

**APLIKASI TRANSFER EMBRIO SAPI MADURA HASIL
FERTILISASI IN VITRO PADA SAPI PERAH
TUJUH HARI PASCA INSEMINASI**

Ketua Peneliti :

Drh. Imam Mustofa, M.Kes.

PAMERAN

16 MAY 1998

SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan

DIP Nomor : 172/XXIII/3/--/1997 Tanggal 31 Maret 1997

Kontrak Nomor : 086/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1997

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud

Nomor Urut : 31

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**APLIKASI TRANSFER EMBRIO SAPI MADURA HASIL
FERTILISASI IN VITRO PADA SAPI PERAH
TUJUH HARI PASCA INSEMINASI**



3000069983141

Oleh :

Drh. Imam Mustofa, M.Kes.
Drh. Pudji Srianto, M.Kes.
Dr.Drh.Laba Mahaputra, M.Sc.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DP3M-BBI 1997/1998
Nomor : 086/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997
SK.Rektor Nomor :504/J03.12/PL/1997
Nomor Urut : 31

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit / Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C, Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. a. Judul Penelitian :
 Aplikasi Transfer Embrio Sapi Madura Hasil Ferfilisasi
 in Vitro pada Sapi Perah Tujuh Hari Pasca Inseminasi
 b. Macam Penelitian : () Dasar () Terapan () Pengembangan
 c. Kategori : I/II/III *
2. Kepala Proyek Penelitian :
 a. Nama lengkap dengan gelar : Imam Mustofa, M.Kes., Drh.
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata/IIIc/131653421
 d. Jabatan fungsional : Lektor Muda
 e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan / Reproduksi
 f. Universitas : Airlangga
 g. Bidang Ilmu yang Diteliti : Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Kecamatan Wonocolo, Surabaya
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama lembaga, sebutkan :
 a. Nama Instansi : -
 b. A l a m a t : -
6. Jangka Waktu Penelitian : 1 (satu) tahun
7. Biaya Tahun I 1997/1998 : Rp 5.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian
 a. Dilaksanakan Tanggal : 7 Januari 1998
 b. Hasil Penelitian : () Baik Sekali (V) B a i k
 () S e d a n g () Kurang

Surabaya, 6 Februari 1998.

Mengetahui :
 Pembantu Dekan I
 Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Ketua Peneliti,

DR. Ismudiono, MS., Drh.
 NIP. 130 687 297

Imam Mustofa, M.Kes., Drh.
 NIP. 131 653 421

Mengetujui :
 Ketua Lembaga penelitian
 Universitas Airlangga,

RINGKASAN

APLIKASI TRANSFER EMBRIO SAPI MADURA HASIL FERTILISASI IN VITRO PADA SAPI PERAH TUJUH HARI PASCA INSEMINASI

Imam Mustofa, Pudji Srianto, Laba Mahaputra
1997, 40 Halaman

Transfer embrio (TE) dan Fertilisasi in vitro (FIV) sebagai generasi kedua bioteknologi reproduksi setelah inseminasi buatan (IB) diyakini memiliki beberapa kelebihan antara lain dapat digunakan untuk penyebaran bibit unggul ternak dengan cara yang lebih cepat kepada masyarakat. Satu-satunya faktor yang masih dirasakan sebagai kendala adalah mahalnnya harga preparat hormon untuk penyerentakan birahi dalam aplikasi teknologi tersebut.

Sapi betina dapat mengandung lebih dari satu fetus dalam sekali masa kebuntingan. Untuk meningkatkan penerimaan uterus terhadap embrio yang ditransferkan dapat dilakukan penyuntikan preparat progesteron eksogen yang dalam bentuk medroxy progesterone acetate (MPA) dapat diperoleh dengan harga yang relatif murah.

Berdasarkan fakta di atas perlu diteliti kelayakan pelaksanaan TE hasil FIV pada sapi tujuh hari pasca IB. Sebagai pembeda antara hasil IB dengan hasil TE resipien yang dipakai adalah sapi perah FH yang telah di IB dengan semen beku pejantan sapi FH, sedangkan embrio yang ditransferkan adalah embrio sapi madura hasil FIV.

Empat puluh ekor sapi perah Frisian Holstein betina yang sehat dan dalam keadaan tidak bunting (milik peternak anggota Koperasi Harum Kotamadya Surabaya) dibagi secara acak menjadi empat kelompok percobaan. Untuk memudahkan jadwal

pelaksanaan penelitian kepada hewan coba dilakukan penyerentakan birahi. Inseminasi buatan dilakukan 8-10 jam setelah birahi. Kelompok pertama tidak diberi perlakuan (kontrol), sedangkan tiga kelompok yang lain masing-masing disuntik MPA 100 mg. + TE, MPA 150 mg. + TE, dan MPA 200 mg. + TE. Penyuntikan MPA dilakukan secara intra muskuler pada hari ke-3 setelah IB. Transfer embrio dilakukan hari ketujuh setelah IB secara kontra lateral (berlawanan tempat dengan keberadaan korpus luteum).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kebuntingan yang terjadi pada kelompok kontrol, perlakuan transfer embrio dengan suplementasi MPA 100, 150 dan 200 mg berturut-turut sebesar 60 %, 37,5 %, 37,5 % dan 55,6 % ($p > 0,05$).

(Jurusan Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Ditbinlitabmas - Dikti Nomor : 086/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997)

SUMMARY

THE APPLICATION IN TRANSFER OF IN VITRO FERTILIZATION DERIVED MADURA CATTLE EMBRYOS TO DAIRY CATTLE RECIPIENTS SEVEN DAYS POST INSEMINATION

Imam Mustofa, Pudji Srianto, Laba Mahaputra
1997, 40 pages

Embryo transfer (ET) and In Vitro Fertilization (IVF) as the second generation of reproductive biotechnology after Artificial Insemination (AI) is believed to earn some benefits including the possibility for spreading the high breeding value livestock intensively. The only obstacle is the high cost of the hormone for estrous synchronization in the application of this technology.

One cow can bear more than one foetus in one pregnancy. Injection of Medroxy Progesterone Acetate (MPA) as exogenous progesterone, which is relatively cheap, was carried out to increase uterus receptivity to transferred embryo.

Regarding this fact the feasibility of transfer procedure of IVF derived embryo seven days post AI needs to be investigated. As comparison between the result of AI and ET, dairy cattle recipient were inseminated artificially using frozen semen of bull from the same breed, whereas the transferred embryo were IVF derived Madura cattle embryos.

Fourty healthy and non pregnant Friesian Holstein dairy cows (owned by Koperasi Harum Kotamadya Surabaya farmers) were derived randomly into four experimental groups. The experimental animals were estrous synchronized to simplify the timetable of this research. Artificial inseminations were hold 8-10 hours post estrous. Embryo was transferred contra

laterally 7 days post AI. The first group was control (without treatment), meanwhile the other three groups were intramuscularly injected with 100, 150 and 200 mg MPA respectively three days post AI.

The result of this research showed that the percentage of pregnancy of the control group, MPA 100 , 150 and 200 mg were 60, 37.5, 37.5 and 55,6 % respectively ($p > 0,05$).

(Department of Reproduction and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Ditbinlitabmas - Dikti Nomor : 086/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah swt., bahwa atas rahmat, taufik dan hidayah Nya maka penelitian sampai dengan penyusunan laporan ini dapat dilaksanakan.

Pada kesempatan ini disampaikan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, atas kepercayaannya mengabdikan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan.
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, atas kelancaran mulai proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan akhir hasil penelitian ini.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
4. Kepala Laboratorium Kebidanan Veteriner FKH Unair beserta seluruh stafnya.
5. Mitra peternak sapi perah anggota Koperasi Harum Kotamadya Surabaya
6. Fihak-fihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Sebagai hasil karya manusia, disadari sepenuhnya adanya beberapa kekurangan di beberapa bagian laporan ini. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan baik untuk kematangan peneliti maupun agar laporan penelitian ini dapat memberi manfaat kepada fihak-fihak yang berkepentingan.

Surabaya, 10 Desember 1987.

Peneliti

v

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR / ILUSTRASI	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	17
IV. METODE PENELITIAN	19
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	29

DAFTAR TABEL

Nomor	Uraian Tabel	Halaman
1.	Hasil Pemeriksaan Kebuntingan setelah Transfer Embrio Tujuh Hari Pasca Inseminasi	32

DAFTAR GAMBAR / ILUSTRASI

Nomor	Uraian Gambar / Ilustrasi	Halaman
1.	Gambaran Skematis Jadwal Pelaksanaan Penelitian	27
2.	Diagram Bar Hasil Pemeriksaan Kebuntingan setelah Transfer Embrio Tujuh Hari Pasca Inseminasi	33

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Uraian Lampiran	Halaman
1.	Data Hasil Penelitian Aplikasi Transfer Embrio Sapi Madura Hasil Ferfilisasi in Vitro pada Sapi Perah Tujuh Hari Pasca Inseminasi	41
2.	Uji Chi-kuadrat Hasil Aplikasi Transfer Embrio Sapi Madura Hasil Ferfilisasi in Vitro pada Sapi Perah Tujuh Hari Pasca Inseminasi	42

BAB I

PENDAHULUAN

Latar belakang Permasalahan

Dalam rangka memecahkan masalah kekurangan pasok protein hewani asal ternak dari dalam negeri, salah satu langkah yang perlu dipertimbangkan adalah melakukan intervensi dengan mengaplikasikan teknologi maju yang telah dikuasai dan dikembangkan, yaitu transfer embrio (TE) dan fertilisasi in vitro (FIV). Sebagai generasi kedua bioteknologi reproduksi setelah inseminasi buatan (IB), TE dan FIV diyakini memiliki beberapa kelebihan antara lain dapat digunakan untuk penyebaran bibit unggul ternak dengan cara yang lebih cepat kepada masyarakat. Satu-satunya faktor yang masih dirasakan sebagai kendala adalah mahalnnya aplikasi teknologi tersebut di lapangan, belum seperti teknik IB yang telah memasyarakat bahkan saat ini sudah sampai pada tahap swadaya/swadana masyarakat. Dari sisi resipien, mahalnnya biaya tersebut berasal dari harga preparat hormon untuk penyerentakan birahi yang masih cukup tinggi, sementara persentase keberhasilannya masih lebih rendah dibandingkan teknik IB.

