

38^c/DL.

29 OCT 2003



PENELITIAN HIBAH PROYEK DUE-LIKE

USUL PENELITIAN
HIBAH PROYEK DUE-LIKE
TAHUN ANGGARAN 2002/2006



PRODUKSI PMSG (PREGNANT MARE SERUM GONADOTHPIN)
DALAM NEGERI DARI KUDA INDONESIA SEBAGAI UPAYA
MENINGKATKAN KUALITAS DAN POPULASI
SAPI DI INDONESIA

Peneliti

Drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes
Drh. Widjiati Msi

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Mei, 2002

570

PENELITIAN HIBAH PROYEK DUE-LIKE

USUL PENELITIAN
HIBAH PROYEK DUE-LIKE
TAHUN ANGGARAN 2002/2006



PRODUKSI PMSG (PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN)
DALAM NEGERI DARI KUDA INDONESIA SEBAGAI UPAYA
MENINGKATKAN KUALITAS DAN POPULASI
SAPI DI INDONESIA

Peneliti

Drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes
Drh. Widjiati Msi

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Mei, 2002

**TITULUS : PRODUKSI PMSG (PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN)
DALAM NEGERI DARI KUDA INDONESIA SEBAGAI UPAYA
MENINGKATKAN KUALITAS DAN POPULASI SAPI DI INDONESIA**

Ketua Peneliti

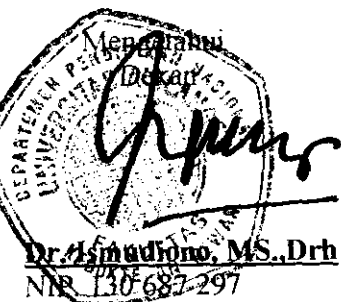
Nama : Drh. Kuncoro Puguh Santoso. M.Kes
Jenis Kelamin : Pria
Pangkat/Golongan : Penata Muda Tingkat I / III B
NIP : 132 014 463
Jabatan : Asisten Ahli
Fakultas : Fakultas Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 4,5 Bulan

Biaya yang diajukan (Th. Ke I/2002) : Rp 30.000.000.-

Surabaya, 20 Mei 2002



Ketua Peneliti,

Drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes
NIP. 132 014 463

Menyetujui
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga

Tjatjik Srie Tjahjandari, Ph.D
NIP. 131 801 627

URAIAN UMUM

1.1 Judul Usul : Produksi PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) Dalam Negeri dari Kuda Indonesia Sebagai Upaya Meningkatkan Kualitas dan Populasi Sapi di Indonesia.

1.2. Ketua Peneliti

Nama Lengkap dan Gelar : Drh. Kuncoro Puguh Santoso, MKes
 Pangkat/Golongan : III B
 Bidang Keahlian : Fisiologi Endokrin
 Jabatan : Asisten Ahli
 Unit Kerja : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
 Alamat Surat : Fakultas Kedokteran Hewan. Kampus C
 Unair Jl. Mulyorejo Surabaya 60115
 Telepon : (031) 5993016 Fax : (031) 5993015
 E – mail : -

1.3. Anggota Peneliti

O	NAMA DAN GELAR AKADEMIK	PANGKAT/ GOLONGAN	BIDANG KEAHLIAN	INSTANSI	ALOKASI WAKTU	
					Jam/Mg	Bulan
	Drh.Kuncoro Puguh Santoso, MKes.	III B	Fisiologi Endokrin	FKH Unair	10	4,5
	Drh. Widjiati, MSi.	III C	Biologi Reproduksi	FKH Unair	10	4,5

1.4. Subyek Penelitian

Unsur kandungan PMSG di dalam serum kuda Indonesia (Sandel, CrossbrG2, Crossbred G4) dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan dengan aplikasinya dalam IVM/IVF untuk menyiapkan embrio yang berkualitas serta in vivo untuk menanggulangi hipofungsi ovarium pada sapi petani peternak.

Aspek penelitian meliputi aspek:

1. Kadar PMSG dan estradiol 17β pada kuda Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan.
 2. Kinerja PMSG atau PMSG - estradiol 17β dari salah satu ras kuda Indonesia atau Thoroughbred yang memiliki kadar PMSG tertinggi, secara in vitro dan in vivo.
- 1.5 Periode Pelaksanaan Penelitian: 10/06/2002 berakhir 30/10/2002
- 1.6 Jumlah Anggaran yang Diusulkan (Untuk Tahun Pertama/2002): Rp.30.000.000,-
- 1.7 Lokasi Penelitian Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat yaitu: Fakultas Farmasi (Laboratorium Kimia Analisis Instrumental), Tropical Disease Centre/TDC (Laboratorium Biologi Molekuler), Fakultas Kedokteran Hewan (Laboratorium Kebidanan Veteriner), dan Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian (IP2TP) Grati Pasuruhan Jawa Timur.
- 1.8 Hasil yang Ditargetkan
- Penelitian ini menargetkan hasil berupa produk PMSG atau PMSG + estradiol 17β dalam negeri dari kuda Indonesia (Sandel, Crossbred G2 dan Crossbred G4). Petani peternak berkesempatan lebih banyak untuk menanggulangi sapi yang menderita hipofungsi ovarium melalui pemanfaatan produk PMSG dalam negeri yang mampu bersaing dengan produk import. Kesempatan petani peternak untuk mewujudkan harapan mencapai one calf a year akan semakin besar sehingga keuntungan dari memelihara sapi akan semakin cepat dinikmati disamping akan mengimbas pula kepada percepatan penyebaran bibit sapi. Kebutuhan akan serum kuda Indonesia sebagai bahan baku PMSG nantinya akan memicu pengelolaan usaha peternakan kuda yang lebih intensif.
- 1.9 Perguruan Tinggi Pengusul: Universitas Airlangga.

1.10 Keterangan Lain yang Dianggap Perlu

Penelitian ini merupakan penelitian yang mendukung program unggulan pemerintah di bidang peternakan yang menitikberatkan kepada upaya optimalisasi kemampuan reproduksi pada sapi petani peternak melalui penciptaan produk PMSG dalam negeri dari kuda Indonesia bunting 3,5 bulan. Upaya untuk mencapai maksud tersebut akan melibatkan dukungan teknologi biotek (SDS PAGE, Immunoblotting serta Elusi). Tersedianya produk PMSG dalam negeri pada gilirannya akan berdampak kepada peningkatan pendapatan petani peternak serta percepatan penyebaran bibit sapi.

Untuk itu, sangat diperlukan penelitian yang berkesinambungan secara utuh yang melibatkan tiga pentahapan. Untuk pentahapan pertama, pelaksanaan penelitiannya direncanakan melalui pendanaan Proyek Hibah DUE-LIKE FKH Unair Tahun Anggaran 2002.

ABSTRAK RENCANA PENELITIAN

Diakui oleh PORDASI (Persatuan Olahraga Berkuda Seluruh Indonesia) bahwa Crossbred G4 (Generasi ke 4 hasil persilangan antara kuda Sandel dengan Thoroughbred) merupakan kuda pacu Indonesia terbaik. Akankah kemampuan pacu Crossbred G4 diimbangi dengan profil PMSG nya yang menyamai Thoroughbred?

