukan ion-ion menyebabkan konsentrasi ion sekeliling sel-sel bagian dalam morula meningkat. Ketika kepekatan ion dalam morula meningkat, air berdifusi masuk morula melalui zona pelusida dan mulai membentuk rongga berisi cairan dan disebut blastocoele.

Jika rongga berisi cairan sudah jelas terbentuk, embrio disebut blastocyst. Secara alamiah *tight junction* (diantara *outer cells*) dan *gap junction* (diantara *inner cells*), maka embrio menjadi terpartisi menjadi dua kelompok sel yang berbeda. Bagian dalam dikenal dengan *inner cell mass* (ICM) dan bagian luar disebut trophoblast. *Inner cell mass* akan menjadi tubuh organism. Sel-sel trophoblast akan menjadi chorion yang nantinya menjadi plasenta yang merupakan komponen fetus (Senger 2005).

Ketika blastosis melanjutkan mitosisnya, cairan akan terus mengisi blastocoele dan disertai dengan peningkatan tekanan dalam embrio. Bersamaan dengan pertumbuhan dan akumulasi cairan, sel-sel trophoblast mensekresi enzim proteolitik. Enzim proteolitik akan menyebabkan zona pelusida lemah, menipis dan akhirnya akan ruptur sejalan dengan peningkatan tekanan yang timbul dari akumulasi cairan. Peningkatan tekanan dan menipisnya zona pelusida akan membentuk *expanded blastocyst*. Zona pelusida ruptur sebagian trophoblast keluar disebut *hatching blastocyst*. Jika akhirnya seluruh blastosis keluar dari zona pelusida disebut *hatched blastocyst*. Blastosis yang telah keluar meninggalkan zona pelusida (*hatched blastocyst*) ini akan melekat dan berkembang di selaput lendir endometrium yang peristiwanya disebut implantasi atau nidasi. Perkembangan dan umur embrio praimplantasi dalam rute perjalanan dari ovulasi di ovarium sampai uterus dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5 Ilustrasi skematis perkembangan embrio praimplantasi dalam saluran reproduksi betina (Senger 2005).

2.3 Hormon Reproduksi dan Superovulasi

Didalam tubuh terdapat suatu kelenjar yang tidak memiliki alveoli dan pembuluh penyalur disebut kelenjar endokrin. Sel-sel khusus didalam kelenjar endokrin dapat menghasilkan zat organik yang dirembeskan kedalam peredaran darah dalam jumlah sangat kecil dan dapat merangsang sel-sel tertentu untuk berfungsi. Zat organik yang diproduksi dan disekresikan oleh kelenjar endokrin disebut hormon sedangkan organ lain yang sel-selnya dirangsang oleh hormon untuk berfungsi disebut target organ.

Kelenjar endokrin yang memiliki fungsi utama mengontrol proses reproduksi dan menjamin kesinambungan pelestarian keturunan individu disebut endokrin reproduksi. Kelenjar endokrin yang termasuk kedalam golongan kelenjar endokrin reproduksi diantaranya hipotalamus, hipofisa, gonad (testes dan ovaria) dan plasenta. Secara kolektif kelenjar-kelenjar ini bekerja sama secara konser dan membuat suatu putaran interkoneksi (*interconnecting loop*) yang dikenal sebagai poros hipotalamo-hipofisagonadal (*hypotahamopituitarygonadal axis*). Pengaturan fungsi endokrin melalui peredaran darah disebut pengaturan humoral yang mencakup pengaturan sintesa, produksi dan penambahan atau sebaliknya mengurangi atau menghentikan sama sekali sekresi hormon. Proses ini disebut umpan balik (*feed back mechanism*). Jika sekresi hormon meningkat disebut umpan balik positif, tetapi jika sekresi hormon dihambat disebut umpan balik negatif.

Kelenjar hipofisa anterior mensekresi *follicle stimulating hormone* (FSH), *luteinizing hormone* (LH), prolactin (PRL) dan beberapa macam

hormon lainnya. *Follicle stimulating hormone* dan LH berfungsi merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel serta menstimulir ovulasi, sedangkan PRL diantaranya mengatur laktasi. Kelenjar hipofisa sering disebut *master gland*, tetapi saat ini dapat dibuktikan bahwa hipofisa merupakan pembantu hipotalamus yang melaksanakan perintah-perintah yang diberikan oleh hipotalamus.

Hipofisa anterior melalui suatu jaringan pembuluh-pembuluh darah yang disebut sistim porta pembuluh darah dihubungkan dengan eminentia mediana dari hipotalamus. *Releasing factor* (RF) yang disekresi oleh neuron-neuron hipotalamus melalui sistim porta ditranspot ke sel-sel hipofisa anterior. Dalam siklus kelamin FSH-RF dan LH-RF juga disebut sebagai gonadotropin *releasing hormone* (GnRH) yang memiliki rumus kimia decapeptide. FSH-RF dan LH-RH dapat merangsang pelepasan sekresi FSH dan LH oleh hipofisa anterior.

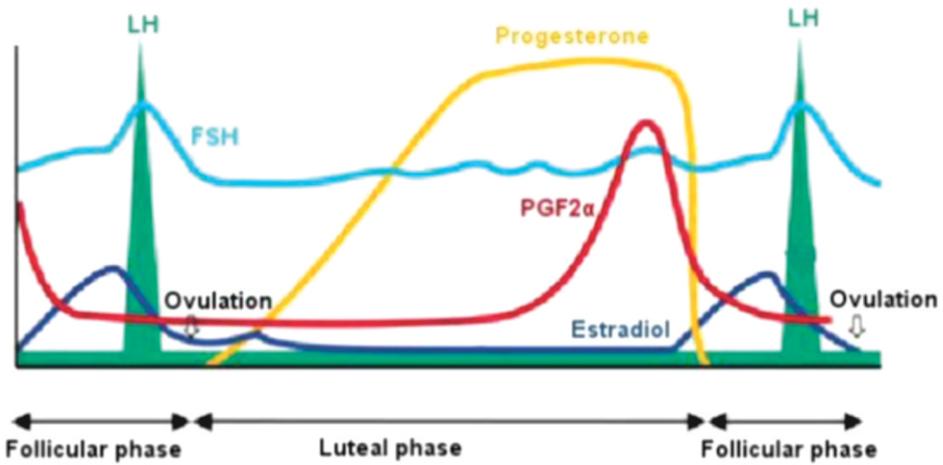
Gonadotropin FSH dan LH memiliki target organ ovarium. Sekresi FSH terjadi secara ritmis selama empat sampai lima hari sebelum berahi. Menjelang fase luteal berakhir konsentrasi FSH dalam plasma meningkat dan secara sinergis dengan LH akan merangsang pertumbuhan folikel, dan dalam waktu dua sampai empat hari kemudian, folikel akan mencapai stadium folikel tertier yang matang dan siap ovulasi (folikel de Graaf). Selama interval waktu yang pendek tersebut, dibawah pengaruh FSH dan estradiol-17beta (E_2) timbul pembentukan reseptor-reseptor untuk kedua macam hormon tersebut pada sel-sel granulosa folikel dan pada saat yang bersamaan juga terjadi induksi pembentukan reseptor untuk LH.

Sel-sel teka interna folikel membentuk estrogen C19- steroid dibawah pengaruh LH, yang didalam sel-sel granulosa dibawah pengaruh FSH diubah menjadi estrogen C18-steroid. Dengan meningkatnya produksi E_2 akan menstimulir sekresi LH. Tampaknya LH akan saling E_2 akan menurun bahkan respon reseptor FSH hilang sama sekali. Reaksi ini menyebabkan pertumbuhan folikel terhenti. Dalam waktu bersamaan, LH menginduksi pembentukan reseptor untuk PRL dan juga terjadi awal proses luteiniasi sebelum ovulasi. Prolactin menginduksi kembali reseptor LH di dalam jaringan luteal, dalam jangka waktu 48 jam. Dari hasil penelitian akhir-akhir ini dapat diperlihatkan bahwa folikel preovulasi mensekresi suatu hormon yang disebut inhibin. Sekresi FSH dari hipofisa anterior dapat dihambat oleh inhibin. Jadi jika ada folikel yang berkembang menjadi matang, akan terjadi pehambatan sekresi FSH melalui mekanisme ini sehingga tidak ada perkembangan dan pertumbuhan dari folikel yang lainnya.

Dalam folikel preovulasi, hubungan sel antara oosit dengan sel-sel kumulus dan diantara sel-sel kumulus terdiri dari *gap junction* yang akan putus karena pengaruh LH. Sel-sel kumulus sekitar oosit dapat menghasilkan plasminogenaktifator yang berperanan penting pada proses rupturnya folikel waktu ovulasi. Kesenambungan produksi progesteron oleh korpus luteum tidak tergantung pada PRL akan tetapi tergantung dari LH level. Konsentrasi dasar LH dalam plasma sekitar 1,0 ng/ml. Selama fase luteal, sekresi FSH berjalan terus dengan fluktuasi ritmis dan menimbulkan suatu selombang pembentukan pertumbuhan folikel bahkan dapat dilihat pada grafik fluktuasi plasma E_2 . Konsentrasi progesteron menghambat

pelepasan sekresi LH, meskipun kadang-kadang terjadi sedikit kenaikan konsentrasi LH pada pertengahan siklus kelamin. Biasanya folikel yang tumbuh di pertengahan siklus kelamin ini disebut parasiklus folikel. Parasiklus folikel ini tidak dapat ovulasi, bahkan sebaliknya akan berdegenerasi dan menjadi folikel atretik, karena kekurangan reseptor-reseptor FSH, LH dan E_2 sehingga tidak ada stimulasi yang definitif.

Jika proses kebuntingan tidak terjadi, endometrium akan menghasilkan $PGF_{2\alpha}$, karena tidak ada hambatan dari trophoblast. Dari sini $PGF_{2\alpha}$ masuk kedalam pembuluh-pembuluh vena uterus yang beberapa centimeter sebelum bermuara di *V. cava caudalis* berjalan paralel, berhimpitan dan kontak dengan arteri-arteri ovaria. Pada trayek yang bersinggungan ini terjadi pertukaran $PGF_{2\alpha}$ dari *V. uterina* kedalam *A. ovarica* melalui mekanisme *counter current* sehingga terjadi potong kompas menghindari sirkulasi umum dari peredaran darah, langsung dapat mencapai ovaria dan menyebabkan korpus luteum regresi. $PGF_{2\alpha}$ mempunyai aktifitas kerja luteolisis. Proses ini terjadi sekitar 17 hari setelah estrus dan ditandai dengan penurunan konsentrasi progesteron dengan tajam. Blokade pelepasan sekresi GnRH oleh progesteron secara tidak langsung dinetralsir oleh luteolisa $PGF_{2\alpha}$ dan siklus berlanjut dengan fase folikuler berikutnya (Gambar 6).



Gambar 6 Perubahan relatif tingkat konsentrasi hormon reproduksi selama siklus estrus yang normal pada ternak sapi (dimodifikasi dari Intervet oleh Bertens 2010).

Panjang siklus kelamin sapi berkisar dari 18-24 hari dengan rata-rata 21 hari. Setiap selang waktu siklus, level hormon reproduksi dalam plasma darah naik dan turun sesuai dengan pola regular dan tetap (mengikuti ritme dan fluktuasi yang regular). Pola tersebut merupakan hasil dari sejumlah interaksi diantara organ-organ endokrin dan hormon-hormonnya. Peningkatan level suatu hormon dapat menstimulir atau sebaliknya menghambat produksi salah satu atau lebih dari hormon lainnya.

Suatu aspek yang penting dari endokrinologi reproduksi ternak sapi adalah superovulasi. Setiap satu siklus kelamin sapi hanya mengovulasikan satu oosit matang (oosit sekunder, stadium metafase II). Beberapa puluh tahun yang lalu, telah ditemukan bahwa aplikasi hormon dengan aktifitas

seperti FSH akan menstimulir pertumbuhan dan pematangan beberapa folikel pada ovarium, sehingga dapat terjadi ovulasi dalam jumlah yang besar. Preparat hormon yang paling umum digunakan untuk menginduksi respon superovulasi adalah ekstrak hipofisa dari babi atau domba yang berisi FSH dan pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG), suatu hormon dengan aktifitas seperti FSH yang diperoleh dari serum kuda bunting.

Sejumlah metoda yang berbeda telah berhasil digunakan untuk superovulasi sapi. Secara umum, aplikasi hormon superovulasi dimulai empat sampai lima hari sebelum onset estrus yang diharapkan (Hofmann 1981). Superovulasi dengan PMSG, hanya diperlukan satu kali suntikan, karena waktu paruhnya (*half live*), yaitu waktu yang dibutuhkan sampai konsentrasi menjadi separuh dari konsentrasi semula, cukup lama. Waktu paruh PMSG pada sapi sekitar dua sampai lima hari (Allen dan Stewart 1978). *Follicle stimulating hormone* memiliki waktu paruh yang pendek sekitar 2- 5 jam, sehingga perlu penyuntikan berulang selama periode superovulasi. Prostaglandin $\text{PGF}_{2\alpha}$ dapat dipakai dalam lanjutan superovulasi supaya dapat menentukan secara tepat waktu estrus. Tipe skema superovulasi pada ternak sapi yaitu dimulai penyuntikan FSH mulai 9 hari sampai 13 hari setelah estrus dan menyuntik $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada hari ke empat dari FSH program. Sapi diharapkan estrus dalam jangka waktu 36 sampai 60 jam kemudian setelah penyuntikan prostaglandin.

BAB III

KAJI BANDING METODA SUPEROVULASI

Keberhasilan transfer embrio tergantung dari keberhasilan setiap tahap transfer embrio yang meliputi seleksi donor dan resipien, sinkronisasi estrus, jenis dan dosis hormon gonadotropin eksogen untuk superovulasi, inseminasi buatan dan teknik pemanenan embrio. Penelitian-penelitian harus dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan transfer embrio ini. Hasil penelitian dari luar negeri tidak bisa begitu saja diterapkan di Indonesia karena perbedaan musim, temperatur, kelembaban, intensitas cahaya matahari, vegetasi, curah hujan, yang akan mempengaruhi fungsi fisiologi hewan.

3.1 Superovulasi

Berbeda dengan sapi jantan yang menghasilkan beberapa juta sampai beberapa milyar spermatozoa setiap hari, seekor sapi betina secara normal hanya menghasilkan satu atau dua sel telur pada setiap ovulasi dalam satu siklus. Dengan perlakuan superovulasi maka diharapkan diperoleh sel telur dalam jumlah yang lebih banyak dari biasanya. Superovulasi adalah proses biologi pertumbuhan, pematangan dan pelepasan sel telur dalam jumlah melebihi ovulasi alamiah. Superovulasi dapat terjadi secara alamiah dan buatan. Bila terjadi secara alami, akibat superovulasi dapat menyebabkan kelahiran kembar apabila sel-sel telur itu dibuahi oleh spermatozoa. Sedangkan secara buatan diinduksi dengan pemberian hormon gonadotropin eksogen diantaranya *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), *follicle stimulating hormone* (FSH), *human*

menopause gonadotropin (hMG) dan *horse anterior pituitary* (hAP). Dari ke empat hormon gonadotropin tersebut yang sering dipakai adalah PMSG dan FSH.

Perlakuan superovulasi bertujuan menstimulasi proses biologis rekrutment banyak folikel untuk tumbuh, berkembang, matang dan diakhiri dengan ovulasi. Sel-sel telur yang diovulasikan tersebut diharapkan dapat difertilisasi untuk memperoleh banyak embrio yang layak transfer dan jika ditansfer ke resipien akan memberikan angka kebuntingan yang tinggi (Bó *et al.* 2002).

Adam *et al.* (1994) melaporkan bahwa superovulasi yang dimulai pada saat awal dimulainya gelombang folikel memberikan respon positif yang optimal. Perlakuan superovulasi umumnya dimulai antara hari ke-8 sampai 12 (D8-D12), setelah estrus yaitu di awal pertumbuhan gelombang folikel kedua (Bó *et al.* 1995). Akan tetapi perlu diperhatikan bahwa terjadinya gelombang kedua ini berbeda antara sapi yang punya pola gelombang yang berbeda (Jaiswal *et al.* 2009), karena sapi dapat memiliki 2 sampai 4 gelombang folikel dalam satu siklus kelaminnya.

Aplikasi FSH maupun PMSG masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Walaupun PMSG sangat potensial dalam menstimulasi fungsi ovarium, namun waktu paruh yang panjang dalam sirkulasi darah memungkinkan untuk menginduksi pertumbuhan dan perkembangan folikel tanpa diikuti ovulasi. Dalam hal ini, antibodi anti PMSG diperlukan dalam membatasi efek negatif PMSG. Berkaitan dengan pengoptimalan program superovulasi, dalam tulisan ini ditampilkan perbandingan efektifitas metode aplikasi hormon gonadotropin eksogen (FSH, PMSG dan

kombinasi PMSG-antibodi (monoklonal) anti-PMSG) dalam stimulasi superovulasi pada sapi perah FH dan sapi potong PO dengan kriteria, a) jumlah korpus luteum dan folikel, b) jumlah embrio hasil panen yang laik transfer.

Menurut Betteridge (1980) hormon gonadotropin sebaiknya diberikan pada hari ke-10 sampai ke-14 siklus estrus, ditambah dengan penyuntikan PGF2 α pada hari ke-3 setelah penyuntikan hormon gonadotropin pertama. Estrus akan terlihat 42 sampai 48 jam setelah penyuntikan PGF2 α dan inseminasi buatan dapat dilakukan 10 sampai 24 jam setelah estrus. Untuk mendapatkan hasil panen embrio yang baik, sebaiknya inseminasi buatan dilakukan paling sedikit dua kali dengan selang waktu 12 jam

Menurut Armstrong (1993), superovulasi merupakan faktor terpenting yang menjadikan transfer embrio teknologi untuk perbaikan genetik hewan ternak. Respon biologi superovulasi dapat distimulasi dengan pemberian hormon gonadotropin eksogen. Kebanyakan peneliti menekankan superovulasi pada sumbangannya untuk rataan ovulasi yang diinduksi oleh hormon gonadotropin. Sebenarnya rataan ovulasi hanya merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi rataan jumlah embrio, dan rataan ovulasi tidak berhubungan dengan rataan embrio yang laik transfer. Masih menurut Armstrong, indikator terbaik keberhasilan suatu program superovulasi adalah jumlah anak lahir yang hidup per donor. Berbeda dengan Armstrong, Popova *et al.* (2002) memakai kriteria: jumlah ova, rataan fertilisasi, perkembangan embrio, dan kualitas embrio sebagai parameter keberhasilan superovulasi.

Menurut Supriatna (1997) terdapat tiga hambatan dalam penggunaan superovulasi pada sapi yaitu 1) respon terhadap gonadotropin tidak konsisten, 2) jumlah ova yang diperoleh dari superovulasi yang berturut-turut dari hewan yang sama akan menurun karena pengaruh balik ovarium dan pembentukan anti hormon, 3) angka fertilitasnya rendah. Deni (2001) membuktikan bahwa terjadi penurunan jumlah ova dan embrio laik transfer yang diperoleh dari program superovulasi berturut-turut. Walaupun demikian, rasio embrio laik transfer terhadap jumlah ova tidak berubah. Program superovulasi yang terus-menerus dengan hormon gonadotropin yang sama bahkan dapat menghilangkan respon superovulasi. Efek negatif ini dapat dikurangi dengan pemakaian selang-seling hormon gonadotropin yang berbeda dan adanya waktu istirahat untuk program superovulasi berturut-turut. Hal ini dijelaskan oleh Armstrong (1993) dalam reviewnya bahwa banyak faktor yang mempengaruhi superovulasi sehingga dapat menghasilkan jumlah anak sapi lahir hidup melebihi normal. Faktor tersebut diantaranya adalah a) faktor yang mempengaruhi respon ovulasi, yaitu, tahap siklus estrus, jenis dan dosis hormon gonadotropin, faktor yang mempengaruhi peningkatan rekrutmen folikel pre-antral dan faktor yang menyebabkan regresinya folikel dominan; b) faktor yang mempengaruhi fertilisasi dan kelangsungan hidup embrio, yaitu fertilisasi, faktor yang mempengaruhi perkembangan embrio dan pengaruh superovulasi pada embrio; c) faktor yang berhubungan dengan program dan manajemen hewan yaitu umur donor dan resipien, kondisi donor dan resipien, musim, temperatur dan cuaca.

Tidak berbeda jauh dengan Armstrong, Jillella (2009), mengatakan respon ovarium untuk superovulasi dipengaruhi oleh faktor umur, berat badan, keturunan, status pemberian makanan, kegiatan siklus berahi dan laktasi dari donor, iklim dan musim, jenis dan dosis hormon yang digunakan. Sunarti *et al.* (2001) melaporkan bahwa perlakuan superovulasi maupun umur induk berpengaruh terhadap meningkatnya kejadian abnormalitas embrio. Hal ini dikarenakan terjadinya fragmentasi DNA sejalan dengan bertambahnya umur. Dalam penggunaan yang berulang dari hormon gonadotropin eksogen yang merupakan glikoprotein, adalah adanya kemungkinan terjadinya reaksi imunologis. Respon imunologis karena penyuntikan berulang dari hormon gonadotropin eksogen dapat membatasi berapa kali donor dapat disuperovulasi. Baik FSH maupun PMSG adalah glikoprotein yang karenanya mempunyai potensi untuk menginduksi reaksi imunologis. Antigenitas ini menunjukkan bahwa penyuntikan berulang dapat menstimulir terbentuknya anti-gonadotropin, yang mungkin dapat mereduksi respon berikutnya atau mungkin mengganggu hormon gonadotropin endogen. Akan tetapi pada kenyataannya beberapa tim TE dari berbagai negara yang sudah maju industri transfer embrionya, belum pernah menghadapi permasalahan tersebut dan data mengenai adanya reaksi anti-gonadotropin sangat jarang diperoleh. Sepanjang pengetahuan, hormon tersebut sebaiknya digunakan secara hati-hati. Kemungkinan kelainan endokrin dapat dikurangi, jika donor diberi kesempatan untuk bunting setelah beberapa kali superovulasi. Setiap

donor dapat dilakukan tiga kali superovulasi dalam satu tahunnya (Supriatna dan Pasaribu 1992).

3.2 Rute, Frekuensi dan Efektivitas Aplikasi Penyuntikan Gonadotropin Superovulasi

Efektivitas hormon gonadotropin dalam pelaksanaan superovulasi untuk menghasilkan sel-sel telur sangat tergantung dari beberapa faktor diantaranya, rute aplikasi, biopotensi hormon, waktu paruh (*half life*), konsentrasi dan status reproduksi ternak donor itu sendiri. Rute aplikasi obat-obatan termasuk hormon secara umum dapat per oral, intra muscular, intravena, intrauteri, dan subkutan. Rekrutment, pertumbuhan, perkembangan dan pematangan folikel memerlukan sekitar 4-5 hari. Agar folikel beserta sel telur dapat matang perlu stimulasi yang terus menerus agar bisa matang dan dapat ovulasi. Untuk itu diperlukan sejumlah hormon yang dapat menunjang secara menerus sampai folikel matang dan ovulasi.

Hormon gonadotropin eksogen yang dipakai untuk superovulasi, secara biokimiawi merupakan hormon glikoprotein. Dalam saluran pencernaan, bahan biologis glikoprotein merupakan makromolekul yang dapat terurai menjadi monomer-monomer glukosa dan asam-asam amino, sehingga jika gonadotropin diaplikasi secara oral maka biopotensinya akan hilang karena terurai menjadi unit-unit molekul terkecil. Sehingga jelas rute aplikasi hormon gonadotropin untuk superovulasi tidak bisa peroral akan tetapi sebaiknya intramuskular dan subkutan. Selain itu juga perlu diperhatikan waktu paruh gonadotropin

yang akan dipakai. *Follicle stimulating hormone* (FSH) memiliki waktu paruh 2-5 jam sehingga perlu penyuntikan berulang pagi sore dengan selang waktu penyuntikan 10-12 jam selama 4-5 hari, sedangkan PMSG memiliki waktu paruh 124 jam (5 hari) sehingga penggunaan PMSG untuk superovulasi dapat dilakukan hanya sekali saja dengan rute intramuskular.

Metoda konvensional penyuntikan berulang FSH, sangat membutuhkan waktu (*time consuming*), dan dapat menyebabkan stress yang dapat memberikan dampak negative terhadap donor. Untuk mengatasi penyuntikan berulang dilakukan melalui kombinasi FSH dengan media depo seperti *polyvinylpyrrolidone* (PVP)(Suzuki *et al.* 1994) dan gel aluminium hidroksida (Yoshioka *et al.* 2008, Kimura *et al.* 2007). Depo ini dapat membawa dan melepas secara bertahap sedikit demi sedikit FSH dalam satuan waktu tertentu. Media kombinasi ini disuntikkan dengan dosis tunggal secara intramuskular dan dilaporkan memiliki tingkat keberhasilan yang beragam. Namun ada kekhawatiran bahwa superovulasi dengan FSH yang dikombinasikan dengan bahan depo tersebut mungkin dapat menimbulkan perkembangan antibodi yang bereaksi negatif terhadap FSH karena bahan depo (yang biasa dipakai untuk bahan vaksin) seperti PVP bersifat iritasi yang dapat menginduksi reaksi pembentukan antibody (Sutherland, 1991). Upaya lain mengatasi efek negatif timbulnya reaksi antigen antibodi yaitu mengkombinasikan FSH dengan menggunakan polimer *biodegradable*, antara lain larutan *slow release formulation* (SRF) berbasis hyaluronan (SRF, Bioniche Animal Health Inc., Belleville, ON, Canada). Penggunaan SRF sebagai pembawa dilaporkan oleh Tríbulo *et al.* (2011, 2012). Kombinasi SRF sebagai

pembawa FSH menghasilkan embrio layak transfer yang serupa dengan metode konvensional.

Aplikasi FSH melalui rute subkutan dilaporkan oleh Hiraizumi *et al.* (2015) dan Takedomi *et al.* (1995). Penyuntikan dengan rute subkutan dimaksudkan memanfaatkan lemak dibawah kulit sebagai bahan depo untuk FSH agar dapat melepas FSH dalam jangka waktu yang cukup panjang dan dapat menstimulasi folikel terus menerus selama 4-5 hari. Hiraizumi *et al.* (2015) menyuntik via subkutan pada sapi potong (*Japanese Black*) dan menghasilkan respon superovulasi sejumlah embrio layak transfer sebanyak dengan metode konvensional. Akan tetapi penelitian sebelumnya yang dilakukan Takedomi *et al.* 1995 pada sapi perah memberikan hasil berbeda berupa respon superovulasi yang rendah, karena sapi perah memiliki jaringan lemak adipose subkutan lebih sedikit dibandingkan sapi potong.

Gonadotropin hormon eksogen yang sudah masuk dalam peredaran darah akan segera dimetabolisir menjadi metabolit dan mengalami degradasi serta mulai kehilangan biopotensinya secara bertahap sesuai dengan waktu paruhnya. Konsentrasi gonadotropin eksogen dalam peredaran darah sangat dipengaruhi oleh rute penyuntikan, bahan pelarut hormon atau pembawa (depo) dan degradasi metabolis (*elimination rate*) dari gonadotropin tersebut. Penyuntikan intramuskular sekitar 40% tertahan dalam jaringan dan selebihnya masuk peredaran darah. Aplikasi intra vena jauh lebih tinggi jumlahnya yang masuk peredaran darah dibanding intra muskular. Pelarut (diluent) seperti 0,9% NaCl fisiologis akan lebih cepat terabsorpsi dan lebih cepat

dimetabolisir disbanding dengan pembawa berupa depo seperti PVP. Proses absorpsi yang cepat juga akan menghasilkan degradasi dengan kecepatan sama, sehingga folikel yang terkespos sejumlah konsentrasi FSH dalam periode waktu yang singkat tidak akan mampu mempertahankan pertumbuhannya sampai ovulasi (Bó *et al.* 1994).

Untuk memperlambat absorpsi dan pelepasan hormon gonadotropin eksogen dilakukan pencampuran dengan media pembawa atau depo sehingga absorpsi FSH lebih lambat dibandingkan dengan dicampur larutan 0,9% NaCl fisiologis. Jika konsentrasi FSH dapat dipertahankan cukup tinggi dalam sirkulasi darah selama waktu 4-5 hari sesuai pertumbuhan pematangan folikel dapat memicu proses superovulasi folikel. Metode aplikasi penyuntikan yang mempengaruhi tingkat absorpsi FSH akan lebih berperan dan menjadi faktor pembatas dalam pelaksanaan superovulasi dan mengarah kepada penggunaan aplikasi dosis tunggal (Tribulo *et al.* 2012).

Di bidang kedokteran hewan, banyak zat-zat farmakologis seperti obat lokal anastesi dan analgesik diaplikasikan melalui penyuntikan kedalam ruang epidural (Thurmon *et al.* 1996). Beberapa tindakan medik seperti aplikasi obat anastesi dan analgesik disuntikkan pada ruang epidural dengan tujuan memperpanjang durasi efeknya (Grubb *et al.* 2002). Ruang epidural adalah ruang diantara jaringan lapisan terluar susunan syaraf tulang belakang dan kanal vertebral yang dikelilingi oleh jaringan berlemak (Moore and Dalley 2006). Penyuntikan epidural biasanya dilakukan pada ruang antar tulang sacrum dengan tulang ekor ke1 (os Sacrum - os Cy1) atau antara tulang ekor ke 1 dan 2 (os Cy1 - os Cy2).

Rute epidural dapat dipakai untuk penyuntikan hormon dan analog-analognya untuk menghasilkan respon lokal farmakologis selektif yang diharapkan. Secara anatomis ovarium diinervasi oleh syaraf sympathetic yang berasal dari syaraf plexus ovaria dan syaraf hypogastric, maka administrasi hormon gonadotropin melalui rute epidural secara tidak langsung dapat mempengaruhi ovarium (Dissen *et al.* 1993, Pelagalli and Botte, 2003),

Daya kerja dan respon farmakologis obat-obatan yang disuntikkan kedalam ruang epidural tergantung banyak faktor antara lain volume media, konsentrasi obat, kemampuan berikatan dengan air (hydrophile atau hydrophobe), lipofilisitas (*lipophilicity*) dan bobot molekulnya (Thurmon *et al.* 1996, Lee *et al.* 2005). Rute penyuntikan FSH yang bersifat hidrofilik ke dalam ruang epidural yang bersifat lipofilik dapat memperlambat absorpsi FSH ke dalam peredaran darah karena adanya lapisan lemak (adipose) di dalamnya dan dapat menginduksi proses superovulasi pada sapi.

3.3 Follicle Stimulating Hormone (FSH)

Pada masa awal diintroduksi metoda TE dalam program pembiakan ternak, pelaksanaan superovulasi memiliki prosedur atau protokol konvensional, yaitu superovulasi dilakukan dengan penyuntikan hormon FSH i.m. yang dimulai pada D8-D12 (hari ke 8 sampai dengan 12 setelah berahi) pada pagi dan sore selama 4-5 hari (Mapletoft dan Bó 2012) atau bahkan ada yang memperpanjang sampai 6-7 hari (Guerra *et al.* 2012, García *et al.* 2012) dengan dosis tetap atau menurun untuk menstimulasi perkembangan folikel sampai folikel dapat ovulasi.