Tujuan beternak sapi perah yang utama adalah untuk diambil air susunya. Namun demikian produksi pedet dengan jarak antar beranak yang ideal tidak dapat diabaikan, sebab produksi air susu pada dasarnya merupakan bagian tidak terpi-

sahkan dari sistem reproduksi sapi perah tersebut. Jarak antar beranak yang ideal juga akan meningkatkan pendapatan peternak.

Sapi betina dapat mengandung lebih dari satu fetus dalam sekali masa kebuntingan. Bahkan Echterkamp (1992) mengemukakan berdasarkan hasil penelitiannya bahwa faktor pembatas produktivitas anak pada sapi adalah *ovulation rate*-nya, sedangkan kapasitas uterus dapat ditingkatkan sampai lebih dari tiga fetus per kornua uteri. Dengan demi-embrio (embrio paro) Seike *et al.* (1989) dapat menghasilkan 143,3 % pedet dibandingkan jumlah induknya. Kebuntingan kembar yang paling menguntungkan dalam program transfer embrio adalah kembar dua, satu embrio pada masing-masing kornua uterinya (Hart-Elock *et al.*, 1990).

Untuk menghasilkan kebuntingan kembar dibutuhkan korpus luteum sejumlah kembarnya. Hal ini penting untuk menjaga stabilitas uterus dalam memelihara kehidupan intra uterin. Stimulasi jumlah korpus luteum lebih dari satu dengan superovulasi menggunakan preparat Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) ternyata menghasilkan angka kebuntingan yang rendah. Hal ini disebabkan oleh tetap tingginya kadar estradiol-17 β serum sampai dengan hari ke-14 setelah birahi (Mustofa, 1995). Untuk meningkatkan penerimaan uterus terhadap embrio yang ditransferkan dapat dilakukan dengan penyuntikan preparat progesteron eksogen (Geisert., *et al.*, 1991). Dalam

bentuk medroxy progesterone acetate (MPA, Depo Provera, Upjohn, USA) hormon progesteron dapat diperoleh dengan harga yang relatif murah. Pemberian MPA untuk suplementasi hormon progesteron pada sapi perah agar terjadi peningkatan kadar progesteron dalam darah dapat dilakukan pada hari ketiga siklus birahi, karena menurut Hafez (1993) secara fisiologis mulai hari ketiga setelah birahi hormon progesteron dari korpus luteum mulai dihasilkan.

Berdasarkan fakta diatas perlu diteliti kelayakan pelaksanaan TE hasil FIV pada sapi tujuh hari pasca IB. Sebagai pembeda antara hasil IB dengan hasil TE, resipien yang dipakai adalah sapi perah FH yang telah di IB dengan semen beku pejantan sapi FH, tetapi embrio yang ditransferkan adalah embrio sapi madura hasil FIV. Dengan demikian diharapkan akan dapat diketahui kemungkinan saling isi antara teknik IB dengan teknik TE. Apabila hasil aplikasi kedua teknik tersebut pada seekor resipien berhasil maka akan terjadi kelahiran kembar dua atau tiga dengan jenis pedet berbeda. Kalaupun hasil TE gagal masih ada embrio hasil IB, demikian juga sebaliknya apabila hasil IB gagal masih ada harapan dari embrio hasil TE. Dengan aplikasi kedua teknik ini diharapkan tidak mengecewakan peternak terhadap aplikasi TE pada ternaknya, sehingga tujuan beternak sapi perah untuk menghasilkan pedet secara periodik agar produksi susu konsisten tetap dapat dicapai.

Rumusan Masalah

1. Apakah embrio sapi Madura hasil FIV dapat diaplikasikan pada sapi perah tujuh hari pasca inseminasi ? Indikator keberhasilan aplikasi ini adalah persentase kebuntingan yang terjadi setelah perlakuan dibandingkan dengan aplikasi teknik IB saja.
2. Berapakah dosis MPA yang diperlukan untuk suplementasi progesteron pada resipien untuk mempertahankan kebuntingan setelah perlakuan ? Hal ini perlu secara khusus diteliti karena pada sapi yang tidak dilakukan superovulasi hanya memiliki sebuah korpus luteum sebagai pemasok progesteron untuk mempertahankan kebuntingan. Dengan demikian untuk mempertahankan kebuntingan kembar yang diharapkan terjadi pada penelitian ini dibutuhkan pasokan progesteron eksogen sampai saatnya plasenta mengambil alih peran sebagai penghasil progesteron endogen. Untuk itu penyuntikan depot progesteron secara intra muskuler dapat dipakai sebagai alternatif. Indikatornya adalah pada dosis berapa persentase kebuntingan kelompok perlakuan tidak berbeda nyata dengan kelompok yang tidak dilakukan TE.

Dalam pelaksanaan TE tujuh hari pasca inseminasi, uterus resipien mengalami perlakuan yaitu masuknya alat TE sampai apeks kornua uterus pada sisi yang berlawanan (kontra

lateral) terhadap keberadaan korpus luteum. Permasalahannya bagaimanakah viabilitas embrio hasil IB akibat perlakuan dan bagaimanakah viabilitas embrio hasil TE tersebut? Hal ini dapat diketahui setelah terjadi kelahiran pada sapi-sapi resipien penelitian. Indikatornya adalah berapa persen kelahiran sapi madura yang terjadi dan berapa persen terjadinya kelahiran kembar dengan jenis pedet berdeda. Pada saat penyusunan laporan ini, kelahiran tersebut belum terjadi sehingga masalah viabilitas embrio hasil IB maupun hasil TE pada penelitian ini belum dapat dibahas.

Hipotesis Penelitian

1. Persentase kebuntingan kelompok resipien dengan perlakuan TE tujuh hari pasca inseminasi pada sapi perah tidak berbeda nyata dibandingkan kelompok sapi perah yang diberi perlakuan IB saja.
2. Semakin tinggi dosis MPA pada kelompok sapi-sapi resipien perlakuan TE tujuh hari pasca inseminasi akan menghasilkan persentase kebuntingan yang lebih tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Fertilisasi Invitro

Pengembangan teknologi fertilisasi invitro memberikan andil dan harapan besar untuk pengadaan embrio di masa yang akan datang, sehingga bank embrio selalu tidak akan pernah kosong dengan keberadaannya. Satu sisi keunggulan teknik ini yaitu dapat mengolah kembali hasil ikutan Rumah Potong Hewan (RPH) menjadi bermanfaat sekaligus memperlambat penurunan populasi ternak, walaupun lebih rumit serta hanya terkontrol 50% genetik embrio yang dihasilkan (Elsden and Seidel, 1985).

Kerumitan teknik ini terletak pada pengendalian kondisi dari kedua obyek utama yaitu oosit dan sperma. Oosit harus terlebih dahulu dimatangkan dengan penanganan khusus sehingga sama dengan oosit yang diovulasikan yaitu pada stadium metafase, dengan adanya polar body I dan pronucleus betina. Sedangkan sel mani perlu mendapatkan perlakuan seperti layaknya kapasitas in vivo yaitu untuk memperbanyak DNA dan inti serta meningkatkan perbialitas akrosom (Hafez, 1993). Selain itu kapasitas sperma diperlukan untuk mengadakan fusi antar membran sel dengan akrosom. Hal ini dapat diketahui dengan melihat ada atau tidak adanya reaksi akrosom dengan oosit (Pavasuthipaisit *et al.*, 1992). Kapasitas sel mani dilakukan antara 3 jam untuk sapi (Elsden and Seidel, 1985; Hinting, 1995), atau 6 jam (Povokofiev *et al.*, 1992). Demikian juga untuk sel mani kerbau (Pavasuthipaisit *et al.*, 1992).

Untuk pencucian oosit media yang dipakai umumnya mengandung buffer fosfat (PBS) + 10% FCS atau 10% serum sapi birahi yang diinaktifkan dan ditambah dengan antibiotikan Penisilin + Streptomisin (Elsden and Seidel, 1985; Povokofiev *et al.*, 1992).

Media maturisasi oosit biasanya dipakai adalah Tissue Culture (Tc 199) dengan penambahan pyruvat, antibiotika (penicillin dan streptomycin). Sedangkan untuk kapasitasi dan fertilisasi sel mani yang dipakai adalah media Basic Solution (BO [+]) + heparin dan juga Caffein (Elsden and Seidel, 1985). Povokofiev *et al.* (1992) melakukan maturasi dan pengembangan cleavage menggunakan Tc 199 dengan earle's + Hepes 10 mM + glutamin 0,5 mM, 15% serum sapi birahi yang diinaktifasi dan kananycine 75 ng/ml. Pada manusia media maturisasi oosit hingga 6 jam, media yang digunakan berisi earle's balanced salt solution (EBSS) ditambah dengan Human serum albumin (HSA) dan antibiotik. Sedangkan untuk kapasitasi dan fertilisasi sel mani dipakai larutan earle's, HSA, Hepes dan antibiotik (Hinting, 1995; Bongso, 1995).