Serum bahan baku PMSG sampai saat ini masih berasal dari kuda Thoroughbred. Artinya PMSG masih merupakan komoditi jenis obat yang masih harus diimport. Sementara petani peternak masih mengeluhkan beratnya menangani sapi-sapinya yang menderita hipofungsi ovarium karena mahal dan semakin sulitnya memperoleh PMSG. Sudah dapat dipastikan bahwa hipofungsi ovarium akan menginduksi perpanjangan calving interval. Suatu fenomena yang sudah barang tentu akan meresahkan petani peternak, sebab harapan akan memperoleh satu pedet setiap tahunnya (one calf a year) akan semakin tidak menentu.

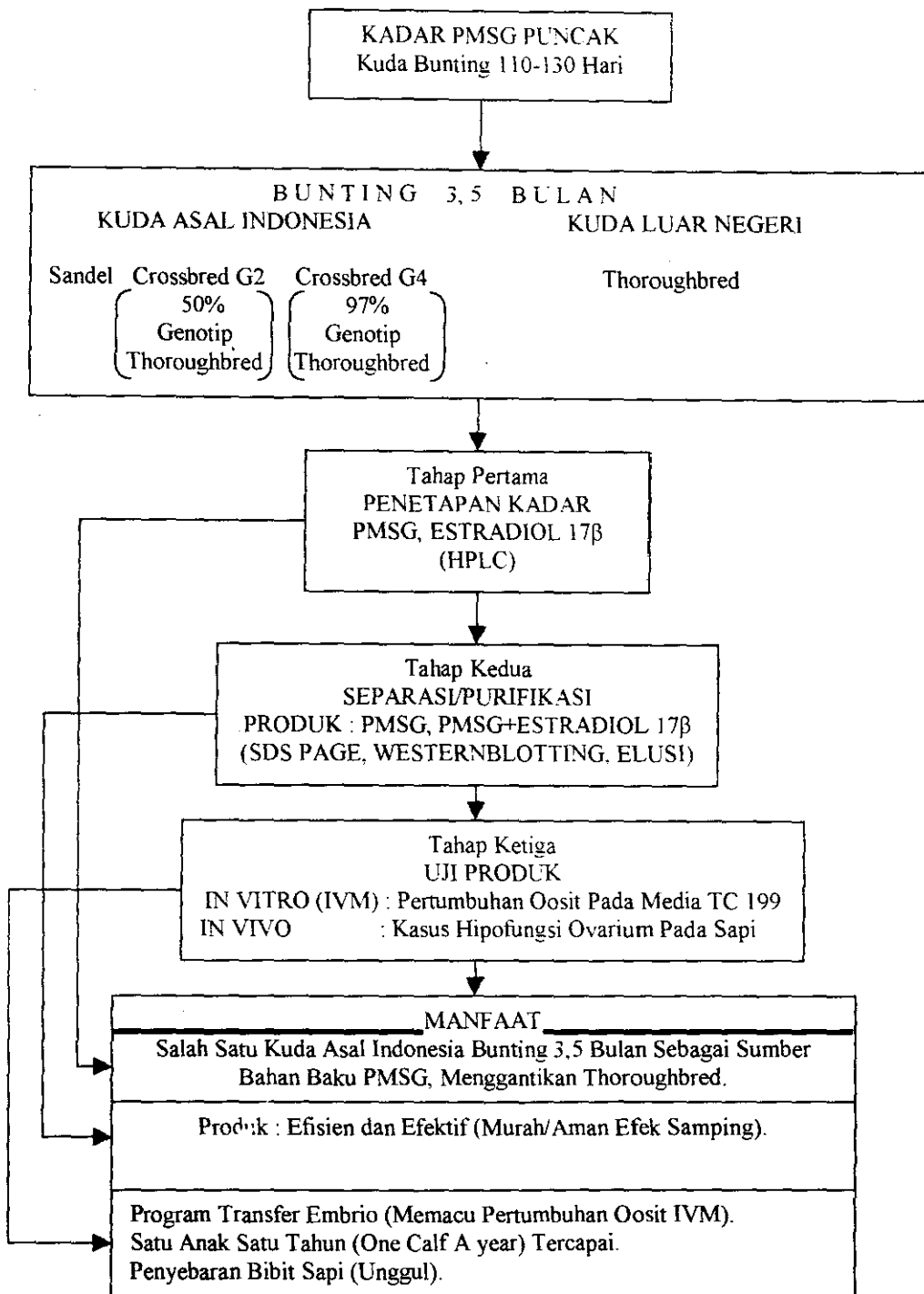
Apabila bahan baku PMSG dapat bersumber dari serum kuda Indonesia atau hasil persilangannya dengan Thoroughbred maka niscaya harapan-harapan petani peternak tersebut akan semakin menjadi kenyataan, disamping penyebaran bibit sapi akan berjalan relatif lebih cepat.

Berdasarkan permasalahan di atas maka penelitian ini menetapkan tujuan jangka panjangnya yaitu untuk mengoptimalkan kemampuan reproduksi sapi-sapi petani peternak sehingga kualitas dan populasi sekaligus penyebaran bibit sapi semakin meningkat melalui pencapaian one calf a year.

Tujuan jangka panjang tersebut akan tercapai melalui target khusus penelitian ini yaitu menyiapkan produk PMSG atau PMSG + estradiol 17 β yang bersumber bahan baku serum dari kuda Indonesia.

Untuk mencapai target khusus tersebut maka metode pencapaian akan dibagi menjadi tiga tahapan. Tahap I (tahun kesatu, pelaksanaannya melalui Proyek Hibah DUE-LIKE FKH UNAIR Tahun Anggaran 2002): adalah tahap penetapan kadar PMSG dan estradiol 17 β dari kuda Indonesia (Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4) dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan melalui teknik kromatografi cair kinerja tinggi/KCKT/HPLC. Tahap II (tahun kedua): adalah tahap purifikasi/isolasi PMSG dari serum kuda Indonesia yang terbukti kadar PMSG nya tertinggi atau tidak berbeda dengan Thoroughbred melalui teknik SDS PAGE, Immunoblotting dan Elusi. Tahap III (tahun ketiga): adalah tahap uji potensi biologis terhadap PMSG, PMSG + estradiol 17 β serta Foligon (PMSG produk paten) sebagai pembandingan. Uji biologis ini meliputi uji secara in vitro (IVM/IVF: untuk meningkatkan perolehan serta kualitas embrio yang akan ditransfer dalam program transfer embrio) maupun in vivo (melalui kemampuan menanggulangi kasus hipofungsi ovarium pada sapi milk petani peternak binaan IP2TP Grati Pasuruhan Jawa Timur).

MATRIK PENELITIAN



4. TUJUAN KHUSUS

Tahap I (Dilaksanakan Melalui Proyek Hibah DUE-LIKE FKH Unair Tahun Anggaran 2002)

1. Menetapkan kadar PMSG dan estradiol 17β pada kuda Sandel bunting 3,5 bulan.
2. Menetapkan kadar PMSG dan estradiol 17β pada kuda Crossbred G2 bunting 3,5 bulan.
3. Menetapkan kadar PMSG dan estradiol 17β pada kuda Crossbred G4 bunting 3,5 bulan.
4. Menetapkan kadar PMSG dan estradiol 17β pada kuda Thoroughbred bunting 3,5 bulan.