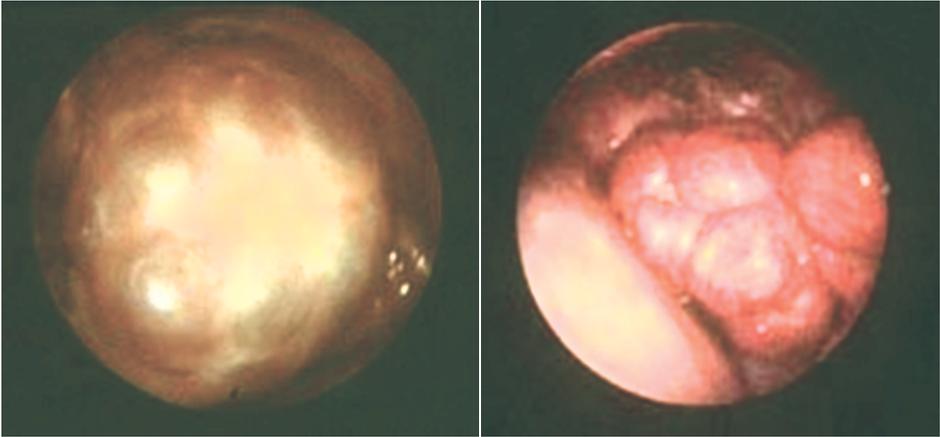
Secara kimiawi FSH sapi merupakan glikoprotein dengan berat molekul (BM) 37.300, terdiri dari subunit alfa (BM 12.600) dan subunit beta (BM 18.500). Menurut hasil penelitian Pastorova (1998) bahwa pemberian FSH untuk superovulasi menyebabkan peningkatan konsentrasi epinephrine dan norepinephrine di eminentia mediana (EM). Pada hipofise, FSH meningkatkan epinephrine, sedangkan pada epifise, FSH meningkatkan norepinephrine tetapi menurunkan konsentrasi dopamine.

Menurut Docke (1981) dan Baruselli *et al.* (2006) FSH memiliki waktu paruh atau *half life (elimination rate)* sekitar 2-5 jam. Karena singkatnya waktu paruh FSH ini maka pemberian FSH dalam kegiatan superovulasi pada sapi sebaiknya dilakukan dua kali sehari dengan interval waktu penyuntikan 8-12 jam selama empat hari berturut-turut dengan dosis menurun secara gradual berkisar antara 8 hingga 3 mg. Pemberian berulang ini akan menjamin konsentrasi FSH yang cukup dalam darah untuk menstimulasi perkembangan folikel (Supriatna dan Pasaribu 1992). Hal ini sesuai dengan yang di laporkan Walsh *et al.* (1993), bahwa sapi heifer yang disuntik FSH-P dua kali sehari mempunyai jumlah yang lebih tinggi dalam ovulasi, ukuran folikel, embrio yang dihasilkan dan embrio yang dapat dibekukan (*freezable embryos*) dibandingkan sapi heifer yang disuntik FSH-P satu kali sehari. Walaupun demikian tidak ada perbedaan kualitas embrio yang dihasilkan.

Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Fernandez *et al.* (1993), hasil penelitiannya mengatakan bahwa superovulasi pada sapi Rubia Galega dengan pemberian FSH satu kali sehari subkutan lebih baik walaupun tidak

berbeda nyata dengan pemberian FSH dua kali sehari. Ini menunjukkan bahwa penggunaan FSH satu kali sehari subkutan akan lebih efektif dan efisien. Proses penyuntikan berulang pagi-sore, memerlukan alokasi waktu yang lama (*time consuming*) dan diperlukan tenaga khusus dalam teknis pelaksanaannya. Selain itu, penyuntikan dua kali sehari dapat memberikan faktor cekaman terhadap donor yang mungkin bisa menurunkan respon superovulasinya (Bó *et al.* 1994).

Hasil penelitian Hofmann (1981) telah membuktikan efek FSH dalam superovulasi. Aplikasi FSH untuk superovulasi yang diberikan sebanyak 10 kali penyuntikan intramuskular dua kali per hari yaitu pagi sore selama 5 hari superovulasi. Dosis FSH menetap 10 mg perhari. Superovulasi penyuntikan pertama FSH dimulai pada hari ke-10 (D10) siklus kelamin pada sapi Frisian Holstein yang memiliki CL fungsional dengan kualitas baik. Hari ke-13 disuntik dua kali intramuskular pagi sore. Hari ke-10 (D10) sebelum dimulai program superovulasi CL dan hasil superovulasi pada hari ke-15 (D15) ovaria diperiksa secara fisik menggunakan laparoskop. Hasil penyuntikan FSH menunjukkan reaksi superovulasi yang baik dengan membesarnya ukuran ovaria dan adanya folikel-folikel matang siap ovulasi. Pada hari ke-10 setelah estrus karena superovulasi terbentuk banyak CL yang menunjukkan folikel-folikel hasil penyuntikan FSH dapat berlanjut dengan proses ovulasi (Gambar 7).



Gambar 7 Foto laparoskop ovaria sapi hasil superovulasi pada saat estrus dan setelah pemanenan embrio (Hofmann 1982).

Hasil survey Muawanah (2004) menyatakan bahwa ternak donor yang disuperovulasi dengan FSH dosis 36 mg aplikasi dua kali sehari selama empat hari mempunyai respon superovulasi yang paling rendah (44,44%) dibandingkan dosis 37, 38, 40, dan 44 mg (83,33%; 62,50%; 73,33% dan 83,33%), tetapi mempunyai jumlah embrio laik transfer perdonor yang lebih tinggi. Oleh karena itu, dia menyimpulkan bahwa dosis 36 mg cukup optimal digunakan sebagai hormon superovulasi.

Dalam pelaksanaan superovulasi, jumlah FSH yang dipakai bervariasi dan tergantung dari laboratorium yang memproduksi FSH (produsen FSH). *Follicle stimulating hormone-pituitary* (FSH-P) yang diproduksi dan didistribusikan oleh laboratorium Burns-Biotec Omaha Nebraska (USA) umumnya memerlukan sekitar 28 mg sampai dengan 30 mg FSH per ekor donor, dan FSH dengan nama dagang Antrin dari Firma Fujihira, Nippon

memerlukan 28 sampai dengan 30 Armour Unit (AU), sedangkan Folltropin dari Bioniche, Ontario-Canada memerlukan 400 mg per ekor sapi donor. Hormon FSH ini dalam bentuk kering beku atau *lyophilized* FSH. Jika akan dipakai harus dilarutkan terlebih dulu dengan 0,9% NaCl fisiologis.

Aplikasi FSH via subkutan dengan memanfaatkan deposit lemak dibawah kulit dapat menghasilkan respon superovulasi setara dengan metode konvensional yaitu penyuntikan FSH berulang pagi-sore selama 4 hari berturut-turut pada sapi potong (*Japanese Black*) (Hiraizumi *et al.* 2015). Teknik penyuntikan konvensional FSH subkutan pada sapi perah tidak menghasilkan respon superovulasi yang memuaskan, karena sapi perah memiliki jaringan lemak adipose subkutan lebih sedikit dibandingkan sapi potong (Takedomi *et al.* 1995).

Imron (2016) melaporkan dari hasil penelitiannya membandingkan perlakuan kombinasi penyuntikan tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural plus intramuskular (perlakuan kombinasi epi+i.m.) dengan penyuntikan FSH dua kali sehari secara intramuskular selama 4 hari (perlakuan intramuskular), menggunakan dosis total masing-masing 400 mg FSH (Folltropin, Bioniche Ontario-Canada). Respon superovulasi dari kelompok perlakuan epi+i.m (n=4) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan intramuskular (n=4) pada semua hasil pengamatan. Selanjutnya dalam penelitian aplikasi 280 mg FSH (n=4) yang disuntikkan dalam dosis tunggal ke dalam ruang epidural menghasilkan total koleksi dan embrio layak transfer ($9,0 \pm 2,65$ dan $3,33 \pm 2,52$) tidak berbeda nyata dengan kontrol perlakuan epi+im ($9,33 \pm 5,68$ dan $3,67 \pm 3,21$). Disimpulkan

bahwa supersovulasi dengan penyuntikan FSH dengan dosis tunggal ke dalam ruang epidural menghasilkan embrio layak transfer yang setara dengan penyuntikan dua kali sehari selama 4 hari.

Penggunaan FSH untuk superovulasi tidak terbatas pada program transfer embrio tetapi juga dapat dijadikan terapi pengobatan pada kasus *idiopathic infertility*. Deng dan Clark (2004) melaporkan bahwa superovulasi menggunakan FSH dan inseminasi intrauterine merupakan cara yang aman dan efektif dalam mengobati *idiopathic infertility*.

3.4 Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)

Secara kimiawi PMSG merupakan glikoprotein dengan berat molekul 64.000 dalton dan terdiri atas subunit alfa yang berat molekulnya 44.000 dalton dan subunit beta yang berat molekulnya 17.000 dalton (Christakos dan Bahl 1979, diacu dalam Supriatna *et al.* 1996). Konsentrasi dan susunan asam-asam amino dari PMSG subunit (alfa dan beta) mirip dengan FSH dan LH. Kedua subunit tersebut secara terpisah sendiri tidak mempunyai aktivitas biologis, akan tetapi jika bersatu dengan subunit yang sesuai dari FSH dan LH endogen, dapat menimbulkan aktivitas biologis dari ovaria (Papkoff 1978). Hormon gonadotropin ini terdapat pada serum darah kuda bunting muda dengan konsentrasi tinggi. Hormon ini dihasilkan dan disekresikan oleh sel-sel dari mangkok-mangkok endometrium uterus kuda bunting dengan umur kebuntingan sekitar 40 sampai 120 hari masa kebuntingan dan tidak dapat dieksresikan melalui urine, karena bobot molekul PMSG yang besar 64 kD tidak dapat melalui glomerulus ginjal. *Pregnant mare serum gonadotropin* tertahan dalam

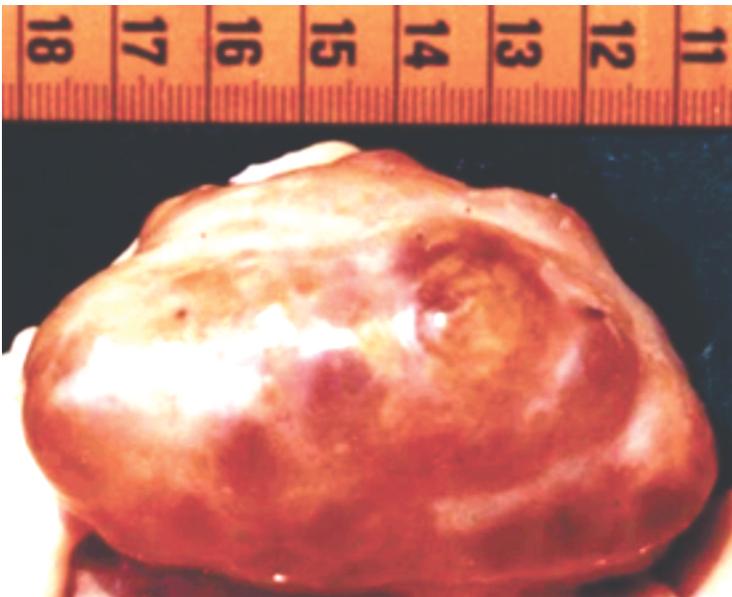
peredaran darah dengan konsentrasi tinggi dalam serum darah kuda bunting (Hafez 1987).

Mekanisme kerja PMSG sebagai agen superovulasi dalam menstimulasi perkembangan folikel-folikel tambahan lainnya melalui beberapa cara yaitu diantaranya, 1) folikel-folikel kecil (*primordial follicles*) direkrut dan dipercepat pertumbuhannya menjadi folikel yang berkembang (*growing follicles*), 2) meningkatkan jumlah folikel preantral, 3) meningkatkan pertumbuhan folikel-folikel antral baik yang kecil maupun yang besar sehingga proporsi folikel antral yang mengalami atresia akan menurun, dan 4) menyelamatkan folikel atresia (stadium ringan) kembali dapat tumbuh berkembang dan ovulasi (Cahill 1982, diacu dalam Supriatna *et al.* 1996). Pastorova *et al.* 1998, melaporkan bahwa pemberian PMSG meningkatkan konsentrasi norepineprine pada hipofise, tetapi tidak ada perubahan terhadap epinephrine dan dopamine.

Yusuf (1992) melaporkan bahwa dosis PMSG 2.000 IU dibandingkan dengan dosis 1.000 IU dan dosis 3.000 IU merupakan dosis terbaik dalam menimbulkan respon superovulasi pada sapi. Dosis 3.000 IU dapat digunakan dalam kegiatan superovulasi namun tidak memberikan lebih banyak embrio dan juga tidak memperbaiki kualitas embrio bahkan meningkatkan jumlah folikel persisten. Ini menandakan semakin tinggi dosis PMSG, pengaruh respon negatif makin terlihat yaitu semakin banyaknya folikel persisten dan proporsi embrio laik transfer yang rendah.

Hormon gonadotropin eksogen PMSG dapat menstimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel yang telah ada pada kedua ovaria

sapi. Pada program superovulasi, hormon gonadotropin hanya diperlukan untuk stimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel. Selanjutnya proses ovulasi folikel-folikel tersebut diambil alih oleh hormon gonadotropin endogen yaitu dalam hal ini *luteinizing hormone*. Stimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel hanya diperlukan sekitar empat hari dan selanjutnya harus dihentikan, ovulasi terjadi dengan proses fisiologis internal dan merubah seluruh folikel yang ovulasi menjadi korpus luteum (Supriatna *et al.* 1996) (Gambar 8).



Gambar 8 Ovaria sapi hasil superovulasi menggunakan PMSG (Supriatna *et al.* 1996).

3.5 Superovulasi Komparatif antara PMSG dengan FSH

Menurut hasil penelitian Pastorova (1998) bahwa pemberian FSH untuk superovulasi menyebabkan peningkatan konsentrasi epinephrine dan norepinephrine di eminentia mediana (EM). Pada hifofise FSH meningkatkan epinephrine, sedangkan pada efifise FSH meningkatkan norepinephrine tetapi menurunkan konsentrasi dopamine. Sedangkan pemberian PMSG meningkatkan konsentrasi norepineprine pada hifofise, tetapi tidak ada perubahan terhadap epinephrine dan dopamine. Pengaruh hormon gonadotropin eksogen dalam mengubah konsentrasi catecholamine menunjukkan bahwa pengaruh FSH terutama pada eminentia mediana dan hifofise, sedangkan PMSG pada efifise.

Munoz *et al.* (1995) melaporkan superovulasi menggunakan FSH mempunyai jumlah ovulasi yang lebih tinggi dan berbeda nyata dibandingkan PMSG. Dengan FSH, hasil fertilisasi in vitro (FIV) cenderung sama dengan embrio normal dan jumlah embrio abnormal jauh lebih sedikit dibanding superovulasi yang distimulasi PMSG.

Hasil penelitian Harsono (2001), respon superovulasi lebih tinggi dibandingkan dengan PMSG baik pada sapi perah maupun pada sapi potong. Respon superovulasi oleh FSH tertinggi terlihat pada sapi potong, sedangkan jika menggunakan PMSG respon tertinggi terdapat pada sapi perah. Potensi menghasilkan embrio FSH jauh lebih tinggi dibandingkan dengan PMSG.

Papova *et al.* (2002) meneliti bahwa pada tikus Sprague-Dawley yang belum dewasa menunjukkan superovulasi menggunakan PMSG sama efektifnya dengan menggunakan FSH. Dengan demikian untuk transgenik

tikus lebih baik menggunakan PMSG karena lebih murah dan mudah aplikasinya. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa dosis hCG yang diberikan setelah PMSG sangat mempengaruhi hasil superovulasi. Sedangkan pemberian hCG setelah FSH tidak mempengaruhi hasil ovulasi.

Dalam studi banding PMSG dan FSH, Schmitz (1986) mengungkapkan bahwa, a) CL terpalpasi pada perlakuan FSH lebih tinggi daripada PMSG. Perbedaan ini sangat berarti. Jumlah CL terpalpasi akan menurun dengan makin seringnya donor distimulasi ($P < 0,05$) dan hal ini tidak tergantung pada preparat yang digunakan, b) folikel persisten lebih banyak terbentuk pada superovulasi pertama daripada kedua ketiga ($P < 0,05$). Sama pada kedua perlakuan baik FSH maupun PMSG, c) Jumlah embrio terkoleksi pada donor yang distimulasi FSH rata-rata 4,9 embrio, lebih tinggi daripada donor perlakuan PMSG dengan rata-rata 3,6 embrio. Pada pengulangan superovulasi jumlah rata-rata ini juga akan menurun. Penurunan jumlah embrio terkoleksi lebih cepat dan lebih besar pada PMSG daripada FSH.

Penelitian yang membandingkan aplikasi hormon FSH versus PMSG disertai dengan rute aplikasi penyuntikan antara intramuskular dan intraovari pada sapi Simbrah telah dilakukan oleh Adriani *et al.* (2007). Dalam penelitiannya menunjukkan bahwa aplikasi terbaik adalah superovulasi menggunakan 40 mg FSH dengan dosis menurun yang disuntikan melalui rute intramuscular. Superovulasi FSH tersebut menghasilkan corpus luteum sekitar $9,0 \pm 4,68$. Penelitian kaji banding hormone FSH dan PMSG dengan rute intramuscular dan intraovari dilakukan kembali pada sapi Brahman cross, dan hasilnya tetap

menunjukkan yang terbaik aplikasi 40 mg FSH dengan rute aplikasi intramuscular (Adriani *et al.* 2009).

3.6 Kombinasi FSH dan PMSG

Secara umum, hubungan dosis-rataan respon ovaria dengan dosis PMSG dapat diplot, tetapi keragaman dalam respon akan meningkat dengan meningkatnya dosis. Pregnant mare serum gonadotropin memiliki biopotensi yang tinggi dalam stimulasi ovaria. Sayangnya dosis tinggi PMSG dapat meningkatkan keragaman sel telur, abnormalitas sel telur dan banyaknya folikel persisten. Untuk mengurangi efek negatif PMSG, Ryan *et al.* (1991) mengkombinasikan FSH dengan PMSG dosis sedang. Penelitiannya menunjukkan bahwa respon ovulasi yang lebih tinggi diperoleh pada sapi yang disuperovulasi dengan kombinasi FSH dan PMSG dosis sedang dibanding pemberian FSH saja. Penelitian itu sejalan dengan penelitian selanjutnya oleh Armstrong *et al.* (1994) bahwa ketika FSH yang diaplikasikan satu kali sehari bersama dosis rendah PMSG, perkembangan folikel dan oosit terkoleksi sama dengan respon superovulasi oleh FSH dua kali sehari.

Hal ini kembali diperkuat oleh Yamada *et al.* (1996) bahwa kombinasi dosis rendah PMSG dengan FSH merupakan hormon gonadotropin superovulasi yang lebih efektif dan efisien dibanding pemberian FSH atau PMSG saja. Kombinasi ini menimbulkan respon ovulasi yang tinggi tanpa meningkatkan folikel persisten. Penelitian Yamada *et al.* (1996) juga menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti dalam rataan ovulasi maupun embrio yang terkoleksi antara pemberian FSH+PMSG

menggunakan penyuntikan FSH satu kali sehari dibandingkan dengan pemberian FSH+PMSG menggunakan penyuntikan FSH dua kali sehari.

Berbeda dengan peneliti yang lain Cseh *et al.* (1993) melaporkan tidak ada perbedaan yang berarti antara metode aplikasi pemberian PMSG tunggal dibandingkan kombinasi PMSG dan FSH. Rata-rata jumlah CL (PMSG 8,7; PMSG+FSH 8,6) dan embrio laik transfer (PMSG 5,5; PMSG+FSH 6,2) tidak berbeda antara kedua grup. Embrio terkoleksi tidak berbeda antara kedua grup. Proporsi embrio laik transfer (PMSG 83,2%; PMSG+FSH 86%), oosit tidak terfertilisasi (PMSG 10,4%; PMSG+FSH 7,9%) dan embrio degenerasi (PMSG 6,4%; PMSG+FSH 6,1%) tidak berbeda antara kedua grup, jumlah embrio laik transfer berkorelasi positif dengan jumlah hewan bunting.

3.7 Antibodi (*Immunoglobulin*) Anti PMSG Dalam Superovulasi

Menurut Samik (2001), walaupun PMSG sangat potensial dalam menstimulasi fungsi ovarium, namun waktu paruh yang panjang dalam sirkulasi darah yaitu 118-123 jam memungkinkan untuk menginduksi pertumbuhan dan perkembangan folikel tanpa diikuti ovulasi. Hal ini disebabkan residu PMSG yang masih beredar dalam peredaran darah dan masih memiliki aktivitas biologis akan terus menstimulasi ovaria. Menurut Supriatna *et al.* (1996), adanya residu PMSG dengan biopotensi aktif dalam sirkulasi darah akan menimbulkan *negative rebound effect* terhadap hipofise sehingga LH tidak disekresi. Ovaria yang terus terstimulasi disertai tidak adanya sekresi LH akan menghasilkan folikel-folikel persisten (tidak ovulasi). Untuk mengatasi pengaruh negatif PMSG tersebut perlu

diberikan bahan yang mampu membatasi masa kerja PMSG yaitu dengan membuat antibodi anti PMSG sehingga angka ovulasi dapat ditingkatkan. Menurut Samik (2001) antibodi poliklonal anti PMSG mampu melawan kerja PMSG dalam waktu satu jam setelah penyuntikan. Biopotensi antibodi poliklonal anti PMSG dalam melawan kerja PMSG terletak pada pengenceran 1/20, yang berarti 1 ml antibodi poliklonal anti PMSG mampu menetralkan 1000 IU PMSG.

Pengaruh ovine antiserum PMSG terhadap efek superovulasi PMSG pada domba Merino dan sapi Hereford telah dipelajari. Jika antiserum diberikan 24 jam setelah penyuntikan PMSG maka efek superovulasinya akan dinetralkan. Begitu pula jika interval waktu diperpanjang menjadi 72 jam, angka ovulasinya tidak sama dengan grup yang hanya memperoleh PMSG saja. Akan tetapi derajat overstimulasi pada ovaria berkurang pada perlakuan antiserum. Selain itu antiserum PMSG masih juga diperlukan dalam waktu lebih dari 120 jam untuk melengkapi hasil superovulasi.

Dieleman *et al.* (1993) dalam reviewnya menyatakan tidak ada perbedaan efektivitas komparatif antara antibodi monoklonal anti PMSG dibandingkan dengan antibodi poliklonal anti PMSG. Dua faktor utama yang menentukan hasil dari metode aplikasi kombinasi PMSG-anti PMSG adalah 1) waktu penyuntikan anti-PMSG. Waktu yang tepat penyuntikan anti-PMSG adalah sesaat setelah LH *peak*, 2) respon yang bervariasi pada setiap sapi.

Menurut Supriatna *et al.* (1996), penyuntikan 2,5 ml monoklonal anti PMSG i.v. yang diaplikasikan 60 jam dan 72 jam setelah penyuntikan PGF2 α pertama dapat memperbaiki efek superovulasi 2500 IU PMSG dalam hasil

panen embrio, baik berupa peningkatan produksi embrio per donor, peningkatan kualitas embrio, maupun peningkatan embrio laik transfer. Demikian pula stimulasi ovaria dapat diperbaiki dengan adanya peningkatan jumlah CL perdonor disertai penekanan pembentukan jumlah folikel. Pada penyuntikan 2,5 ml monoklonal anti PMSG i. v. yang diaplikasikan 36 jam setelah penyuntikan PGF_{2α} pertama (72 jam setelah penyuntikan PMSG) dapat meniadakan biopotensi PMSG dalam efek superovulasi. Sedangkan penyuntikan 2.5 ml monoklonal anti PMSG i.v. yang di aplikasikan 48 jam setelah penyuntikan PGF_{2α} pertama (84 jam setelah penyuntikan PMSG) tidak meniadakan respon ovaria tetapi mengurangi respon superovulasi.

Pintado *et al.* (1998) melaporkan rata-rata embrio laik transfer terkoleksi dari perlakuan menggunakan PMSG-anti PMSG (rata-rata 5,75) lebih tinggi dan berbeda nyata dibandingkan kontrol yang hanya mendapatkan PMSG saja (rata-rata 2,74). Walaupun demikian tidak ada perbedaan nyata dalam respon superovulasi. Dari hasil penelitiannya mereka berpendapat bahwa penggunaan antibodi anti PMSG untuk superovulasi merupakan cara yang ampuh dalam meningkatkan jumlah embrio hidup (*viable embryos*) terkoleksi.

BAB IV

PERSIAPAN DAN PENYEDIAAN MEDIA

Dalam pelaksanaan program transfer embrio secara menyeluruh ada beberapa tahapan kerja yang harus dilakukan di antaranya pemanenan embrio, isolasi dan evaluasi embrio, pemindahan embrio, penyimpanan embrio baik dalam jangka pendek maupun jangka panjang. Kegiatan-kegiatan ini memerlukan berbagai macam media, misalnya pada saat pemanenan embrio (*flushing, embryo recovery, embryo collection*) diperlukan medium pembilas untuk membilas bagian saluran reproduksi betina donor seperti tuba fallopii dan cornua uteri yang mengandung oosit atau embrio praimplantasi supaya dapat dikeluarkan dan dikoleksi, begitu juga pada waktu pemindahan embrio ke resipien diperlukan medium transfer atau pada proses penyimpanan embrio jangka panjang dengan cara pembekuan (*long storage cryopreservation*) diperlukan medium krioprotektan. Media-media ini mempunyai komposisi bahan yang disesuaikan dengan tujuan dari kegiatan yang bersangkutan.

Pada prinsipnya media yang digunakan ini merupakan tiruan dari cairan fisiologis alamiah tempat tinggal embrio di dalam saluran reproduksi hewan betina. Secara garis besar media memiliki fungsi mekanis, fisik dan biokimiawi. Ketiga fungsi ini harus memberikan lingkungan yang optimal untuk menjamin kelangsungan hidup (*viabilitas*) embrio dan dapat berkembang secara *in vitro*. Media buatan yang merupakan tiruan dari cairan fisiologis alamiah embrio disebut media sintesis. Walaupun puluhan tahun penelitian telah dilakukan untuk

memperoleh media sintetis yang menyerupai media alam, sampai saat ini usaha tersebut belum berhasil.

Media sintetis yang optimal harus memiliki komposisi yang terdiri atas beberapa faktor diantaranya, garam anorganik dan ion, osmolaritas, pH, substrat energi, protein dan asam-asam amino, makromolekul, vitamin dan mineral (*trace element*) (Kane 1978). Media sintetis merupakan tempat perkembangbiakan mikro-organisme yang dapat merubah lingkungan media, bahkan dapat mengganggu secara langsung pada embrio sehingga perkembangan embrio *in vitro* terhambat. Untuk mengatasi hal ini perlu penambahan antibiotik atau antimikotik. Antibiotik yang dipakai dapat bersifat bakteriostatik ataupun bakterisid, akan tetapi tidak menimbulkan efek negatif baik berupa kerusakan mekanis atau mengganggu metabolisme embrio. Selain media sintetis bebas dari kontaminan mikroorganisme, juga harus bebas dari kontaminan kimia organik maupun anorganik (kaporit, detergen). Untuk pelarut bahan-bahan komposisi media gunakan air murni bebas mineral terlarut, bebas pirogen, bebas mikroorganisme dan bebas partikel. Seandainya jenis air tersebut tidak ada gunakan air yang telah disuling berulang-ulang misalnya aquatridest.

Media yang dipakai dalam kegiatan transfer embrio pada ternak sapi pada umumnya adalah *phosphate buffered saline* (PBS) yang dapat dimodifikasi sesuai dengan tujuannya, misal modifikasi menurut Whittingham atau Whitten. *Phosphate buffered saline* (PBS) merupakan larutan buffer yang dapat mempertahankan pH dan osmolaritas fisiologis yang sangat diperlukan oleh sel untuk dapat berkembang dengan baik.

Larutan buffer ini dapat dibeli dalam bentuk jadi, yang dikemas secara komersil atau dengan meramu sendiri. Larutan buffer ini sekaligus dapat dipakai sebagai medium dasar pembentukan medium sintesis misalnya setelah ditambah nutrisi dalam bentuk serum untuk pemupukan sementara atau medium *maintenance* pratransfer embrio. Larutan PBS yang diformulasikan oleh firma Serva (Jerman) terdiri atas dua kemasan dalam vial. Kemasan vial pertama berisi komponen I berupa serbuk yang terdiri atas NaCl 8.000 mg/l, KCl 200 mg/l, $MgCl_{2.6} H_2O$ 100 mg/l, dan $CaCl_2$ (*anhydrous*) 100 mg/l. Kemasan vial kedua berisi komponen II berupa serbuk yang terdiri atas $Na_2HPO_4.12 H_2O$ 1.000 mg/l, $Na_2H_2PO_4$ 150 mg/l, $K_2H_2PO_4$ 200 mg/l.

Media PBS dapat pula diramu atau dibuat sendiri dengan komposisi seperti di bawah ini.

Bahan-bahan susunan PBS adalah sebagai berikut:

Komponen I

NaCl	8.000 mg/l
KCl	200 mg/l
$MgCl_{2.6} H_2O$	100 mg/l
$CaCl_2$ (<i>anhydrous</i>)	100 mg/l

Komponen II

$Na_2HPO_4.12 H_2O$	1.000 mg/l
$Na_2H_2PO_4$	150 mg/l
$K_2H_2PO_4$	200 mg/l

Bahan-bahan modifikasi yang dapat ditambahkan kedalam larutan PBS

Komponen III

Glukose	1.000 mg/l
Na-pyruvat	36 mg/l

Komponen IV (Antibiotik atau Antimikotik)

Penisilin	100.000 IU/l
Streptomisin SO ₄	100 mg/l

Menyediakan bermacam-macam antibiotik merupakan suatu tindakan yang tepat. Kadang-kadang terjadi resistensi mikroorganisme terhadap streptomisin dan penisilin. Alternatif yang paling baik adalah menggantinya dengan antibiotik yang lain misal gentamisin (50 mg/l). Kontaminasi fungi juga dapat terjadi, untuk mengatasi hal ini dapat diberi antimikotik (fungizone) amphotericin B (5-10 mg/l) atau mycostatin (100 mg/l). Pemberian antimikotik atau antifungal ini jarang dipakai, karena sifatnya yang toksik terhadap embrio. Antibiotik lain yang mungkin dapat dipakai diantaranya (masih perlu pengkajian): tylosin tartrat, neomycin, kanamycin, dan novobiocin. Kanamycin juga dapat dipakai untuk mencegah kontaminasi mycoplasma (yang berukuran 0,3 µm). Pelarut yang dipakai adalah air yang telah di-deionisasi dan didestilasi (*deionized-distilled water*). Air yang telah dideionisasi sebaiknya didestilasi dua kali, kemudian dipurifikasi sehingga diperoleh air dengan resistensi final 18 megaohm/cm. Jika jenis air ini tidak dapat diperoleh, dapat dipakai aquatridest.