Semua media baik untuk maturisasi oosit ataupun pencucian sperma diletakkan dalam inkubator pada suhu 38°C, 5% CO₂ dan 95% udara dengan kelembaban 90-100% sehari sebelum dipakai. Sedangkan mineral oil (minyak mineral) sebagai penutup media dalam inkubator berguna untuk meniadakan penguapan, mengatur masuknya gas dan menghindari kontaminasi media oleh kuman (Hafez, 1993; Elsdan and Seidel, 1985; Hinting, 1995).

Konsentrasi sel mani yang dipakai untuk sapi biasanya antara 12,5 juta/ml (Elsden and Seidel, 1985) dan 10 juta/ml sel mani (Povokofiev *et al.*, 1992). Dengan demikian tiap-tiap tetes atau 100 μ l akan berisi sel mani 1 juta. Pada kerbau tiap 1 tetes (50 μ l) cukup diberikan 5×10^5 sel mani, atau berarti tiap 2 tetes (100 μ l) juga mengandung 1 juta sel mani (Pavasuthipaisit *et al.*, 1992).

Keberhasilan maturisasi oosit, selain tergantung dari media dan zat aditifnya, juga tergantung kualitas inkubator CO_2 yang dipakai. Inkubator yang baik akan dapat mendistribusikan dan mengatur konsentrasi CO_2 secara tetap merata dan dengan suhu tidak terlalu banyak berubah sekitar $38^\circ C$. Inkubasi dalam media Tc 199 selama 18 dan 24 jam tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap angka maturisasi yaitu masing-masing 71% dan 76% (Povokofiev *et al.*, 1992). Tetapi angka tersebut sangat berbeda apabila lamanya waktu inkubasi berbeda, yaitu hanya 2% oosit mature pada inkubasi selama 12 jam dan akan meningkat menjadi 67% bila maturisasi selama 20 jam (Chian *et al.*, 1992).

Empat puluh delapan jam setelah fertilisasi, embrio yang berkembang dengan baik sudah ditemukan dalam bentuk empat atau enam sel blastomer, selanjutnya berkembang menjadi morula masing-masing dengan keberhasilan 64,3% dan 59,2%. Namun demikian, keberhasilan perkembangan embrio dengan dua sel blastomer menjadi morula setelah 48 jam fertilisasi hanya 3,6% (Povokofiev *et al.*, 1992).

Inseminasi Buatan

Pada proses perkawinan secara buatan (Inseminasi Buatan, IB) semen dalam kemasan straw, setelah melalui proses thawing, dengan menggunakan alat inseminasi (*insemination gun*) ditumpahkan ke dalam *canalis cervicalis*. Hal ini dimaksudkan agar proses-proses yang dijalankan oleh fungsi lendir serviks dapat terjadi dengan baik. Spermatozoa yang dapat menembus lendir serviks selanjutnya akan menuju ke dalam uterus, melewati *Utero Tubal Junction* (UTJ) sampai ke tempat fertilisasi yaitu pada tuba fallopii. Setelah memasuki ampula sel-sel spermatozoa akan menjadi aktif karena adanya bikarbonat, piruvat, asam amino bebas, oksigen, steroid dan nukleosida (Hafez, 1993).

Pada waktu salah satu sel spermatozoa berhasil menemukan ovum, pada saat itu ovum masih terbungkus oleh sel-sel granulosa yang berasal dari folikel. Sel-sel granulosa tersebut akan diikat oleh asam hyaluronat. Spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi, di bagian kepalanya banyak mengandung enzim hyaluronidase yang berfungsi melisiskan asam hyaluronat pada zona pellusida. Setelah menembus zona pellusida sel spermatozoa selanjutnya akan bersentuhan dengan membran vittelin. Pada saat itu terjadilah reaksi zona agar tidak dapat ditembus oleh sel spermatozoa lain. Reaksi zona terjadi akibat dilepaskannya suatu zat oleh granula kortika yang terdapat diluar membran vittelin. Reaksi ini dimulai di sekitar lubang tembus zona pelusida yang dibuat oleh Sel

spermazoa, kemudian meluas sampai ke seluruh permukaan zona pelusida. Setelah kepala spermatozoa menembus membran vitelin terjadilah reaksi ovum. Pada tempat persentuhan tersebut akan terjadi tonjolan kecil yang berasal dari membran vitelin. Pada saat yang bersamaan kepala spermatozoa masuk ke dalam sitoplasma ovum (Fuquai dan bearden, 1980). Setelah spermatozoa bersatu dengan ovum maka terbentuklah zigot yang bersifat diploid dan mampu mengadakan pembelahan.

Biakan Embrio dan Transfer Embrio hasil FIV

Embrio stadium awal banyak memerlukan asam amino dibanding kebutuhan glukosa dalam medianya. Media Rosencreen (CR1-aa) selain keseimbangan mineral juga banyak mengandung asam amino baik BME (Basal Medium Essential asam amino) dan Minimum amino acid Essential (MEM) yang sesuai untuk pembiakan embrio stadium awal. Basal Medium Essential asam amino dapat menghilangkan hambatan pertumbuhan stadium awal embrio selanjutnya MEM merangsang pembelahan embrio (Hahn, 1994). Penambah glukosa pada stadium awal embrio sapi dapat menghambat pertumbuhan untuk menjadi morula atau blastosis (Elliyton et al., 1990; Kim et al., 1993; Bavister et al., 1993). Adanya glukosa dalam medium akan meningkatkan terjadinya proses glikolisis, sehingga produk samping dari glikolisis tersebut dapat mengganggu respon tumbuh dari embrio sapi, kambing pada stadium awal perkembangan embrio tersebut (Schini dan Bavister, 1988; Seshogiri dan Bavister, 1991).

Demikian pula penambahan 20 asam amino dengan BSA akan dapat meningkatkan jumlah embrio sapi yang membelah dari satu sel menjadi morula. Pada stadium 8 sel ditemukan banyak sintesis protein lewat DNA dan RNA dan pembentukan protein kembali lebih banyak untuk sumber energi juga dibantu oleh proses diaminase asam amino (More *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1993). Serum dibutuhkan dalam perkembangan embrio dari 16 sel menjadi blastosis sebab serum mengandung faktor penumbuh dasar embrio ekstra seluler berupa fibronectin (Pinyopummint dan Bavister, 1994). Makin tinggi stadium embrio makin tinggi keperluan proteinnya. Adanya bahan dasar faktor penumbuh seperti fibronectin dan mitogen dapat mengontrol tingkat proliferasi dan diferensiasi sebagai efek hormon gonadotropin dan steroid yang ditambahkan pada media atau yang ada dan dikeluarkan oleh kumulus (Mercola dan Stile, 1988; Pinyopummint dan Bavister, 1994).

Transfer embrio hasil FIV, dilakukan dalam media yang mengandung modified phosphat buffer saline dulbecco's (MDPBS). Media ini mengandung berbagai jenis mineral keseimbangan pH ditambah glukosa, foetal Bovine serum (FBS) sebagai nutrisi dan antibiotika sebagai anti pertumbuhan kuman (Elsden dan Seidel, 1985). Embrio fase morula dan blastula (yang dikenal lebih tahan terhadap suasana lingkungan baru) dihisap ke dalam straw bening berukuran 250 ul dengan urutan media - udara - embrio + media - udara - media. Dengan menggunakan alat inseminasi buatan embrio kemudian didepositkan

di dalam lumen kornua uteri bagian kranial. Transfer dilakukan pada resipien yang sudah dilakukan sinkronisasi birahi dengan $PGF_{2\alpha}$ pada 6 - 7 hari setelah timbulnya birahi, dengan asumsi berada pada stadium luteal. Fase luteal ini dapat dikonfirmasi dengan kadar progesteron $\geq 0,75$ ng/ml (Mahaputra *et al.*, 1990; Mohamed *et al.*, 1990).

Perkembangan Embrio Intra Uterin

Periode kebuntingan dimulai dari saat ovum mengalami fertilisasi oleh spermatozoa sampai dengan terjadinya kelahiran normal. Lamanya periode kebuntingan pada tiap spesies hewan berbeda-beda. Pada sapi kebuntingan berlangsung selama 280 hari atau berkisar antara 270 - 292 hari (Knickerbocker, 1986).

Periode kebuntingan ini dibagi dalam tiga periode yaitu periode ovum, periode embrio dan periode foetus. Periode ovum sebagian terjadi pada tuba fallopii dan sebagian yang lain dalam uterus. Pada sapi periode ini berlangsung sejak saat ovulasi sampai dengan hari ke-12 (Mahaputra, 1993). Selama periode ovum, pembelahan berlangsung di tempat pertemuan ampulla isthmus tuba fallopii. Di sini perkembangan sel-selnya mencapai stadium morula yang ditandai massa sel luar dan sel dalam sebanyak 16-32 sel.

Pada sapi, morula memasuki uterus pada hari ke-4 sampai 5 sesudah pembuahan. Mulai pada hari ke-7 sampai 8 zona pelusida terbagi atas fragmen-fragmen membentuk ruangan

berongga yang disebut *blastocole* (Knickerbocker, 1986). Cairan *blastocole* berasal dari cairan uterus yang diserap secara aktif. Bahan makanan embrio sebelum implantasi terdiri dari lemak yang berkumpul di dalam epitel uterus, bersama reruntuhan seluler dan leukosit di dalam lumen uterus membentuk susu uterus (*histiotrof*). Pada ternak hubungan antara darah induk dengan fetus tidak terlalu erat sehingga susu uterus menjadi sangat penting sepanjang masa kebuntingan (Toelihere, 1985). Blastosis sapi masuk ke dalam uterus tidak langsung mengadakan implantasi, tetapi terapung bebas selama 7-9 hari. Pada hari ke-12 blastula baru berhenti terapung bebas dan menetap di suatu tempat kemudian bertaut secara longgar pada dinding uterus (Hafez, 1993 ; Hardjopranjoto, 1990 dan Mahaputra, 1993).