Tahap II

Separasi dan purifikasi PMSG dan estradiol 17β dari serum kuda bunting 3,5 bulan yang telah terbukti pada tahap I memiliki kandungan PMSG tertinggi.

Tahap III

1. Mengukur kemampuan PMSG dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred yang memiliki kadar PMSG tertinggi secara in vitro dan in vivo.
2. Mengukur kemampuan PMSG + estradiol 17β dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred yang memiliki kadar PMSG tertinggi secara in vitro dan in vivo.

5. PENTINGNYA ATAU KEUTAMAAN RENCANA PENELITIAN

CG (Chorionic Gonadotropin) pada hewan domestik yang sampai saat ini masih hangat diperbincangkan adalah CG yang berasal dari kuda yaitu eCG atau oleh penemunya Harold Cole diberi nama Pregnant Mare Serum Gonadotropin atau PMSG (Davidson et al.1997).

Serum kuda bunting disamping mengandung PMSG (Hunter, 1995) telah diteliti pula mengandung progesteron dan estradiol 17β (Mahaputra, 1997).

PMSG mulai disintesis oleh sel-sel trofoblast (chorionic girdle) yang akhirnya membentuk endometrial cups, setelah umur kebuntingan kuda mencapai 35 hari (Stabenfeldt dan Edqvist, 1993). Selanjutnya konsentrasi PMSG dalam darah kuda mencapai 100 iu / ml pada saat umur kebuntingan 40 hari dan semakin meningkat menjadi 150 iu / ml setelah umur kebuntingan 130 hari (Hafez, 1993). Puncak konsentrasi PMSG dalam darah terdapat pada umur kebuntingan antara 110 – 130 hari (Davidson et al., 1997).

PMSG yang sampai sekarang beredar di pasaran berasal dari kuda luar negeri yaitu ras Thoroughbred.

Indonesia memiliki kuda Sandel. Disamping itu menurut terminologi PORDASI (Persatuan Olahraga Berkuda Seluruh Indonesia) yang dimaksudkan sebagai kuda Indonesia selain kuda Sandel adalah juga kuda Crossbred G1 sampai dengan Crossbred G4. Kuda Crossbred G4 ini merupakan hasil persilangan antara kuda Sandel dengan kuda Thoroughbred sampai menghasilkan generasi ke 4 yang sudah menunjukkan keberhasilan memiliki 97% genotip kuda Thoroughbred. Generasi hasil persilangan sebelumnya adalah kuda Crossbred G2 yang baru memiliki 50% genotip kuda Thoroughbred. Namun demikian populasi kuda Crossbred G2 tampaknya lebih tinggi daripada kuda Crossbred G4. Kuda Crossbred G4 sudah ditetapkan oleh PORDASI sebagai kuda pacu Indonesia terbaik.

Akankah terdapat kecenderungan bahwa semakin meningkat tahapan generasi hasil persilangan kuda Sandel dengan kuda Thoroughbred juga akan meningkatkan kadar PMSG di dalam darah kuda hasil persilangan tersebut?

Artinya bisa terdapat kemungkinan nantinya bahwa kadar PMSG kuda Crossbred G4 disamping estradiol 17β lebih tinggi daripada kuda Crossbred G2 atau bahkan lebih tinggi atau tidak berbeda dengan kuda Thoroughbred. Sampai saat ini penelitian yang berupaya mengkaji kadar PMSG pada kuda Indonesia (Sandel, Crossbred G2 dan Crossbred G4) belum pernah dilakukan.

Andaikata kadar PMSG dalam darah kuda Crossbred G4 ternyata lebih tinggi atau tidak berbeda dengan kuda Thoroughbred maka kenyataan ini akan sekaligus menambah prestasi kuda Crossbred G4 sebelumnya.

Dengan demikian kemampuan kuda Crossbred G4 sebagai kuda pacu yang handal ternyata dibarengi pula dengan kadar PMSG yang tinggi di dalam darahnya. Gambaran kadar PMSG pada kuda Crossbred G4 di atas akan dapat membawa implikasi kepada kecenderungan akhirnya untuk menjadikan kuda Crossbred G4 sebagai sumber bahan baku produk PMSG, menggantikan kuda Thoroughbred. Kemungkinan lainnya yang dapat muncul melalui hasil pengkajian kadar PMSG pada kuda Indonesia ini adalah kadar PMSG kuda Sandel lebih tinggi atau tidak berbeda dengan kuda Thoroughbred. Andaikata fenomena tersebut di atas benar-benar terjadi maka bisa dipastikan peranan kuda Thoroughbred sebagai sumber bahan baku serum untuk memproduksi PMSG akan segera digantikan oleh kuda Sandel yang sekaligus merupakan kekayaan fauna Indonesia.

Seperti telah dilaporkan oleh Mahaputra (1994) bahwa penggunaan PMSG untuk tujuan super ovulasi pada sapi FH dengan dosis tunggal sebanyak 4500 iu akan mengakibatkan penekanan jumlah ovulasi serta masih terdapatnya folikel sisa yang tidak terovulasikan. Fenomena tersebut merupakan efek yang kurang menguntungkan dari kebanyakan hormon gonadotropin golongan glikoprotein (seperti halnya juga LH dan FSH) yang bermassa molekul besar antara 45000 sampai 65000 (Knobil dan Neill, 1994). Sementara itu Mustofa (1995) telah membuktikan bahwa PMSG yang digunakan untuk maksud menggertak birahi dan ovulasi tunggal cukup efektif hasilnya dengan dosis tunggal yang rendah yaitu 750 iu.

PMSG yang beredar di Indonesia, merupakan produk import. Sejak krisis moneter melanda negara kita, PMSG merupakan salah satu obat hewan yang sangat mahal disamping langka keberadaannya.

PMSG sangat dibutuhkan oleh peternak untuk menanggulangi hipofungsi ovarium pada sapi. Disisi lain peternak terutama peternak kecil di pedesaan tidak mampu membelinya. Mengganti PMSG dengan preparat hormon gonadotropin lainnya seperti LH dan FSH memang bisa dilakukan tetapi lebih tidak memungkinkan karena harga kedua hormon tersebut jauh lebih mahal melebihi harga PMSG.

Kasus-kasus hipofungsi ovarium (inactive ovaries) pada sapi potong tidak jarang terlanjur muncul karena ketidakmampuan peternak untuk membeayai ongkos pengobatan sapi. Salah satu penyebab munculnya hipofungsi ovarium tersebut adalah karena efek frekuensi menetek (suckling) anak sapi disamping faktor lainnya seperti nutrisi. Efek frekuensi menetek ini akan memicu sekresi prolaktin. Sementara prolaktin yang tinggi pada akhirnya akan menekan dopamin serta GnRH. Akibatnya sintesis gonadotropin tertekan termasuk LH dan FSH. Turunnya sintesis LH dan FSH ini pada gilirannya akan menghambat perkembangan folikel serta merta ovulasi tidak akan terjadi. (Davidson et al., 1997 ; Guyton dan Hall, 1996). Munculnya kasus hipofungsi ovarium pada sapi potong ini akan memicu panjangnya calving interval. Panjangnya calving interval ini akhirnya akan mengundang kegagalan pencapaian satu anak satu tahun (one calf a year). Kegagalan-kegagalan tersebutlah yang pada gilirannya akan berdampak kepada kegagalan dalam skala nasional yaitu kegagalan pemerintah dalam upaya penyebarluasan bibit unggul sapi potong.