Pembuatan medium PBS yang dimodifikasi adalah sebagai berikut :

- a) Komponen I larutkan dalam 350 ml air
- b) Komponen II larutkan dalam 350 ml air
- c) Larutan I dan II campurkan
- d) Tambahkan komponen III kedalam campuran larutan I dan II
- e) Campuran komponen I, II, dan III ditambah air sampai dengan satu liter
- f) Saring dengan filter membran selulosa dengan pori-pori 0,2 μm
- g) Tambahkan komponen IV kedalam media yang telah disaring

Media yang telah selesai dibuat dikemas kedalam botol-botol steril dalam satuan satu liter. Diberi label secukupnya dan disimpan di refrigerator pada temperatur 4-5 °C. Penyimpanan ini sebaiknya tidak lebih dari dua minggu.

Media yang akan dipakai sebaiknya selalu dalam keadaan segar, atau baru dibuat. Sebelum pemakaian, media diberi serum dari fetal sapi yang telah diinaktifkan (*heat inactivated fetal bovine serum*, h.i. FBS). Untuk media pembilas, larutan PBS diberi satu persen h.i. FBS, sedangkan media transfer dan media *maintenance* diberi 10 sampai 20% h.i. FBS dan atau ditambah bovine serum albumin (BSA) *fraction V* sebanyak 3-5 g/l. Media yang telah jadi ini harus memiliki pH 7,2-7,4 dengan osmolaritas 280 mosmol.

Medium pembilas uterus dalam proses pemanenan embrio praimplantasi menggunakan PBS yang telah siap pakai biasanya dalam kemasan dari beberapa perusahaan seperti Serva (Jerman), Gibco (USA) dan Nissui (Nippon). Media lainnya yang dapat dipakai dalam pemanenan

embrio dengan cara *flushing* uterus diantaranya medium laktat ringer misal dari Otsuka (Nippon). Penggunaan laktat ringer ini seperti penggunaan PBS biasanya hanya saja terbatas untuk proses *flushing* dalam rangka panen embrio.

Bahan-bahan larutan PBS dapat dibeli langsung dari beberapa perusahaan diantaranya Serva (Jerman), Nissui (Jepang) dan Gibco (USA) yang telah dikemas dalam bentuk serbuk ataupun larutan yang telah jadi siap pakai. Di bawah ini ada formulasi ramuan media PBS disertai komponen modifikasinya dari perusahaan Nissui dan Gibco, Tabel 3.

Tabel 3. Formulasi media PBS yang dapat dipakai untuk pembuatan media transfer embrio.

	<i>Component</i>	<i>g/l</i>	NISSUI	GIBCO	
PBS (+)	NaCL	8,00	PBS (-)	A	
	KCl	0,20			
	KH ₂ PO ₄	0,20			
	Na ₂ HPO ₄	1,15			
	MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,10			
	CaCl	0,10			<i>Metal salt</i>
	Na Pyruvate	0,036			
<i>Modified Component</i>	Glucose	1,00		A	
	BSA	3,00-4,00			
	Penicillin (IU)	100.000			
	Streptomycin (mg)	100			
	Bovine Serum (%)	20			

BAB V

PROSEDUR DAN TAHAPAN PELAKSANAAN PROGRAM TRANSFER EMBRIO

5.1 Pengelolaan Donor

5.1.1 Pemilihan Donor

Dalam pemilihan dan penentuan seekor ternak untuk dijadikan donor haruslah memiliki beberapa kriteria seleksi. Nilai seekor donor akan tergantung dan sesuai dengan konsep seleksi donor dari suatu sistim baku penilaian yang berbeda. Ternak sapi secara intrinsik bernilai dari daging, susu, dan produk lain yang dihasilkannya, selain itu dapat pula dipengaruhi oleh situasi pasar. Dimasa lalu dan sampai saat ini, kelangkaan dan promosi memberikan nilai tambah atau pengaruh yang positif terhadap harga pasar daripada nilai genetik dari ternak itu sendiri. Seharusnya nilai genetik (kemampuan untuk menurunkan sifat-sifat yang diinginkan pada ternak) merupakan pertimbangan atau kriteria yang terpenting.

Sampai saat ini, TE secara ekonomis hanya layak untuk sapi bibit unggul, meskipun biaya pelaksanaan telah tereduksi secara nyata dengan adanya kemajuan-kemajuan dalam beberapa metoda transfer embrio seperti teknik pemanenan dan pemindahan embrio tanpa bedah, angka kebuntingan yang naik dalam teknik pengelolaan embrio beku. Saat ini bibit unggul yang elite dan top 10% dari populasi, secara ekonomis dapat dijadikan sebagai donor. Untuk mendapat donor yang terbaik, digunakan konsep seleksi yang didasarkan pada empat kriteria pokok yang normatif,

yaitu 1) memiliki genetik unggul (*genetic superiority*) 2) memiliki kemampuan reproduksi (*reproductive ability*) 3) pemasaran keturunannya memiliki nilai pasar (*market value of progeny*), 4) fenotipe. Keunggulan genetik penting karena merupakan tujuan dasar dari TE yaitu meningkatkan kontribusi gen yang unggul dari pihak induk sapi dengan sejarah reproduksi yang baik seperti beranak teratur dan tidak pernah mengalami kesulitan melahirkan. Akhirnya nilai pasar mempunyai peranan yang berarti jika biaya program TE paling sedikit dapat diatasi oleh harga pasar dari keturunannya. Transfer embrio merupakan bisnis yang mahal dan banyak peternak penghasil embrio tidak mampu menjalankan program TE dengan donor-donor tertentu yang keturunannya kelak memiliki prospek penjualan yang lebih rendah daripada keuntungan yang diharapkan.

Ditinjau dari sudut kriteria keunggulan genetik, induk sapi potong yang akan dijadikan donor, diperlukan pengukuran mengenai sifat-sifat maternal *breeding value*, *weaning breeding value*, dan *yearly breeding value*. Pengukuran sifat-sifat tersebut diarahkan untuk menghasilkan rata-rata pertumbuhan pre- dan pascapenyapihan lebih besar serta menghasilkan lebih banyak daging terpasarkan per populasi ternak. Program evaluasi bibit pejantan sapi pedaging secara obyektif menentukan keunggulan genetik nilai prestasi induk dari pejantan bibit.

Untuk menentukan sapi perah sebagai donor diperlukan data keunggulan genetik melalui:

a) Cow index (CI).

Index ini meliputi *performance* ternak sapi itu sendiri, yaitu prakiraan prestasi (*predicted difference*) dari bapaknya dan CI dari induk sapi tersebut. *Cow index* ini di Amerika dihitung oleh *United States Department of Agriculture* (USDA) pada test resmi, dan ternak harus memiliki nomor registrasi yang sah. Sapi elite Friesian Holstein yang dapat dijadikan kandidat potensial adalah sapi dengan CI + 800 lbs. susu (99%) dapat juga dengan index + 300 lbs. susu (90%). Sekarang peringkat CI berdasarkan produksi susu diganti dengan CI berdasarkan peringkat jumlah produksi susu yang dikonversi kedalam satuan uang (dolar). Ternak sapi dengan peringkat 90% (*top 10% breed*) memiliki CI \$38 atau lebih tinggi. Jika sapi tadi berperingkat top 1% dari Friesian Holstein, maka ternak tadi akan memiliki CI \$ 96. *United States Department of Agriculture* menggunakan tingkat penyaringan (*screening level*) untuk menentukan sapi elite. Sapi terpilih harus memiliki prestasi rata-rata bangsa, atau lebih tinggi untuk persentase lemak susu, persentase protein dan atau persentase *solids non fat* (SNF).

Ternak sapi yang terpilih sebagai donor direkomendasikan telah mengalami fase laktasi sekali dan lebih disukai dua kali atau lebih. Semakin lengkap data yang diperoleh dari donor dan induknya, semakin akurat angka CI, karena angka pengulangan (*repeatability*) meningkat.

b) Keserasian Tipe.

Donor harus memiliki keserasian tipe yang tinggi, lebih disenangi memiliki score 85 atau lebih. Direkomendasikan juga sebaiknya sapi

berumur lebih dari 5 tahun dan diklasifikasikan sekali setelah 5 tahun karena score tersebut permanen. Kelenjar susu (*mammary system*) harus sangat baik atau lebih baik dan memiliki score penilaian linear diatas 30. Donor harus memiliki score linear 20-30 untuk kaki dan bagian belakang. Semakin tinggi score seluruh klasifikasi, semakin banyak kode linear score ideal kategori (Thompson *et al.* 1983) maka transmisi genetik untuk keserasian tipe akan semakin kuat.

5.1.2 Kesehatan dan Makanan

Donor yang potensial harus dalam keadaan sehat. Ternak sapi yang kurang sehat biasanya tidak berespons terhadap superovulasi, karena sistim reproduksi sangat sensitif terhadap gangguan dalam fungsi tubuh secara umum. Di beberapa negara, sesuai dengan peraturan kesehatan hewan yang berlaku, donor harus divaksinasi misalnya dengan *infectious bovine rhinotracheitis* (IBR), *bovine diarrhea* (BVD), *parainfluenza* III (PI3), penyakit klostridia atau leptospirosis. Kesehatan populasi ternak juga dilindungi melalui peraturan karantina yang ketat, test darah dan vaksinasi. Program kesehatan ternak harus memenuhi persyaratan dan peraturan yang berlaku. Sebagai tambahan, pelaksanaan TE haruslah familiar dengan regulasi penggolongan tipe darah dari ras ternak, pejantan dan keturunan yang dihasilkan. Data tersebut haruslah diinformasikan kepada peternak pemilik donor. Umumnya persatuan peternak pemilik donor menghendaki identifikasi donor dengan tato dan atau surat keterangan (*registration paper*) sebelum program transfer embrio dilaksanakan.

Baik obesitas maupun kondisi ternak yang jelek akan menurunkan tingkat kesuburan. Karenanya donor harus diberi pakan untuk memperoleh atau sebaliknya menurunkan berat badan supaya mendapatkan kondisi tubuh yang optimum. Air bersih dan segar, garam mineral pelengkap dan konsentrat harus tersedia. Donor harus mendapat rasio ransum yang baku. Beberapa donor memerlukan pakan yang agak berlebih, sedangkan yang lainnya memerlukan pengurangan pakan. Ternak yang tua, penakut dan yang lemah sebaiknya dikandangkan terpisah. Nutrisi ternak dimonitor secara cermat. Induk dan pedet dikandangkan bersama dan memperoleh makanan setiap saat.

5.1.3 Penentuan dan Penetapan Siklus Kelamin Donor

Penentuan estrus merupakan faktor kunci keberhasilan TE. Siklus kelamin donor dikatakan akurat jika program superovulasi yang dijadwalkan sesuai dengan estrus yang diantisipasi. Siklus kelamin normal memiliki keteraturan dalam interval panjang siklus. Jika interval siklus kelamin bervariasi, pemberian hormon superovulasi yang ceroboh akan menyebabkan tidak sinkron dengan pola hormonal sapi normal. Dengan perkataan lain, jika siklus kelamin abnormal program superovulasi dapat gagal.

Prediksi tipe siklus kelamin donor adalah sangat penting, paling sedikit satu siklus kelamin normal harus diamati sebelum donor masuk program superovulasi. Transportasi dapat merubah siklus kelamin secara temporer. Makanan dan kondisi manajemen yang berbeda dapat merubah data estrus terdahulu, meskipun data tersebut berguna akan tetapi tidak

dapat digunakan sebagai pedoman tindakan awal dari superovulasi. Jika terjadi ketidak teraturan siklus kelamin, donor harus dimonitor lebih lama lagi dan pemeriksaan lengkap dibuat untuk menentukan penyebab abnormalitasnya. Beberapa donor dapat dibandingkan bersama. Siklus kelamin tidak dapat dimonitor selama periode karantina tanpa adanya ternak pelacak berahi (*teaser animal*).

5.1.4 Superovulasi Donor

Ternak sapi termasuk hewan menyusui unipara, polyovulasi maupun kelahiran kembar jarang terjadi. Selama masa produktivitasnya setiap induk sapi rata-rata melahirkan empat ekor pedet, walaupun pada ternak sapi dewasa kelamin jumlah folikel primer di kedua ovaria sekitar 100.000. Reservoir oosit ini begitu besarnya dan tidak pernah atau belum dapat digunakan secara maksimal. Banyak upaya melalui metoda-metoda biologis untuk memobilisasi potensial berupa oosit dalam kedua ovaria untuk dikonversi menjadi pedet.

Pada masa kini dengan menggunakan metoda bioteknik telah berhasil memobilisasi potensi oosit dan meningkatkan daya gunanya, walaupun upaya ini belum membuahkan hasil konversi yang maksimal. Salah satu metoda biologis yang telah digunakan dalam upaya meningkatkan jumlah ovulasi untuk memperoleh hasil berupa oosit yang fertil, viabel dengan jumlah yang lebih banyak dari jumlah oosit yang diovulasikan secara alami. Mobilisasi oosit sering mendapat sebutan ilmiah dengan stimulasi, *multiple ovulation and embryo transfer* (MOET) atau superovulasi. Pemberian hormon gonadotropin eksogen akan

menimbulkan proses pertumbuhan, perkembangan, pematangan dan ovulasi dari sejumlah besar folikel ternak sapi. Superovulasi dapat dilakukan melalui beberapa cara yang berbeda, diantaranya perbedaan dalam pemberian dosis, preparat dan prosedur pelaksanaannya.

Pada waktu lahir kedua ovaria pedet mengandung seribu kali lebih banyak oosit dari pada oosit yang akan matang dan diovulasikan. Folikel-folikel dengan oosit yang dengan dikandungnya secara tetap dan berkesinambungan mengalami degenerasi selama aktivitas reproduksi seekor ternak. Folikel yang berdegenerasi ini akan menjadi folikel atretik. Proses ini secara rutin biasanya terjadi pada pertengahan siklus kelamin yaitu antara D8-D12 atau stadium bifase. Dalam perkembangan ilmu reproduksi saat ini dikenal gelombang folikel. Dalam satu siklus kelamin dapat terjadi 2-4 gelombang folikel, umumnya dua gelombang folikel yang biasanya gelombang folikel pertama terjadi dipertengahan siklus kelamin. Pada setiap gelombang folikel akan direkrut sekitar 10-15 folikel, kemudian diseleksi yang dapat tumbuh berkembang sekitar 3-5 folikel, selebihnya akan berdegenerasi dan menjadi atretik. Dari 3-5 folikel yang dapat berkembang hanya satu yang menjadi matang disebut folikel dominan, dan yang lainnya pertumbuhannya terhambat dan menjadi folikel subordinat. Pada pertengahan siklus kelamin (gelombang folikel) biasanya tumbuh 3-5 folikel dengan diameter lebih kecil dari 5-8 mm. Dahulu folikel-folikel ini disebut parasiklus folikel yang tidak dapat ovulasi tetapi akan berdegenerasi dan menjadi atretik. Parasiklus folikel ini dapat ovulasi jika diberi hormon eksogen. Parasiklus folikel atau folikel-folikel yang direkrut tadi yang tadinya tidak dapat berkembang menjadi matang dan ovulasi,

potensi biologisnya dengan superovulasi akan dikembangkan dan ditingkatkan menjadi folikel- folikel yang matang dan siap ovulasi.

Mekanisme kerja hormon superovulasi masih belum jelas, tetapi mungkin mengembalikan viabilitas beberapa folikel dari degenerasi. Hormon gonadotropin yang disuntikkan selama fase luteal dalam suatu siklus kelamin akan menstimulir pematangan sejumlah besar follikel. Pemberian hormon tersebut harus dimulai sebelum level progesteron menurun (Chupin dan Procureur 1982, Greve *et al.* 1984). Sebelum superovulasi dimulai, siklus kelamin donor harus diamati paling sedikit satu siklus normal. Jika panjang interval siklus kelamin tidak teratur atau abnormal, pengamatan dilakukan lebih lanjut dalam siklus-siklus berikutnya. Jika panjang siklus agak tidak teratur, harus dilakukan pemeriksaan ginekologis yang lengkap untuk mengetahui apakah terdapat hal-hal patologis dari saluran reproduksi.

Dalam dekade tahun 1970-an, hormon standar untuk superovulasi adalah PMSG, dan sampai saat ini masih banyak digunakan di banyak negara. Diawal 1980, ada beberapa tim transfer embrio yang menggunakan hMG untuk superovulasi pada sapi. Hasil yang ditimbulkan oleh hMG adalah baik, akan tetapi pemakaian praktis di lapangan secara ekonomis belum layak dan secara teknis pelaksanaan masih sedikit rumit karena waktu paruhnya (*half life*) yang pendek (Critser *et al.* 1982, Lauria *et al.* 1982). Sebagai tandingan di kelas yang paralel adalah FSH. Superovulasi dengan FSH menghasilkan lebih banyak corpora lutea dan viabel embrio, daripada PMSG. Selain itu PMSG menimbulkan respon yang sangat bervariasi pada seekor ternak sapi yang sama walaupun dosis yang

diberikan identik. Beberapa ternak sapi tampak tidak berespon (*refractory*) setiap saat pemberian PMSG, yang lainnya kadang-kadang berespon (*refractory intermittently*) dan sebagian lain lagi responnya berlebihan (*over respon*) disertai pembesaran ovarium sampai ukuran kepalan tangan atau ukuran jeruk. Respon dengan 20-30 ovulasi pada sebuah ovarium adalah spektakuler, tetapi jarang diperoleh embrio yang viabel atau kualitas embrio yang dihasilkannya jelek. Dengan ovarium yang sangat membesar tersebut akan terjadi kesulitan pengambilan ova oleh fimbriae saluran telur, sehingga tidak jarang hasil koleksi atau pembilasan sangat rendah. Produksi progesteron yang ekstrim dari *multiple corpora lutea* dan folikel yang luteinisasi mungkin merubah kecepatan transportasi sperma atau ova dalam saluran telur. Tampaknya respon superovulasi yang ideal diasosiasikan dengan ovaria yang berukuran sebesar telur ayam, dan setiap ovarium memiliki 5-10 folikel yang akan ovulasi.

Dari beberapa penelitian superovulasi berespon sangat baik jika superovulasi dimulai hari ke-9 sampai dengan ke-14. *Follicle stimulating hormone* (FSH) menstimulir pertumbuhan dan pematangan folikel. Waktu paruh FSH pada sapi antara dua sampai lima jam. Pemberian pada donor dilakukan secara berulang dalam delapan kali suntikan (dosis 6-7 mg per suntikan di awal dan menurun sampai 2 mg diakhir superovulasi). Interval penyuntikan adalah setengah hari (12 jam), biasanya diberikan pada pagi dan petang setiap hari selama empat hari. Pemberian berulang ini akan menjamin konsentrasi FSH yang cukup dalam darah untuk menstimulir perkembangan folikel. Penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam kombinasi dengan FSH adalah untuk mengetahui interval antara akhir pemberian gonadotropin

dengan timbulnya estrus (Donaldson 1983). Jika $PGF_{2\alpha}$ diaplikasikan pada ternak sapi yang disuperovulasi maka estrus timbul dua hari kemudian, sedangkan yang tidak disuperovulasi biasanya terjadi dalam tiga hari. Perbedaan ini mungkin terjadi akibat adanya level estrogen yang tinggi pada sapi yang disuperovulasi. Sebagai contoh, jika aplikasi FSH dalam superovulasi dimulai pada D10 dan diikuti aplikasi $PGF_{2\alpha}$ pada D13 biasanya donor akan berahi pada D15. Prostaglandin ($PGF_{2\alpha}$) memiliki kelebihan berupa fleksibilitas dalam pengaturan estrus donor, atau menghindari hari libur ataupun memperbaiki kemanduran superovulasi. Sebagai salah satu contoh pelaksanaan protokol superovulasi menggunakan FSH pada donor sapi perah FH dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Jadwal penyuntikan hormone FSH dalam skedul superovulasi pada sapi perah dan sapi dwiguna (*dual purpose breed*)

Hari (D)	0. Estrus	Sapi perah	Sapi dwiguna
10	pagi.*	-	-
	sore	6 mg FSH	7 mg FSH
11	pagi	6 mg FSH	7 mg FSH
	sore	5 mg FSH	6 mg FSH
12	pagi	5 mg FSH	6 mg FSH
	sore	4 mg FSH	4 mg FSH
13	pagi	3 mg FSH + Prostaglandin	4 mg FSH + Prostaglandin
	sore	3 mg FSH	4 mg FSH
14	pagi	2 mg FSH	4 mg FSH
	sore	-	-
15	pagi	-	-
	sore.	AI + hCG 3.000	AI + hCG 3.000
22		Panen embrio (<i>flushing</i>)	

* Superovulasi dapat dimulai antara D9-D14 setelah estrus

Penambahan LH dalam FSH adalah tidak penting. Beberapa tahun yang lalu, produksi preparat FSH tersedia dalam bentuk campuran dengan LH. Perbandingan kombinasi FSH LH adalah lima berbanding satu. Mungkin dalam sederetan preparat FSH mengandung terlalu banyak LH untuk respon yang optimal. Pada ternak sapi yang disuperovulasi, LH eksogen tidak diperlukan untuk menginduksi ovulasi (Chupin *et al.* 1984). Pada umumnya LH surge endogenous terjadi dengan sendirinya karena superovulasi tadi, akan tetapi beberapa tim menyuntik GnRH pada awal estrus. Dalam beberapa kasus, folikel-folikel mungkin ovulasi selama periode waktu 24 jam. Jika hal ini terjadi, kemungkinan banyak ova yang tidak terfertilisasi. Beberapa cara superovulasi dengan berbagai macam preparat gonadotropin serta kombinasinya terlihat pada Tabel 5.

Follicle stimulating hormone (FSH) diperjual belikan dalam bentuk serbuk kering beku liofilisasi (lyophilization, freeze dried) yang dikemas dalam botol kecil (vial). Tiap vial berisi 50 mg FSH. Penjualan FSH ini disertai dengan pelarut 10 ml NaCl fisiologis steril yang dikemas dalam vial yang terpisah. Stok FSH berbentuk kering beku dan cairan pelarut NaCl fisiologis terpisah disimpan dalam temperatur 4 °C dan tahan berbulan-bulan. Serbuk kering FSH baru dilarutkan jika hendak dipakai dalam superovulasi. Konsentrasi 5 mg per ml FSH merupakan volume yang praktis dan mudah ditangani. Follicle stimulating hormone (FSH) dalam bentuk larutan disimpan dalam refrigerator (4 °C) untuk pemakaian singkat, akan tetapi jika terpaksa dipakai dalam jangka waktu yang lama, larutannya harus disimpan pada -20 °C. Beberapa tim TE mempersiapkan dan menyimpan

FSH yang telah dicairkan pada temperatur 4 °C refrigerator dalam kemasan spoit hypodermik, disposable, dengan diberi label yang jelas terbaca. Molekul FSH dapat dengan mudah diinaktifkan oleh mikroorganisme (Murphy *et al.* 1984). Penggunaan berulang spoit hypodermal atau jarum hypodermal jika tidak steril benar sebaiknya dihindari.

Tabel 5 Penggunaan berbagai macam hormon gonadotropin untuk superovulasi sapi

Siklus Estrus Hari ke-	Aplikasi Hormon Gonadotropin			
	PMSG	PMSG-anti PMSG	FSH	hMG
D10 pagi			FSH	
D10 sore	PMSG	PMSG	FSH	hMG
D11 pagi			FSH	hMG
D11 sore			FSH	hMG
D12 pagi			FSH	hMG
D12 sore			FSH	hMG
D13 pagi	PG	PG	FSH+ PG	hMG+PG
D13 sore	PG	PG	FSH+ PG	hMG+PG
D14 pagi				
D14 sore				
D0 So pagi	IB	IB	IB	IB
D0 So sore	IB(+hCG)	IB(+anti PMSG)	IB(+hCG)	IB(+hCG)
D1 So pagi	IB	IB	IB	IB
D1 So sore				
D7 So	<i>Flushing</i>	<i>Flushing</i>	<i>Flushing</i>	<i>Flushing</i>

Pada awal program superovulasi sebelum penyuntikan hormon dilakukan pemeriksaan ginekologis ulang, terutama untuk memonitor ukuran ovaria. Melalui palpasi rektal pada hari pertama superovulasi (D10) dapat diketahui kedua ukuran ovaria juga sekaligus struktur fungsionalnya, seperti ada tidaknya corpus luteum dan folikel. Jika, kedua ovaria berukuran sama besar, corpus luteum tidak terpalpasi, dan terdapat folikel

besar (> 2,5 cm), maka superovulasi harus ditunda sampai siklus kelamin berikutnya. Jika folikel tadi adalah siste atau diduga akan mejadi siste, dapat disuntik GnRH, tetapi jika folikel tadi mengandung lutein (*luteinized follicle*) maka ternak harus disuntik dengan PGF_{2α}.

Pada hari kelima superovulasi atau lima hari setelah penyuntikan FSH, ukuran ovaria dicatat kembali untuk mengetahui dan menentukan respon dari folikel. Menduga jumlah folikel pada kedua ovaria tidak dapat diperoleh dengan tepat, meskipun demikian ukuran kedua ovaria adalah merupakan indikator yang terbaik untuk mengetahui respon ovarium terhadap hormon superovulasi.

Palpasi kedua ovaria pada waktu estrus (D0) dan ovulasi (beberapa jam setelah estrus), sangat tidak dianjurkan. Akan tetapi palpasi ovaria sehari atau dua hari sebelum pemanenan embrio (*flushing, collection*) pada D7 kerap kali berguna untuk menentukan respon dan mengambil keputusan apakah pemanenan dilakukan atau tidak. Pada waktu pemanenan, ovarium sangat membesar, corpora lutea mudah terpalpasi dalam ternak sapi yang responsif. Sering, ovaria dalam ternak sapi yang tidak responsif menjadi lebih kecil atau lebih keras pada waktu pemanenan, dibandingkan dengan waktu pertama kali FSH disuntikkan. Kegiatan pemeriksaan status reproduksi sebaiknya dicatat dalam borang monitoring pelaksanaan superovulasi, disertai dengan gambaran kedua ovaria sebelum superovulasi dan sebelum pemanenan embrio pada D7 setelah estrus yang ditimbulkan oleh superovulasi (Tabel 5).

Kadang-kadang donor menunjukkan gejala estrus setelah satu atau dua hari setelah penyuntikan FSH yang pertama. Jika ternak tersebut

dikawinkan (IB), jarang menghasilkan ova yang terfertilisasi, sehingga dalam hal ini semen beku yang mahal jangan digunakan. Selain itu jika estrus timbul melebihi dua hari dari estrus yang dijadwalkan, maka jarang dilakukan pemanenan embrio.

Tabel6 Borang evaluasi pemeriksaan klinis status reproduksi sebelum superovulasi dan sebelum panen embrio.

**Form Status Reproduksi Donor Dalam Program
Transfer Embrio**

Nama/No.reg. Sapi : Pemilik :

Breed : Alamat :

Umur :

Jumlah kelahiran :

Partus terakhir :

Siklus interval : teratur/tidak teratur (18, 19 20, 21, 22, 23)

Estrus : sangat jelas/jelas/kurang jelas

Lama estrus :jam

Estrus terakhir : Tanggal

	Hasil Palpasi Rektal	
	Ovarium Kiri	Ovarium Kanan
Sebelum Superovulasi	<p style="text-align: center;">Gambar ovarium kiri</p> <p>Ukuran Ovarium :</p> <p>Fol : Ø</p> <p>Cl : Ø</p>	<p style="text-align: center;">Gambar ovarium kanan</p> <p>Ukuran Ovarium :</p> <p>Fol : Ø</p> <p>Cl : Ø</p>

Tabel 6 (Lanjutan)

	Hasil Palpasi Rektal	
	Ovarium Kiri	Ovarium Kanan
D6/D7 Setelah Superovulasi	Gambar ovarum kiri	Gambar ovarium kanan
	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø

Dalam penggunaan berulang dari gonadotropin yang juga merupakan protein, adalah kemungkinan terjadinya reaksi anaphylaxis. Respon imunologis karena penyuntikan berulang dari gonadotropin dapat membatasi berapa kali donor dapat disuperovulasi. Baik FSH maupun PMSG adalah protein dan karenanya mempunyai potensi untuk menginduksi anaphylaxis. Antigenisitas ini menunjukkan bahwa penyuntikan berulang dapat menstimulir terbentuknya anti-gonadotropin, yang mungkin dapat mereduksi respon berikutnya atau mungkin mengganggu gonadotropin endogen. Akan tetapi dalam kenyataannya beberapa tim TE di beberapa negara yang sudah maju industri TE-nya, belum pernah menghadapi masalah tersebut dan data mengenai adanya reaksi anti-gonadotropin sangat jarang diperoleh. Sepanjang pengetahuan, hormon tersebut sebaiknya digunakan secara hati-hati. Kemungkinan kelainan endokrin dapat dikurangi, jika donor diberi kesempatan untuk bunting setelah beberapa kali superovulasi. Setiap donor dapat dilakukan tiga kali superovulasi per tahun. Untuk memonitor dan pengendalian tindakan superovulasi dapat direkam dalam Tabel 6.

Tabel 7 Form pemberian hormon superovulasi inseminasi buatan (IB) pada donor.

Nama/No. Reg. Donor :

Siklus Berahi (Hari ke-)	Hormon Perlakuan	Waktu Penyuntikan	Dosis mg atau unit	Route
D10		pagi sore		
D11		pagi sore		
D12	Prostaglandin Prostaglandin	pagi sore		
D13		pagi sore		
D14	IB1	sore		
D15	IB2	pagi sore		
D16		pagi sore		

- IB dilakukan dua kali, sesuai dengan waktu berahi tepat

- Pejantan IB :

Nama :

(Service Sire)

No. Reg. :

- Tanggal Panen Embrio :

(Flushing date)

5.2 Pengelolaan Resipien

5.2.1 Pemilihan Resipien

Ada beberapa faktor dalam seleksi ternak untuk mendapatkan suatu kelompok resipien, yaitu 1) keseimbangan diantara kualitas baku, 2) kelayakan ekonomis dan 3) kemudahan untuk memperoleh ternak resipien (*availability*), 4) *calving ease*, *milking ability*, dan *mothering ability*. Resipien yang ideal adalah umur yang masih muda jika mungkin masih dara, bebas penyakit, sehat dengan kesuburan yang terjamin dan mempunyai kemampuan memebesarkan anak (*mothering ability*). Resipien tumbuh dengan baik sejak pedet, dapat bunting dan pernah melahirkan tanpa kesulitan. Ras ternak sapi tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna walaupun ternak bastar (keturunan silang) umumnya lebih subur. Sapi tua, diatas 10 tahun sebaiknya tidak digunakan karena kemampuan pemeliharaan kebuntingan sudah menurun, walaupun faktor umur bukan merupakan faktor yang penting untuk resipien. Ternak yang liar tidak diharapkan untuk menjadi resipien, jika ditinjau dari aspek penanganan walaupun keberhasilan TE tidak terpengaruhi.