Pada proses implantasi blastosis akan bersarang di dalam uterus induk sehingga terjadi hubungan antara selaput ekstra embrional dengan selaput lendir uterus (Hardjopranjoto, 1990). Pada saat implantasi terjadi, mukosa uterus sedang berada dibawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh Korpus luteum. Pengaruh progesteron dimulai pada hari ke-3 sampai 5 setelah ovulasi dan mencapai puncaknya pada hari ke-15 sampai 17 (Mahaputra *et al.*, 1990).

Pada sapi proses implantasi dimulai pada hari ke-11 sampai 40 setelah pembuahan dengan rincian : awal implantasi hari ke-12 sampai 13, mulai menetap disuatu tempat dalam uterus hari ke-13 sampai 18, mulai bertaut 28-32 hari dan

pertautan lengkap terjadi 40-45 hari setelah saat ovulasi (Mahaputra, 1993).

Adanya kebuntingan dapat dideteksi dengan berbagai cara baik secara klinis maupun laboratoris. Secara klinis dapat dilakukan dengan mengamati tidak kembalinya birahi 21 hari setelah inseminasi, namun yang paling banyak dipakai adalah pemeriksaan palpasi rektal sejak 45 hari setelah inseminasi. Pemeriksaan kebuntingan dapat pula dilakukan secara laboratorium. Teknis yang cukup populer dewasa ini adalah dengan peneraan kadar progesteron serum atau plasma atau air susu sejak 21 hari usia kebuntingan. Pada sapi yang bunting kadar progesteron darah hari ke 21-24 mencapai 2,5-3,3 ng/ml dan akan dipertahankan sampai akhir kebuntingan (Mahaputra, 1993). Namun pada sapi yang disuntik dengan preparat progesteron eksogen depot intra muskuler, diagnosis kebuntingan dengan peneraan kadar hormon progesteron menjadi tidak akurat, sebab depot hormon progesteron tersebut mampu bertahan sampai tiga bulan.

Kematian embrio perlu dibedakan dengan kegagalan fertilisasi. Pada sapi yang sistem reproduksinya normal, *fertilization rate* mencapai 85-95 % (kerugian akibat kegagalan fertilisasi dapat mencapai 15 %), sedangkan kerugian akibat kematian embrio bisa mencapai 25 % (Hafez, 1993).

Kematian ovum setelah pembuahan dapat dihubungkan dengan siklus birahi induknya. Siklus birahi yang lama atau tidak menentu dapat disebabkan oleh kematian dan pengeluaran

embrio. Kematian ovum yang telah dibuahi dapat disebabkan oleh ovum yang cacat dan akan diabsorpsi setelah mati (Toelhere, 1985). Apabila terjadi kematian embrio kurang dari 19 hari, maka sapi akan kembali birahi dengan lama birahi yang normal. Tetapi apabila kematian embrio terjadi setelah hari ke-19 setelah pembuahan maka korpus luteum akan dipertahankan beberapa lama, baru kemudian terjadi birahi dengan siklus birahi yang normal. Tidak teraturnya siklus birahi terutama adanya perpanjangan siklus birahi merupakan indikasi terjadinya kematian embrio. Perkiraan berdasarkan pemantauan kadar progesteron dan timbulnya kembali estrus dalam waktu yang tidak teratur menunjukkan bahwa kematian embrio akhir atau kematian foetalis berkisar antara 5-10 % (Hafez, 1993).

Salah satu faktor penyebab kematian embrio dini adalah karena ketidak seimbangan hormonal estrogen - progesteron. Periode kehidupan embrio yang kritis adalah stadium akhir bkastosis. Secara normal adanya embrio dalam uterus mencegah pengeluaran $PGF_2\alpha$ dan mendorong perkembangan korpus luteum. Kemampuan korpus luteum menghasilkan progesteron dapat mempertahankan kebuntingan. Penurunan kemampuan korpus luteum dalam menghasilkan progesteron dapat diikuti kematian embrio atau kematian fetus (Hardjopranjoto, 1996). Keadaan ini dapat diatasi dengan pemberian preparat progesteron eksogen. Salah satu preparat progesteron yang saat ini secara luas dipakai sebagai preparat kontrasepsi di Indonesia adalah Medroxy Progesterone Acetate (MPA). Preparat ini mempunyai daya kerja

yang lebih kuat dan apabila disuntikkan secara intra muskuler dalam bentuk suspensi mempunyai daya kerja yang lebih lama dibandingkan progesteron murni. Pada hewan preparat MPA menyebabkan perkembangan glandular endometrium, mempertahankan kebuntingan, menunda parturasi, menghambat ovulasi dan menekan siklus birahi (Anonymous, 1992).

Pada kebuntingan kembar kebutuhan progesteron untuk mempertahankan kehidupan intra uterin lebih tinggi dari pada kebuntingan tunggal. Secara normal, pada kebuntingan kembar fraternal kadar progesteron darah 21 hari setelah inseminasi sebesar 5-5,5 ng/ml (Mahaputra, 1993 ; Srianto, 1995).

Kebuntingan dan Diagnosa Kebuntingan

Secara fisiologis periode kebuntingan dimulai dari saat ovum mengalami fertilisasi oleh spermatozoa sampai dengan terjadinya kelahiran. Lamanya periode kebuntingan pada tiap spesies hewan berbeda-beda. Pada sapi perah FH kebuntingan berlangsung selama 280 hari atau berkisar antara 270 - 292 hari (Knickerbocker, 1986).

Periode kebuntingan ini dibagi dalam tiga periode yaitu periode ovum, periode embrio dan periode foetus. Periode ovum sebagian terjadi pada tuba fallopii dan sebagian yang lain dalam uterus. Pada sapi periode ini berlangsung sejak saat ovulasi sampai dengan hari ke-12 (Mahaputra, 1993). Selama periode ovum, pembelahan berlangsung di tempat pertemuan ampula isthmus tuba fallopii. Di sini perkembangan sel-selnya

mencapai stadium morula yang ditandai massa sel luar dan sel dalam sebanyak 16-32 sel. Pada mamalia pembelahan sel telur akan berlanjut menghasilkan mikromer dan makromer. Mikromer akan berkembang menjadi tropoblas, sedangkan makromer akan menjadi *inner cell mass* yang kelak akan berkembang menjadi embrio setelah implantasi. Kecepatan pembelahan dipengaruhi oleh jumlah serta distribusi kuning telur yang terdapat dalam sel telur itu (Hardjopranto, 1990). Pada stadium 2-4 sel kemampuan berkembang blastomer bersifat totipoten atau pluri-poten, yaitu blastomer sanggup berdeferensiasi secara luas. Sedangkan kemampuan berkembang blastomer pada stadium yang lebih lanjut menjadi terbatas atau bersifat unipoten.

Pada sapi, morula memasuki uterus pada hari ke-4 sampai 5 sesudah pembuahan. Mulai pada hari ke-7 sampai 8 zona pelusida terbagi atas fragmen-fragmen membentuk ruangan berongga yang disebut *blastocole* (Knickerbocker, 1986). Cairan *blastocole* berasal dari cairan uterus yang diserap secara aktif. Bahan makanan embrio sebelum implantasi terdiri dari lemak yang berkumpul di dalam epitel uterus, bersama reruntuhan seluler dan leukosit di dalam lumen uterus membentuk susu uterus (*histiotrof*). Pada ternak hubungan antara darah induk dengan fetus tidak terlalu erat sehingga susu uterus menjadi sangat penting sepanjang masa kebuntingan (Toelihere, 1985). Blastosis sapi masuk ke dalam uterus tidak langsung mengadakan implantasi, tetapi terapung bebas selama 7-9 hari. Pada hari ke-12 blastula baru berhenti terapung

bebas dan menetap di suatu tempat untuk kemudian bertaut secara longgar pada dinding uterus (Hafez, 1987 ; Hardjopranojoto, 1990 dan Mahaputra, 1993).

Periode embrio dan organogenesi pada sapi berlangsung dari hari ke-13 sampai 45 sejak pembuahan (Hafez, 1987 ; Hardjopranojoto, 1990 dan Mahaputra, 1993). Periode ini ditandai dengan adanya selaput embrio. Dengan selaput itulah embrio menempel pada dinding uterus. Pada periode embrio plasenta merupakan satu-satunya sumber makanan bagi anak selama di dalam kandungan. Plasenta mengandung tiga macam enzim, yaitu enzim yang bekerja dalam aktifitas seluler, enzim yang berfungsi katalis untuk proses pengangkutan aktif dan enzim yang bekerja dalam aktivitas khusus seperti biosintesa hormon steroid. Zat-zat yang diangkut melalui plasenta adalah gas-gas (Oksigen masuk dan karbon-dioksida keluar), air, zat anorganik (Na, Fe, Cu, Mn, Ca dan P) serta zat-zat organik seperti fruktosa, asam lemak, gliserol, vitamin A, D dan E (Toelihere, 1985). Pada periode ini berbagai organ tubuh telah terbentuk, mata telah terbentuk, terjadi pematangan jaringan sehingga kerangka fetus akan berkembang (Hafez, 1987 dan Djanuar, 1985)

Periode pertumbuhan fetus pada sapi berlangsung mulai hari ke-46 masa kebuntingan sampai kelahiran. Pada periode ini terjadi perubahan-perubahan diferensiasi organ. Karunkula dan kotiledon pada mukosa uterus berkembang untuk memberi makan fetus. Pada akhir kebuntingan fetus telah sanggup hidup

dimana saluran pencernaan dan saluran pernafasan telah siap untuk memulai fungsinya (Hafez, 1987 dan Djanuar, 1985).