PMSG yang sering ditambahkan pada media TC 199 sangat mendukung keberhasilan maturasi *in vitro* (IVM) dan pembuahan *in vitro* (IVF) yang merupakan tahapan penting pada program transfer embrio.

PMSG dapat menunjukkan kelemahannya terutama bila dosis yang digunakan relatif besar seperti biasanya diperlukan untuk tujuan super ovulasi, apalagi bila frekuensi penggunaannya pendek, kurang dari 3 bulan (Mahaputra, 1994). Reaksi hipersensitivitas sering timbul akibat pola penggunaan PMSG seperti tersebut di atas. Tidak hanya akan muncul efek anti PMSG, tetapi bahkan efek anti FSH bisa terjadi (Itsuo, 1990). Pengkombinasian antara PMSG dengan estradiol 17β akan mengurangi dosis PMSG sehingga resiko yang dikhawatirkan akan muncul akibat PMSG dapat ditekan. Apalagi aplikasi produk PMSG hasil penelitian ini akan ditekankan pemanfaatannya untuk menanggulangi hipofungsi ovarium.

Berdasar latar belakang di atas maka peneliti bermaksud mengkaji kadar PMSG disamping estradiol 17β dari kuda asal Indonesia (Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4) dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan dalam rangka menciptakan produk PMSG atau PMSG + estradiol 17β untuk memacu pertumbuhan oosit secara in vitro (IVM) sebagai sumber embrio in vitro serta menanggulangi hipofungsi ovarium pada sapi secara in vivo.

STUDI PUSTAKA

A. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)

Chorionic gonadotropin (CG) pada hewan domestik yang sampai saat ini masih hangat menjadi bahan perbincangan adalah CG yang berasal dari kuda bunting yaitu eCG yang oleh penemunya Harold Cole diberi nama Pregnant Mare Serum Gonadotropin atau PMSG (Davidson et al., 1997).

PMSG merupakan hormon gonadotropin kelompok glikoprotein yang tergolong bermassa molekul besar antara 45 000 – 65 000 DA (Knobil dan Neill, 1997). PMSG terdiri dari 2 nonkovalen subunit α dan subunit β . Subunit α nya tersusun dari 96 asam amino, sementara subunit β nya tersusun dari 145 asam amino (Murphy and Martinuk, 1991 ; Knobil and Neill, 1997). Rantai oligosakarida kedua subunit PMSG mengandung D – mannose, D – galactose, L – fucose, sialic acid, N – acetylglucosamine dan N – acetyl galactosamine. Subunit β nya mengandung 50 % lebih banyak karbohidrat daripada subunit α nya yang hanya mencapai 21 %. Kandungan karbohidrat yang lebih besar pada subunit β terletak pada komponen : D – galactose, sialic acid dan N – acetylglucosamine. Namun secara utuh PMSG mengandung 43 % karbohidrat dari keseluruhan beratnya (Knobil and Neill, 1994). Dibandingkan dengan hormon gonadotropin kelompok glikoprotein lainnya, rupanya komponen sialic acid PMSG yang paling dominan perbedaannya diantara komponen karbohidrat lainnya. Kenyataan inilah yang kemudian sekaligus memberi ciri khas PMSG yang memiliki waktu paruh terpanjang yaitu kurang lebih 6 hari dibandingkan dengan gonadotropin lainnya (Murphy and Martinuk, 1991).

PMSG dihasilkan oleh sel – sel trofoblas yang pada awalnya berbentuk seperti pita – pita pada korion (chorionic girdle), yang melepaskan diri dari salah satu kornua uteri bergerak ke arah uterus.

Selanjutnya trofoblas melakukan penetrasi di endometrium dari mulai lamina basalis hingga ke bagian interstisiil dan akhirnya berasosiasi dengan sel ssoi membentuk suatu discrete tissue bodies yang lebih dikenal sebagai endometrial cups (Davidson et al., 1997). Endometrial cups ini untuk pertama kalinya terlihat pada umur kebuntingan kuda kurang lebih 36 hari (Stabenfeldt dan Edqvist, 1993; Knobil dan Neill, 1994). PMSG sudah mulai bisa terdeteksi di jalur sirkulasi umum pada saat umur kebuntingan kuda mencapai 40 hari. Pada waktu itu kadar PMSG dapat mencapai 100 iu/ml dan bisa menjadi 150 iu/ml setelah kebuntingan kuda 130 hari (Hafez, 1993). Puncak kadar PMSG dalam darah terjadi pada umur kebuntingan kuda antara 110 – 130 hari. PMSG memang bisa ditemukan pada sirkuklasi fetus, namun kadarnya tidak signifikan (Davidson et al., 1997). Profil serum PMSG dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : massa endometrial cups, conceptus, ras/genotip fetus, umur kebuntingan. Endometrial cups mulai mengalami degenerasi sejak umur kebuntingan kuda 60 hari. Tetapi cups masih tampak di endometrium pada umur kebuntingan kuda 150 hari. Degenerasi endometrial cups tersebut terjadi diperkirakan karena reaksi imunologis endometrium terhadap antigen paternal pada sel trofoblas. Sejak serum induk kuda yang mengandung fetus kembar terbukti lebih tinggi kadar PMSG nya dibandingkan dengan yang mengandung fetus tunggal, maka massa endometrial cups dianggap merupakan faktor yang berperan mengatur kadar PMSG (Hafez, 1993). Bagaimana proses sekresi PMSG berlangsung di endometrial cups, masih belum terungkap jelas. Melalui uji struktur dapat ditunjukkan bahwa nampaknya tidak terjadi pembentukakan granul – granul sekresi yang padat. Kenyataan tersebut menggambarkan rupanya sekresi PMSG dari endometrial cups tidak menganut mekanisme yang lazim terjadi seperti pada hormon peptida/protein (Knobil dan Neill, 1994), dimana proses sekresi vesikel – vesikel hormon dilakukan melalui mekanisme eksositosis yang melibatkan peran serta Ca^{++} ekstra selluler (Vander et al., 2001).

Rendahnya kadar PMSG pada kuda yang mengalami abortus menunjukkan bahwa faktor conceptus tampak berperan dalam pelestarian PMSG ini (Stabenfeldt dan Edqvist, 1993).

Aktivitas biologis PMSG bersifat mendua. Artinya PMSG dapat menunjukkan dominasinya berefek FSH atau dilain pihak dapat menyerupai efek LH.