Kadang-kadang membentuk suatu populasi resipien ideal secara ekonomis tidak menguntungkan. Biaya tambahan yang dikeluarkan untuk pembelian dan alokasi resipien yang ideal dalam pembentukan populasi resipien tidak dapat mengembangkan keberhasilan TE itu sendiri. Sebagian besar ternak yang ditawarkan untuk dijual, selain terlalu muda, kesuburan tidak terjamin, juga umumnya merupakan afkiran dari program pemuliaan karena tidak dapat bunting selama program perkawinan terdahulu. Dalam persentase kecil, sapi-sapi dara mungkin banyak

mengalami kesulitan melahirkan akan tetapi berdasarkan pertimbangan bahwa induk-induk sapi ditolak karena tidak subur, maka biasanya sapi dara merupakan prospek yang lebih baik. Selain itu kasus peradangan traktus genitalis pada sapi dara lebih kecil dari induk sapi atau sapi yang pernah melahirkan.

Pembelian sapi dara bunting akan melengkapi sumber resipien yang subur untuk program yang direncanakan. Sapi dara yang bunting tersebut, dengan pengelolaan yang baik kelak akan dapat dipakai sebagai resipien yang baik dan siap pakai dalam program transfer embrio 60 hari postpartus. Pendekatan ini memerlukan program terencana, sumber makanan yang murah dan informasi mengenai data perkawinan yang menjamin kelahiran pedet tidak diperpanjang berbulan-bulan.

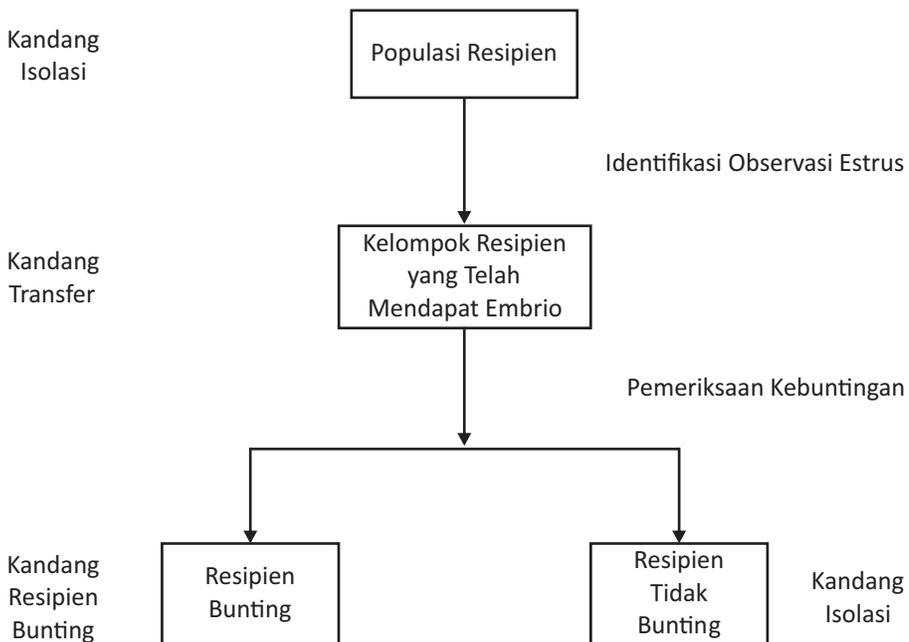
5.2.2 Kesehatan

Jika mungkin, peternak membeli ternak dalam jumlah yang banyak (kelompok) dari populasi ternak komersial. Kelompok ternak ini harus diperiksa secara teliti terhadap kesehatan dan status reproduksinya. Sesuai dengan prosedur pemeriksaan ditujukan untuk menentukan abnormalitas dari saluran reproduksi, kebuntingan dini dan penyakit yang mungkin masih dalam masa inkubasi selama periode pembelian. Di beberapa negara pada prinsipnya melalui prosedur yang sama. Salah satu contoh prosedur pemeriksaan adalah sebagai berikut (Colorado-USA).

- 1) Isolasi ternak yang baru datang sehingga tidak ada kontak dengan ternak yang ada, makanan, maupun persediaan air yang ada.

- 2) Periksa setiap ternak terhadap gejala penyakit, umur, dan kondisi badan. Palpasi rektal untuk penentuan kemungkinan kebuntingan, perlekatan (*adhesio*), *freemartin*, dan abnormalitas saluran reproduksi yang lainnya (seperti uterus atau ovaria *infantile*, folikel siste, dan sebagainya). Ternak yang abnormal sebaiknya segera dijual. Dalam beberapa contoh, ternak yang bunting dapat digugurkan tanpa banyak kehilangan waktu. Periksa apakah ternak telah divaksinasi.
- 3) Test setiap ternak terhadap brucellosis, tuberculosis, anaplasmosis dan blue tongue. Reaktor harus segera diafkir. Ternak yang dicurigai tuberculosis harus ditahan 10 hari dan ditest kembali menggunakan test servikal komparatif. Sampel darah harus diidentifikasi secara tepat dan setiap ternak harus diberi identifikasi yang jelas dan permanen.
- 4) Ternak yang baru datang divaksinasi (IBR, BVD, Leptospirosis)-*five antigen*, dan *seven clostridial diseases- electroid-7*).
- 5) Sebulan kemudian lakukan test ulang terhadap brucellosis, tuberculosis anaplasmosis dan *blue tongue* dan lakukan palpasi rektal kembali terhadap kemungkinan tidak terdeteksinya kebuntingan dan abnormalitas. Vaksinasi *booster* terhadap penyakit klostridia juga diberikan pada saat tersebut. Semua ternak yang abnormal dan positif harus dijual. Ternak yang bunting harus dijual, jika bunting kurang dari sepuluh hari dapat digugurkan.
- 6) Sebelum ditransportasi ke lain daerah, perlu diketahui persyaratan kesehatan yang berlaku di daerah yang bersangkutan.

Berikut ini digambarkan skema proses penyaringan (lihat Gambar 9), semua ternak yang dijadikan resipien dan dikelompokkan kedalam populasi resipien harus mempunyai peluang yang baik untuk TE dan harus memenuhi persyaratan kesehatan baik regional maupun internasional. Di USA hampir semua negara bagian hanya mengizinkan pemasukan ternak sapi jika ternak tersebut telah divaksinasi terhadap brucellosis. Persyaratan internasional lebih kompleks dan berubah baik oleh suasana politik maupun kesehatan. Selain itu persyaratan karantina mengharuskan observasi yang ketat terhadap resipien setiap hari. Faktor-faktor yang harus diobservasi diantaranya gejala penyakit, luka, kenaikan temperatur tubuh dan infeksi yang semuanya berkorelasi tinggi dengan infertilitas dan beberapa diantaranya dapat menimbulkan abortus.



Gambar 9 Tahapan proses seleksi kelompok resipien pascatransfer embrio.

5.2.3 Persiapan dan Jumlah Resipien

Besar jumlah resipien yang diperlukan akan tergantung dari jumlah donor yang diprogram. Pada umumnya populasi sekitar 200 ternak yang telah dikarantina dan paling sedikit tercatat mengalami dua kali siklus kelamin normal, dapat dijadikan sebagai populasi resipien. Berpedoman bahwa satu siklus 20 hari, maka rata-rata lima persen dari populasi atau 10 ekor akan berahi setiap hari. Tidak seluruhnya akan terdeteksi seperti diatas, mungkin dalam beberapa hari akan lebih banyak atau lebih sedikit yang berahi.

Dalam satu hari dapat saja terjadi 20 ekor resipien berahi. Sistem ini dapat digunakan oleh manajer membuat program TE untuk tidak lebih dari lima atau enam ekor donor per minggu, karena kecukupan resipien yang terpilih dapat disediakan untuk lebih dari 95% embrio. Jika donor yang diprogram lebih per satuan waktu, maka diperlukan lebih banyak lagi resipien kecuali jika sinkronisasi estrus dijalankan dalam populasi resipien. Dalam rangka penyediaan stok 200 yang siap pakai diperlukan sekitar 100 ekor ternak yang harus masuk dalam kandang isolasi resipien untuk program karantina, sehingga penyediaan stok pengganti resipien terjamin (*a steady flow of replacement*).

5.3 Penentuan Fase Estrus Resipien Dan Donor

5.3.1 Siklus Kelamin (Siklus Estrus)

Interval rata-rata siklus kelamin ternak sapi adalah 21 hari dan dibagi kedalam empat fase yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (lihat Gambar 3). Estrus atau fase berahi dimulai jika produksi estradiol

mencapai puncak. Fase ini didefinisi sebagai hari ke-O (D0) dari siklus kelamin. Pada saat tersebut ternak sapi akan diam berdiri jika dinaiki oleh sapi yang lain (*standing heat*). Fase berahi berlangsung sekitar 15 sampai 18 jam. Ovulasi terjadi pada D1 dini setelah fase berahi berakhir. Fase berahi akan dilanjutkan oleh fase metestrus yang biasanya dikarakterisir dan diawali dengan pengeluaran lendir bercampur darah (*metestrus bleeding*). Fase ini dari D2 sampai D3. Perdarahan metestrus terjadi pada sekitar 90% sapi dara dan 50% sapi induk. Perdarahan metestrus adalah fisiologis normal dan tidak berkorelasi dengan konsepsi. Selama metestrus, CL tumbuh, berkembang dan akan mulai memproduksi progesteron kira-kira pada D4 yang merupakan awal fase diestrus.

Fase terlama adalah diestrus yang berawal D4 dan berakhir pada D16. Selama fase diestrus CL berfungsi dan menghasilkan progesteron yang berpengaruh terhadap uterus dan memelihara kebuntingan jika konsepsi terjadi akan tetapi jika konsepsi gagal maka CL menjadi tidak berfungsi dan produksi progesteron berhenti pada D16 sampai D18 dari siklus kelamin. Kejadian ini akan diikuti dengan fase proestrus. Pada fase proestrus terjadi perkembangan folikel dengan cepat dan memproduksi estradiol. Peningkatan sekresi estradiol akan disertai gejala-gejala berahi.

5.3.2 Gejala-Gejala Berahi

Ternak yang berahi atau mendekati berahi cenderung berkumpul bersama. Jika ada pejantan disekitarnya maka ternak yang berahi berusaha mendekat sedekat mungkin pada pejantan. Biasanya ternak menjadi gelisah, tidak mau diam. Pada sapi perah sering ditandai dengan

penurunan produksi susu. Tanda lain menyentuh dan menggeser-geserkan tubuh, menanduk ternak lain, mencium vulva ternak yang lain atau menyandarkan dagu pada bagian belakang ternak yang lainnya. Tanda lain adalah *nose to nose posture* dengan ternak lain yang estrus atau mendekati estrus. Vulva menjadi lembab, membengkak, warna selaput lendir menjadi berwarna merah jambu (*pink*). Sekresi lendir jernih transparan, keluar dari vulva. Sekresi lendir ini dapat berlangsung beberapa hari, dapat sebelum, selama ataupun setelah estrus.

Ternak sapi yang mendekati estrus akan mempunyai interes menaiki sapi lain yang estrus, akan tetapi tidak mau jika dinaiki ternak lain. Jika ternak sapi tersebut telah mau dinaiki, artinya berdiri diam jika dinaiki ternak sapi yang lain, maka dapat ditetapkan bahwa ternak yang diam berdiri waktu dinaiki (*standing heat*) benar-benar dalam keadaan berahi (estrus).

Berahi yang melanjut pada puncaknya, ternak sapi akan memberi posisi kopulasi sewaktu dinaiki. Jika tanah peternakan berlumpur dan basah maka bagian flank sapi berahi akan menjadi kotor karena jepitan kaki depan ternak sapi lain pada waktu menaiki sapi yang berahi. Sapi yang berahi kadang-kadang berbaring, tetapi jika diganggu biasanya yang tercepat atau yang pertama bangun. Pada sapi perah dapat menjadi lebih nervous, sering menendang dan menunjukkan sifat yang menyimpang dari biasanya.

5.3.3 Efisiensi Deteksi Berahi

Efisiensi deteksi estrus tergantung dari pengamatan estrus setiap hari dan lamanya setiap pengamatan estrus. Pengamatan yang terus-

menerus menghasilkan deteksi sekitar 98%-100% ternak sapi yang estrus. Pengamatan selama satu jam dengan frekwensi dua atau tiga kali selama satu hari akan sudah dianggap baik dan sekitar 81%-91% ternak sapi estrus akan terdeteksi. Pengamatan tidak tetap dan sambil lalu selama aktivitas rutin seperti waktu pemerahan dan memberi makan ternak akan memberikan hasil yang tidak memuaskan karena hanya 50% dari ternak sapi teramati estrusnya selama aktifitas tersebut.

Sekitar 60% dari ternak sapi, estrus dipagi hari sedangkan 40% estrus di sore hari. Pengamatan baik pada waktu pagi maupun sore hari akan menghasilkan deteksi sekitar 85% sapi akan teramati estrusnya. Pengamatan di siang hari akan menambah nilai 6%-7% yang teramati. Pagi hari pengamatan dilakukan pada jam 6.00. Menurut laporan yang ada pengamatan jam 6.00 pagi lebih baik dari pada jam 7.00 karena akan meningkatkan efisiensi deteksi estrus sebanyak 14%.

5.3.4 Pelaksanan Teknik Deteksi Berahi Resipien dan Donor

Deteksi estrus harus dilakukan seteliti mungkin supaya dapat menentukan secara jelas waktu fertilitas maksimum yang merupakan waktu terbaik untuk mengawinkan atau menginseminasi. Untuk memperoleh ketelitian dan ketepatan deteksi yang tinggi diperlukan ketrampilan dan kemampuan mengenali dan menginterpretasikan tanda-tanda estrus. Program TE yang berhasil memerlukan ketepatan deteksi estrus. Keadaan fisiologi dari saluran reproduksi berubah dengan nyata pada setiap fase yang berbeda dalam satu siklus kelamin. Sebagai contoh pada D1 (sehari setelah estrus), keadaan lingkungan saluran telur (oviduct)

merupakan milieu yang ideal untuk ovum yang baru difertilisasi, tetapi lingkungan dalam uterus pada hari yang sama merupakan milieu yang lethal.

Keberhasilan TE tergantung dari derajat sinkronisasi antara donor dan resipien, sehingga deteksi estrus haruslah dilakukan secara tepat, hati-hati dan teliti (Gordon 1982). Selain itu panjang interval siklus berahi harus merupakan panjang interval yang sama. Angka keberhasilan akan sangat tinggi jika resipien estrus dalam satu hari dengan donor. Sinkronisasi satu setengah hari termasuk baik. Jika resipien menunjukkan gejala-gejala estrus di malam hari dan tidak dapat dimonitor baik pada pagi dan petang hari, dapat dikatakan dalam observasi, resipien tersebut estrus satu hari tidak sinkron dengan donor. Seekor ternak sapi tidak dapat dipakai sebagai resipien jika tidak sinkron dengan donor, kecuali ternak yang bersangkutan berahi 17-24 hari sebelumnya.

Setiap ternak, baik induk sapi maupun sapi dara, diobservasi secara visual setiap hari paling sedikit dua kali untuk menentukan fase berahi yang tepat. Observasi minimal dua kali (lebih sering lebih baik) yaitu pada pagi dan sore hari. Untuk menetapkan atau meyakinkan estrus donor, diperlukan pengecekan lebih lanjut sepanjang hari dan sering ditempatkan pada kelompok sapi yang baru. Setiap ternak digolongkan ke dalam tiga kategori dalam setiap observasi estrus yaitu 1) tidak berahi 2) meragukan (*dubious*) atau 3) berahi (*standing heat*). Tanggal, nomor registrasi atau nama ternak dan waktu pagi atau petang juga dicatat (lihat Tabel 7).

Tabel 8 Pencatatan harian data berahi ternak berdasarkan hasil pengamatan deteksi berahi

Tanggal	:	
Pengamatan dimulai dari	: jam sampai jam	
Kandang No.	: Lapangan:	
Tanda	: berahi, dubious, tidak berahi, perdarahan metestrus, lendir	
Nama sapi/No telinga	Kandang No.	Keterangan status berahi

Deteksi berahi merupakan seni dan ilmu. Teknik observasi akan berfungsi sangat baik yaitu dengan mengelilingi kandang sekitar 15 menit atau lebih, perhatikan secara menyeluruh satu per satu, jika ada ternak yang berbaring diusahakan harus berdiri. Ternak yang berahi akan diam berdiri jika dinaiki oleh yang lain.

Ternak yang fase berahinya meragukan memiliki tanda-tanda antara lain gelisah, bekas lendir yang mengering dan melekat pada rambut bagian belakang sekitar perianal, menggesek-gesek badan, menaiki ternak lain, mencium-cium bagian perianal ternak lain, menaik-naikkan ekornya sendiri, keluar lendir jernih dari vulva, vulva bengkak dengan selaput lendir berwarna rose. Tidak setiap ternak sapi yang menunjukkan gejala tersebut dikategorikan "meragukan", Tetapi sebaiknya diamati dan diobservasi lebih lanjut dan lebih intensif untuk dapat diketahui dan dicatat sebagai *standing heat* atau "meragukan".

Satu sampai tiga hari setelah estrus, sering terjadi perdarahan metestrus (*metestrous bleeding*), sering terlihat dengan tanda-tanda adanya lendir bercampur darah yang melekat pada pangkal ekor ataupun bagian belakang ternak. Perdarahan ini merupakan tanda yang baik, yang menunjukkan ternak memiliki siklus kelamin yang normal dan selalu dicatat baik pada donor maupun resipien, apalagi jika standing estrus-nya tidak teramati selama observasi.

Sebagai alat bantu yang lain untuk mendapatkan deteksi estrus yang tepat adalah pencatatan dengan menggunakan kalender. Jika estrus terdeteksi, nomor donor sebaiknya dicatat pada kalender 18 hari kemudian. Jadi donor-donor yang berahi 18-24 hari yang lalu dapat diobservasi secara terencana dan lebih teliti. Hasil pengamatan segera dicatat sebagai data dasar (*base data*), kemudian sebaiknya ditransfer lagi ke buku catatan yang telah dipersiapkan dalam form tabulasi harian dan kartu data individu setiap ternak. Setiap waktu data ditransfer, sebaiknya diperiksa oleh orang kedua atau staf yang lain. Alat atau metoda lain sebagai deteksi estrus berguna, selama alat tersebut dapat mendukung deteksi visual. Dalam program TE, penggunaan pejantan sebagai detektor, baik yang telah divasektomi maupun dengan penis yang di-*block* atau dideviasikan, tidak dianjurkan karena prosedur tersebut tidak menjamin sterilitas total. Selain itu pejantan dapat menyebarkan penyakit kelamin. Jika ternak pengusik atau pelacak (*teaser*), sebagai alternatif pilihan maka gunakan ternak betina yang diberi androgen.

5.3.5 Identifikasi

Dalam pengelolaan kesehatan populasi ternak, dalam deteksi estrus dan disetiap tahapan program TE, pengelola harus mampu memilih dan menentukan salah satu dari ratusan ekor ternak, dan menjamin sepenuhnya bahwa ternak yang terpilih tadi secara nyata berdasarkan fakta adalah benar. Jadi diperlukan suatu sistem yang permanen maupun temporer. *Ear tags* yang benar dan mudah terbaca dipasang di kedua telinga pada saat test darah pertama merupakan teknik identifikasi yang baik. Di beberapa negara, masih digunakan identifikasi dengan menggunakan besi panas. Selain itu juga dapat menggunakan tato, biasa digunakan juga untuk kartu data individu. Persatuan peternak (*breed association*) memerlukan identifikasi permanen untuk pencatatan pedet hasil TE. Jadi, untuk mencatat suatu rangkaian transfer, tanda tambahan seperti nomor tato yang jelas terbaca pada telinga direkomendasikan pada saat TE.

5.3.6 Sinkronisasi Resipien dengan Donor

Jumlah donor yang dipakai dalam program TE tergantung dari besar kecilnya peternakan dan tersedianya ternak bibit unggul yang memenuhi persyaratan untuk dijadikan donor. Peternakan yang besar, dapat saja menyediakan donor, satu, sepuluh, dua puluh atau bahkan lebih dan sebagai resipiennya disediakan dari peternakan yang bersangkutan. Sinkronisasi estrus dapat menggunakan hormon progestagen atau prostaglandin dan kombinasi PGF 2α dengan basis gonadotropin releasing hormone (GnRH) (Hall *et al.* 2009). Sinkronisasi estrus dapat pula

dilakukan dengan PGF_{2α} atau analognya atau dengan synchromate B. Angka kebuntingan (*pregnancy rate*) dalam program TE untuk kelompok resipien yang berahinya diinduksi (resipien memiliki corpus luteum dan disuntik PGF_{2α}) dengan kelompok resipien yang menunjukkan berahi alam adalah sama. Untuk sinkronisasi estrus resipien pada umumnya dapat dilakukan dengan tiga cara:

- 1) Penyuntikan PGF_{2α} hanya pada kelompok resipien tidak bunting yang memiliki corpora lutea. Estrus timbul antara 48-96 jam kemudian, mayoritas estrus sekitar 60 jam kemudian.
- 2) Seluruh resipien yang tidak bunting baik memiliki corpora lutea maupun tidak, suntik dengan PGF_{2α}. Ulangi kembali penyuntikan PGF_{2α} 11 hari kemudian. Gejala estrus akan muncul dengan puncaknya antara 2 dan 3 hari kemudian. Resipien-resipien yang berespon dari penyuntikan pertama akan berada dalam pertengahan siklus kelamin pada penyuntikan kedua. Sedangkan resipien-resipien yang tidak berespon dalam penyuntikan pertama karena berada sekitar D1 sampai D5, pada penyuntikan kedua akan berada diantara pertengahan sampai akhir siklus kelamin.
- 3) Implantasikan synchromate B dan suntik dengan preparat pelengkap intramuscular (i.m.). Sembilan hari kemudian keluarkan implant secara sempurna. Sebagian besar resipien akan estrus dalam 2-3 hari kemudian (rata-rata 45 jam).

Rata-rata donor yang subur dalam siklus kelamin teratur, untuk pertama kali disuperovulasi akan menghasilkan sekitar tujuh *transferable embryo*, sehingga diperlukan penyediaan resipien sekitar tujuh atau

delapan ekor untuk setiap donor. Untuk memperoleh tujuh atau delapan ekor resipien yang siap ditransfer, harus dipersiapkan sekitar 20 ekor calon resipien. Dari kelompok calon ini melalui palpasi rektal dapat ditentukan 12 ekor (60%) yang memiliki korpus luteum. Jika dari 12 ekor ini disuntik $PGF_{2\alpha}$ akan diperoleh rata-rata delapan ekor yang benar-benar cocok dan sinkron dengan donor.

Dalam prosedur pelaksanaan superovulasi, siklus kelamin donor dan resipien akan sinkron jika kelompok resipien disuntik $PGF_{2\alpha}$ sehari sebelum donor disuntik dengan $PGF_{2\alpha}$, karena pengaruh pemberian gonadotropin terdahulu pada donor akan menyebabkan donor akan estrus dalam waktu 36-60 jam (rata-rata 42 jam) setelah penyuntikan $PGF_{2\alpha}$, sedangkan resipien estrus sekitar 48-96 jam kemudian (rata-rata 60 jam).

Tabel 9 Dua macam contoh pelaksanaan sinkronisasi estrus antara donor dan resipien.

Siklus Kelamin	Waktu	Contoh 1		Contoh 2	
		Donor	Resipien	Donor	Resipien
D0	pagi sore	Berahi alam atau buatan	$PGF_{2\alpha}$ i.m.	Berahi alam atau buatan	
D10	pagi sore	FSH FSH		FSH FSH	
D11	pagi sore	FSH FSH		FSH FSH	
D12	pagi sore	FSH FSH	siang $PGF_{2\alpha}$	FSH FSH	
D13	pagi sore	$FSH+PGF_{2\alpha}$ $FSH+PGF_{2\alpha}$		$FSH+PGF_{2\alpha}$ $FSH+PGF_{2\alpha}$	
D14	pagi sore				
D15	Estrus	Estrus	Estrus	Estrus	Estrus

Catatan :

- 1) Donor dan resipien akan berahi pada D15. Donor di inseminasi pertama 12 jam kemudian setelah *standing estrus*, dan diinseminasi ke dua 24 jam kemudian setelah *standing estrus*. Masing-masing inseminasi dengan satu dosis semen beku. Resipien yang estrus tidak diinseminasi.
- 2) Pada pelaksanaan superovulasi donor sapi perah, penyuntikan hormon gonadoropin eksogen (FSH, PMSG) dan PGF_{2α} sebaiknya dilakukan sesudah pemerahan susu.

Sekitar 70%-80% donor yang fertil akan berespons terhadap gonadotropin pada program superovulasi yang pertama (Hasler *et al.* 1983). Jika tiga sampai lima donor disuperovulasi pada waktu yang bersamaan, variabilitas respon terhadap superovulasi yang timbul akan berimbang dengan terpakainya resipien yang sudah dipersiapkan. Sering tidak diperoleh dari embrio dari hanya seekor donor yang disuperovulasi, akibatnya resipien yang telah dipersiapkan tidak terpakai. Kegagalan semacam ini adalah mahal. Seorang operator yang berpengalaman mampu melakukan lokalisasi, pembilasan, koleksi, klasifikasi dan mentransfer embrio tanpa bedah dari lima ekor donor dalam waktu enam sampai delapan jam, jika cukup tersedia asisten yang membantu dalam pelaksanaan, terutama pada saat pemanenan (pembilasan), koleksi dan transfer embrio.

5.4 Inseminasi Donor

Salah satu cara yang digunakan dalam program peningkatan mutu genetik (*genetic improvement programme*) ternak sapi adalah melalui metoda inseminasi buatan (IB). Penggunaan IB telah lama dilakukan oleh banyak negara untuk tujuan *upgrading* populasi ternak sapi. Inseminasi

buatan yang dipakai dalam program kawin silang (*cross breeding programme*), jika ditinjau dari segi waktu yang dibutuhkan untuk memperoleh derajat kemurnian genetik yang tinggi (*purebred*), akan diperlukan waktu sampai enam generasi kehidupan ternak sapi (12-18 tahun). Metoda transfer embrio memerlukan waktu satu generasi untuk memperoleh bangsa yang murni. Pada umumnya donor dapat diketahui kualitasnya dari nilai CI dan kesesuaian tipe, sedangkan pejantan IB (*service sire*) dapat dievaluasi nilai genetiknya lebih banyak dan lebih tepat dari donor, sehingga pemilihan pejantan yang akan dipakai dalam menginseminasi donor adalah sangat penting untuk memperoleh keturunan dengan potensi genetik tertinggi dan dapat dijadikan stok bibit yang potensial.

5.4.1 Pemilihan Pejantan (*Service Sire*) Untuk Inseminasi Donor

Dalam usaha peternakan sapi perah, dipergunakan suatu nilai indeks untuk memilih pejantan IB. Nilai indeks ini disebut *Total Performance Index* (TPI) yang merupakan kombinasi dari taksiran kemampuan pejantan untuk menurunkan sifat-sifat produksi susu (*Predicted Difference for Milk, PDM*), persentase lemak susu (*Predicted Difference for Fat, PD %Fat*) dan tipe (*Predicted Difference for Type, PD Type*) kepada anak betinanya. Perbandingan kombinasi antara PDM, PD % Fat dan PD Type adalah 3:1:1. Ketiga sifat yang diturunkan tersebut merupakan sifat-sifat yang penting dimiliki oleh seekor sapi perah.

Total Performance Index (TPI) merupakan figur setiap pejantan yang diperoleh melalui formula baku. Sejumlah 100 ekor pejantan yang mampu

menurunkan sifat-sifat tersebut dengan peluang (*repeatability*) 50% keatas disusun mulai peringkat tertinggi sampai terendah dalam suatu daftar. Populasi pejantan ini disebut dalam suatu daftar. Populasi pejantan ini disebut *The Top 100 TPI Bulls*, sebagai contoh dapat dilihat pada Tabel 9. Daftar *The Top 100 TPI Bulls* ini merupakan alat yang populer untuk membuat keputusan (*breeding decision*) bagi peternak sapi perah di beberapa negara seperti Amerika dan Jerman.

Prosedur mengambil keputusan dalam pemilihan pejantan yang akan dipakai:

- 1) Evaluasi produksi donor, tentukan kelebihan dan kekurangan dari sifat fungsional donor (*trait profiles* untuk susu, % lemak susu, *final score* dan *linear traits*).
- 2) Penentuan kontribusi genetik untuk donor diperoleh dari populasi pejantan yang tersedia baik yang berbentuk semen beku maupun dalam status pejantan hidup. Pejantan (*service sire*) harus memiliki TPI yang tinggi.
- 3) Dari populasi pejantan yang tersedia misal dari *The Top100 TPI Bulls*, pilih pejantan secara individual yang memiliki produksi tertinggi dan dapat memperbaiki sifat-sifat linier yang lemah dan merupakan prioritas tertinggi untuk diperbaiki.

Tabel 10 Daftar contoh urutan peringkat keunggulan dari 100 ekor pejantan elite (*Top 100 TPI Bulls*) diawal tahun 1986.

Peringkat	Nama dan no. registrasi	Milk		Fat		Pro/SNF		Type	TPI
		PD±CR	PD	PD%	PD\$	PD	PD%	PD±CR	
1	Arlinda Rotate, 1697572	1736 ± 79	73	.06	223	44 P	.05	.54 ± .16	771
2	Rockalli Son of Bova , 1665634	1972 ± 79	34	.19	173	29 p	.17	1.18 ± .10	741
3	Bossir Glen – Valley Starlite Al, 1819119	1641 ± 341	43	.08	168	130 S	.04	1.50 ± .44	736
4	Tri Day Valiant Gold, 1811342	1446 ± 350	48	.02	165	43 P	.01	1.40 ± .42	710
5	S.W.D. Valiant, 1650414	1169 ± 56	50	.04	152	40 P	.02	1.85 ± .07	701
6	Carlin M Ivanhoe Bell, 1667366	1632 ± 56	55	.02	187	50P	.01	.42 ± .07	690
7	Sweet Haven Tradition, 1682485	1755 ± 56	32	.16	157	39 P	.08	1.00 ± .07	687
8	Lekker Valiant Royalty, 1821208	1494 ± 327	46	.04	164	48 P	.02	1.05 ± .37	687
9	Whittier Farms Ned Boy, 1806201	1018 ± 274	53	.09	148	49 P	.04	1.74 ± .33	681
10	MJR Pistil Pete, 1804227	1449 ± 322	24	.15	126	24 P	.11	1.68 ± .40	659
90	K – Way Apostle King Vic, 1699493	761 ± 79	43	.09	116	25 P	.01	.53 ± .20	526
91	Merit Hamlet Starlite Valiant, 1832924	102 ± 257	58	.31	101	20 P	.10	1.30 ± .43	526
92	Betterway Matador, 1766552	1083 ± 307	16	.12	91	27 P	.02	.94 ± .43	525
92	Betterway Matador, 1766552	1083 ± 307	16	.12	91	27 P	.02	.94 ± .43	525
93	Long Haven Oscar Et, 1823341	1220 ± 367	9	.19	87	20 P	.08	.95 ± .49	523
94	Elm – Nor – Way Perfect Conductor, 1780400	1094 ± 244	19	.00	96	26 P	.04	.78 ± .40	522
95	Needle Lane Jon Red, 1802 072	701 ± 376	30	.03	91	16 P	.03	1.17 ± .48	522
96	Vigo Starlite Elvate, 1720138	828 ± 125	35	.03	107	15 P	.06	.68 ± .22	521
97	Mil Nor II Design, 1721369	785 ± 148	19	.05	78	6 P	.10	1.40 ± .31	517
98	Kish View Conductor Sugardaddy, 1781574	1011 ± 286	30	.03	109	28 P	.02	.40 ± .36	517
99	I.O. State Chief Ford, 1674245	1326 ± 56	29	.10	127	20 P	.11	.25 ± .07	516
100	Luck – E Chief Tri County, 1715880	1153 ± 137	28	.07	115	30 P	.03	.17 ± .28	516

5.4.2 Pelaksanaan Inseminasi Buatan

Pelaksanaan inseminasi buatan pada donor pada prinsipnya hampir sama dengan IB pada ternak sapi yang tidak disuperovulasi. Meskipun demikian, inseminasi donor perlu mendapat perhatian khusus terutama yang menyangkut seluruh kegiatan pada waktu inseminasi. Untuk mengetahui faktor-faktor yang berperan dan memerlukan perhatian khusus pada waktu inseminasi donor, akan diuraikan terlebih dahulu mengenai pelaksanaan kegiatan waktu inseminasi pada ternak yang disuperovulasi.