Adanya kebuntingan dapat dideteksi dengan berbagai cara baik secara klinis maupun laboratoris. Secara klinis dapat dilakukan dengan mengamati tidak kembalinya birahi 21 hari setelah inseminasi, namun yang paling banyak dipakai adalah pemeriksaan palpasi rektal sejak 45 hari setelah inseminasi. Pemeriksaan kebuntingan dapat pula dilakukan secara laboratorium. Teknis yang cukup populer dewasa ini adalah dengan peneraan kadar progesteron serum atau plasma atau air susu sejak 21 hari usia kebuntingan. Pada sapi yang bunting kadar progesteron darah hari ke 21-24 mencapai 2,5-3,3 ng/ml dan akan bertahan sampai akhir kebuntingan (Mahaputra, 1993).

Kematian Embrio Dini dan Kematian Foetalis

Kematian embrio perlu dibedakan dengan kegagalan fertilisasi. Pada sapi-sapi yang sistem reproduksinya normal, *fertilisation rate* mencapai 85-95 %. Dengan demikian kerugian akibat kegagalan fertilisasi ini dapat mencapai 15 %, sedangkan kerugian akibat kematian embrio bisa mencapai 25 % (Roche, 1986).

Kematian embrio setelah pembuahan dapat dihubungkan dengan siklus birahi induknya. Siklus birahi yang lama atau tidak menentu dapat disebabkan oleh kematian dan pengeluaran embrio. Kematian embrio yang telah dibuahi dapat disebabkan oleh ovum yang cacat dan akan diabsorpsi setelah embrio mati

(Toelihere, 1985). Apabila terjadi kematian embrio kurang dari 19 hari, maka sapi akan kembali birahi dengan lama birahi yang normal. Tetapi apabila kematian embrio terjadi setelah hari ke-19 setelah pembuahan maka korpus luteum akan dipertahankan beberapa lama, baru kemudian terjadi birahi dengan siklus birahi yang normal. Tidak teraturnya siklus birahi terutama adanya perpanjangan siklus birahi merupakan indikasi terjadinya kematian embrio. Perkiraan berdasarkan pemantauan kadar progesteron dan timbulnya kembali estrus dalam waktu yang tidak teratur menunjukkan bahwa kematian embrio akhir atau kematian foetalis berkisar antara 5-10 % (Roche, 1986).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian :

1. Untuk mengetahui viabilitas embrio hasil FIV pada uterus sapi tujuh hari setelah inseminasi dengan dan tanpa suplementasi hormon progesteron eksogen.
2. Untuk mengetahui apakah TE ke dalam uterus sapi tujuh hari setelah inseminasi tidak mengganggu viabilitas embrio hasil IB.
3. Untuk mengetahui efisiensi reproduksi dengan meningkatkan jumlah kelahiran kembar.
4. Untuk menemukan berapa dosis progesteron eksogen yang tepat untuk mempertahankan kebuntingan kembar pada resipien tanpa perlakuan superovulasi.

Manfaat Penelitian :

1. Apabila penelitian dengan embrio segar ini menunjukkan hasil sesuai dengan yang diharapkan maka terbuka peluang untuk pelaksanaan TE segar secara luas dengan mengikuti pelaksanaan IB yang saat ini sudah memasyarakat dalam usaha peternakan sapi di Indonesia, dan dapat

diteruskan dengan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui viabilitas embrio beku hasil FIV dalam uterus sapi perah tujuh hari setelah IB.

2. Apabila dengan embrio bekupun menampakkan hasil yang sama, maka teknik ini dapat dipakai sebagai alternatif pelaksanaan TE secara praktis, lebih murah dan dapat dilaksanakan setiap waktu sesuai dengan ritme pelaksanaan IB di lapangan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

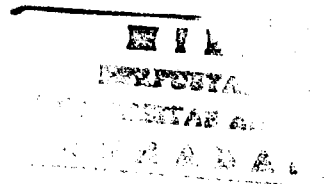
Penelitian ini dilakukan dengan hewan coba sapi perah milik beberapa peternakan perusahaan susu sapi perah (berdomisili di sekitar Jalan Bendul Merisi Besar) anggota Koperasi Harum Kotamadya Surabaya. Fertilisasi in Vitro untuk menghasilkan embrio sapi Madura dilakukan di Sub Laboratorium Fertilisasi in Vitro, Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Kegiatan penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli sampai dengan Desember 1997.

1. MATERI PENELITIAN

1.1. Hewan Coba

Hewan coba untuk penelitian ini adalah 40 ekor sapi perah Frisian Holstein (FH) betina yang pernah beranak 1 - 2 kali. Kecuali beberapa variabel perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini, faktor-faktor lain yang meliputi jumlah dan mutu pakan yang diberikan, cara pemeliharaan serta cara pemerahannya dilakukan seperti biasa selama ini dilaksanakan di peternakan tersebut.

Sebelum perlakuan dilaksanakan, terlebih dahulu dilakukan anamnesis pada pemilik ternak tentang kesehatan reproduksi ternaknya yaitu untuk mengetahui bahwa hewan coba tidak memiliki sejarah terkena penyakit reproduksi atau



penyakit lain yang berpengaruh terhadap sistem reproduksinya. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan palpasi per rektal untuk meyakinkan bahwa masing-masing hewan coba sedang tidak bunting, tidak memiliki kelainan anatomis organ reproduksi, tidak sedang terjangkit penyakit reproduksi dan sedang dalam fase luteal (teraba adanya korpus luteum fungsional).

1.2. Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan habis pakai yang diperlukan dalam penelitian ini terdiri dari : Prostaglandin F_{2a} analog (Glandin, TAD, Jerman), Aquadest steril, Nitrogen Cair, Semen beku sapi FH dan sapi Madura (produksi Balai Inseminasi Buatan Singosari, Malang), ovarium sapi Madura (dari Rumah Pemotongan Hewan Pegirian, Surabaya), Straw transparan (france) serta media-media Fertilisasi in Vitro, yaitu Millipore 0,22 μ m (Sartorius-Minisart, NML), Earle's Balanced Salt Solution (Sigma), Tissue Culture Medium 199 (Sigma), Foetal Calf Serum (Sigma), Bovine serum albumin (Sigma), Bufer Hepes (Sigma), Heparin (Sigma), Penicillin (Sigma), Gentamycin (Sigma, USA), Streptomycin sulfat (Meiji), Na Cafein (Sigma), Bufer fosfat saline dulbecco's (Sigma), Minyak mineral (Sigma), Disposable poly prophylyene petri dish (Sigma), Disposable pipet pasture (Nipro), Disposable culture bottle (Sigma), Follicle stimulating hormon (bFSH, USA), Luteinizing Hormon (bLH, USA), Serum sapi birahi (ECS), dan Serum kuda birahi (EMS).

1.3. Alat-alat Penelitian

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi : Disposable syringe 10 ml, Kateter intra uterin, sarung tangan plastik untuk eksplorasi per rektal, plastik inseminasi buatan (plastic sheath), alat inseminasi buatan (Artificial Insemination Gun), Container nitrogen cair dan peralatan-peralatan Fertilisasi in Vitro, yaitu inkubator Co₂ (Thermolyne, USA), Laminar flow (Speg Air Tech, PRC), Hot plate - magnetic stirer (Labinco, Holland), Mikroskop bisecting (Meiji), Mikroskop Inverted (Meiji), Waterbath (Memmerf), mikro pipet (Eppendorf, Gmn), Freezer (Sharp, Japan), Refrigerator (Sharp, Japan), Centrifugator (EBA-3S, Hettich), Timbangan listrik (Electronic Balance, Chyo), Sterilisator (Aesculap-Werketuttlingen, Germany), Thermometer digital +99^oC sampai - 40 ^oC (Hanna, Instruments), pH meter (Hanna, Singapore), Vortex mixer (Thermolyne, USA), Warm plate, Parafilm (National Can, Amerika) dan Petri dish 36 mm (Nuclon, Denmark).

2. METODE PENELITIAN

2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental penerapan teknologi di lapangan (peternakan sapi perah) berupa aplikasi teknologi transfer embrio sapi Madura hasil penelitian Fertilisasi in Vitro di laboratorium yang telah dilakukan sebelumnya.

Rancangan percobaan yang dipakai adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan, masing-masing menggunakan sepuluh ulangan dengan hewan coba sapi perah FH.

Pada masing-masing kelompok selanjutnya diberi perlakuan sebagai berikut :

- Kelompok I : PGF_{2α} + IB
- Kelompok II : PGF_{2α} + IB + MPA 100 mg. + TE.
- Kelompok III : PGF_{2α} + IB + MPA 150 mg. + TE.
- Kelompok IV : PGF_{2α} + IB + MPA 200 mg. + TE.