Pada kuda sendiri baik secara *in vitro* maupun *in vivo* PMSG berikatan kuat dengan reseptor LH di jaringan testes, folikel ovarium dan CL. Namun demikian meskipun susunan asam amino PMSG nya homologus tinggi dengan LH kuda tetap saja efek LH dari PMSG lebih lemah daripada efek LH nya sendiri. Rendahnya tingkat homologus urutan primer α FSH dengan α PMSG kuda yang kurang dari 90 % menyebabkan rendahnya daya ikat PMSG kuda dengan reseptor FSH nya. Pada keledai sekalipun masih tergolong satu rumpun keluarga dengan kuda CG nya (dCG) ternyata berikatan kuat dengan reseptor FSH pada ovarium dan testes. Kenyataan tersebut cukup memberikan gambaran bahwa efek mendua PMSG sifatnya sangat heterologus dan spesifik terhadap spesies. Diluar keluarga kuda tetapi masih tergolong mamalia seperti tikus, babi dan sapi ternyata PMSG nya berikatan kuat dengan reseptor FSH dengan menimbulkan efek yang betul – betul khas FSH. Tidak hanya terhadap reseptor FSH saja PMSG tersebut berikatan tetapi dengan reseptor LH pun PMSG hal yang sama terjadi (Murphy and Martinuk, 1991 ; Knobil and Neill, 1994; Chopineau et al., 1997). Beberapa peran PMSG pada kuda bunting akan dipaparkan berikut ini. PMSG mempertahankan/memperpanjang masa hidup CL primer yang muncul sesuai dengan siklus ovulasi. PMSG juga berperan membentuk sejumlah CL sekunder/assesoris melalui rangsangan PMSG terhadap folikel yang terovulasi, folikel yang tidak terovulasi atau luteinasi folikel (Hafez, 1993). Disamping itu PMSG merangsang CL primer dan sekunder untuk menghasilkan progesteron (Knobil dan Neill, 1994 ; Davidson et al., 1997). Murphy dan Martinuk (1991) mencoba menggambarkan bahwasanya PMSG dan CL sekunder pada hakekatnya berperan sebagai penyangga yang diharapkan mampu menjamin kelangsungan fungsi sekresi CL primer mendukung kebuntingan sampai pada saatnya nanti plasenta mampu bertindak sebagai organ steroidogenik.

Besarnya massa molekul PMSG dapat mengundang kelemahan, terutama bila dosis yang digunakan cukup besar. Untuk tujuan super ovulasi pada sapi, dosis besar PMSG sering menimbulkan reaksi hipersensitivitas ovarium. Akibatnya muncul kemudian efek anti terhadap PMSG atau bahkan anti terhadap FSH yang tergolong sama – sama gonadotropin kelompok glikoprotein (Itsuo, 1990). Bahkan Putro (1993), menemukan masih adanya sisa folikel yang tidak terovulasikan serta terdapatnya banyak bentuk embrio yang tidak normal sehingga jumlah embrio yang dapat di transfer menurun. Namun demikian menurut Mahaputra (1994), efek samping akibat penggunaan PMSG tersebut di atas dapat dihindari dengan cara mengulang pemberian minimal setelah 3 bulan. Siswanto (1989), telah membuktikan bahwa sampai dosis 3500 iu PMSG masih menunjukkan respon yang memuaskan terhadap jumlah ovulasi pada sapi – sapi FH. Selanjutnya Mustofa (1995), menggunakan PMSG untuk maksud menggertak birahi dan ovulasi tunggal dengan dosis mulai dari 500 iu, 750 iu hingga 1000 iu. Semua dosis tunggal PMSG tersebut ternyata berhasil memperpendek awal munculnya birahi. Lamanya birahipun menjadi lebih panjang pada semua sapi perlakuan. Penelitian yang menggunakan dosis kecil PMSG tersebut juga telah berhasil membuktikan bahwa dengan dosis 750 iu yang disuntikkan saat estrus dan insiminsi telah berhasil menaikkan estradiol 17β secara bermakna. Disamping itu terjadi kecenderungan bahwa kejadian meningkatnya jumlah corpus luteum (CL) ternyata sebanding dengan peningkatan dosis PMSG yang diberikan. Semakin tinggi dosis PMSG maka akan semakin banyak jumlah CL yang dapat ditemukan. Fenomena yang menggambarkan peningkatan dosis PMSG mengakibatkan peningkatan jumlah CL, terjadi juga pada penelitian sebelumnya (Mahaputra dkk., 1994) yang menerapkan dosis 1500 iu dan 2000 iu.

B. Maturasi Oosit In Vitro (IVM)

Maturasi secara in vitro dapat dilakukan dengan 2 teknik. Teknik aspirasi dan teknik insisi.

Teknik aspirasi, merupakan teknik yang bertujuan mengeluarkan oosit dari folikel dengan menggunakan jarum suntik yang telah diisi dengan larutan phosphate buffer saline (PBS). Biasanya ukuran jarum suntik G 18 – 21 digunakan untuk memperoleh oosit sapit kambing atau domba.

Teknik insisi adalah teknik untuk memperoleh oosit dengan cara merobek folikel ovarium dengan scalpel steril di dalam cawan petri yang sudah diisi PBS, kemudian oositnya diaspirasi (Kanagawa et al., 1989).

Oosit yang dimaturasi secara *in vitro* sebenarnya memiliki potensi yang sangat rendah terhadap kemampuan fertilisasi dan perkembangan selanjutnya (Hafez, 1993).

Oleh karena itu penambahan hormon seperti FSH, LH atau PMSG yang berperan memacu pertumbuhan folikel dan ovulasi maupun serum seperti serum kuda/sapi birahi yang berperan sebagai sumber nutrisi, faktor penumbuh (growth factor), kedalam media maturasi oosit akan meningkatkan kualitas oosit (metafase II) sehingga potensinya untuk fertilisasi dan perkembangan embrional meningkat (Kanagawa et al., 1989). Lebih lanjut Funahashi dan Day (1993), menegaskan bahwa penambahan hormon kedalam media maturasi akan meningkatkan maturasi sitoplasma dan ekspansi sel – sel cumulus oophorus. Selain faktor – faktor yang mempengaruhi maturasi oosit tersebut di atas, faktor lain yang tak kalah pentingnya adalah kondisi oosit pada stadium permulaan. Oosit tanpa atau hanya dilapisi oleh satu lapis sel cumulus oophorus pada kondisi awalnya akan gagal mengalami maturasi (Mahaputra dkk., 1995). Twagirawungu et al. (2000), telah melakukan penambahan LH pada media maturasi oosit *in vitro* dengan hasil meningkatnya viabilitas embrio yang dihasilkan. Dasrul (1997), telah menambahkan serum kuda buting 60 hari kedalam media TC 199 dengan hasil meningkatkan persentase maturasi oosit mencapai metafase II. Disamping faktor penambahan hormon dan serum yang berkesempatan memperbaiki potensi oosit secara *in vitro*, faktor ukuran folikel ternyata juga terbukti mempengaruhi maturasi oosit. Menurut Cecconi et al. (1996) oosit yang dikoleksi dari folikel bagian antral ternyata memiliki kecenderungan lebih baik dalam proses meiosis selama maturasi oosit *in vitro* berlangsung.

Sedangkan Hyttel et al. (1997), lebih jauh menggambarkan bahwa populasi oosit yang diambil dari folikel yang berukuran lebih kecil dari 100 μ m, akan menghasilkan oosit matur dalam tahap metafase II hanya 15 %.

Ukuran folikel yang lebih kecil dari 100 μ m ini akan menyebabkan penyimpanan RNA dan lipid droplet tidak optimal, sehingga proses maturasi nukleus terganggu.