5.4.2.1 Waktu Inseminasi Ternak Sapi yang Tidak Disuperovulasi

Menurut hasil penelitian akhir-akhir ini, dalam pengamatan berahi, dapat ditunjukkan bahwa ternak sapi yang berahi tidak mau dinaiki oleh pejantan sampai fase akhir berahi, walaupun mau dinaiki oleh ternak sapi betina yang lain di awal fase estrus. Waktu terbaik untuk mengawinkan, dengan teknik IB, tidak dalam waktu yang tepat bersamaan dengan estrus atau beberapa saat setelah estrus berakhir. Alasan ini logis jika dibandingkan dengan kawin secara alami. Pada kawin secara alami, semen dideposit di vagina bagian depan sedangkan pada IB semen dideposit pada pangkal uterus dekat dengan cranial serviks.

Perkawinan dengan IB sebaiknya dilakukan selama selang periode 12 jam, yaitu selang mulai dari enam jam sebelum sampai enam jam setelah estrus berakhir (kira-kira, enam jam sebelum ovulasi). Waktu IB yang baik dapat dilihat pada Tabel 10. Sapi yang estrus harus diperlakukan dan ditangani secara baik, setiap tindakan jangan sampai menimbulkan nervositas ataupun stress pada ternak sapi itu sendiri. Peralatan IB harus dijaga sesteril mungkin.

Tabel 11 Relevansi antara gejala berahi, ovulasi dan waktu inseminasi (modifikasi dari Busch *et al.* 1982).

Gejala berahi	Vagina merah-lembab, vulva bengkak. Gelisah, mudah terangsang. Berusaha menaiki yang lain. Berahi (<i>standing heat</i>) sekitar 18 jam. Produksi susu menurun.					Tidak mau dinaiki lagi. Tetap tinggal diam bersama yang lain. Lendir banyak keluar				Fertilitas maks. ovum 2-6 jam
Waktu (jam)	Onset berahi	9	12	15	18	21	24	27	30	
Kebuntingan	Gagal	Rendah	Sedang	Baik	Sangat baik	Baik	Sedang	Rendah	Gagal	
Inseminasi	Terlalu dini	Dapat di IB tetapi kebuntingan rendah-sedang		Waktu optimal untuk IB antara 12-24 jam setelah estrus mulai			Dapat di IB tetapi kebuntingan rendah-sedang		Terlambat	

Sistem pagi-sore untuk waktu IB memberi hasil yang agak baik (CR agak lebih tinggi), jika sistem tersebut mengikuti hasil pengamatan berahi yang teliti. Ternak sapi yang estrus pada pagi hari dikawinkan pada sore hari, sedangkan yang berahi sore hari dikawinkan pada pagi hari berikutnya. Anjuran ini berdasarkan dari beberapa hasil studi.

Perkawinan yang dilakukan lebih awal dari periode yang ada dalam sistem akan menghasilkan CR rendah karena fertilitas dan viabilitas sperma telah menurun. Perkawinan yang dilakukan lebih akhir dari periode juga akan menurunkan CR, karena sperma memerlukan waktu tertentu di dalam saluran kelamin betina untuk memperoleh kapasitas membuahi ovum dengan perkataan lain sperma harus mengalami proses kapasitasasi sebelum sperma dapat melakukan fertilisasi ovum. Pada kawin yang terlalu akhir, mungkin ovum telah berdegenerasi pada saat sperma telah kapasitasasi.

5.4.2.2 Inseminasi Ternak Sapi Donor

Dalam pelaksanaan akhir superovulasi, donor harus diamati tanda-tanda berahinya secara teliti. Ternak sapi yang disuperovulasi kadang-kadang tidak memperlihatkan gejala berahi sejelas sapi berahi yang tidak disuperovulasi, sehingga alat bantu deteksi estrus sangat bermanfaat. Sekitar 10% dari donor tidak pernah memperlihatkan gejala-gejala berahi. Donor-donor yang tidak memperlihatkan gejala berahi sebaiknya tidak dikawinkan.

Waktu donor memperlihatkan gejala berahi yang pertama atau awal berahi (*standing estrus*) adalah merupakan data penunjang (*point of reference*) untuk menentukan waktu yang tepat untuk IB. Ovulasi terjadi selama periode waktu tertentu, transport sperma dan ova berubah pada donor yang disuperovulasi, karenanya disarankan untuk mengawinkan atau menginseminasi lebih dari satu kali dan gunakan semen dengan konsentrasi yang lebih tinggi dengan kualitas yang lebih baik dari biasanya. Penggunaan semen cair yang baru ditampung (*fresh semen*) adalah lebih baik dari semen beku, karena karena viabilitasnya lebih lama dalam saluran reproduksi hewan betina. Untuk semen cair gunakan dengan konsentrasi 50×10^6 motil spermatozoa per ml. Inseminasi dengan semen cair ini dilakukan dua kali, pertama 12 jam dari awal berahi, kedua 24 jam dari awal berahi, masing-masing satu dosis dengan konsentrasi 50×10^6 motil spermatozoa per ml. Jika semen beku digunakan untuk IB, dapat dari ampul maupun jerami plastik (*straw*). Biasanya semen beku memiliki konsentrasi awal sebelum pembekuan paling sedikit 20 juta motil spermatozoa per dosis. Apapun kemasan semen beku diharapkan dosis

awal sebelum pembekuan adalah 20 juta spermatozoa motil (tetapi ada juga yang memberi 25-30 juta spermatozoa motil). Waktu inseminasi pertama adalah 12 jam setelah awal berahi, IB kedua 12 jam kemudian masing-masing satu dosis semen beku. Semen beku dalam kemasan jerami plastik sistim Perancis (0,5 ml dan 0,25 ml), Kontinental (0,3 ml) maupun kemasan ampul dicairkan dengan air hangat 35 °C (95 °F) selama 30 detik dan secepat mungkin diinseminasikan. Konsentrasi setelah pencairan minimal 40% (ada juga yang membakukan 50%) spermatozoa harus motil.

Pola hormonal yang berubah akan menciptakan saluran reproduksi donor yang disuperovulasi memiliki lingkungan yang kurang menguntungkan (*more hostile enviroment*) dari pada ternak sapi yang tidak disuperovulasi, karenanya penggunaan semen harus memiliki kualitas terbaik. Penggunaan semen dengan kualitas buruk atau sedang sering menghasilkan ova yang tidak terfertilisasi atau embrio yang berdegenerasi.

Inseminator harus menginseminasi dengan cara yang terbaik, sesteril mungkin karena stress dari superovulasi menyebabkan saluran reproduksi bagian atas menjadi sangat sensitif. Manipulasi yang kasar dan berlebihan dapat menyebabkan kegagalan fimbriae mengambil seluruh ova. Infeksi yang ditimbulkan pada waktu inseminasi dapat menurunkan angka fertilisasi dan angka pemanenan. Lagipula pada waktu inseminasi pertama, mungkin masih banyak folikel yang belum ovulasi, karenanya saluran reproduksi jangan terlalu banyak dimanipulasi untuk mencegah folikel ruptur. Selain itu, jika terjadi banyak ovulasi dan ovaria membesar, terjadi perdarahan yang lebih dari pada normal dan ukuran relatif dari

organ berubah. Hal ini akan meningkatkan kemungkinan terjadinya perlekatan organ (*adhesions*) sebagai akibat seringnya dilakukan inseminasi.

5.5 Pemanenan dan Koleksi Embrio (*Embryo Recovery, Flushing*)

Secara alamiah ovum yang telah diovulasikan akan ditransport oleh saluran telur kearah uterus. Pada ternak sapi, ovum berada dalam saluran telur sekitar tiga sampai empat hari. Pada hari kelima ovum telah mencapai apeks uterus. Jika terjadi fertilisasi, maka selama transportasi, ovum yang telah terbuahi atau zigot juga akan mengalami perkembangan berupa pembelahan yang disebut *cleavage*. Embrio berkembang sampai stadium 8-16 sel di dalam saluran telur, sedangkan mulai dari stadium 16 sel atau stadium morula dan selanjutnya akan berkembang dalam uterus.

Berdasar proses fisiologis yang diuraikan diatas, embrio dapat dipanen dan dikoleksi baik dari saluran telur maupun dari uterus. Sesuai dengan tujuan TE, embrio dapat dipanen dalam stadium tertentu dan letaknya dapat dilokalisir dengan berpedoman dari umur embrio tersebut. Selain itu dari segi kemudahan pelaksanaan pemanenan embrio ataupun pemindahan embrio dengan peralatan dan teknik yang tersedia, maka baik pemanenan maupun pemindahan embrio dapat dilakukan dengan dua metoda yaitu metode bedah atau metoda tanpa bedah dari ternak hidup. Ova dan atau embrio dapat terkoleksi sekitar 40%-80% dari jumlah corpora lutea yang ada di kedua ovaria ternak donor yang disuperovulasi. Sampai saat ini belum diketahui dengan jelas, mengapa jumlah ova atau embrio terkoleksi lebih rendah daripada jumlah corpora lutea yang ada, tetapi ada

beberapa dugaan diantaranya, 1) ova tidak dapat ditangkap oleh fimbrae saluran telur, karena ovaria terlalu membesar, 2) ova menghilang dalam saluran reproduksi karena adanya perubahan steroid hormon, 3) adanya pembentukan corpora lutea tanpa ovulasi, 4) faktor ketrampilam dan ketelitian dalam menemukan seluruh ova atau embrio yang ada dari saluran reproduksi.

Embrio masih berada dalam saluran telur sekitar 3-4 hari setelah ovulasi dan akan bermigrasi ke uterus pada hari kelima. Pemanenan pada hari ke D1-D3 melalui metoda bedah pada saluran telur akan menghasilkan embrio lebih banyak daripada pemanenan pada D5 atau lebih dari uterus. Akan tetapi embrio yang berasal dari uterus akan menghasilkan angka kebuntingan yang lebih baik daripada embrio yang berasal dari saluran telur. Selain itu embrio dari uterus dapat dibekukan dan lebih berhasil dari embrio yang lebih muda atau yang berasal dari saluran telur.

Pada saat ini metoda tanpa bedah merupakan suatu pilihan yang sudah rutin dijalankan. Pemanen embrio dengan metoda bedah melalui mid-ventral laparotomy dapat dianjurkan dalam kasus tertentu dengan adanya kausa mekanis yang menimbulkan infertilitas seperti obstruksi saluran telur, yang dapat dikoreksi secara bedah. Penyayatan flank yang dilakukan dibawah lokal anastesi dapat berhasil dengan baik pada beberapa kondisi. Pada umumnya pemanenan cara ini tidak dianjurkan, karena sulitnya mempreparir saluran reproduksi. Cara ini juga dapat menimbulkan stres, hasil panen menurun dan dapat memperbesar kemungkinan terjadinya perlekatan (*adhesion*).

5.5.1 Metoda Bedah

Ova dan atau embrio dari saluran telur dapat dibilas (*flushing*) dari arah fimbriae ke uterotubal junction (UT) atau sebaliknya. Pada ternak sapi pembilasan ke arah fimbriae lebih disukai, karena hasil panennya lebih tinggi dan luka yang ditimbulkan kecil sekali. Ova dapat juga dipanen dari tanduk uteri, setelah ova meninggalkan saluran telur, biasanya pada hari D5 atau lebih. Medium pembilas dialirkan ke arah pangkal tanduk uterus. Medium pembilas ditampung melalui jarum suntik yang tumpul yang dimasukkan ke dalam lumen melalui dinding uterus. Prosedur dapat dilakukan sebaliknya. Jumlah ova yang terkoleksi dengan cara ini lebih sedikit daripada dari saluran telur (Betteridge *et al.* 1980). Luka yang serius dapat terjadi dengan cara ini dan juga dapat menimbulkan perlekatan. Volume sekitar 2-30 ml digunakan untuk membilas saluran telur, sedangkan untuk membilas uterus diperlukan sekitar 10-100 ml, tergantung dari ukurannya (Newcomb 1982).

5.5.2 Metoda Tanpa Pembedahan

Pemanenan embrio tanpa bedah dilakukan pada D6-D8. Sebelum hari kelima atau keenam setelah estrus, embrio masih berada didalam saluran telur dan tidak dapat dipanen melauai metode tanpa bedah. Untuk maksud tersebut, pemberian makanan untuk donor dikurangi (kecuali sapi perah yang laktasi) dan bila perlu tidak diberi makan dan minum selama 24 jam sebelum pembilasan saluran reproduksi.

Donor yang akan dibilas saluran reproduksinya (*flushing*), dapat ditempatkan dalam kandang jepit atau tetap pada kandangnya. Bagian

depan dari kandang agak sedikit dinaikkan dengan menggunakan papan ataupun tumpukan jerami. Ujung ekor diikat keatas atau ke bagian depan. Bagian belakang (perineum) dan sekitarnya dicuci dengan sabun. Jika rektum berisi penuh udara, harus dikeluarkan dulu menggunakan selang plastik (dengan diameter luar 0,5 cm) yang salah satu ujungnya dipegang dalam rektum dan ujung lainnya dihubungkan ke alat penghisap vakum. Ternak diberi penenang (tranquilizer) 10 cc Combelen, dan anastesi epidural 5 cc procaine (2%) atau hostacaine. Lakukan palpasi rektal untuk mengestimasi jumlah korpora lutea, folikel dan ukuran dari ovaria.

Dalam keadaan tertentu diperlukan servikal ekspander untuk sedikit memperlebar lumen serviks. Biasanya sapi dara masih agak sulit ditembus dengan katheter, baik Foley maupun Neustadt/Aisch kateter. Servikal ekspander jarang digunakan pada sapi induk, karena lubang serviks cukup luas untuk masuknya kateter. Pada kasus tertentu seperti sapi perah yang tua, yang sudah beberapa kali beranak, serviksnya biasanya sudah agak tertarik ke ruang abdomen, sehingga dalam hal ini diperlukan penjepit serviks untuk menarik serviksnya kedalam rongga pelvis. Pemasukan kateter akan lebih mudah jika serviks berada dalam rongga pelvis dan berada dekat vagina. Selain itu pemanen embrio yang dilakukan pada hari 6-8 setelah inseminasi, biasanya serviks sudah tertutup dengan lendir yang kental, untuk itu dibutuhkan *mucus remover* untuk mengambil lendir tersebut. Beberapa jenis kateter flushing yang dibutuhkan dalam pelaksanaan panen embrio (*embryo collection*) dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10 Kateter fushing embrio dari Neustadt Aisch Neustadt/Aisch CH18 Sterile (kiri), Silicone ET catheter CH18, Foley 3-ways, Balloon max.30ml (kanan) (Minitube GmbH).

Untuk sapi potong biasanya digunakan kateter Foley (42 cm), yang tersedia dengan ukuran 18 atau 24 (*French gauge*). Kateter Neustadt/Aisch, panjang 67 cm tersedia dengan ukuran Ch 18 dan Ch 14 (*German gauge*) biasanya digunakan untuk sapi perah. Ukuran tersebut tentu disesuaikan dengan besar kecilnya saluran reproduksi, misalnya kateter Neustadt/Aisch nomor Ch 18 digunakan untuk induk sapi perah sedangkan Ch 14 untuk sapi dara. Kedua macam kateter tersebut menggunakan piston dari logam (*stainless steel stilet*) supaya kateter karet menjadi kaku dan mudah dimasukkan ke dalam uterus. Kedua kateter selain memiliki lubang dikedua ujungnya juga memiliki balon manset untuk memfiksir ujung kateter. Balon manset pada kateter Foley dalam penggunaannya diletakkan dalam salah satu tanduk uterus dekat bifurkasio uteri, sedangkan balon manset kateter Neustadt/Aisch diletakkan dua pertiga bagian depan kornua uteri (sepertiga dari apeks kornua uteri). Balon manset ini dapat diberi udara sekitar 10-15 ml dengan tambahan udara sekitar 2-6 ml. Tujuannya selain memfiksir kateter juga mencegah medium

pembilas mengalir keluar dari rute yang seharusnya. Jadi balon cukup kencang sehingga medium tidak bocor kedalam korpus uteri. Jika balon terlalu kuat, endometrium pecah dan perdarahan yang timbul dapat mengganggu pemeriksaan. Khusus pada pemakaian kateter Foley, balon dapat diisi NaCl fisiologis steril sampai menggembung (*flush body*) dan ditarik ke belakang untuk menutup os uteri interna. Pemanenan dilakukan dengan memasukkan medium pembilas dan mengeluarkannya kembali. Sebagai ilustrasi dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11 Penempatan kateter pembilas (*flushing*) dalam koruna uteri. Keteter yang dipakai adalah kateter Foley. Medium pembilas diilustrasikan dalam bentuk lilin (*wax*) berwarna coklat tua (foto W. Gehring).

Medium pembilas yang tertampung kembali diperiksa dibawah mikroskop untuk mengkoliksi ova atau embrio. Lokalisasi, identifikasi, isolasi dan klasifikasi baik ova maupun embrio memerlukan pelaksanaan dan penanganan yang simple, logis dan praktis. Pemeriksaan dan pencarian di bawah mikroskop sebaiknya dilakukan secara berulang

(pengulangan oleh dua teknisi yang berlainan). Ova atau embrio mudah terselip dan hilang dalam medium pembilas. Untuk mengatasi hal ini dibuat gelas jam, dengan bentuk cekung dan memiliki kemiringan tertentu serta memiliki dasar bulat. Tidak seluruh ova atau embrio menggelinding ke dasar gelas yang bulat, sehingga semua bagian harus diperiksa dengan cermat. Bentuk lain untuk pencarian ova atau embrio yaitu dengan penampungan medium pembilas dalam cawan petri yang datar dan diberi pembagian daerah secara merata. Cara-cara tersebut sudah cukup efisien dalam usaha menemukan ova atau embrio dalam medium pembilas.

5.5.3 Evaluasi dan Klasifikasi Embrio

5.5.3.1 Pembuahan Oosit

Proses bersatunya (fusi) antara sel kelamin betina (oosit) dan sel kelamin jantan (spermatozoa) disebut pembuahan atau fertilisasi. Fertilisasi terjadi apabila oosit telah mencapai tingkat kematangannya yaitu stadium metafase II. Sebelum oosit bertemu dengan spermatozoa, oosit belum mempunyai kemampuan untuk fertilisasi. demikian pula spermatozoa sejak meninggalkan testis sampai terjadinya ejakulasi, spermatozoa belum mempunyai kemampuan untuk fertilisasi. Dalam proses fertilisasi dapat dibagi menjadi tiga proses yaitu:

- 1) proses kapasitasi spermatozoa (proses terjadinya kemampuan spermatozoa untuk dapat membuahi ovum)
- 2) aktivasi oosit oleh spermatozoa untuk dapat berkembang
- 3) fusi genetik material antara inti sel kelamin jantan dan betina

Fertilisasi terjadi di sepertiga atas oviduct atau di bagian caudal ampulla dari oviduct.

5.5.3.2 Periode Embrio

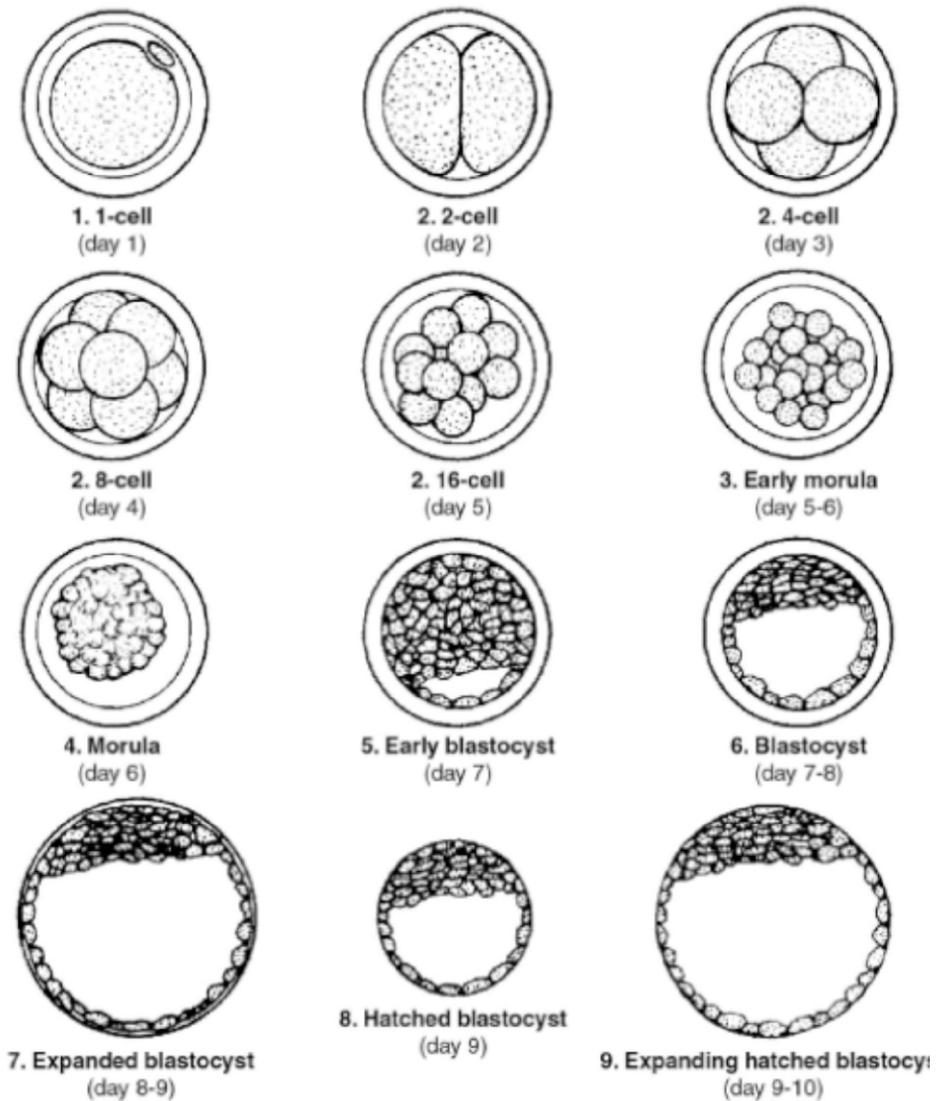
Hasil fertilisasi yang merupakan fusi ovum-sperma disebut zigot. Morfologi zigot terdiri atas masa seluler yang dikelilingi matriks aseluler yang disebut zona pelusida. Ruang antara zona pelusida dan masa seluler disebut ruang perivitelin. Setelah fertilisasi, zigot sapi akan ditransport selama 72-96 jam (empat hari) menuju cornua uteri. Selama transportasi tersebut, zigot juga akan mengalami serangkaian pembelahan sel (mitosis) pada masa selulernya menjadi blastomer. Pembelahan seluler tersebut tidak disertai dengan pembelahan zona pelusida dan pembelahan zigot ini disebut *cleavage*. Pembelahan sel-sel blastomer yang berturut-turut berlangsung sangat cepat secara geometris (1-2-4-8-16 sel blastomer) sampai stadium 16 sel, sehingga sel-sel blastomer tidak sempat tumbuh, dengan demikian jumlah sel-sel blastomer meningkat akan tetapi ukurannya mengecil. Embrio stadium 16 sel (morula dini) memiliki ukuran relatif sama besar dengan zigot karena zona pelusida tetap intak (utuh, tidak membelah). Pada hari ke lima embrio mulai memasuki kornua uteri dan berkembang lebih lanjut menjadi 32 sel (morula), blastosis, blastosis menetas (*hatched blastocyst*), yang akhirnya akan implantasi pada endometrium.

Morula sapi akan berkembang menjadi blastosis pada hari ke7-8. Pada hari ke 8-9, blastosis berbentuk *spherical* (diameter 180 m), menjadi *expanded blastocyst* dan akan menetas keluar dari zona pelusida menjadi *hatched blastocyst*, hari ke12-13 *hatched blastocyst* yang telah *expanded* akan berkembang berbentuk tubular membujur, dan pada hari ke 13-17 berbentuk filament. Blastosis akan implantasi pada endometrium pada

hari ke 18-22 setelah fertilisasi. Blastosis pada hari ke17-18 mengisi sekitar dua per tiga sisi kornua uteri bunting, dan akan mengisi seluruh kornua uteri bunting pada hari ke 18-20, kemudian mengisi dan mengembang ke kornua yang kontralateral pada hari ke-24.

5.5.3.3 Implantasi

Implantasi ialah proses melekatnya blastosis yang telah menetas (*hatched blastocyst*) di dalam endometrium, sehingga terjadi hubungan sel antara selaput ekstra embrionik dengan selaput lendir endometrium. Ketika zigot berkembang dan ditransport dalam tuba fallopii (oviduct) selama 3-4 hari menuju kornua uteri, cumulus oophorus dan korona radiata lisis. Pada hari ke 4-5 embrio 16 sel masuk kedalam kornua uteri, terus berkembang menjadi morula dan blastosis. Pada hari ke 9 blastosis yang telah expanded, zona pelusidanya menipis dan akan lisis, dengan demikian blastosis yang menetas leluasa berhubungan dengan uterus. Blastosis mengalami pengembangan ukuran disertai penipisan zona pelusida (*expanded blastocyst*), kemudian akan robek dan trophoblast mulai keluar dari zona pelusida (*hatching blastocyst*) pada hari ke 8-11. Setelah itu zona pelusida lisis. Blastosis yang telah menetas meninggalkan zona pelusida lisis (*hatched blastocyst*), tumbuh-berkembang tubular memanjang dan akan implantasi pada hari ke 18-22 setelah inseminasi. Proses biologis perkembangan zigot-embrio sampai dengan *expanding hatched blastocyst* dapat dilihat secara skematis dalam Gambar 12.



Gambar 12 Stadia perkembangan zigot sampai dengan *expanding hatched blastocyst* (IETS 2010).

Faktor yang menentukan dalam berhasilnya TE adalah kualitas embrio dan bukan kuantitas. Embrio dengan kualitas baik mempunyai daya tahan hidup, kemampuan berkembang lebih lanjut yang baik pula, artinya kualitas mempunyai hubungan erat dengan angka kebuntingan (*pregnant rate*) (Betteridge *et al.* 1980). Ada beberapa kriteria dalam evaluasi dan klasifikasi embrio menurut Niemann (1980) yaitu: 1) pemeriksaan morfologi, 2) pewarnaan vital, 3) pemupukan *in vitro*, 4) pengukuran laju metabolisme sel, dan 4) transfer. Yang paling umum dalam evaluasi dan klasifikasi embrio secara morfologis menggunakan pemeriksaan mikroskopis (Gambar 13).



Gambar 13 Stereo-zoom microscope dengan pembesaran 7x-45x yang dapat dipakai dalam pemeriksaan kualitas embrio secara morfologis (Minitube GmbH).

Mayoritas embrio yang terkoleksi harus sesuai dengan stadium perkembangannya. Embrio yang dikoleksi 3 hari (D3) setelah donor menunjukkan gejala berahi harus berada dalam stadium 4 atau 8 sel, pada hari ke-4 (D4) harus mempunyai 8-16 sel, pada hari ke-5 atau ke-6 (D5-D6) harus berada dalam stadium morula dan pada hari ke-7 atau lebih harus sudah berupa blastosis. Sejak folikel pada superovulasi ovaria ovulasi sepanjang periode waktu tertentu, maka terdapat penyebaran stadium perkembangan embrio yang tersebar dalam interval (*range*) yang normal alamiah. Adalah mungkin, walaupun jarang, bahwa 4-sel embrio terkoleksi bersama-sama grup morula dan berkembang menjadi fetus yang normal.

Morfologi embrio mempunyai korelasi erat dengan angka kebuntingan (walaupun tidak mutlak), ada beberapa penampilan abnormal dari embrio berkembang menjadi fetus. Embrio yang *retarded* dalam perkembangannya selama 2 hari lebih, sebaiknya jangan ditransfer. Retarded embrio, 2-, 3-, dan 4 sel jarang *survive* kalau ditransfer ke uterus, walaupun ditransfer ke dalam tuba falopii sekalipun.

Embrio harus dievaluasi dan diklasifikasikan sehingga resipien yang sesuai dapat diseleksi. Pada umumnya embrio yang baik akan ditransfer ke resipien yang baik, dan embrio yang jelek ditransfer ke resipien yang jelek. Begitu pula stadium embrio tertentu ditransfer ke resipien yang mempunyai lingkungan rahim yang sesuai dengan umur dari embrio itu sendiri. Sebagai contoh embrio morula dan blastosis awal akan ditransfer ke resipien yang memiliki siklus estrus D7. Embrio stadium blastosis lanjut

(*expanded blastocyst*) ditransfer ke resipien dengan siklus kelamin D8, sedangkan embrio stadium 16-sel ditransfer ke resipien D6. Jika donor *diflushing* pada D7, embrio yang terkoleksi dengan stadium lebih muda (embrio 8-16 sel) dapat ditransfer ke resipien yang estrusnya satu-setengah hari sebelum donor estrus, embrio dengan stadium morula dan blastosis awal dapat ditransfer ke resipien yang sinkron siklus estrusnya dengan donor, sedangkan embrio praimplantasi dengan perkembangan lebih lanjut dari blastosis sebaiknya ditransfer ke resipien dengan siklus estrus lebih satu hari dari pada siklus estrus donor (D7), sehingga lingkungan dalam uterus mendekati umur embrio yang diindikasikan melalui pengamatan morfologi. Beberapa parameter karakteristik yang dapat digunakan untuk evaluasi pemeriksaan morfologis termasuk: a) kekompakan (ikatan) sel-sel, b) keteraturan bentuk embrio, c) variasi dalam ukuran sel, d) warna dan susunan sitoplasma, e) ada tidaknya *vesicle* yang besar, f) adanya sel-sel yang keluar dari ikatan sel (*extruded*), g) diameter, h) keutuhan dan keteraturan *zona pellucida*, i) adanya sel *debris* berupa reruntuhan sel, dan granulasi.