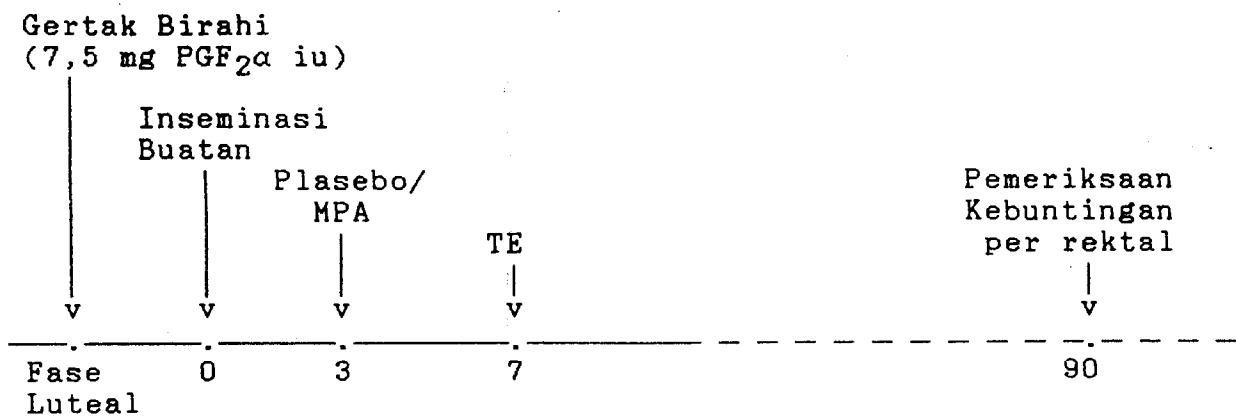
2.2. Perlakuan Hewan Coba

Empat puluh ekor sapi perah penelitian dibagi secara acak menjadi empat kelompok percobaan. Untuk memudahkan jadwal pelaksanaan penelitian kepada hewan coba dilakukan penyerentakan birahi dengan pola dua kali pemberian deposit Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) analog intra uterin masing-masing dengan selang waktu 11 hari. Inseminasi Buatan (IB) dilakukan dengan semen beku dalam kemasan *straw* dari pejantan sapi FH (produksi Balai Inseminasi Buatan Singosari, Malang) 8-10 jam dari saat munculnya tanda-tanda birahi setelah pemberian PGF_{2α} kedua.

Penyuntikan Medroxy Progesterone Acetate (MPA) dilakukan secara intra muskuler pada hari ketiga setelah IB. Pelaksanaan TE menggunakan embrio segar sapi madura (hasil FIV di Sub Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Unair) dilakukan hari ketujuh setelah IB. Embrio

ditempatkan kolateral (berlawanan tempat dengan keberadaan korpus luteum) pada apeks kornua uteri dengan menggunakan alat IB (*Artificial Insemination gun, AI gun*).

Secara skematis jadwal pelaksanaan penelitian ini digambarkan sebagai berikut :



Gambar 1. Gambaran Skematis Jadwal Pelaksanaan Penelitian

2.3. Prosedur Pembuatan Embrio Sapi Madura

2.3.1. Maturasi Oosit

Sepuluh sampai 20 ovarium sapi Madura diambil dari rumah potong hewan (RPH) Surabaya dalam satu kali proses IVM/IVF. Ovarium tersebut dibawa ke laboratorium Fertilisasi In vitro Fakultas Kedokteran Hewan dengan perantaraan termos yang berisi cairan fisiologis dan antibiotika dengan suhu 36^o-38^oC. Semua folikel yang berdiameter 1-5 mm dilakukan aspirasi dari jaringan ovarium

di luar bagian jaringan folikel yang menghadap keluar dengan perantaraan jarum 18G dan berisi cairan pencuci oosit (OWS), dengan tusukan satu kali pada jaringan ovarium tapi menusuk 3-4 folikel tanpa mencabutnya. Aspirasi oosit dari ovarium dilakukan satu persatu sedangkan sisa yang belum diaspirasi tetap dijaga pada suhu 36 - 38°C di dalam air penghangat (waterbath). Selanjutnya semua oosit yang terkumpul dicuci dengan Oocyte Washing Solution (OWS) tiga kali dan sekali terakhir dengan masing-masing media maturisasi. Ada tiga macam media untuk maturisasi oosit yaitu Tissue culture medium 199 (TC 199) + 5 ng/ml b-FSH + 25 ng/ml b-LH media + 1 µg/ml Estradiol 17β (E₂) ; Tissue culture medium + 10% serum sapi birahi (Tc + ECS) ; dan Tissue culture medium + 10% serum kuda birahi (Tc + EMS).

Ke dalam tiap tetes (50 µl) TC199 yang telah ditutup dengan minyak parafin ditransferkan 10 buah oosit lalu diinkubasikan selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂ kelembaban 95-99% (Thermolyne-USA). ECS yang dipakai mengandung kadar progesteron 0,0 ng/ml dan Estradiol 10,0 pg/ml, sedangkan EMS mengandung kadar progesteron 0,0 ng/ml dan estradiol 190 ng/ml.

2.3.2. Preparasi Sel Mani

Satu mini straw mani beku sapi Madura unggul (Komadur, BIB Singosari) dilakukan pengenceran dengan air hangat 36-38°C selama 1 menit, lalu dimasukkan kedalam tabung keru

cut (coil tube) yang sudah berisi 1,0 ml Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) untuk kemudian diputar dalam sentrifuge dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Pencucian diulangi sekali lagi dengan metoda yang sama, setelah meninggalkan peletnya sekitar 100 μ l. Tiga puluh menit sebelum semen disentrifuge, telah disiapkan pula tetes EBSS bentuk rosset dalam cawan petri polypropylene berpenampang 36 mm (Nuclon, Denmark) yaitu 90 μ l EBSS yang berada di pusat petri yang dikelilingi secara sentripetal dengan 10 tetes masing-masing 10 μ l EBSS. Setelah sentrifuge sel mani selesai semua cairan pencuci EBSS yang berada di atas endapan sel mani (pellet) dibuang dengan cara menghisap menggunakan pipet Pastur sehingga yang tinggal 100 μ l bersama pellet. Dengan menambahkan 500 μ l EBSS lalu dibiarkan selama 30 menit dalam inkubator CO₂ untuk proses swimp up (sel-sel mani yang hidup dan motil akan berenang ke atas). Bagian atas campuran tersebut diambil 40 μ l setelah dilakukan perhitungan konsentrasi lewat Thoma lalu dimasukkan dalam drop EBSS bagian pusat Roset. Konsentrasi ini dibuat hingga mencapai 1,2 juta/40 μ l dengan cara menambahkan EBSS. Sebanyak 40 μ l campuran sel mani ini dimasukkan kedalam pusat rosset cawan petri yang berisi 90 μ l EBSS lalu kembali dimasukkan kedalam inkubator CO₂ selama 1 jam untuk kapasitasi. Sebagian pada petri yang lain percobaan ini dipakai hanya untuk menghitung jumlah sel mani yang hidup pada tiap drop roset sentripetal 10 μ l setelah 1 jam inkubasi terlewatkan.

2.3.3. Fertilisasi in Vitro

Semua oosit dihisap lalu dicuci 3 kali dengan OWS lalu diikuti dengan yang ke empat dengan EBSS. Setelah semua oosit bebas dari debris tapi masih mempunyai kumulus dimasukkan 5-7 buah ke dalam masing-masing tepi sentripetal roset yang berisi 10 μ l EBSS. Untuk mendapatkan fertilisasi lalu dimasukkan kembali dalam inkubator CO₂ selama 48 jam dan tiap 24 jam digoyang.

2.3.4. Evaluasi dan Pembenihan Embrio

Embrio yang berada pada stadium 2-16 sel blastomer setelah dicuci 3 kali dengan OWS dan sekali dengan Rosen Creen saja (CR1) atau CR1 + OCS dimasukkan masing-masing 5 embrio stadium yang sama dengan katagori embrio yang sama dalam 50 μ l tetes CR 1 dan dibiakkan selama 48 jam. Pembenihan ini diulangi lagi 48 jam dengan setiap 24 jam dilakukan goyangan kemudian hingga embrio mencapai stadium morula atau blastosis atau hari ke 8 selanjutnya disimpan beku -196°C.

2.4. Prosedur Transfer Embrio

Embrio yang sudah berada di dalam media DMPBS + 20% BCS dihisap ke dalam straw bening (French) 250 μ l dengan urutan : Media - Udara - Embrio dengan media - udara - media - malam seal. Embrio dibawa ke lapangan dengan perantaraan thermos yang berisi kotak kaca dan sekelilingnya diisi air hangat

37°C. Straw yang berisi embrio lalu dimasukkan kedalam alat transfer (gun - transfer), tutup seal malam digunting, selanjutnya dipasang plastik sheat, lalu ditransferkan ke dalam lumen kornua uteri dengan teknik rekto - vaginal.

3. VARIABEL PENELITIAN

Variabel yang diamati adalah : terjadinya kebuntingan (pemeriksaan per rektal) 3 bulan setelah IB (1), kelahiran pedet sapi perah (2), sapi madura (3), dan kembar perah-madura (4) pada sapi-sapi penelitian.

Pada laporan ini (dibuat bulan Desember 1997) hanya variabel kebuntingan yang dibahas, sedangkan variabel-variabel yang lain baru dapat diamati pada bulan Mei 1998.

4. RENCANA ANALISIS DATA

Berdasarkan sifat data yang diperoleh, maka analisis data direncanakan menggunakan uji Chi-kuadrat dengan tingkat kepercayaan 5% (Steel dan Torrie, 1991).