Sementara itu Kim et al. (2000), menyarankan agar sebaiknya oosit yang dimaturasi secara in vitro diambil dari folikel – folikel yang seragam ukurannya. Folikel – folikel yang tidak seragam ukurannya akan menyebabkan perkembangan kapasitas oosit tidak seragam juga, yang akhirnya juga akan mempengaruhi perkembangan embrio hingga tahap blastosis. Widjiati dan Rimayanti (2001), telah menggunakan oosit kambing dari folikel berdiameter lebih dari 100 μ m berhasil mencapai angka maturation rate (metafase II) tinggi yaitu 50 % dibandingkan yang hanya 15 % pada kelompok folikel berdiameter lebih kecil dari 100 μ m.

C. Pembuahan In Vitro (IVF)

Berkembangnya teknologi pembuahan in vitro memberi harapan besar terhadap pengadaan embrio dimasa depan. Salah satu keunggulan teknik ini adalah kemampuannya memanfaatkan limbah yang tidak terpakai menjadi bermanfaat dan sekaligus mampu memperlambat penurunan populasi ternak. Namun demikian teknik ini tampak jelas lebih rumit dan hanya mampu mengontrol genetik embrio yang akan dihasilkan sebanyak 50 % (Elsden dan Seidel, 1985). Rumitnya teknik ini terletak pada upaya pengendalian terhadap kedua objek utamanya yaitu oosit dan spermatozoa. Oosit dalam hal ini memerlukan penanganan khusus untuk maturasinya, sehingga oosit benar – benar matur seperti oosit yang diovulasikan pada tahap metafase II dengan terdapatnya polar body I dan pronukleus jantan. Sementara sel spermatozoa perlu mendapat perlakuan seperti layaknya kapasitas in vivo yaitu bertujuan untuk memperbanyak DNA dalam inti serta meningkatkan permeabilitas akrosom (Hafez, 1993). Untuk keperluan kapasitas dan pembuahan sel spermatozoa dapat digunakan media Basic Solution ditambah dengan heparin dan juga caffein (Elsden dan Seidel, 1985).

Sedangkan Povokovief et al. (1992), menyarankan untuk keperluan maturasi dan perkembangan cleavage sebaiknya digunakan media TC 199 dengan Earle's + Hepes 10 mM + glutamin 0,5 mM + 15 % serum sapi birahi yang diinaktifkan + kanamycine 75ng/ml.

Konsentrasi sel spermatozoa yang dipakai untuk sapi biasanya berkisar pada angka 12,5 juta/ml (Elsden dan Seidel, 1985) sementara Povokofiev et al. (1992) mengusulkan 10 juta/ml. Mahaputra, dkk. (1998) telah membuktikan bahwa EBBS yang juga sekaligus dapat berperan sebagai media pembuahan hanya mampu menyumbang 24,5 % morula/blastosis dibandingkan dengan 32,5 % pada media TC yang mengandung biakan cumulus oophorus.

Yuliani, (1997) telah membandingkan kemampuan TCM 199 dengan media CR 1 aa yang sama – sama ditambah serum kuda bunting 60 hari ternyata TCM 199 lebih baik kemampuan membiakkan embrio kambing sampai stadium 8 sel. Perkembangan embrio dini menjadi morula ternyata cukup bagus terjadi di dalam biakan cell line (sel cumulus oophorus dan sel tuba) dengan pencapaian hingga 50% dan terbaik secara nyata ditemukan pada media biakan sel tuba umur 9 hari. Pada media biakan sel tuba umur 9 hari tersebut juga diperoleh blastosis terbanyak, sementara terendah terdapat pada biakan sel cumulus umur 9 hari (Mahaputra ddk., 2000).

Mustofa, dkk. (1999) telah membandingkan kemampuan serum kuda bunting dengan serum sapi FH bunting terhadap perkembangan zygot sapi Madura. Ternyata serum sapi FH bunting yang terbukti mengandung rendah estradiol 17β dan tinggi kolesterol dalam TCM 199 lebih baik kemampuannya mematurasi oosit sapi Madura sampai ke perkembangan embrio 2 sel. Dengan semakin majunya teknologi industri farmasi, teknologi pembuahan in vitro dan transfer embriopun menuai kemajuan. Kemajuan tersebut dapat digambarkan melalui beberapa penelitian yang telah berhasil menggunakan gonadotropin eksogen seperti hMG (human Menopausal Gonadotrophin), highly purified urinary FSH, FSH recombinant dengan tingkat keberhasilan hingga 50 % angka kebuntingannya dibandingkan dengan program IVF – ET (embryo transfer) siklus alamiah. Selanjutnya telah juga dicobakan kombinasi gonadotropin eksogen dengan GnRH agonist analogues. Ternyata hasilnya lebih baik daripada usaha yang pertama di atas.

Hasilnya lebih banyak oosit yang menjadi matur sempurna sehingga program IVF – ET mencapai angka keberhasilan lebih tinggi. Penelitian terakhir yang dilakukan adalah menggunakan GnRH antagonist analogues. Tahapan penelitian terakhir ini muncul karena dilatarbelakangi oleh adanya efek samping yang dikhawatirkan muncul berupa akumulasi LH yang akan menimbulkan produksi androgen oleh ovarium. Efek GnRH antagonist ini bekerja akut menghentikan sekresi LH, tanpa melalui fase peningkatan awal LH seperti pada penggunaan agonist GnRH (Barbieri dan Hornstein, 1999).

7. METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Tahapan awal penelitian ini yang bertujuan untuk menetapkan salah satu dari kuda asal Indonesia (Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4) atau Thoroughbred yang memiliki kadar PMSG tertinggi, merupakan penelitian eksploratif (non eksperimental).

Tahapan penelitian yang bertujuan untuk menguji produk penelitian secara in vitro (IVM) maupun secara in vivo pada sapi tersangka hipofungsi ovarium bersifat eksperimental murni (mengenakan dengan sadar suatu perlakuan penelitian dan menggunakan kontrol sebagai pembanding). Pengujian produk secara in vitro (IVM) maupun secara in vivo akan melibatkan: kontrol (Po), perlakuan I (PI) adalah Foligon (PMSG produk paten, perlakuan II (PII) adalah PMSG dari produk penelitian dan perlakuan III (PIII) adalah PMSG + esdtradiol 17 β dari produk penelitian.

Rancangan penelitian yang digunakan untuk tahap penelitian yang bertujuan menguji produk secara in vitro (IVM) adalah rancangan faktorial yang melibatkan 4 ras kuda (Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred), 3 bahan yang akan diuji secara in vitro (IVM) yaitu Foligon, PMSG dan PMSG + estradiol 17 β produk penelitian, dimana ras dan bahan penelitian yang akan diuji tersebut merupakan variabel bebas. Sementara variabel tidak bebasnya mencakup 2 aspek yaitu perkembangan oosit yang mencapai fase metafase II dan cleavage rate.