Embrio yang ideal adalah: kompak, ikatan satu blastomer dengan yang lain erat, *spherical* (bulat). Blastomer-blastomernya sama dalam ukuran, warna dan susunan, warna sedang (tidak terlalu pucat dan tidak terlalu gelap), sitoplasma tidak bergranulasi dan mempunyai *vesicle* berukuran sedang. Ruang perivitelin: kosong dan diameter teratur. Zona *pellucida*: rata menggelembung, tidak mengkerut atau kolaps dan mulus (*smooth*). Tidak ada reruntuhan sel.

Dalam evaluasi dan klasifikasi embrio secara morfologis ada beberapa metoda yang dapat dipakai. Secara prinsip umumnya parameter yang dipakai sebagai kriteria yang dipakai dalam evaluasi sama. Dalam penjelasan buku ini diuraikan dua metoda yaitu pertama metoda evaluasi dan klasifikasi embrio menurut Dorn dan Kraemer (1987) yang telah dimodifikasi dan kedua metoda evaluasi dan klasifikasi menurut *International Embryo Transfer Society* tahun 2010 (IETS 2010).

Tabel 12 Klasifikasi embrio sapi donor yang terkoleksi pada pembilasan D7 berdasarkan penampilan umum morfologis.

Kelompok embrio	Kualitas embrio (grade)	Penampilan umum morfologis
Laik transfer	1 (sangat baik)	Embrio hampir sempurna dengan lebih 98% sel aktif, sehat dan viabel. Stadia embrio sesuai dengan yang diantisipasi, tidak cacat, zona intak, bentuk bundar spherical, ikatan blastomer erat (tidak ada <i>extruded blastomere</i>) dan kompak, ukuran sama besar dan simetri, warna agak gelap
	2 (baik)	Embrio dengan persentase sel aktif dan sehat sekitar 70-98%. Stadia perkembangan sedikit cacat seperti keluarnya salah satu ikatan blastomer dari ikatan, bentuk asimetri (tidak bundar), zona intak
	3 (cukup)	Embrio dengan proporsi sel aktif dan sehat kurang dari 70%. Stadia perkembangan agak retarded 1-2 hari dari stadia yang diantisipasi (8-16 sel), cacat beberapa blastomer keluar, ukuran blastomer tidak simetri dan mungkin terjadi malformasi ekstrim
Tidak laik transfer	4 (jelek)	Retarded: hambatan perkembangan parah (2-8 sel) hari ke -7 Degenerasi: ikatan blastomer longgar sampai lepas Oosit tidak terbuahi (<i>unfertilized ova</i>)

Sumber: Modifikasi dari Dorn dan Kraemer (1987)

Untuk lebih jelasnya dalam evaluasi dan klasifikasi embrio untuk menentukan stadium perkembangan dan kualitas embrio secara morfologis, dapat dipakai pedoman pemeriksaan morfologis sebagai petunjuk praktis seperti yang terurai dalam Table 12 dan 13 tentang pemeriksaan morfologis embrio. Klasifikasi atau *grading* embrio yang ditentukan dengan pemeriksaan morfologis untuk menentukan stadium embrio dan mengestimasi persentase embrio yang masih viabel.

Tabel 13 Kriteria baku penilaian dan klasifikasi kualitas embrio sapi menurut *International Embryo Transfer Society* tahun 2010 (IETS 2010).

Kode	Kualitas Embrio	Penjelasan
1	Sangat baik atau Baik (<i>Excellent</i> atau <i>Good</i>)	Stadia perkembangan embrio sesuai dengan stadia pada waktu <i>recovery</i> setelah estrus. Massa embrio simetris dan bulat dengan individual sel-sel blastomer yang seragam dalam ukuran, warna dan kepadatannya. Ketidak teraturan relatif minor dan paling sedikit 85% material selular utuh dan merupakan massa embrio yang viabel. Penilaian tersebut harus berdasarkan proporsi sel-sel embrio yang representasikan sebagai material embrio yang keluar dari ikatan kelompok blastomer yang masuk ke ruang perivitelin. Zona pelusida harus mulus dan tidak memiliki bentuk konkaf atau permukaan yang mendatar yang dapat menyebabkan embrio menempel ke cawan petri atau plastik straw.
2	Cukup (<i>Fair</i>)	Tingkat ketidak teraturan sedang dalam semua bentuk massa embrio atau dalam ukuran, warna dan kepadatan dari sel-sel embrio. Paling sedikit 50% selular material harus utuh dan merupakan massa embrio yang viabel.
3	Buruk (<i>Poor</i>)	Tingkat ketidak teraturan parah dalam semua bentuk massa embrio atau dalam ukuran, warna dan kepadatan dari sel-sel embrio. Paling sedikit 25% selular material harus utuh dan merupakan massa embrio yang viabel.
4	<i>Dead</i> atau <i>degenerating</i>	Embrio-embrio yang mengalami degenerasi, oosit, atau embrio-embrio 1 sel: tidak viabel.

Keputusan untuk mentransfer embrio tergantung dari individual program dan tujuannya. Banyak pertimbangan diantaranya faktor ekonomi menjadi pertimbangan utama. Dengan tingginya biaya pemeliharaan resipien dan rendahnya angka kebuntingan (*pregnancy rate*) hasil transfer merupakan *break event point* dalam menjalankan usaha komersial embrio transfer. Dalam program transfer embrio yang sukses, angka kebuntingan yang dapat diharapkan dari beberapa macam kualitas embrio diantaranya: kualitas sangat baik (1) sekitar 60%, kualitas baik (2) sekitar 40% dan kualitas cukup (3) sekitar 20% (Dorn dan Kraemer 1987). Beberapa contoh kualitas embrio laik transfer hasil superovulasi (Gambar 14). Hasil pemanenan embrio hasil superovulasi diambil datanya melalui pencatatan pada Tabel 14.

Tabel 14 Hasil evaluasi embrio yang terkoleksi.

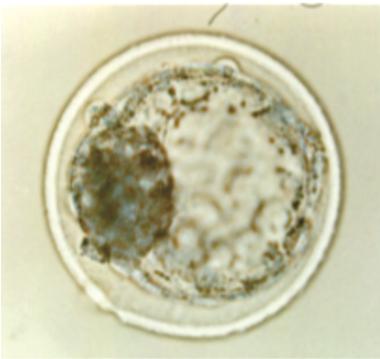
	Kualitas Embrio	Jumlah
Transferable embryo	Excellent (A)	
	Good (B)	
	Fair (C)	
	Degenerasi (Deg)	
Untransferable embryo	Retarded (Ret)	
	Unfertilized (-)	
		Total :



Stadia : Morula
Kualitas : Sangat baik



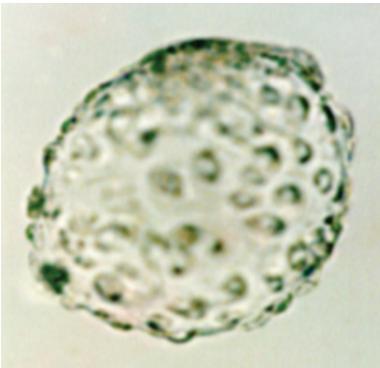
Stadia : *Early blastocyst*
Kualitas : Sangat baik



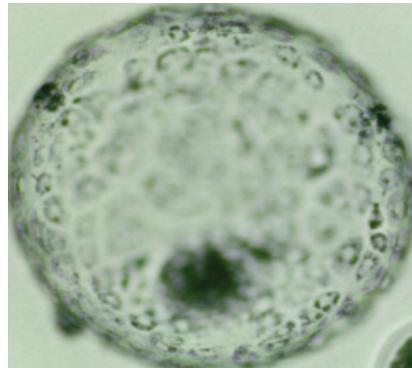
Stadia : *Expanded blastocyst*
Kualitas : Sangat baik



Stadia : *Hatching blastocyst*
Kualitas : Sangat baik

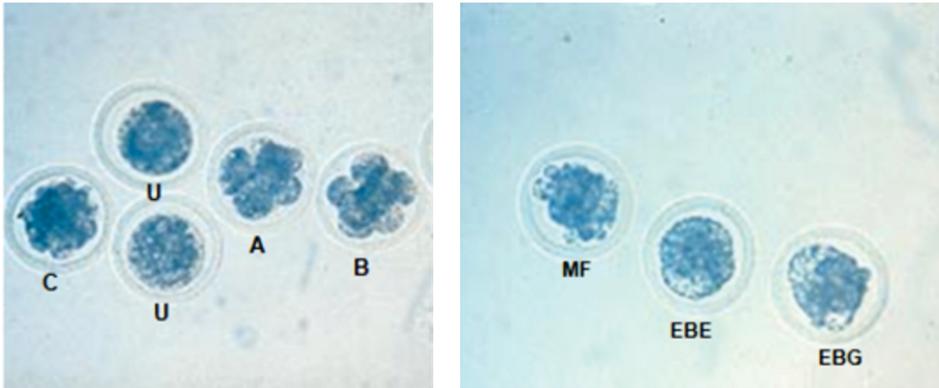


Stadia : *Hatched blastocyst*
Kualitas : Sangat baik



Stadia : *Expanded hatched blastocyst*
Kualitas : Sangat baik

Gambar 14 Beberapa stadia embrio praimplantasi yang laik transfer (Bó and Mapletoft 2013).



A: Embrio 8-sel, B: Embrio: 16-sel,
C: *Early morula* (32- sel),
U: *Unfertilized oocytes*

MF: Morula, kualitas sedang (*fair*)
EBE: *Early blastocyst* kualitas sangat baik
EBG: *Early blastocyst* kualitas baik

Gambar 15 Embrio yang dipanen pada hari ke-5 (D5) setelah estrus (kiri) dan embrio yang dipanen pada D7 (kanan).

5.6 Kegiatan Pemindahan Embrio (Transfer Embrio) ke Resipien

Untuk memudahkan pelaksanaan kegiatan pemindahan embrio ke resipien, sebaiknya resipien dipelihara dalam suatu kelompok dan ditempatkan dalam suatu kandang dan mudah dilakukan pengamatan baik siklus kelamin maupun pemeriksaan kesehatan. Resipien-resipien harus dalam kondisi baik, sehat dan telah mencapai umur optimal untuk dikawinkan. Sebelum resipien digunakan dalam program TE, sebaiknya minimal resipien telah mengalami dua siklus kelamin alamiah berurutan, normal dan tetap. Selama pengamatan berahi dua siklus, resipien juga dapat diprogram untuk penggunaan resipien melalui sinkronisasi esrus. Resipien yang mengalami berahi alamiah pada waktu yang sama dengan donor dapat ditransfer embrio.

Secara teoritis peranakan silang yang dipakai sebagai resipien, menghasilkan angka kebuntingan yang lebih tinggi dari bangsa sapi yang murni (*purebred*). Beberapa peternak masih meragukan keturunan hasil TE, apakah pedet yang dilahirkan resipien berasal dari TE atukah dari IB atau kawin alami. Untuk menghilangkan keraguan ini dapat dipakai peranakan silang atau resipien yang memiliki warna yang berbeda dari kedua induknya. Sebagai contoh Gambar 16 menunjukkan sapi FH resipien dengan pedetnya yang telah ditransfer dengan embrio sapi *black japanese* (sapi wagyu).



Gambar 16 Resipien sapi FH dengan pedet black japanese hasil transfer embrio (Foto *Okayama Prefectural Livestock Research Centre*).

Dari awal diperkenalkannya TE, sampai program ini menjadi program rutin saat ini, ada tiga macam metoda pemindahan embrio. Dua macam metoda melalui pembedahan dan satu macam tanpa bedah. Pemindahan embrio dengan metoda bedah menghasilkan angka kebuntingan (*pregnancy rate*) yang tertinggi dan sangat konsisten. Akan tetapi dengan adanya kemajuan dan penyempurnaan teknik, teknisi yang terampil dan terlatih dapat menghasilkan angka kebuntingan yang sama antara metoda bedah dan tanpa bedah.

Metoda yang pertama kali digunakan dalam pemindahan embrio adalah metoda pemindahan melalui pembedahan medioventral. Laparotomi medioventral dibawah pengaruh anastesi general merupakan metoda pertama yang digunakan dalam awal penerapan program TE. Secara praktis metoda ini memiliki faktor pembatas diantaranya fasilitas dan lingkungan yang mendukung seperti di klinik atau rumah sakit hewan. Lagipula metoda ini memerlukan teknisi yang terampil dan terlatih memerlukan pelayanan dari yang kompeten seperti dokter hewan. Metoda pembedahan yang kedua untuk pemindahan embrio yaitu pembedahan di daerah legok lapar (*flank*) dengan menggunakan anastesi lokal. Metoda ini dapat dilakukan di peternakan maupun *ranch*.

Metoda pemindahan embrio melalui pembedahan flank dibawah pengaruh lokal anastesi, mungkin menghasilkan angka kebuntingan (*pregnancy rate*) yang lebih rendah dibanding dengan metoda pembedahan menggunakan anastesi general, tetapi proses pemindahan embrio lebih cepat. Pelaksanaan metoda ini akan menghadapi kesulitan dalam 1) mengeluarkan tanduk uterus tanpa menimbulkan luka yang

parah, terutama pada resipien dara, resipien yang tidak dipuasakan, resipien yang terlalu gemuk atau terlalu besar dan 2) menghindari pengaruh negatif stress dari pembedahan flank pada resipien sapi perah yang laktasi atau operasi mid-ventral ternak sapi potong pada kondisi peternakan yang jelek, terutama selama cuaca yang buruk.

Metoda ketiga adalah pemindahan embrio tanpa bedah. Metoda tanpa bedah ini paling banyak dan paling sering digunakan dan sudah menjadi teknik yang rutin dalam pelaksanaan program TE sejak awal dekade tahun delapan puluhan. Pada tahap permulaan penerapan metoda ini menghasilkan angka kebuntingan (*pregnancy rate*) yang rendah. Beberapa faktor yang dapat menurunkan angka kebuntingan ini diantaranya, teknisi yang kurang terampil, terjadi infeksi terutama pada waktu proses memasukkan transfer gun ke dalam uterus, pengeluaran (*expulsion*) embrio karena stimulasi uterus dan deposisi embrio yang suboptimal pada bagian uterus. Saat ini faktor penghambat tersebut dapat diatasi oleh teknisi yang terampil dan terlatih, peralatan *transfer gun* lebih sempurna, lebih higienis (misalnya dengan adanya berbagai selubung plastik untuk *transfer gun*), berbagai macam obat relaksasi uterus untuk mencegah proses ekspulsi embrio oleh uterus dan obat untuk mencegah perejanan sapi pada saat dipalpasi rektal (*rectal squeeze*) untuk mempermudah pelaksanaan deposit embrio yaitu dengan memberi obat *prifinium bromide* (Padrin) intravena sebagai anti perejanan dan atau cukup dengan pemberian anastesi epidural menggunakan obat anastesi seperti Xylocaine, Hostacaine, Lidocaine atau Procaine.

5.6.1 Metoda Pembedahan Legok Lapar (*Flank, Fossa Paralumbalis*)

Resipien masukkan ke kandang jepit, jika resipien tenang dapat dikandangnya sendiri. Lakukan palpasi rektal untuk menentukan letak korpus luteum dan bagian ipsilateral flank. Daerah ipsilateral flank adalah daerah flank yang paling dekat dengan letak korpus luteum, sedangkan yang dimaksud daerah flank atau legok lapar (*fossa paralumbalis*) yaitu daerah ventral lumbal dan diantara tulang rusuk terakhir (*os costa ke-13*) dan *tuber coxae* (satu tapak tangan dari *tuber coxae*).

Daerah ipsilateral flank yang merupakan daerah operasi dicukur, dicuci dengan sabun dan desinfeksi dengan iodine dan alkohol. Jika resipien tidak tenang dan agresif, dapat diberi 50 mg xylazine (*Rompun*) atau 5-10 ml *Combelen*. Anastesi lokal dengan menyuntik garis sayatan vertikal (*vertical local line block anaesthesia*). Sayatan vertikal terletak di pertengahan antara tulang rusuk terakhir dengan *tuber coxae*. Panjang sayatan 15 cm (6 inch) dengan menggunakan 60 ml *procaine 2%*, atau 100 ml *lidocaine 2%* atau 60 ml *hostacaine*. Pertama-tama kulit disayat, kemudian lapisan otot dipreparir dan akhirnya peritoneum dipotong.

Lokalisasi ovarium dengan memasukkan tangan melalui lubang sayatan, biasanya sekitar 25 cm posterior dari sayatan. Kornua uteri keluarkan sekitar lubang sayatan dengan cara menggenggam dan menarik ligamenta uterus (*ligamentum lata uteri* dan *ligamentum teres uteri* bertaut bagian atas, di dorsal legok lapar dan bagian bawah di *facies ventralis uteri*). Ligamenta uterus ini dapat dilokalisasi di medial kornua uteri. Sepertiga bagian anterior kornua uteri (± 3 inch dari *utero tubal junction*) dibuat luka tusukan dengan jarum suntik yang tumpul (no. 16).

Embrio yang telah siap dihisap kedalam Pasteur pipet atau mikropipet (diameter luar 1,5 mm) bersama kurang lebih 0,2 ml medium. Melalui lubang tusukan pada dinding uterus, deposisikan embrio. Sayatan operasi pada dinding abdomen (legok lapar) dijahit kembali secara kontinyu dalam bentuk dua susunan (no. 8 Braunamid). Teknisi yang terampil dapat menyelesaikan metoda pembedahan legok lapar sekitar 15 menit (Hahn *et al.* 1977). Resipien diberi *long-acting* penicillin misal Depopen atau Paratopen intramuskuler. Jahitan dapat dilepas seminggu kemudian.

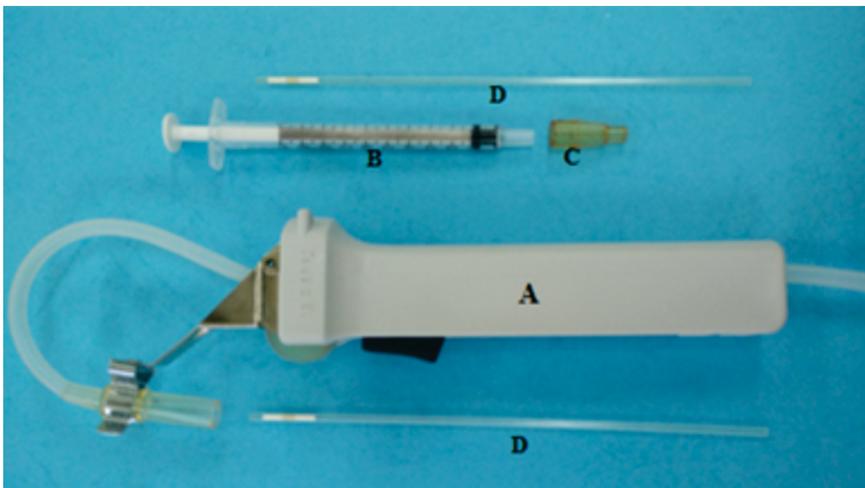
5.6.2 Metode Tanpa Pembedahan

Pelaksanaan pemindahan embrio tanpa bedah, mirip dengan pelaksanaan inseminasi buatan. Alat untuk deposisi embrio dapat menggunakan 1) pipet inseminasi dari plastik yang kuat dan elastis, dilengkapi dengan selang plastik (*vinyl tube*) dengan diameter luarnya sama dengan diameter dalam pipet inseminasi. Selang plastik ini salah satu ujungnya dihubungkan dengan penghubung (*tomcat*) pada spoit, dan ujung lainnya dimasukkan melalui lubang pipet inseminasi. Ujung lain ini dipakai untuk tempat embrio yang akan dipindahkan, 2) inseminasi gun Cassou dengan plastik mini straw (*french straw* 0,25 ml) dan 3) Transfer kanul dengan bagian depan ujungnya memiliki lubang tempat pengeluaran embrio, dan dimuati dengan *plastic straw* transparan (volume 0,25 ml, diameternya 3 mm, panjang 13 cm), untuk tempat kemasan embrio dengan medium transfer. Jenis transfer kanul (*transfer gun*) beragam diantaranya model Hannover yang bagian depannya dapat dilepas dengan sistim sekrup. Model kanul transfer embrio lainnya dengan

ujung kanul tidak dilepas diantaranya model Fujihira (Jepang), model Cassou (Perancis) dan model RAB (Australia).

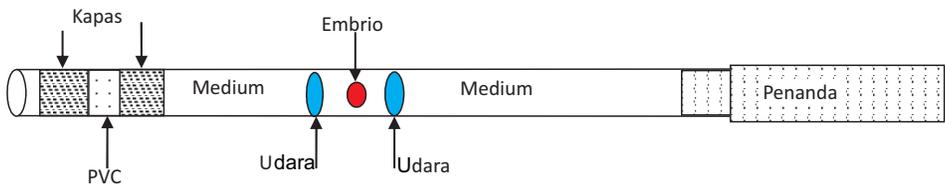
Bagian belakang resipien diberi anestesi epidural 3 ml hostacaine atau lidocain 2%. Ujung ekor diikat sedemikian rupa agar tidak mengganggu pelaksanaan pemindahan embrio. Pencatatan mengenai letak korpus luteum untuk menentukan kornua uteri yang ipsilateral juga catat mengenai sinkronisasi dan diskrepansinya (penentuan resipien D6, D7 atau D8) untuk penyesuaian stadia embrio yang akan dipindahkan.

Penyiapan transfer kanul model Hannover, plastik straw yang transparan dan selubung plastik (*sanitary sheat*). Embrio dihisap ke dalam straw melalui alat mikropipetier helper atau 1 ml tuberkulin spoit. Ujung bebas straw menyentuh embrio dalam medium sedangkan ujung yang bersumbat *polyvinil chloride* (PVC) disambungkan ke spoit tuberculin 1cc atau mikropipetter (Gambar 17).



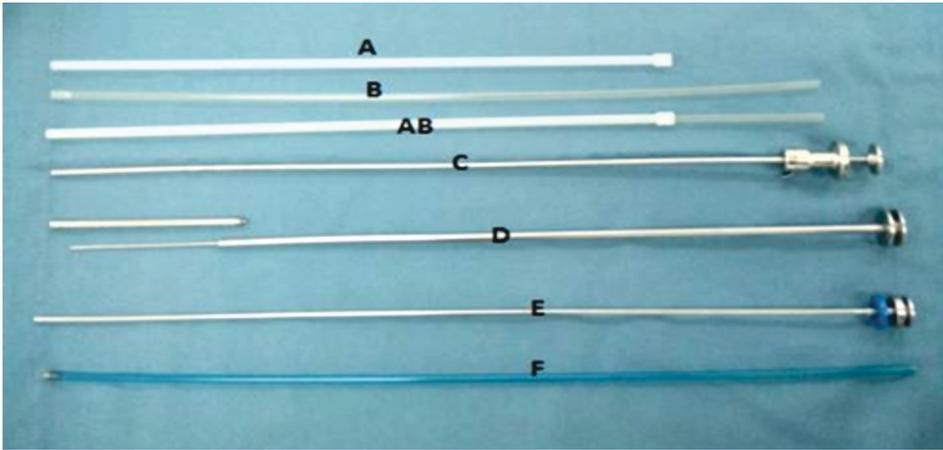
Gambar 17 Peralatan pengemasan embrio, A. Mikropipetter, B. Spoit tuberculin 1 cc, C. Konektor dan D. *Plastic mini straw*.

Embrio dan medium dihisap sebagai berikut, pertama-tama hisap medium saja (tanpa embrio) sampai sekitar 5 cm dari panjang straw, kemudian diikuti dengan pembentukan gelembung udara 0,5 cm baru diikuti medium yang berisi embrio sampai ketinggian kolom straw 2,5-3,5 cm, diikuti lagi dengan 0,5 cm gelembung udara yang lain. Pada akhirnya medium dihisap lagi sampai kolom medium yang awal membasahi sumbat PVC. Bentuk skema pengemasan embrio dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18 Kemasan embrio dalam *plastic straw* yang siap ditransfer.

Plastic straw yang telah berisi embrio, dimasukkan kedalam bagian depan transfer kanul dan seluruh bagian atas dimasukkan ke dalam selubung plastik (*plastic protector* atau *sanitary plastic sheath*). Transfer kanul siap untuk dipakai mendepositkan embrio kedalam apeks kornua uteri ipsilateral yaitu kornua uteri yang sepihak atau satu sisi dengan ovarium yang memiliki corpus luteum (CL). Resipien yang layak ditransfer adalah resipien yang memiliki siklus kelamin sinkron dengan donor atau status reproduksi siklus estrusnya sesuai dengan stadia perkembangan embrio yang akan ditransfer.



Gambar 19 Transfer kanul (*transfer gun*) untuk mendepositkan embrio kedalam kornua uteri , A. *Plastic protector*, B. *Sanitary plastic sheath* untuk transfer kanul, AB. *Plastic protector* dengan *sanitary plastic sheath*, C. Transfer kanul (Nippon), D. Transfer kanul (Jerman), E. Transfer kanul (Cassou, Perancis), F. *Sanitary plastic sheath* untuk transfer kanul dari Cassou.

Teknisi memasukkan tangan kedalam rektum, fiksir serviks uteri, dengan bantuan asisten kuakkan vulva dan masukkan transfer kanul ke dalam vagina. Upayakan ujung transfer kanul tetap steril, tidak menyentuh bagian luar vulva, tidak kena feses ataupun urine. Serviks uteri biasanya pada D6, D7 atau D8 sudah menutup terutama pada resipien dara. Pasase transfer kanul melalui serviks pada D6, D7 atau D8 lebih sulit dari pada waktu berahi, karena sudah mulai menutup dan terisi lendir yang kental dan lengket. Pada waktu transfer kanul menyentuh os serviks uteri eksterna, selubung plastik tarik ke belakang, sehingga bagian ujungnya bebas. Setelah transfer kanul melewati serviks, arahkan ujungnya ke

tanduk uteri ipsilateral terhadap korpus luteum. Bifurkasio interna letaknya hanya 1-2 cm dari serviks, sehingga transfer kanul harus segera disimpangkan arahnya ke tanduk uteri yang ipsilateral. Kornua uteri diangkat, diluruskan ke depan, kanul dimasukkan sejauh mungkin. Begitu hambatan ditemukan, embrio segera dideposisi dan kanul dikeluarkan kembali. Deposisi embrio sebaiknya dilakukan pada bagian tengah uteri ipsilateral dengan korpus luteum (Delcampo *et al.* 1979). Waktu yang dibutuhkan untuk pemindahan cara ini rata-rata sekitar satu menit.

Hambatan yang sering ditemui dengan metoda ini adalah 1) pasase kanal melauai serviks terutama pada resipien dara, 2) deposisi embrio pada ujung tanduk uteri dapat menyebabkan luka pada endometrium (yang paling parah jika terjadi perforasi), 3) tangan mudah letih jika terlalu banyak embrio yang dipindahkan pada hari yang sama, 4) untuk memperoleh angka konsepsi yang tinggi diperlukan ketrampilan manual dan pengalaman. Dalam realita, diperlukan ketrampilan yang lebih pada kedua metoda tanpa bedah baik pada proses pemanenan maupun pada pemindahan embrio, sehingga banyak teknisi yang menjadi enggan menggunakan metoda ini sebelum dicapai ketrampilan yang baik.

Hasil pelaksanaan transfer embrio dicatat melalui pemeriksaan kebuntingan dua bulan kemudian. Data yang diperoleh dapat dirangkum dalam Tabel 15.

Tabel 15 Form penyiapan resipien dan pelaksanaan transfer embrio hasil panen.

A. Persiapan Sinkronisasi Resipien (menggunakan PGF_{2α})

- Tanggal penyuntikan I :
- Tanggal penyuntikan II :
- Tanggal berahi yang :
sinkron dengan donor

B. Pelaksanaan Transfer Embrio

Tanggal :

No.	Nama/No. Reg.	Siklus Berahi (D6, D7 atau D8)	Asal Embrio donor (No.Reg.Donor)	Alamat Resipien	Hasil PKB (+/-)
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					

5.7 Diagnosa Kebuntingan dan Pengelolaan Resipien Bunting

Penjelasan yang mendalam mengenai pemeriksaan kebuntingan, sebenarnya diluar dari pembahasan pelaksanaan program transfer embrio. Meskipun demikian perlu dilakukan untuk mengetahui keberhasilan pelaksanaan program. Resipien yang telah ditransfer embrio dapat saja gagal menjadi bunting. Kegagalan resipien menjadi bunting dapat disebabkan oleh kesalahan teknis pelaksanaan program, tetapi

dapat juga disebabkan oleh faktor-faktor biologis yang alamiah. Secara biologis alamiah kegagalan kebuntingan dapat terjadi karena kematian embrional dan fetal pada setiap tahap kebuntingan. Kegagalan kebuntingan tertinggi terjadi terjadi karena kematian dini embrio pada kebuntingan muda sampai dengan hari ke -42 (minggu ke-6). Persentase kejadian kegagalan reproduksi mulai dari waktu fertilisasi sampai dengan kebuntingan muda hari ke-42 sekitar 15 -50%. Persentase kasus mulai dari kegagalan fertilisasi sampai dengan termin waktu partus dapat dilihat pada Tabel 16.

Tabel 16 Tingkat kegagalan reproduksi pada beberapa tahap kebuntingan.

	Kegagalan fertilisasi	Kematian embrio		Kematian fetal	
		Awal	Akhir	Awal	Akhir
Hari kebuntingan	0	1-25	25-42	42-90	90-termin
Kejadian (%)	5-20	5-20	5-10	5-10	Jarang

Sebagai indikator pertama yang baik dipakai dalam penentuan kebuntingan sapi resipien adalah resipien tidak kembali meminta kawin atau tidak menunjukkan gejala estrus dalam 11-17 hari setelah resipien ditransfer embrio. Sebaliknya jika memperlihatkan gejala estrus resipien dapat dianggap tidak bunting, walaupun sebenarnya sebagian kecil sapi yang bunting tiga minggu dapat menunjukkan gejala estrus.

Pemeriksaan konsentrasi hormon progesterone dari susu atau dari darah 22–24 hari setelah pre-transfer oestrus dapat mendiagnosa secara

tepat 95% sapi tidak bunting dan sekitar 80% sapi bunting. Akan tetapi deteksi estrus yang cermat dapat memberikan informasi yang sama seperti informasi yang diperoleh dari pemeriksaan hormon progesterone. Dengan kata lain, jika ketepatan deteksi estrus begitu rendah, sebagai data tambahan pemeriksaan hormon progesterone untuk melengkapi informasi diagnosa kebuntingan, dapat dirasakan sepertinya program transfe embrio akan gagal karena deteksi estrus yang tidak tepat.

Dalam informasi awal untuk penentuan keberhasilan atau problem pelaksanaan program transfer embrio, deteksi estrus dan pemeriksaan progesterone tidak cukup memberikan informasi yang tepat untuk menentukan kebuntingan definitive setiap individu resipien. Informasi mengenai tidak kembalinya estrus (*non return*) sangat bermanfaat dalam data basis poulasi, karena memberikan informasi awal dalam evaluasi pelaksanaan program apakah berhasil atau tidak.