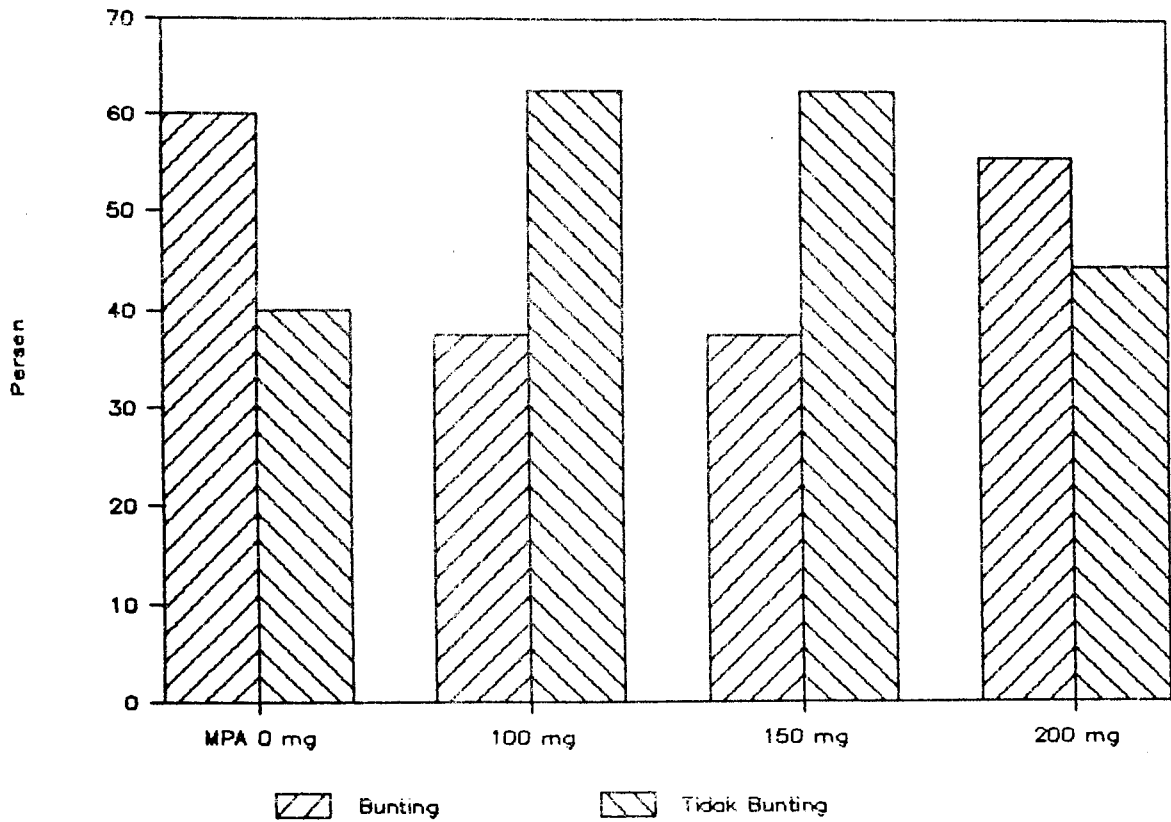
BAB V
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian, penelitian ini harus sudah selesai paling lambat tanggal 15 Desember 1997 (lima bulan sejak penandatanganan perjanjian). Sedangkan secara teknis penelitian ini baru tuntas setelah diketahui kelahiran sapi-sapi penelitian (\pm 280 hari setelah Inseminasi Buatan (IB) dilakukan, yaitu bulan Mei 1998) untuk mengetahui anak yang dilahirkan tersebut hasil inseminasi buatan (anak berupa pedet sapi Frisian Holstein, FH) atau hasil transfer embrio (anak berupa pedet sapi Madura). Dengan demikian pada laporan hasil penelitian ini data yang dapat diolah dan disajikan hanyalah hasil pemeriksaan kebuntingan yang dilakukan dengan cara palpasi per rektal 90 hari setelah IB, sebagaimana tercantum dalam tabel 1 dan gambar 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Kebuntingan setelah Transfer Embrio Tujuh Hari Pasca Inseminasi

Dosis MPA	Bunting (%)	Tidak Bunting (%)	Jumlah (%)
0 mg	6 (60 %)	4 (40 %)	10 (100 %)
100 mg	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	8 (100 %)
150 mg	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	8 (100 %)
200 mg	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)	9 (100 %)

Chi-kuadrat = 1,484 ; $p > 0,05$



Gambar 2. Diagram Bar Hasil Pemeriksaan Kebuntingan setelah Transfer Embrio Tujuh Hari Pasca Inseminasi

Dari empat puluh ekor sapi perah penelitian, masing-masing dua ekor pada kelompok perlakuan 100 dan 150 mg MPA, serta satu ekor dari kelompok 200 mg MPA dijual oleh pemiliknya sebelum evaluasi kebuntingan dapat dilakukan.

Dalam uji statistik terhadap data yang diperoleh ternyata tidak terdapat perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan ($\text{Chi-kuadrat} = 1,484$; $p > 0,05$). Berarti aplikasi transfer embrio menggunakan embrio sapi Madura hasil FIV pada sapi perah tujuh hari pasca inseminasi tidak mengganggu kehidupan intra uterin embrio pada resipien.

Hasil tersebut menunjukkan tiga kemungkinan yaitu :
Pertama, kehidupan embrio hasil IB ternyata tidak terganggu oleh perlakuan transfer embrio menggunakan embrio sapi Madura hasil FIV, yang dilakukan tujuh hari pasca inseminasi dengan suplementasi MPA. Kemungkinan ini menjadi kenyataan bila anak yang dilahirkan dari resipien adalah tunggal berupa pedet sapi FH. *Kedua*, embrio sapi Madura hasil FIV ternyata mampu menggantikan kedudukan embrio hasil IB yang gagal terbentuk oleh karena kegagalan fertilisasi atau kematian embrio dini. Kemungkinan ini menjadi kenyataan kalau anak yang dilahirkan kelak adalah berupa pedet sapi Madura. *Ketiga*, dengan suplementasi MPA, uterus sapi resipien mampu menampung embrio baik hasil IB dengan semen sapi FH maupun hasil transfer embrio menggunakan embrio sapi Madura hasil FIV. Kemungkinan ketiga ini terbukti apabila kelak anak yang dilahirkan resipien adalah kembar berupa pedet sapi FH dan pedet sapi Madura.

Mahaputra *et al.* (1997) melaporkan embrio stadium morula dan blastula segar yang tergolong klasifikasi bagus sekali atau bagus dalam pemeriksaan dibawah mikroskop yang ditransferkan tujuh hari pasca birahi (tanpa didahului IB) kepada sapi resipien FH, menghasilkan angka kebuntingan 38,5%. Angka kebuntingan ini hampir sama dengan angka kebuntingan yang dicapai sebelumnya dengan transfer embrio segar pada resipien sapi Madura, yaitu 33,3% (Mahaputra *et al.*, 1996). Menurut Mahaputra *et al.* (1997) resipien yang tidak menjadi bunting diakibatkan oleh adanya *anovulatory cycle*. Hal ini dapat terjadi karena sapi-sapi tersebut memiliki produksi susu yang tinggi (15 - 21 liter/hari), sehingga walaupun birahi, tetapi tidak diikuti ovulasi karena terhambatnya pelepasan LH akibat tingginya hormon prolaktin (PRL) untuk produksi susu. Dengan demikian untuk penelitian selanjutnya, pada sapi resipien FH yang memiliki produksi air susu tinggi perlu dilakukan penyuntikan hormon Human Chorionic Gonadotropin (hCG) pada akhir estrus setelah penyuntikan PGF_{2α} untuk sinkronisasi birahinya. Penyuntikan tersebut dimaksudkan untuk menjamin terjadinya ovulasi, karena pada hewan betina hCG bekerja layaknya LH. Sedangkan kejadian ovulasinya dapat dimonitor dari peneraan kadar progesteron dalam darah. Contoh darah untuk pemeriksaan tersebut dapat diambil dari vena Jugularis sebanyak tiga kali, yaitu pada saat penyuntikan PGF_{2α}, pada saat munculnya tanda-tanda birahi dan tiga hari kemudian. Peneraan kadar

progesteron dapat dilakukan pada serum atau plasma darah dengan menggunakan teknik Radio Immuno Assay (RIA). Sapi resipien dipastikan ovulasi apabila kadar hormon progesteron tinggi pada saat penyuntikan PGF₂ α (fase luteal), kemudian menjadi basal (mendekati nol) pada saat birahi dan tinggi lagi pada hari ketiga setelah birahi.

Sedangkan rendahnya angka kebuntingan pada kelompok perlakuan penelitian ini mungkin disebabkan terjadinya kontraksi rektum pada saat pelaksanaan transfer embrio. Adanya kontraksi tersebut mengharuskan tangan operator bertahan memegang kornua uteri, sehingga secara tidak sengaja terjadi peremasan pada kornua uteri tersebut. Dengan demikian pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan penyuntikan preparat anestesi secara epidural dengan Procain HCl sesaat sebelum pelaksanaan transfer embrio agar rektum dalam keadaan relaksasi pada saat transfer embrio dilaksanakan.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

1. Embrio sapi Madura hasil fertilisasi in vitro dapat ditransferkan kepada sapi FH tujuh hari pasca inseminasi dengan suplementasi hormon progesteron eksogen dengan persentase kebuntingan tidak berbeda nyata dibandingkan hasil inseminasi buatan saja.
2. Makin tinggi dosis hormon progesteron eksogen yang disuntikkan, makin tinggi persentase kebuntingan yang terjadi sampai dengan umur kebuntingan tiga bulan.