Rancangan penelitian yang digunakan untuk penelitian yang bertujuan menguji produk secara *in vivo* pada sapi adalah rancangan faktorial yang melibatkan 4 ras kuda (Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred), 3 bahan yang akan diuji secara *in vivo* yaitu Foligon, PMSG dan PMSG + estradiol 17 β produk penelitian, dimana ras dan bahan yang akan diuji tersebut di atas merupakan variabel bebas. Sementara variabel tidak bebasnya mencakup 2 aspek pengamatan yaitu birahi (awalnya) serta angka ovulasi pada sapi tersangka hipofungsi ovarium dengan memeriksa progesteron 7 hari setelah birahi (dengan prediksi konsentrasinya > 1 ng/ml).

B. Sampel Penelitian

Sampel penelitian pada tahap penetapan kadar PMSG adalah serum kuda Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan. Keempat ras kuda yang menjadi sumber serum kuda bunting tersebut berasal dari pemilik kuda anggota PORDASI Jatim dengan umur kuda yang tidak jauh berbeda dan masing-masing ras akan diwakili oleh 4 ekor kuda yang berhasil terpilih menjadi kuda penelitian berdasar purposive sampling.

Sampel penelitian pada tahap pengujian produk secara *in vitro* (IVM) adalah oosit sapi yang masing – masing perlakuan berjumlah 30 oosit dengan mengambil ulangan sebanyak 10 kali. Dengan demikian setiap perlakuan akan memerlukan 300 oosit sapi.

Sampel penelitian pada tahap pengujian produk secara *in vivo* pada sapi adalah sapi tersangka hipofungsi ovarium yang masing – masing perlakuan membutuhkan 7 ekor sapi yang ditetapkan berdasarkan purposive sampling.

C. Variabel Penelitian

Ras kuda: Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4, dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan, Foligon, produk penelitian (PMSG dan PMSG + estradiol 17 β , menjadi variabel bebas.

Oosit yang berhasil mencapai fase metafase II serta hasil cleavage rate, jumlah sapi birahi, angka ovulasi (ovulation rate) , menjadi variabel tidak bebas.

Oosit pada IVM yang berhasil mencapai fase metafase II ditandai dengan tampaknya polar body I (PBI) dan IPN serta hasil cleavage rate dari masing – masing perlakuan.

Sapi yang tergolong menderita hipofungsi ovarium ditetapkan melalui pemeriksaan rektal yang akan dikonfirmasi dengan pemeriksaan kadar progesteron yang besarnya $< 1 \text{ ng / ml}$.

Birahi sapi dapat ditinjau dari dua aspek yaitu awal birahi dan lama birahi. Awal birahi adalah dihitung dari saat pemberian bahan sampai saatnya muncul pertama kali tanda birahi umumnya.

Perbaikan aspek ovulasi pada sapi dapat diamati dari pemeriksaan rektal melalui palpasi ovarium setelah 7 hari dari timbulnya birahi, serta dikonfirmasi dengan kadar progesteron yang mencapai $> 1 \text{ ng / ml}$.

D. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain : KCKT/HPLC (Agilent 1100 Series Capillary LC System Photo Diode Array Detector), vacum evaporator, penangas air, refregerator, pengaduk magnet, centrifuge, pipet mikro, tip mikro, tabung eppendorf, kertas nitroselulose, timbangan mikro, gelas beker, inkubator CO₂, mikroskop inverted, bilik steril (laminar flow hood), alat suntik plastik, cawan petri, jarum suntik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah : serum kuda bunting, Foligon, produk penelitian (PMSG dan PMSG + estradiol 17 β), PMSG standard, estradiol 17 β standard, asetone-tril (fase mobil HPLC), ovarium sumber oosit, anti PMSG, anti estradiol 17 β , acrilamid, tris HCl (pH 6,6 / 6,8), SDS 0,5 %, temed, metanol (2,5 % / 25%), asam asetat 7,5%, glutaral dehid 10%, AgNO₃, gliserol 10 %, aquades, NaCl fisiologis, OWS (oocyte washing solution), TCM 199 stock (TCM yang mengandung 25 mM Hepes dengan Earle salt, piruvat, gentamisin, FCS 10%).

E. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat yaitu Fakultas Farmasi Unair (Laboratorium Kimia Analisis Instrumental), Tropical Disease Centre / TDC (Laboratorium Biologi Molekuler), Fakultas Kedokteran Hewan Unair (Laboratorium Ilmu Kebidanan) dan Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Grati Pasuruhan Jawa Timur.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Penetapan Kadar PMSG dan Estradiol 17β (Untuk Tahun I Periode Anggaran 2002, Proyek DUE-LIKE FKH Unair. Pelaksanaan Penelitian: 10-Juni sampai dengan 30-Oktober-2002)

Tahap awal dari prosedur penelitian ini dimulai dengan pembuatan serum dari darah kuda Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan. Darah kuda bunting yang diambil dari vena yugularis dibiarkan dalam dalam suhu kamar selama 3 jam lalu ditusuk bagian pinggir darah yang berhadapan dengan dinding tabung, diamkan selanjutnya hingga 24 jam. Selanjutnya disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan $1000 \times g$ untuk memisahkan serum dengan darah yang menjendal. Supernatannya dipisahkan sebagai serum yang siap digunakan setelah melalui saringan millipore $0,2 \mu m$ atau dapat disimpan dalam temperatur $-20^{\circ} C$ bila tidak digunakan. Serum kemudian diekstraksi dengan dietileter serta dilanjutkan dengan proses penguapan yang berlangsung di vacuum evaporator. Proses ekstraksi serum tersebut di atas berlangsung tiga kali. Setelah serum mengering, kemudian dilarutkan di dalam metanol absolut. Campuran tersebut di atas kemudian diuapkan di dalam penangans air dengan suhu $90^{\circ} C$. Setelah campuran menjadi kering, campuran tersebut dilarutkan lagi di dalam metanol absolut.

Serum yang sudah berupa larutan di dalam metanol ini merupakan stock spesimen yang akan ditentukan kadar PMSG serta estradiol 17β nya. Sebanyak masing-masing $100\mu l$ stock serum dari kuda Sandel, Crossbred G2, Crossbred G4 dan Thoroughbred bunting 3,5 bulan disuntikkan kedalam KCKT/HPLC (Agilent 1100 Series Capillary LC System Photo Diode Array Detector). Pada saat yang bersamaan kedalam KCKT tersebut juga disuntikkan PMSG standar dan estradiol 17β standard.

Dengan membandingkan bentuk kurva serta waktu munculnya kurva pada kertas pencatat (recorder) maka dapat ditetapkan jenis bahan dan kadarnya (Hamilton dan Sewell, 1979).