Sekitar umur kebuntingan 26 hari pada sapi dara dan 28 hari pada sapi induk, kebuntingan dapat didiagnosa secara tepat pada kondisi lapangan menggunakan ultrasonography (USG) atau oleh petugas pemeriksa kebuntingan yang sangat terampil (Kastelic *et al.* 1988). Keakuratan hasil pemeriksaan menggunakan USG pada umur kebuntingan ke 26 – 28 hari dapat mencapai 100%, akan tetapi perlu dipertimbangkan bahwa tingkat kematian dini embrional secara alamiah pada fase ini masih cukup tinggi dapat mencapai 25% (lihat tabel 14), sehingga untuk mendapat kepastian 100% diperlukan pengulangan pemeriksaan kebuntingan. Pada umumnya program transfer embrio tidak menggunakan USG untuk pemeriksaan kebuntingan meskipun USG sangat berguna

dalam berbagai aplikasi medik reproduksi. Penggunaan USG memerlukan biaya yang cukup tinggi, jika biaya pemakaian USG dapat diturunkan maka mungkin aplikasinya dapat dipertimbangkan menjadi kegiatan rutin dalam pemeriksaan kebuntingan.

Serius problem dalam diagnose awal kebuntingan adalah 10% dari kebuntingan 28 hari tidak akan mencapai termin normal kelahiran. Sekitar 95% dari kebuntingan dua bulan dan 97% kebuntingan tiga bulan akan mencapai termin normal kelahiran (King *et al.* 1985).

Pemeriksaan kebuntingan biasanya dilakukan melalui pemeriksaan rectal dan kebuntingan dapat didiagosa secara definitive setelah hari ke-35 umur kebuntingan. Meskipun demikian tidak direkomendasi pemerisaan rektal sebelum umur kebuntingan 45 hari karena konseptus masih rapuh pada awal stadium dan ada kemungkinan abortus spontan tanpa adanya palpasi rectal. Rekomendasi, sebaiknya palpasi perrektal dilakukan pada kebuntingan 45-60 hari dan dikonfirmasi kembali dengan pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi perrektal satu bulan kemudian.

Sapi yang estrus dapat diperiksa awal sebelum hari ke-45 dengan palpasi perrektal atau USG. Jika tidak bunting dapat dipakai sebagai resipien. Kadangkala sangat bermanfaat dapat membedakan antara kebuntingan karena embrio transfer, inseminasi buatan atau kawin alami dalam siklus berikutnya. Langkah berikutnya, dapat memungkinkan sebagian besar resipien yang tidak bunting dapat segera dikawinkan atau dipakai kembali sebagai resipien. Adalah hal penting untuk tidak mengawinkan resipien yang menunjukkan gejala estrus lebih awal dari normal. Inseminasi atau kawin alamiah dengan pejantan harus ditunda 17-

18 hari dari pre-embryo transfer estrus. Hal ini memungkinkan sekitar 90-95% recipient tidak bunting tanpa siklus estrus pendek dapat dikawinkan.

Pemeriksaan kebuntingan dapat dilakukan dalam jangka waktu tertentu yang dapat memastikan perbedaan antara kebuntingan embrio transfer dengan kemungkinan kebuntingan lain berikutnya minimal 17 hari lebih muda. Dengan palpasi perrektal jangka waktu tersebut dapat diperpanjang sampai sekitar 65 hari setelah pre-transfer estrus untuk pemeriksa yang terampil dan mungkin sampai 60 hari untuk yang kurang terampil. Catatan panjangnya jangka waktu pemeriksaan diperlukan apabila embrio transfer dilakukan dalam periode tujuh sampai sepuluh hari, jika semua resipien diperiksa sekali dan resipien tidak diperiksa sebelum hari ke-45 kebuntingan.

Poin lainnya yang umum untuk mendiagnosa kebuntingan perrektal dengan *slipping membranes*. Metoda ini jangan dipakai paling sedikit sebelum hari ke-50, karena dapat menyebabkan keguguran yang nyata meskipun kasus tersebut kejadiannya dalam persentase yang rendah (Abbitt *et al.* 1978). Palpasi harus dilakukan berdasar data adanya cairan, ketegangan (tonus) dan ukuran tanduk uterus. Pada kasus *false positive* dengan persentase kecil karena tidak terdiagnosanya keadaan uterus yang patologis biasanya lebih rendah dari kasus abortus yang disebabkan metoda *slipping membranes*.

Sapi-sapi resipien yang bunting dengan embrio bergenetik unggul, harus mendapatkan perlakuan yang lebih baik dari yang lainnya. Nutrisi jelas penting seperti halnya pencegahan abortus. Waktu yang paling kritis adalah pada saat melahirkan. Kehilangan 10% pedet pada saat dan

beberapa hari setelah melahirkan adalah wajar (King *et al.*1985); pada umumnya kehilangan pedet adalah karena pengelolaan yang buruk. Terutama sangat rugi kehilangan pedet setelah investasi yang besar. Tentunya resipien sering partus di peternakan, dan tidak dibawah pengawasan langsung dari pelaksana embrio transfer. Demikian pula tindakan bijaksana menyediakan informasi dalam manajemen pada saat melahirkan, misalnya memastikan pedet embrio transfer mendapat kolostrum pada petugas kandang yang bertanggung jawab sehingga embrio transfer program tidak mendapat reputasi yang buruk.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbitt B, Ball L, Kitto GP, Sitzman CG, Wilgenberg B, Raim LW, Seidel GE Jr. 1978. Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in the bovine. *J Am Vet Med Assoc.* 173:973-977.
- Adams GP, Nasser LF, Bó GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. 1994. Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology.* 42: 1103-13.
- Adriani, Depison, Rosadi B, Supriondo Y, Isroli. 2007. The Effect of superovulation on corpus luteum in Simbrah cow. *J Indones Trop Anim Agric.* 32(3): 207-212.
- Adriani, B Rosadi dan Depison. 2009. Penggunaan follicle stimulating hormone dan pregnant mare serum gonadotrophin untuk superovulasi pada sapi persilangan Brahman. *Media Petern.* 32(3): 163-170.
- Alcivar AA, Maurer RR, Anderson LL. 1984. Superovulatory responses in FSH on Pergonal treated heifers. *Theriogenology.* 22: 635-642.

- Allen WR, Stewart F. 1978. The biology of pregnant mare serum gonadotrophin. In: Sreenan JM, editor. *Control of Reproduction in the Cow*. The Hague (NL): Verlag Martinus Nyhoff.
- Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, Mc Lean D, Seamark RF. 1994. Gonadotropin stimulation regimes for follicular aspiration and in vitro embryos production from calf oocytes. *Theriogenology*. 42: 1227-1236.
- Armstrong DT. 1993. Recent advance in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 39: 7-24.
- Baruselli PS, Sa' Filho MF, Martins CM, Nasser LF, MFG, Nogueira, Ciro M, Barros, Bo' GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65: 77-88.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2011. *Perkembangan Beberapa Indikator Utama Sosial-Ekonomi Indonesia*. Jakarta (ID): Badan Pusat Statistik.
- Baker, AA., Kobayashi G, Jilela AD. 1983. A Comparison of the pregnancy rate following non surgical and surgical transfer and visual grading of bovine embryos of farms in South Eastern Queensland. *Theriogenology*. 19: 111.
- [BBIB] Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang. 2010. Semen Beku Sexing: Sapi Potong - Sapi Perah-Kambing (Leaflet). Indo Livestock 2010 Expo & Forum. 8-10 Juli 2010. Jakarta Convention Center. Jakarta (ID): Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari.
- [BBIB] Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. 2009. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Malang siap mengeksport sperma hasil sexing. <http://web.bisnis.com/ediscetak/edisiharian/agribisnis/1id57155.html> [Kamis, 28 Mei 2009].
- Bertens MF. 2010. Comparison of corpus luteum function, uterine environment and embryo quality in heifers and second/third parity lactating cows [tesis]. Agassiz, British Columbia (CA): University Utrecht dan University of British Columbia.

- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mithell D. 1980. Collection description and transfer of embryos from cattle 10 -16 days after oestrus. *J Reprod Fertil.* 79: 205-206.
- Betteridge KJ. 1980. Procedure and results obtainable in cattle. Di dalam: Morrow DA, editor. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia (US): WB Saunders Co.
- Betteridge KJ. 1986. Increasing productivity in farm animals. In: Austin CR, Short RV, eds. *Reproduction in mMammals: 5. Manipulating Reproduction*, p 1-47. Cambridge (GB): Cambridge University Press.
- Bevers MM, Dielemann SJ, Tol HTV, Blankenstein DM, Broek JVD. 1989. Change in pustulatile secretion pattern of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J Reprod Fertil.* 87: 745-754.
- Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology.* 42: 963-75
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* 43: 31-40.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.* 57: 53-72.
- Busch W, Loehle K, Peter W. 1982. Kuenstliche Besamung bei Nutztieren. Stuttgart (DE). Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
- Cassou R. 1984. Instruments used in the techniques for embryo transfer. Proc. Vol. II., 10th. International. Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana- Champaign, USA.
- Cahill LP. 1982. Factors influencing the follicular response of animals to PMSG. *Australian Soc Reprod Biol:* 5-7.
- Christie WB, Newcomb R, Rowson LEA. 1980. Non Surgical transfer of bovine eggs. Investigation of some factors affecting embryo survival. *Vet Rec.* 106:190-193.

- Chupin D, Procureur R. 1982. Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle: Effect of injection regimen. *Theriogenology*. 17: 811.
- Chupin D, Combarous Y, Procureur R. 1984. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. *Theriogenology*. 21:229.
- Critser ES, Critser JK., Winch RP, Eilts C. 1982. Efficacy of pergonal as a superovulatory drug in cattle. *Theriogenology*. 17: 83.
- Cseh S, Seregi J. 1993. Practical experiment with sheep embryo transfer. *Theriogenology*. 39: 207.
- Cseh S, Solti L. 2001. Studies of factor affecting superovulation and embryo transfer in Hungarian Merino ewes. *Acta Vet Hung*. 49(4): 431-441.
- Del Campo MR, Rowe RF, Ginther OJ. 1979. Relationship between side of embryo transfer and the pregnancy rate in cattle. Am Soc Anim SC1. 17. Anlm. Meeting 1979. Abstr. 368. Madison (US): University of Wisconsin.
- Deng CY, Clark S. 2004. Superovulation and intrauterine insemination in treatment of idiopathic infertility in 202 cycles. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bau* 26(2): 178-181.
- Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, Loos AMD. 1993. PMSG/anti PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*. 39: 25-41.
- Dieleman SJ, Bevers MM. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. *J Reprod Fertil*. 81: 533-542.
- Dissen GA, Dees WL, Ojeda SR. 1993. Neural and neurotrophic control of ovarian development. In: Adashi EY, Leung PCK. (Eds.), *The Ovary*. Raven Press, New York, pp. 1-19.
- Donaldson LE. 1983. The effect of prostaglandin F₂ α treatments in superovulated cattle on oestrus response and embryo production. *Theriogenology*. 20:

- Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology*. 22: 205-212.
- Dorn CG, Kraemer DC. 1987. Bovine embryo grading. Texas (US): A&M University. College of Veterinary Medicine, College Station.
- Dwiyanto K. 2008. Pemanfaatan sumber daya lokal dan inovasi teknologi dalam mendukung pengembangan sapi potong di Indonesia. *J Pengemb Inov Pertanian*. 1(2): 173-188.
- Elsden RP, Nelson LD, Seidel Jr GE. 1978. Superovulating cows with follicle-stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 9: 17-26.
- Elsden RP, Seidel GE Jr. 1985. Procedures for Recovery, Bisection, Freezing and Transfer of Bovine Embryos. Fort Collins, Colorado 80523.(US): Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak*. Bandung (ID): Alfabeta.
- Fernandez M, Sanchez L, Alvarez FS, Vazquez, Iglesias A. 1993. Superovulation in Rubia Gallega cows with a single subcutaneous injection of FSH. *Theriogenology*. 39: 217.
- Foote RH, Onuma H. 1970. Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A review. *J Dairy Sci*. 53: 168-169.
- Fujino Y, Ozaki K, Yamamoto S, Ito I, Matsuoka. 1996. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum Reprod*. 7: 1480-1483.
- García GA, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft R. 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*. 78: 353-60.
- Greeve T, Callesen H, Hyttel P. 1984. Plasma progesterone and embryo quality in superovulated cows. *Theriogenology*. 21: 238.
- Gordon I. 1982. Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In: Adams CE, editor. *Mammalian Egg Transfer*. CRS Press, Inc. hlm. 63-80.

- Gorlach A, Hahn R. 1984. Vergleichende Untersuchungen zur Superovulation beim Rind mit Gonadotropin in Kombination mit Anti-Gonadotropin. Hannover (DE): Verhandlungsbericht. IX. Veterinaer-Humanmedizinische Gemeinschaftsagung.
- Grunert E. 1984. *Buiatrik*. Vol. I Edisi ke-4 Hannover (DE): Verlag M. & H Schaper.
- Grubb TL, Riebold TW, Crisman RO, Lamb LD. 2002. Comparison of lidocaine, xylazine, and lidocaine-xylazine for caudal epidural analgesia in cattle. *Vet Anaesthesia Analgesia*. 29: 64-68.
- Guerra GA, Tribulo A, Yapura J, Singh J, Mapletoft R. 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*. 78: 353-60.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. Reproduction in Farm Animals. Edisi ke-7. Baltimore (US): Lippincott Williams & Wilkins.
- Hahn J, Schneider U, Romanowski W, Roselius R. 1977. Ergebnisse der chirurgischen Eiübertragung am stehenden Rind. *Dtsch tieraerztl Wschr*. 84: 229-231.
- Hall JB, Whittier WD, Jims M, Mark C, David C. 2009. GnRH based estrus synchronization systems. *Virginia Cooperative Extension*. Publication 400-013.
- Hasler JF, McCaley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. 1983. Superovulatory response of Holstein cows. *Theriogenology*. 19: 83-99.
- Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, Hashiyada Y. 2015. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology*. 83: 466-473.

- Hofmann E. 1981. Endoskopische Ovaruntersuchungen beim Rind unter Beruecksichtigung der Superovulationvorgaenge [disertasi]. Giessen (DE): Justuz-Liebig-Universitaet Giessen.
- Hunter RHF. 1981. Fisiologi dan teknologi reproduksi hewan betina domestik. Putra DKH, penerjemah; Matram RB, editor. Terjemahan dari: *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*.
- Imron M, Supriatna I dan Harsi T. 2010. Kelahiran kembar pada sapi menggunakan metode sinergi inseminasi buatan dan transfer embrio. Di dalam: Setiadi MA, Karja NWK, Yudi, Murti H, editor. Prosiding Seminar Nasional. Peranan Teknologi Reproduksi Hewan Dalam Rangka Swasembada Pangan Nasional; 6-7 Oktober 2010; Bogor, Indonesia. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana IPB. hlm. 95-98.
- Imron M. 2016. Respons superovulasi dengan penyuntikan tunggal FSH dalam ruang epidural berbasis pertumbuhan gelombang folikel pada sapi Peranakan Ongole [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 72: 81-90.
- Jilela D. 2009. Sharing problems and solutions on embryo transfer in cattle. Embryo transfer training in Indonesia. Brisbane (AU): Embryo Transfer Services of Queensland.
- Junaidi A, Norman ST. 2003. Use of GnRH agonist to delay the ovulation and injection of hCG to induce ovulation in goats superstimulated with FSH. *J Sain Vet*. 21: 1-5.
- Kaltenbach CC, Dunn TG. 1980. Control of estrus in cattle. Di dalam: Morrow DA, editor. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia (US): WB Saunders Co.
- Kane MT. 1978. Culture of mammalian ova. In: Sreenan JM, editor. *Control*

of Reproduction in the Cow. The Hague (NL): Verlag Martinus Nyhoff. Eur 6014EN. hlm. 383-397.

Kastelic JP, Curran S, Pierson RA, Ginther OJ. 1988. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*. 29: 39-54.

[Kementan-BPS] Kementerian Pertanian-Badan Pusat Statistik. 2011. Pendataan Populasi Sapi Perah, Sapi Potong dan Kerbau. Jakarta (ID): Kementan-BPS.

Kimura K, Hirako M, Iwata H, Aoki M, Kawaguchi M, Seki M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*. 68 :633-639.

King KK, Seidel GE Jr, Elsdon RP. 1985. Bovine embryo transfer pregnancies: I. Abortion rates and characteristics of calves. *J Anim Sci*. 61: 747-757.

Koh SB *et al.* 2002. Effect of recombinant human FSH on ovulation, pregnancy and in vitro fertilization in androgen sterilized mice. *Arch Pharm Res*. 25 (3): 357-363.

Lauria AA, Olivia A, Genazzani AR, Cremonesi F, Crotti S, Barbetti M. 1982. Improved method to induced superovulation in cattle using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology*. 18: 357.

Lee I, Yamagishi N, Oboshi K, Ayukawa Y, Sasaki N, Yamada H. 2005. Distribution of new methylene blue injected into the caudal epidural space in cattle. *Vet J*. 169: 257-261.

Mahon GD, Rawle JE. 1987. The export of deep frozen bovine embryos. *Theriogenology*. 27: 21-35.

Mapletoft R, Bó G. 2012. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 24: 278-83.

Marawali A. 1997. Respon superovulasi terhadap pemberian dosis berulang FSH dibandingkan dosis tunggal FSH+PVP pada sapi Bali dan sapi Brangus [tesis]. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

- McDonald LE. 1980. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Edisi ke-3. Philadelphia (US): Lea & Febiger.
- Medowman MR, Jhonson WH, R.J. Mapletoft RJ, W. Jochle W. 1983. Superovulating of beef heifers with Pergonal hMG: A dose response trial. *Theriogenology*. 19: 141.
- Moore K, Dalley A. 2006. Clinically oriented anatomy. 5th edition. Lippincott, Williams & Wilkins. Baltimore.
- Munoz I, Jesus DNP, Espinosa E, Gil I. 1995. Use of follicle stimulating hormone to increase the in vitro fertilization (IVF) efficiency of mice. *J Assist Reprod Genet*. 12(10): 738-743.
- Murphy, Bruce D, Mapletoft RJ, Manns J, Humphrey WD. 1984. Variability in gonadotropin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*. 21: 117-125.
- Naqvi SM, Gulyani R. 1998. The effect of gonadotropin releasing hormone and FSH in conjunction with PMSG on the superovulatory response in crossbred sheep in India. *Trop Anim Healt Prod*. 30(6): 369-376.
- Newcomb R. 1982. Egg recovery and transfer in cattle. In: Adams CE, editor. *Mammalian Egg Transfer*. CRS Press, Inc. hlm. 81-119.
- Niemann H. 1980. Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit früherer Embryonalstadien von Kaninchen und Rind mit dem FDA- und DAPI-Test. [disertasi]. Hannover (DE): Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Noor RR, Supriatna I, Setiadi MA, Jayadi S, Murfi A, Sehabudin U. 2008. Pemetaan Distribusi Semen Sapi Potong dan Sapi Perah. Bogor (ID): Kerjasama Fakultas Peternakan dan Dinas Peternakan Propinsi Jawa Barat.
- Papkoff H. 1978. Relationship of PMSG to the pituitary gonadotropins. Di dalam: Sreenan JR, editor. *Control of Reproductions in the Cows*. EEC Seminar, London. The Hague (NL): Verlag Martinus Nyhoff.
- Pelagalli GV, Botte V. 2003. *Anatomia veterinaria sistematica e comparata*. Edi-Ermes, Milan.

- Pintado B, Gutierrez-adan A, Perezvano B. 1998. Superovulatory response of Murciana goats to treatment based on PMSG/anti PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*. 50(3): 357-364.
- Popova E, Krivokharchenko A, Ganten D, Bader M. 2002. Comparison between PMSG and FSH induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Mol Reprod Dev*. 63(2):177-182.
- Ryan JP, Hunton JR, Maxwell WMC. 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH. *Reprod Fertil Def*. 13: 551-560.
- Samik A. 2001. Uji Biopotensi antibodi poliklonal anti PMSG pada mencit. *Media Kedokteran Hewan*, Vol 17 edisi khusus 1.
- Saumande J, Procureur R, Chupin D. 1984. Effect of time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*. 21: 727-731.
- Schill WB, Bollman W. 1986. Spermakonservierung, Insemination, in-vitro Fertilisation. Munich (DE): Urban & Schwarzenberg.
- Seidel Jr, GE. 1986. Bovine Embryo Transfer. Proc. 1986. Short Course. Animal Reproduction Laboratory. Fort Collins, Colorado (US): Colorado State University.
- Seidel GE Jr, Elsden RP. 1989. Embryo Transfer in Dairy Cattle. WD Hoard & Sons Company. USA. 103 pp.
- Sianturi RG. 2012. Dinamika ovaria dan profil progesterone selama siklus estrus dan optimalisasi inseminasi buatan pada kerbau rawa [disertasi]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sunarti, Djuwita I, Yohan S. 2000, Pengaruh umur induk terhadap perkembangan embrio secara in vitro pada mencit superovulasi. *Media Veteriner*. 7(4): 18-21.
- Supriatna I, Pasaribu F .1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.

- Supriatna I, Yusuf TL, Purwantara B, Hernomoadi LP, Moekti G. 1996. Kajian mengenai waktu aplikasi antibodi monoklonal anti PMSG (Mo Ab Anti PMSG) terhadap peningkatan hasil panen embrio sapi perah yang di superovulasi PMSG. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas (PAU) Institut Pertanian Bogor.
- Supriatna I, Setiadi MA, Hadi S. 2005. Penyusunan Kebijakan Peningkatan Produksi Peternakan dengan Penerapan Teknologi Inseminasi Buatan di Daerah Tertinggal. Jakarta (ID): PT Bernala Nirwana. Resource Development Consultant.
- Supriatna I, Murfi A, Sehabudin U. 2007. Kajian Pengendalian dan Peredaran Mutu Semen Beku Sapi Perah di Propinsi Jawa Barat. Bogor (ID): Kerjasama Fakultas Peternakan dan Dinas Peternakan Propinsi Jawa Barat.
- Senger PL. 2005. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Edisi ke-2. Pullman, Washington (US): Current Conceptions, Inc.
- Stringfellow DA, Seidel SM, editor. 1990. *Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for The Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Precaution*. Edisi ke-2 .Champaign, IL 61820 (US): The International Embryo Transfer Society.
- Stringfellow DA, Givens MD, editor. 2010. *Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Procedures*. Edisi ke-4. Champaign, Illinois 61822(US): The International Embryo Transfer Society.
- Stroud B. 2011. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. Summary: 2010 global *in vivo* and *in vitro* embryo transfer activity up from 2009. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report.
- Supriatna I, Yusuf TL, Achjadi RK, Moekti G dan Hernomoadi LP. 1995. Comparative studies on application of FSH, FSH-PVP, PMSG and

- PMSG antiserum anti PMSG treatments as attempts to improve embryo transfer program in dairy cows. Bogor (ID): Proceed. Symposium on Biotechnology of Animal Reproduction.
- Sutherland W. 1991. In: Byrom, D. (Ed.), *Biomaterials - Novel Material from Biological Sources*. Stockton Press. 307-333.
- Suzuki T, Yamamoto M, Oe M, Takagi M. 1994. Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Vet Rec*. 135: 41-2.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G. 1995. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*. 43: 1259-68.
- Tenhumberg H, Schloesser FM. 2009. *Entwicklung des Embryotransfer in vivo 1985-2007*. Tiefenbach (DE): Minitueb GmbH & Co.KG.
- Thompson Jr, Lee KL, Feeman AE, Johnson LP. 1983. Evaluation of a linear type appraisal system for Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 66: 325-331.
- Toelihere MR. 2006. Pokok-Pokok Pikiran Tentang Perkembangan (Bio) Teknologi Reproduksi di Masa Lalu, Masa Kini, dan Masa yang akan Datang dalam Menunjang Pembangunan Peternakan di Indonesia. Seminar Nasional Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembangunan Peternakan di Indonesia dalam rangka Reuni Akbar Alumni Biologi Reproduksi SPs IPB dan Pelepasan Purnabhakti Prof Dr drh Moses R. Toelihere, MSc (Guru Besar Ilmu Reproduksi Hewan pada FKH, IPB) Bogor 8 April 2006. hlm. 1-12.
- Tríbulo A, Roganc D, Tribulo H, Tribulo R, Alasinod RV, Beltramod D, Biancod I, Mapletoft RJ, Bó GA. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*. 129: 7-13.
- Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bo GA. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular

- administration of Follitropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 77: 1679-85.
- Umbaugh RE. 1949. Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am J Vet Res*. 10: 295-252.
- Vos PL *et al.* 1994. Effect of neutralization of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG superovulated heifers on follicular function and development. *J Reprod Fert*. 100: 387-393.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ. 1951. Successful transplantation of a bovine ovum. *Science*. 113: 247.
- Yamada A, Kawana M, Tamura Y, Miyamoto, Fukui Y. 1996. Effect of single or multiple injection of FSH combined with PMSG on superovulatory response, and normal and freezable embryos. *J Reprod Dev*. 42: 81-87.
- Yoshioka H, Inama Y, Matsuda H, Matoba S, Kimura K, Imai K. 2008. Effect of two different doses of FSH in aluminium hydroxide gel by a single injection on estrus and superovulatory response in Holstein cattle. *Reprod Fert and Dev*. 20(1): 572-580.
- Yusuf TL. 1990. Pengaruh prostaglandin F₂ α dan gonadotropin terhadap aktivitas estrus dan superovulasi dalam rangkaian kegiatan transfer embrio pada sapi Fries Holland, Bali dan Peranakan Ongole [disertasi]. Bogor (ID): Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Yusuf TL. 1992. Penggunaan berbagai dosis PMSG untuk kegiatan superovulasi dan TE pada sapi Fries Holland. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas (PAU), Institut Pertanian Bogor.

Lampiran 1 Daftar peralatan, obat, hormon, dan antiseptik yang diperlukan dalam pelaksanaan program transfer embrio.

Kegiatan	Nama peralatan, obat, hormon	Keterangan
Superovulasi	FSH-P	Antrin, FSH-P, Ovagen , Folltropin, Pluset
	PMSG	Folligon, Equomon, Brumegon
	Prostaglandin	Estrumate, Prosolvin, Reprodin, Capriglandin, Noroprost, Enzaprost, Prostavet, Lutalyse Dinolytic
	Syringes, 3cc	Terumo
	Jarum suntik 20 x 1 ½"	Europlex
	Jarum suntik 18 x 1 ½"	Europlex
	Inseminasi Buatan	IB gun
Semen beku		
Nitrogen cair		
<i>Flushing (Embryo recovery)</i>	PBS (-)	Serva, Gibco, Nissui
	hi FBS (500 ml)	
	Syringes 5 cc	
	Kateter flushing	Neustadt ad Aisch (Jerman), Fujihira (Nippon) , RAB (Australia), Cassou (Perancis)
	Logam stilletes	
	Kateter adaptor	
	Selang ET(junction)	
	Syringe 20 cc	
	Syringe 5 cc	
	Jarum suntik 18 x 1 ½"	
	Filter 0,22 µm	
	Embrio kolektor (Filter)	
	Petri dish 35x15 culture	
	Mucus remover (kateter)	
	Dilator (cervix expander)	
Unopettes		
Antibiotik untuk medium TC		
Antibiotik untuk terapi		
Tranquilizer	Combelen	
Anaestesi epidural	Lidocaine, Xylocaine, Hostacaine, Procaine	
Anti <i>rectal squeeze</i>	Prifinium bromide	Padrin® (Nippon)
Sinkronisasi estrus resipien	Prostaglandin	

Transfer embrio ke resipien	Transfer gun (ET gun) Plastic ministraw Pipette protectors Micropipetter, spoit tuberculin 1 cc dengan konektor Plastic sheath untuk ET gun	Transparan, khusus embrio
Miscellaneous	Tissue paper Alcohol Yodium tincture	
Pejantan (<i>Service sire</i>)	Semen segar Semen beku	<i>Elite AI bull</i> Elite AI bull

FSH : Antrin[®], 40 AU/ampul (Fa. Fujihira, Nippon), 1 AU = 1 IU

FSH-P[®] 50 mg/vial (Burns Biotec, USA), 1 mg= 1IU

Ovagen[®] 17,6 mg/flacon (New Zealand)

Folltropin, 400 mg FSH-P, 20 ml diluent (Bioniche, Ontario-Canada)

Pluset[®]

Antrin untuk 1 ekor donor yang diprogram superovulasi diperlukan 28-30AU

FSH-P untuk 1 ekor donor yang diprogram superovulasi diperlukan 28-30 mg

Ovagen 17,6 mg/flacon dapat dipakai untuk program superovulasi 2 ekor donor.

Folltropin untuk 1 ekor donor yang diprogram superovulasi diperlukan 400 mg

Lampiran 2 Prakiraan biaya pelaksanaan embrio transfer pada ternak sapi.

**PRAKIRAAN BIAYA PELAKSANAAN
PROGRAM TRANSFER EMBRIO TERNAK SAPI
Untuk 10 Ekor Donor dan 100 Ekor Resipien
(Harga Januari 2012)**

A. BIAYA PRODUKSI EMBRIO SEGAR (*fresh embryo*)

- Superovulasi 10 ekor donor (FSH)	: Rp. 20.000.000,-
- Biaya penyuntikan PGF _{2α} (2 kali)	: Rp. 3.000.000,-
- Panen embrio (flushing 10 ekor donor)	: Rp. 3.600.000,-
- Biaya Dokter Hewan/Paramedis	
-siklus diagnostik dan 20 IB untuk 10 donor	: Rp. 600.000,-
- Biaya Semen Beku, 20 dosis	: Rp. 500.000,-
- beserta penyimpanan dalam nitrogen cair	: Rp. 100.000,-
- biaya 35 l nitrogen cair	: Rp. 450.000,- +
	<u>Rp. 28.350.000,-</u>

A.1 Biaya produksi embrio per donor : Rp. 2.835.000

A.2 Biaya per embrio segar (*fresh embryo*)

- Donor yang bereaksi terhadap perlakuan superovulasi (70%)
- Jumlah embrio yang dipanen per donor (4 embrio segar laik transfer)

Dari 10 donor yang dipersiapkan akan diperoleh $70/100 \times 10 \times 4 = 28$ embrio segar laik transfer

Biaya 1 embrio segar yang laik transfer:

= Rp. 28.350.000,- /28 = Rp. 1.012.500,-

B. BIAYA PENYIAPAN 100 EKOR CALON RESIPIEN

- Sinkronisasi 100 ekor calon resipien (sekali penyuntikan PGF ₂)	: Rp. 15.000.000,-
- Siklus diagnostik 100 ekor calon resipien	: Rp. 2.500.000,- +
	<u>Rp. 17.500.000,-</u>

Resipien yang laik transfer 60%

Biaya persiapan resipien laik transfer per ekor: Rp. 291.666,-

Lampiran 2 (lanjutan).