Saran :

1. Aplikasi transfer embrio sapi Madura hasil fertilisasi in vitro pada sapi perah tujuh hari pasca inseminasi dengan suplementasi progesteron sintetis dapat dicoba diterapkan secara komersial di peternakan.
2. Perlu penelitian lebih lanjut dengan dosis progesteron sintetis yang lebih tinggi disertai pemeriksaan profil hormon progesteron serum setelah perlakuan dan dengan menggunakan embrio beku.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 1992. Depo-Provera R. The Upjohn Company, USA.
- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1993. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morula and blastocyst in define culture media. *Theriogenology* 37 : 127-143.
- Bavister, B.D., 1994. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morula and blastocyst in defined culturemedia. *Theriogenology*. 37:127-146.
- Bongso, A. 1995. Standart Media are Used to Stimulate Sperm Motility in Human IVF. National University Hospital of Singapore.
- Chian, R.C., K. Niwa and H. Nakahara. 1992. Effect of sperm penetration invitro on completion of first meiosis by bovine oocyte arrested at various stages in culture. *J. Reprod. Fert* : 96, 73 - 78.
- Echterkamp, S.E., 1992. Fetal development in cattle with multiple ovulations. *J. Anim. Sci.* 1992 Aug. 70(8):2309-2321
- Ellington, J.E., E.W. Corney, B.P. Farrell, M.E. Simkin, R.H. Foote. 1990. Bovine 1-2 cell embryos development using a simple medium in three oviduct epithelial cell culture systems. *Biol. Reprod.* 43: 97 - 104.
- Elsden, R.P. and G.E. Seidel, Jr. 1985. Procedures for recovery, bisection freezing and transfer of bovine embryos. *Animal reprod. Laboratory. Colorado State University.*
- Fuquay, J.W. and H.J. Bearden., 1980. *Aplied Animal Reproduction.* Reston Publishing Company Inc. Virginia. p.106-107.
- Geisert, R.D., T.C. Fox, G.L. Morgan, M.E. Wells, R.P. Wettemann and M.T. Zavy. 1991. Survival of bovine embryos trasferred to progesterone treated asynchronous recipients. *J. Reprod. Fertil*; 1991 Jul; 92(2).
- Hafez, E.S.E. 1993. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation; transport and survival of gametes; fertilization. In : *Reproduction in Farm Animals.* Hafez Edition Ed. 6. Lea and Febiger Philadelphia. USA.
- Hahn, Chr. A.J. 1994. In Vitro Maturation, Fertilization and Culture of Bovine Oocytes in a Modified Menezo B2 medium. *J. Anim. Sci* 35:250-255.

- Hardjopranjoto, S. 1990. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Hardjopranjoto, S. 1996. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Hart-Elcock, L., R.D. Baker and H.W. Leipold, 1990. Growth of the early bovine fetus. Zentralbl-Veterinarmed-(A) May;37(4) p:249-299.
- Hinting, A. 1995. Tatalaksana teknik fertilisasi invitro pada pasangan yang menginginkan mempunyai anak. Lab. Bayi Tabung RS. Dr. Soetomo. Universitas Airlangga.
- Kim, J.H., K. Niwa, J.M. Lim and K. Okuda. 1993. Effect of phosphate energy substrst and amino acid on development of In Vitro-Matured, In Vitro-Fertilized bovine oocytes in a chemically defined protein-free culture medium. Biol.Reprod. 48:1320-1325.
- Knickerbocker, J.J., 1986. Endocrine Patterns During the Initiation of Puberty, the Estrous Cycle, Pregnancy and Parturition in Cattle, in Morrow, D.A. : Curent therapy in theriogenology 2nd Ed. W.B. SaundersCo, Philadelphia.
- Mahaputra, L., M. Hariadi, S. Hardjopranjoto, 1990. Radio-immuno assay of Milk Progesterone to Monitor Reproductive Performance in Small holder Dairy Herds in Indonesia. Proc. The Final Research Coordination Meeting. International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Mahaputra, L., 1993. Ilmu Kebidanan Veteriner I. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mahaputra, L., A. Hinting, S. Utama, P. Srianto, I. Mustofa. 1996. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi perah. Laporan HB II/4. DP3M. DIKTI.
- Mahaputra, L., A. Hinting, S. Utama, P. Srianto, I. Mustofa. 1997. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi perah. Laporan HB II/5. DP3M. DIKTI.
- Mercola, M. and C.D. Stile. 1988. Growth factor Superfamilies and mammalian embryos genesis. Development 102:451-464.
- Mohammed, A.R., R. Sivakanesan and R. Rajamahendran, 1990. Postpartum changes, oestrus detection and pregnancy in some dairy herds in Sri lanka. In. Proc. Int. Symp. on the use of nuclear technuques in different invironments. IAEA-SM-292/10P. Vienna-Austria.

- Moore G.P.M., S. Lintern Moore and L.S. Murphy. 1981. Relative changes in RNA contents of oocytes and preimplantation embryos of the mouse. *Reprod. Nutri. Development*. 21: 505-512.
- Mustofa, I., 1995. Pengaruh Penyuntikan PMSG dan Waktu Penyuntikan hCG yang Berbeda terhadap Profil Estrogen Serum dan Beberapa Variabel Reproduksi pada Sapi Perah. Tesis, Program Pascasarjana Unair.
- Pavasuthipaisit, K., Y. Kitiyanant, C. Thonabulsombat, C. Tocharus, S. Sriurairatna and K.L. White. 1992. In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo oocyte and their development. *Theriogenology*. 38; 545 - 555.
- Pinyopumint, T. and B.D. Bavister, 1994. Development of bovine embryos derived from in vitro matured/fertilized oocytes into morulae/blastocyst in a chemically defined, protein free culture medium. *Biol. Reprod.* 45: 736-742.
- Povokofiev, M.I., L.K. Ernst, N.M. Suraeva, I.S. Lagutina, N.N. Udavlennikova, A.Z. Kesyan and A.I. Dolgohatskiy. 1992. Bovine oocyte maturation fertilization and further development invitro and afater transfer into recipient. *Theriogenology*. 38; 461 - 469.
- Schini, S.A. and B.O. Bavister, 1988. Glucose inhibit development of hamster 8 cell embryos is caused by phosphate two cell block to development of cultured hamster embryos is cause by phosphate and glucose. *Biol. of Reprod.* 39: 1183-1192.
- Seike, N., M. Teranishi, S. Yamada, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanagawa, 1989. Increase in calf production by the transfer of bisecting bovine embryos. *Nippon-Juigaku-Zasshi*. 1989 Dec 51(6) p: 1193-1199.
- Seshogiri, P.B. and B.D. Bavister, 1991. Glucose inhibits development of hamster 8 cells embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 40: 599 - 606.
- Srianto, P., 1995. Profil Progesteron Serum pada Induksi Kebuntingan Kembar pada Sapi Perah Menggunakan Hormon PMSG. Tesis, Program Pascasarjana Unair.
- Steel, G.D. dan J.H. Torrie, 1991. Prinsip dan prosedur statistika, suatu pendekatan biometrik. Alih bahasa : Ir Bambang Sumantri, PT. Gramedia Jakarta. Hal 260-263.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung. hal: 21 - 58 ; 133 - 208.

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian Aplikasi Transfer Embrio Sapi Madura Hasil Ferfilisasi in Vitro pada Sapi Perah Tujuh Hari Pasca Inseminasi

Kode Sapi	Kejadian Birahi	Dosis MPA (mg)	Transfer Embrio	Pemeriksaan Kebuntingan	Keterangan Lain-lain
I.1.	+	-	-	-	
I.2.	+	-	-	+	
I.3.	+	-	-	-	
I.4.	+	-	-	-	
I.5.	+	-	-	+	
I.6.	+	-	-	+	
I.7.	+	-	-	+	
I.8.	+	-	-	-	
I.9.	+	-	-	+	
I.10.	+	-	-	+	
II.1.	+	100	1	-	Metestrus
II.2.	+	100	1	-	
II.3.	+	100	1	+	
II.4.	+	100	2	-	
II.5.	+	100	2	+	
II.6.	+	100	1	?	Dijual
II.7.	+	100	1	-	
II.8.	+	100	1	-	
II.9.	+	100	2	?	Dijual
II.10.	+	100	2	+	
III.1.	+	150	1	+	
III.2.	+	150	1	+	
III.3.	+	150	1	-	
III.4.	+	150	2	-	
III.5.	+	150	1	+	
III.6.	+	150	1	-	
III.7.	+	150	1	-	
III.8.	+	150	1	?	Dijual
III.9.	+	150	2	-	
III.10.	+	150	2	?	Dijual
IV.1.	+	200	2	+	
IV.2.	+	200	2	-	
IV.3.	+	200	2	?	Dijual
IV.4.	+	200	1	+	
IV.5.	+	200	2	+	
IV.6.	+	200	1	+	
IV.7.	+	200	1	-	
IV.8.	+	200	1	-	
IV.9.	+	200	1	-	
IV.10.	+	200	2	+	

Lampiran 2. Uji Chi-kuadrat Hasil Aplikasi Transfer Embrio Sapi Madura Hasil Ferfilisasi in Vitro pada Sapi Perah Tujuh Hari Pasca Inseminasi

----- CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS -----
OBSERVED FREQUENCIES

Perlakuan	Bunting	Tidak	TOTAL
Kontrol	6	4	10
100 mg MPA	3	5	8
150 mg MPA	3	5	8
200 mg MPA	5	4	9
TOTAL	17	18	35

CHI-SQUARE = 1.484, D.F. = 3, PROB. = .6860