Biaya transfer ke resipien laik transfer 1 embrio per resipien:

- Klasifikasi resipien (kualitas CL)	: Rp. 25.000,-
- PGF ₂ 1 kali penyuntikan	: Rp. 80.000,-
- Anastesi epidural	: Rp. 10.000,-
- Plastic sheath, straw, gloves	: Rp. 15.000,-
- Tenaga pelaksana	: Rp. 50.000,-+
	Rp. 180.000,-

Biaya transfer ke 60 ekor resipien laik transfer : Rp. 10.800.000,-

C. KEBUNTINGAN DARI EMBRIO SEGAR

- Pregnancy rate at 90 days of gestation : 50% (recovery and transfer on the farm)
- Abortion between 3 months of pregnancy and before term (calving) : 3%
- Calving rate: 47% ==> 47/100 x 28 = 13 ekor pedet

Biaya 1 ekor pedet TE dari embrio segar yang baru lahir:

$$\frac{(\text{Rp. } 1.012.500,- \times 28) + (\text{Rp. } 291.666,- \times 28) + (\text{Rp. } 180.000,- \times 28)}{13} =$$

$$\frac{\text{Rp. } 28.350.000 + \text{Rp. } 8.166.648 + \text{Rp. } 5.040.000,-}{13} = \text{Rp. } 3.196.665,-$$

D. PEMBEKUAN EMBRIO

- Biaya pembekuan embrio dari 10 ekor donor : Rp. 2.700.000,-
 - Embryo Freezer (maintenance) : Rp. 250.000,-+
- Rp. 2.950.000,-

D.1 Biaya Embrio Beku (*Frozen Embryo*)

- Hanya embrio dengan peringkat **baik** keatas yang cocok/dapat diibekukan
- Sekitar 15% dari embrio laik transfer yang tidak dapat/tidak cocok dibekukan harus segera ditransfer atau dibuang
- Sekitar 10% dari embrio beku yang telah dicairkan (*frozen-thawed embryo*) rusak

Hasil pembekuan akan diperoleh 75% embrio beku yang telah dicairkan dapat ditransfer (laik transfer): 75/100 x 28 = 21 embrio beku

Biaya pembekuan 1 embrio: Rp. 2.950.000/21= Rp. 140.476,-

Lampiran 2 (lanjutan).

Biaya 1 embrio beku = Rp. 1.012.500,- + Rp. 140.476,- = Rp. 1.152.976,-

D.2 Kebuntingan dari Embrio Beku

- Pregnancy rate pada 90 hari kebuntingan : 40%
 - Abortion between 3 months of pregnancy and before term (calving) : 3%
- Calving rate: 37% == > $37/100 \times 21 = 8$ pedet

D.3 Biaya 1 ekor pedet TE dari embrio beku yang baru lahir:

$$\frac{(\text{Rp. } 1.152.976,- \times 21) + (\text{Rp. } 180.000,- \times 21)}{8} =$$
$$\frac{\text{Rp. } 24.212.496,- + \text{Rp. } 3.780.000,-}{8} = \text{Rp. } 3.499.062,-$$

Lampiran 4 Borang dokumentasi tahapan pelaksanaan kegiatan program transfer embrio.

Form Status Reproduksi Donor Dalam Program Transfer Embrio

Nama/No.reg. Sapi : Pemilik :

Breed : Alamat :

Umur :

Jumlah kelahiran :

Partus terakhir :

Siklus interval : teratur/tidak teratur (18, 19 20, 21, 22, 23)

Estrus : sangat jelas/jelas/kurang jelas

Lama estrus : jam

Estrus terakhir : Tanggal

	Hasil Palpasi Rektal	
	Ovarium Kiri	Ovarium Kanan
Sebelum Superovulasi	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø
D6/D7 Setelah Superovulasi	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø	Ukuran Ovarium : Fol : Ø Cl : Ø

Lampiran 4 (lanjutan).

Form Superovulasi Treatment dan Inseminasi Buatan (IB)

Nama/No. Reg. Donor

Siklus Berahi (Hari ke-)	Hormon Perlakuan	Waktu Penyuntikan	Dosis mg atau unit	Route
D10		pagi		
		sore		
D11		pagi		
		sore		
D12	PG	pagi		
	PG	sore		
D13		pagi		
		sore		
D14		pagi		
	IB1	sore		
D15	IB2	pagi		
		sore		
D16		pagi		
		sore		

- IB dilakukan dua kali, sesuai dengan waktu berahi tepat

- Pejantan IB :

Nama :
(Service Sire)

No. Reg. :

- Tanggal Panen Embrio :
(Flushing date)

Lampiran 4 (lanjutan).

Form Panen Embrio Hasil Pembilasan (Flushing) Pada D7

Nama/No. Reg. Donor :

Ovarium Kiri					Hasil (ova)	Ovarium Kanan					Hasil (ova)
CL	Fol	Ukuran (Cm)				CL	Fol	Ukuran (Cm)			
		P	L	D				P	L	D	

Hasil Evaluasi Embrio Yang Terkoleksi

	Kualitas Embrio	Jumlah
Transferable embryo	Excellent (A)	
	Good (B)	
	Fair (C)	
Untransferable embryo	Degenerasi (Deg)	
	Retarded (Ret)	
	Unfertilized (-)	
Total :		

Lampiran 4 (lanjutan).

Form Perlakuan resipien Dalam Program Transfer Embrio

A. Persiapan Sinkronisasi Resipien

- Tanggal penyuntikan I :
 - Tanggal penyuntikan II :
 - Tanggal berahi yang :
- Sinkron dengan donor

B. Pelaksanaan Transfer Embrio

Tanggal :

No.	Nama/No. Reg.	Siklus Berahi (D6, D7 atau D8)	Asal Embrio donor (No.Reg.Donor)	Alamat Resipien	Hasil PKB (+/-)
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					

GLOSARIUM ISTILAH

Abortus (keguguran): keluarnya fetus dari uterus sebelum termin normal kelahiran. Fetus yang keluar tidak memiliki viabilitas dan mati.

Adenohypophysis (*anterior pituitary*): Bagian kelenjar hipofisa depan yang berasal dari stomodeal ectoderm dari embrio. Bagian ini menghasilkan gonadotropin (FSH dan LH), adrenocorticotropin (ACTH), thyroid stimulating hormone (TSH), growth hormone (GH) dan prolactin (PRL).

Alfa subunit: komponen protein dari hormon glikoprotein yang umumnya terdapat pada semua gonadotropin.

Anaestesi epidural: penghilangan rasa sakit di bagian belakang tubuh sekitar daerah perineum, ruang panggul dan bagian saluran reproduksi. Penyuntikan anaestesi (diantaranya lidocaine 2%) dapat dilakukan antara tulang sakrum dengan tulang ekor atau diantara tulang ekor pertama dan kedua.

Anaphylaxis: reaksi alergi yang kuat setelah tubuh terpapar atau mendapat bahan kimawi yang menjadi allergen. Reaksi alergi yang serius ini memiliki onset yang cepat dan dapat menyebabkan kematian.

Antrum: rongga atau ruang.

Atresia: degenerasi dan penyerapan folikel sebelum ovulasi.

Benda kutub (*polar body*): sebagian kecil sitoplasma oosit, mengandung separuh material genetic yang dikeluarkan secara eksositosis keruang perivitelin pada waktu pembelahan meiosis pertama dan kedua.

Beta subunit: komponen hormon glikoprotein yang merupakan keunikan dari hormon.

Bifurkasio internal: percabangan cornua uteri bagian dalam.

Blastocoele: rongga dalam bagian sentral blastosis.

Blastomer: sel hasil pembelahan cleavage dari embrio dini.

Blastosis: embrio stadium awal yang terdiri atas blastocoele, *inner cell mass* dan trophoblast.

Buffer: larutan bufer (*phosphate buffered saline*, PBS) untuk mempertahankan pH medium tetap fisiologis (7,2-7,4) dan osmolaritas 270-310 mOsm/l.

Cairan folikel: cairan yang dihasilkan sel-sel granulosa folikel dan mengisi rongga folikel.

Chorion: membran ekstra embrionik terluar dan berasal dari ectoderm trophoblast. Dari permukaannya tumbuh villi dari tempat perlekatan plasenta fetus.

Cincin servikal (*cervical rings*): penonjolan/penebalan jaringan berbentuk cincin yang terdapat dalam serviks sapi dan domba.

Cleavage: pembelahan mitosis secara seri dari embrio stadium awal yang terjadi dalam bungkus zona pelusida, menghasilkan sel-sel sama besar yang disebut blastomer.

Corpus albican: struktur jaringan ikat pada ovaria berwarna putih yang menggantikan korpus luteum regresi.

Corpus hemorrhagicum: struktur kecil pada ovaria yang berisi gumpalan darah yang terjadi karena sobeknya pembuluh darah selama ovulasi.

Corpus luteum (CL): struktur endokrin berwarna oranye-kuning yang terbentuk setelah ovulasi dan berasal dari sel-sel granulosa dan sel-sel teka folikel. CL mensekresi progesteron dan oxytocin.

Degenerasi: kerusakan dan penurunan fungsi sel.

Detritus: hancuran sel yang berdegenerasi.

Diestrus: salah satu fase dari siklus berahi, yang dikarakterisir dengan adanya Cl dan didominasi progesteron.

Diferensiasi: perkembangan struktur dan fungsi yang lebih spesifik dari sel-sel asal atau jaringan.

Dinamika folikular: sejumlah proses intraovarian termasuk perkembangan folikel dan degenerasi.

Distokia: kesulitan melahirkan atau partus yang abnormal.

Donor: sapi betina unggul (*genetic* dan *performance superior*) dipersiapkan sebagai penghasil embrio.

Endometrium: selaput lendir uterus bagian dalam.

Eksogen: berasal dari luar tubuh.

Embrio: perkembangan awal dari individu yang secara anatomis belum dapat dikenali secara definitif dari spesies tertentu.

Embrio praimplantasi: semua embrio dari stadium awal sampai stadium sebelum implantasi.

Epidural space (ruang epidural): ruang sekitar medulla spinalis.

Equine chorionic gonadotropin (eCG): hormon luteotropik yang diproduksi oleh *endometrial cup* plasenta kuda bunting. Memiliki efek FSH yang kuat.

Estradiol: predomnan estrogen yang diproduksi oleh dominan folikel selama fase folikular dari siklus estrus.

Estrogen: terminologi generik untuk menjelaskan mengenai senyawa (natural atau sintetik) yang menunjukkan efek-efek biologik khas hormon estrogen.

Estrous: kata sifat yang menjelaskan fenomena yang diasosiasikan dengan siklus estrus.

Estrus (*heat, berahi*): suatu fase hewan betina mau menerima pejantan secara sexual. Estrus merupakan hari ke-0 (*Day 0*, disingkat *D0*) dari siklus estrus.

Fase folikular: suatu fase siklus estrus yang dikarakterisir dengan adanya folikel dominan yang memproduksi estradiol. Betina menunjukkan gejala berahi dan ovulasi terjadi pada fase folikular.

Fase luteal: fase siklus estrus yang dikarakterisir dominasi progesteron dan adanya CL. Fase luteal dimulai segera setelah terjadi ovulasi dan berakhir setelah CL lisis.

Fertilisasi (pembuahan): fusi sel kelamin jantan (spermatozoon) dan sel kelamin betina (oosit).

Fetus: individu muda yang belum lahir dengan bentuk definitif dari spesies induknya.

Fimbria: struktur seperti jumbai pada ujung infundibulum dari oviduk.

Flushing (embryo recovery, embryo collection): panen embrio praimplantasi (morula, blastosis) berumur D6-8 dari kornua uteri dengan cara *non surgery* membilas menggunakan medium modifikasi PBS.

Follicle stimulating hormone (FSH): hormon glikoprotein yang disekresi oleh hipofisa anterior sebagai respon GnRH. FSH menstimulir pertumbuhan folikel pada betina dan fungsi sel Sertoli pada jantan.

Folikel: sel telur dan selubung sel yang mengitarinya pada setiap tahap perkembangan.

Folikel antral: folikel dari setiap perkembangan yang memiliki antrum.

Folikel de Graaf: folikel dominan besar preovulasi.

Folikel dominan: tahap pematangan akhir dari folikulogenesis yang menghasilkan folikel matang dengan produksi estradiol dan inhibin berkonsentrasi relatif tinggi.

Folikel parasiklus: folikel yang terbentuk pada stadium luteal dan tidak dapat ovulasi.

Folikel persisten: folikel yang menetap dan tidak ovulasi.

Folikel preovulasi: sel telur (oosit) beserta sel-sel folikel dari semua tahap perkembangan dalam ovarium sebelum ovulasi.

Folikel primer: folikel yang dikarakterisir selapis sel epitel yang membungkus oosit.

Folikel primordial: folikel tahap primitif.

Folikel sekunder: folikel yang dikarakterisir beberapa lapis sel epitel yang mengitari oosit dan mulai terbentuk rongga (antrum) berisi cairan folikel.

Folikel subordinat: folikel yang berkembang dibawah folikel dominan.

Folikel tersier: lanjutan perkembangan folikel sekunder disertai antrum yang membesar berisi cairan folikel.

Folikulogenesis: proses perkembangan folikel dari primer ke sekunder atau ke folikel antral yang mampu ovulasi.

Freemartin: sapi dara steril yang berasal dari kebuntingan kembar bersama jantan. Saluran reproduksinya tidak lengkap dan menunjukkan sifat seperti pejantan.

Gamet: sel oosit matang atau spermatozoon.

Gelombang folikel: perkembangan sekelompok folikel, direkrut, diseleksi dan akan menghasilkan satu folikel dominan, sebagian menjadi subordinat dan yang lainnya atresi. Pada sapi dalam satu siklus estrus dapat terjadi 2-4 gelombang folikel.

Germinal (*germ cells*): sel-sel spermatozoa atau oosit.

Glikoprotein: tipe protein yang dikarakterisir dengan adanya molekul karbohidrat yang terikat pada rantai utama protein.

Gonad: organ yang memproduksi sel-sel gamet; testis pada jantan dan ovarium pada betina.

Gonadotropin: hormon (FSH dan LH) yang berasal dari adenohipofisa dan menstimulasi fungsi gonad.

Gonadotropin releasing hormone (GnRH): dekaeptida yang disekresi dari ujung syaraf dalam surge dan tonic pusat LH di hypothalamus yang dapat menyebabkan pelepasan gonadotropin dari pituitari bagian depan (adenohipofisa).

Granulosa (membana granulosa): lapisan sel yang mengelilingi antrum dari folikel antral.

Heat inactivated serum (hi serum): serum yang sudah mengalami inaktivasi pemanasan 56 °C selama 30 menit.

Hormon: zat organik yang disekresikan oleh sel-sel tertentu atau kelenjar endokrin dalam jumlah sangat kecil, masuk dalam peredaran darah dibawa ke target organ untuk berespon.

Hormon gonad: hormon yang diproduksi oleh gonad jantan atau betina.

Hormon gonadotropin: hormon yang target organnya adalah gonad (testes atau ovarium).

Horse anterior pituitary (hAP): hormon yang diperoleh dari ekstrak bagian depan pituitari dan memiliki biopotensi seperti FSH.

Human chorionic gonadotropin (hCG): hormone yang diproduksi dari plasenta wanita hamil dan memiliki biopoensi luteotropik yang kuat.

Human menopause gonadotropin (hMG): hormon yang diekstrak dari urine wanita menopause dan memiliki biopotensi seperti FSH.

Hypothalamus: bagian ventral otak yang mengelilingi ventrikel ketiga, terdiri atas kluster sel tubuh yang berbeda disebut inti hipotalamus dan berfungsi mensintesis releasing hormone oxytocin dan hormon antidiuretik.

Implantasi: perlekatan embrio (*elongated hatched blastocyst*) pada endometrium.

Infundibulum: struktur berongga berbentuk corong dari oviduk.

Inhibin: hormon glikoprotein yang diproduksi sel-sel Sertoli pada jantan dan sel-sel granulosa pada betina yang secara spesifik menghambat pelepasan FSH dari adenohipofisa (*anterior pituitary*).

Inner cell mass (ICM): sel-sel kluster yang berlokasi pada satu kutub blastosis yang akan berkembang menjadi individu.

Inseminasi buatan: proses deposit mekanis semen yang mengandung spermatozoa viable kedalam saluran reproduksi betina estrus. Umumnya pada sebagian besar spesies hewan di depositkan kedalam uterus.

In-vitro: di dalam gelas atau tabung reaksi.

In-vivo: di dalam tubuh hidup atau organism.

Ipsilateral: pada sisi yang sama.

Isthmus: pasase sempit yang menghubungkan dua rongga besar. Isthmus dari oviduct berdiameter kecil dan menghubungkan antara ampulla dari oviduct berdiameter besar dengan uterus.

Jerami plastik (*plastic straw*): jerami plastik berukuran panjang sekitar 13 cm, diameter 0,2 cm dan volume 0,25 ml yang dipakai sebagai tempat kemasan embrio yang akan ditransfer.

Kapasitasi: proses biologis spermatozoa memperoleh fertilitas dalam saluran reproduksi betina fungsional.

Kateter flushing: alat berupa selang karet atau silikon yang bagian depannya memiliki balon manset dan lubang-lubang untuk keluar masuknya medium.

Kembar identik: kembar berasal dari satu telur.

Klon (*clone*): hewan yang memiliki *genetic make up* sama.

Konsepsi: fusi spermatozoon dengan oosit; fertilisasi; menjadi bunting.

Konseptus: produk dari konsepsi, termasuk embrio, membrane ekstraembrionik dan plasenta.

Kontralateral: pada sisi yang berlawanan.

Kopulasi (*koitus*): *sexual intercourse*, sanggama bersatunya jantan dan betina melalui kelaminnya.

Kriopreservasi (*cryopreservation*): pembekuan sel gamet atau embrio sampai suhu -196°C (suhu nitrogen cair) dalam rangka penyimpanan jangka panjang (*long term storage*). Pada suhu deep freezing - 196°C sel gamet dan embrio dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas.

Luteinisasi: suatu proses terjadinya perubahan sel-sel granulosa dan sel-sel teka menjadi sel-sel lutein. Luteinisasi disebabkan oleh hormon LH.

Luteinizing hormone (LH): hormon glikoprotein yang disekresi oleh anterior pituitary, dan dapat menyebabkan ovulasi disertai perkembangan dan pemeliharaan corpus luteum. Pada jantan menyebabkan sel Leydig memproduksi testosteron.

Luteolisis: suatu proses jaringan luteal (corpus luteum) tidak berfungsi.

Luteolitik: zat yang dapat menyebabkan luteolisis.

Luteotropik: memiliki afinitas atau dapat menstimulasi corpus luteum.

Meiosis: pembelahan sel yang terjadi pada sel berkembang, hasilnya inti sel turunannya memperoleh separuh jumlah kromosom (haploid) dari sel somatik.

Membran ekstraembrionik: membran yang membungkus embrio dan berasal dari embrio itu sendiri, diantaranya amnion, allantois dan chorion.

Metestrus: fase dari siklus estrus antara ovulasi dengan pembentukan corpus luteum fungsional.

Morula: salah satu stadia perkembangan embrio dini dalam zona pelusida yang dikarakterisir massa bulat dari blastomer hasil pembelahan cleavage sigot.

Multiple ovulation and embryo transfer (MOET): tindakan superovulasi disertai dengan transfer embrio ke resipien.

Negative feed back: suatu kondisi hormon menghasilkan efek menghambat pada kelenjar atau organ lainnya untuk menekan sekresi hormone tertentu.

Nekrosis: kematian sel, jaringan atau organ biasanya dari kerusakan jaringan atau kekurangan peredaran darah.

Ootid: oosit setelah pembelahan meiosis pertama disertai dengan adanya benda kutub pertama.

Oosit: sel telur yang berkembang dalam salah satu dari dua tahap perkembangan. Oosit primer berasal dari oogonium melalui diferensiasi menjelang kelahiran dan sudah mulai, tetapi belum sempurna. Oosit sekunder berasal dari oosit primer sesaat menjelang ovulasi dengan pembelahan sel yang menghasilkan benda kutub pertama.

Osmolaritas: terminologi lama dari konsentrasi osmotik yang mengukur konsentrasi solute dalam larutan. Jumlah osmol (Osm) solute per liter larutan (osmol/l atau Osm/l). Osmolaritas biasanya dinyatakan dalam Osm/l (diucapkan osmolar).

Ovari: kelenjar gonad betina yang dapat menghasilkan sel telur dan hormon estrogen, progesteron dan oxytocin.

Oviduk (oviduct, tuba fallopii): saluran telur yang berkelok, berukuran kecil menghubungkan ovarium dengan uterus. Saluran telur ini terdiri atas infundibulum, ampula, dan isthmus.

Ovulasi: ruptur secara periodik dari folikel yang matang (folikel dominan, folikel de Graaf) dan mengeluarkan oosit.

Ovum (plural ova): istilah Latin yang artinya sel telur.

Oxytocin: nonapeptida hasil sintesa syaraf dalam hipotalamus dan dilepas dari ujung syaraf dalam hipofisa bagian belakang. Oxytocin juga diproduksi oleh corpus luteum. Efeknya menyebabkan kontraksi otot polos pada saluran reproduksi jantan dan betina, serta mengatur luteolisis.

Partus: melahirkan.

pH: logaritma desimal resiprokal dari ion hidrogen aktif dalam suatu larutan. pH mengukur konsentrasi ion hidrogen dalam larutan dengan skala 1-14. Angka 7 menunjukkan netral, dibawah 7 asam dan diatas 7 basa.

Phosphate buffered saline (PBS): larutan bufer untuk mempertahankan stabilitas pH dan omolaritas larutan, setelah dimodifikasi dapat dipakai sebagai medium dasar untuk medium koleksi embrio, *embryo maintenance*, pupuk embrio sementara, embrio transfer dan medium pembekuan (*cryoprotectant*).

Plasenta: organ pertukaran metabolik antara fetus dengan induk. Terdiri atas bagian embrionik (chorion) dan bagian dari induk (endometrium). Plasenta juga merupakan kelenjar endokrin temporer.

Positive feedback: suatu kondisi, suatu hormon menimbulkan efek stimulasi pada kelenjar atau jaringan lainnya.

Posterior pituitary (neurohypophysis): bagian belakang kelenjar pituitari yang berasal dari infundibulum otak selama embryogenesis. Bagian belakang ini adalah jaringan syaraf yang merupakan tempat ujung-ujung syaraf yang berasal dari inti-inti spesifik hypothalamus.

Pregnant mare serum gonadotropi (PMSG): sama dengan eCG.

Proestrus: salah satu fase dari siklus estrus antara luteolisis dan onset estrus.

Progesteron: hormon steroid yang diproduksi oleh corpus luteum dan plasenta, Progesteron diperlukan untuk memelihara kebuntingan.

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$): prostaglandin yang diproduksi dari endometrium dan dapat menyebabkan kontraksi myometrium, vasokonstriksi pembuluh darah dan dapat menyebabkan luteolisis.

Prostaglandin (PG): golongan senyawa aktif fisiologis (seperti kelas PGE, PGF, PGA dan PGB) yang umumnya berada dalam jaringan tubuh. Prostaglandin berasal dari arachidonic acid dan memiliki variasi serta fungsi yang luas.

Recruitment: tahap perkembangan folikel antral kecil mulai berkembang menjadi folikel besar.

Regresi: penurunan potensi fisik dan fungsi sel.

Resipien: sapi betina biasa, reproduksi fertil yang laik menerima embrio untuk bunting sampai melahirkan.

Retarded embryo: embrio yang tidak mengalami perkembangan atau terlambat berkembang, secara morfologis stadium embrio yang tampak tidak sesuai dengan umur yang seharusnya.

Ruang perivitelin (*perivitelline space*): ruang antara sel embrio dengan zona pellucid.

Seleksi folikel: terbentuknya folikel ovulatori dari sejumlah folikel antral yang direkrut sebelumnya.

Siklus estrus: siklus reproduksi dari betina, umumnya didefinisikan satu periode dari fase estrus ke berikutnya; terdiri atas fase folikular dan luteal.

Sinkronisasi estrus: upaya penggunaan hormon eksogen untuk menyerentakan berahi dan ovulasi pada banyak hewan betina dalam satuan waktu yang bersamaan.

Serum: komponen darah yang diperoleh dari pemisahan darah yang telah menggumpal. Bagian atas berupa cairan adalah serum sedangkan bagian bawah merupakan endapan darah yang menggumpal.

Serum fetal: serum yang diperoleh dari fetus sapi.

Serviks: suatu struktur terdiri atas jaringan ikat padat, dengan berbagai peringkat lipatan dan penonjolan penutup mukosa epitel. Serviks menghubungkan uterus dengan vagina.

Stadium bifase: fase folikular dan fase luteal bersamaan waktunya dalam pertengahan siklus estrus.

Sumbat serviks: sumbat lendir kental/viscous yang melekatkan lipatan dan menutup serviks selama kebuntingan.

Superovulasi: metoda biologis untuk merangsang ovaria untuk menumbuh, mengembangkan, mematangkan folikel disertai dengan ovulasi dalam jumlah melebihi jumlah ovulasi alamiah.

Transfer embrio: teknologi reproduksi generasi kedua; tindakan medik memindahkan embrio donor dengan mendepositkan dalam kornua uteri resipien yang laik transfer.

Transfer gun: alat untuk mendepositkan embrio pada cornua uteri depan dari resipien.

Tuba fallopii: saluran telur (*oviduct*).

Uterus: organ reproduksi berbentuk saluran yang dikelilingi otot polos disertai lapisan epitel; menghubungkan oviduct dan serviks. Fungsi uterus adalah mentransport sperma, perkembangan embrio awal, pembentukan plasenta dan kelahiran. Uterus juga memproduksi prostaglandin.

Uterus bikornua: uterus yang memiliki kornua yang jelas.

Waktu paruh (*half-life*): periode waktu yang dibutuhkan untuk menghilangkan separuh biopotensi senyawa melalui destruksi, penguraian, metabolisme dan dikeluarkan dari tubuh.

Zona pellucida: mucoprotein jernih, tebal membungkus oosit dan embrio tahap dini.

Tentang Penulis



Iman Supriatna (iman_sprtn@yahoo.com) memperoleh gelar sebagai Dokter Hewan dari Fakultas Kedokteran Hewan (FKH), Institut Pertanian Bogor (IPB), Indonesia, tahun 1979. Sejak tahun 1980 menjadi anggota Persatuan Dokter Hewan Indonesia dan tahun 2010 menjadi anggota Asosiasi Reproduksi Hewan Indonesia. Menjadi calon pegawai negeri sipil 1 Maret 1980 pada Departemen Reproduksi FKH IPB. Mengikuti pendidikan bahasa Jerman di Goethe Institut, Mannheim, Republik Federal Jerman April–Agustus 1983. Setelah lulus pendidikan bahasa Jerman, mengikuti program S3 Doktor dalam bidang Teknologi Reproduksi Terapan, di *Veterinaermedizinische Fakultät der Justus-Liebig-Universität* Giessen, Republik Federal Jerman, dan lulus Juli 1987. Selama menyelesaikan program Doktor, menjadi anggota Tim Embrio Transfer di *Ambulatorische und Geburtshilfliche Veterinaerklinik, der Justus-Liebig-Universität* Giessen dari tahun 1984-1987. Setelah menyelesaikan pendidikan Doktor kembali ke tanah air dan melanjutkan bekerja pada Departemen Reproduksi dan Kebidanan FKH IPB. *Post-Doc Training* di Jepang mengenai Teknik Kriopreservasi dan Embrio Transfer pada Ternak Sapi di *Yamaguchi University* Agustus-September 1992 dan Embrio Transfer dan In Vitro Fertilisasi di *Okayama University* November 1993. Penelitian Bioteknologi Reproduksi Terapan yang banyak dilakukan diantaranya Transfer Embrio, Kriopreservasi Sel dan In Vitro Fertilisasi. Pada tahun 1992 menulis buku In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio.

Pada tanggal 1 Agustus 2009 diangkat sebagai Guru Besar pada bidang Ilmu Reproduksi dan Kebidanan di Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Jabatan lain yang pernah diemban yaitu: a) Ketua Jurusan Reproduksi dan Kebidanan, FKH IPB (1995-2001), b) Ketua Bagian Reproduksi dan Kebidanan, FKH IPB (2003-2005), c) Ketua Program Studi Teknisi Reproduksi Satwa, Program Diploma III, FKH IPB (2000-2007), d) Ketua Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, IPB (2007-2011), e) Ketua Senat Fakultas Kedokteran Hewan, IPB (2012-2016), f) Peneliti Senior Pusat Pengkajian Perencanaan dan Pengembangan Wilayah (P4W), IPB (2009-2014), g) Kepala Divisi Reproduksi dan Kebidanan FKH IPB, (2014-2021).

Dalam pembangunan dan pengembangan peternakan, pernah bekerja sebagai tenaga ahli pada kerjasama atau program lembaga diantaranya: a) Pusat Pengkajian Perencanaan dan Pengembangan Wilayah (P4W) IPB dengan Kementerian Pembangunan Daerah Tertinggal 2005-2009, b) Fakultas Peternakan IPB dengan Dinas Peternakan Provinsi Jawa Barat 2006-2007, c) Fakultas Peternakan IPB dengan Kementerian Negara Koperasi dan UKM 2007-2008, d) Fakultas Peternakan IPB dengan PT Indocement Tunggul Prakarsa 2007, e) Fakultas Peternakan IPB dengan PT Kaltim Prima Coal 2009-2010, f) PKSPL IPB dengan PT Nusa Halmahera Minerals 2008-2010, g) Kementerian Kehutanan 2009, h) SEAMEO BIOTROP dengan PT Vale Indonesia Tbk. 2011-2013, i) Fakultas Kehutanan IPB dengan Dinas Kehutanan Provinsi Jawa Barat 2012, j) P4W IPB dengan Bappeda Pemkab Kampar, Provinsi Riau dan Kabupaten Kutai Barat, Provinsi Kalimantan Timur 2013, dan k) P4W IPB dengan Dinas Peternakan Pemkab Kota Baru, Provinsi Kalimantan Selatan tahun 2013.

Transfer embrio (TE) merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang merupakan alat untuk perbaikan, peningkatan mutu (genetic) individu atau populasi ternak. Persyaratan pelaksanaan TE, embrio diperoleh dari donor betina unggul yang diinseminasi dengan pejantan unggul (breed the best to the best). Melalui program TE dapat dilahirkan pedet dengan kemurnian dan keunggulan mendekati 100% hanya diperlukan satu generasi yaitu sekitar 1 tahun, karena donor betina sebagai induk dan pejantannya sudah unggul.

Pelaksanaan program TE sangat tergantung dari betina donor yang memiliki genetik superior. Donor setelah disuperovulasi, akan diinseminasi dengan pejantan unggul. Seekor donor sapi secara alami hanya dapat menghasilkan satu sel oosit per siklus kelamin dan dalam satu tahun hanya dapat menghasilkan 1 ekor pedet. Jika disuperovulasi dan setelah diinseminasi akan diperoleh sekitar 4-6 embrio perprogram superovulasi. Dalam satu tahun dapat dilakukan 4-5 kali superovulasi dan akan diperoleh 20-30 embrio. Jika angka kebuntingan 50% maka setiap tahun seekor donor betina unggul dapat menghasilkan 10-15 ekor pedet unggul. Metoda TE dapat digunakan untuk menghasilkan kelahiran pedet kembar yaitu dengan mentransfer embrio pada akseptor inseminasi buatan (IB) yang telah diinseminasi. Upaya ini disebut program twinning.