2. Tahap Separasi dan Purifikasi Serum Kuda Bunting (Untuk Tahun Ke II)

Serum dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred bunting 3,5 bulan yang sudah dibuktikan memiliki kadar PMSG tertinggi, kemudian diencerkan dengan Laemli buffer dengan perbandingan 1:2 atau 1:3. Campuran tersebut dimasukkan kedalam waterbath 100° C selama 2 – 10 menit. Langkah tersebut bertujuan untuk mendenaturasi protein di dalam serum. Selanjutnya serum tersebut dimasukkan kedalam gel acrylamid yang sebelumnya sudah disiapkan terlebih dahulu. Gel yang sudah mengandung acrylamid tersebut kemudian di "running" melalui elektroforesis dengan arus listrik (250 V / 41 mA atau 150 V / 20 mA). Setelah running selesai segera dilakukan pencucian menggunakan metanol atau glutaraldehyd untuk tujuan fixasi. Pewarnaan (staining gel) sebagai proses berikutnya dapat dilakukan dengan pewarnaan silver (AgNO_3) atau Coumasie Blue. Band-band pada gel yang sudah terwarnai tersebut harus segera ditransfer ke membran nitroselulose dengan penambahan antibodi (terhadap PMSG dan estradiol 17β), konjugat dan substrat. Tahapan ini disebut dengan Westernblotting yang menggambarkan band-band spesifik untuk masing-masing zat yang ingin dipurifikasi / identifikasi. Untuk memperoleh zat-zat yang sudah teridentifikasi secara spesifik tersebut guna keperluan bahan pengujian dalam penelitian (IVM maupun pada sapi) maka perlu dilakukan tahapan elusi. Elusi ini dilakukan dengan cara memotong-motong terlebih dahulu gel yang sudah spesifik identifikasinya untuk selanjutnya dibungkus dengan kertas selofan serta direndam didalam PBS. Kemudian melalui elektroforisis selama 1,5 – 2 jam akan dihasilkan produk sebagai stock protein.

Lebih baik lagi kalau protein hasil elusi pertama tersebut diulang lagi dengan tindakan elusi kedua dengan maksud produk yang diperoleh lebih murni. Produk hasil elusi (PMSG dan estradiol 17β) ini dapat disimpan didalam tabung eppendorf dalam suhu -70° C.

3. Tahap Uji Maturasi In Vitro/IVM (Untuk Tahun Ke III)

Oosit yang berasal dari folikel-folikel ovarium berukuran 2mm-5mm merupakan bahan baku pada IVM ini.

Oosit yang telah siap, dibiakkan di media TC 199 yang telah ditambah dengan Foligon, produk PMSG atau PMSG + estradiol 17β dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred bunting 3,5 bulan yang memiliki kadar PMSG tertinggi. Biakkan oosit tersebut di atas kemudian diinkubasi di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 38^o C selama 24 jam dengan kelembaban 90% – 100%. Variabel tidak bebas yang menjadi fokus pengamatan pada uji IVM ini adalah oosit yang berhasil menjadi masak sempurna yaitu oosit yang sudah berhasil berada pada fase metafase II dengan ditandai munculnya PBI dan IPN (Sukra, dkk 1996). Hasil uji IVM yang telah menetapkan oosit dengan tingkat maturasi sempurna (metafase II) dilanjutkan ke insiminasi in vitro atau IVI (Mahaputra dkk., 2000). Selanjutnya diteruskan dengan uji pembuahan in vitro (IVF). Beberapa indikasi dapat dipakai sebagai indikator pembuahan (24 setelah pembuahan) seperti: polar body II, pronucleus betina dan jantan serta gabungan polar body II dengan pronucleus betina dan jantan.

Dari beberapa alternatif indikator di atas, Mahaputra dkk. (1995) menyimpulkan: jumlah subjek indikator yang paling banyak dapat digunakan untuk menentukan pembuahan adalah keberadaan pronucleus betina dan jantan. Sementara pengamatan gabungan antara polar body II ditambah dengan adanya pronucleus betina dan jantan menunjukkan indikator yang paling rendah. Ditambahkannya pula untuk pengamatan cleavage rate dapat dilakukan 48 setelah pembuahan guna mengamati cleavage 2 sel sampai lebih.

4. Tahap Uji In Vivo Pada Sapi (Untuk Tahun Ke III)

Penetapan sapi-sapi yang dapat digolongkan kedalam hipofungsi ovarium dilakukan melalui pemeriksaan rektal yang selanjutnya dikonfirmasi melalui kadar progesteronnya yang besarnya < 1 ng/ml.

Setelah pemberian Foligon, produk PMSG saja atau PMSG + estradiol 17 β dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred bunting 3,5 bulan yang memiliki kadar PMSG tertinggi kepada sapi-sapi penderita, maka evaluasi hasil diarahkan kepada birahi dan tingkat ovulasi (ovulation rate). Aspek birahi yang diamati meliputi awal birahi. Pengamatan terhadap perbaikan fungsi ovarium (aspek tingkat ovulasi) dilakukan 7 hari setelah munculnya birahi melalui pemeriksaan ovarium secara rektal. Konfirmasi perlu dilakukan dengan pemeriksaan kadar progesteron sapi yang harus mencapai > 1 ng/ml (Mahaputra dkk., 1990).

G. Analisis Data

Data penelitian yang merupakan hasil pengukuran kadar PMSG disamping estradiol 17 β , kemampuan Foligon, produk PMSG dan PMSG + estradiol 17 β dari salah satu ras kuda asal Indonesia atau Thoroughbred bunting 3,5 bulan yang memiliki kadar PMSG tertinggi secara in vitro dan in vivo dari masing masing perlakuan (Po, PI, PII dan PIII) diuji dengan Anova yang dapat dilanjutkan dengan uji LSD. Proses pengolahan data tersebut diatas dilakukan dengan program SPSS 10.

8. ANGGARAN PENELITIAN

JENIS PENGELUARAN	RINCIAN ANGGARAN YANG DIUSULKAN (Rp)
Peralatan	16.100.000
Bahan Aus (Material Penelitian)	7.400.000
Perjalanan	1.500.000
Pemeliharaan	2.000.000
Pertemuan/Lokakarya/Seminar	1.000.000
Laporan/Publikasi	1.000.000
Lain-lain	1.000.000
Total Anggaran	30.000.000

9. PUSTAKA ACUAN

- Barbieri RL, Horstein, MD, 1999. Assisted reproduction in vitro fertilization succes is improved by ovarium stimulation with exogenous gonadotropins and pituitary supression with gonadotropin releasing hormone analogues. *Endocr Rev* 20 (3): 249 – 252.
- Cecconi S, Aurizio RD, Colonna R, 1996. Role of antral follicle development and cumulus cells on in vitro fertilization of mouse oocytes. *J of Reprod and Fertil* 107: 207 – 214.
- Chopineau M, Martinat N, Marichatou H, Troispoux C, Gouillou CA, Stewart F, Combarnous Y, Guillou F, 1997. Edvidence that the α – subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotrophins. *J of Endocr* 155: 241 – 245.
- Dasrul, 1997. Pengaruh penambahan serum hewan birahi pada media biakan terhadap perkembangan embrio kambing lokal. Tesis, Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Davidson AP, Stabenfeldt GH, Brinsko SP, 1997. Reproduction and lactation. In (Cunningham JG, eds). *Textbook of Veterinary Physiology*. 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders, pp 443 – 507.
- Eldsden RP, Seidel GE, 1985. Procedures for recovery, bisection freezing and transfer of bovine embryos. *Animal Reprod Lab Colorado State University*.
- Funahashi H, Day BN, 1993. Effect of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod and Fertil* 198: 179 – 185.
- Guyton AC, Hall JE, 1996. Female physiology before pregnancy, female hormones, pregnancy and lactation. In *Textbook of medical physiology*. 9th edition. Philadelphia: WB Saunders, pp 1026 – 1046.
- Hafez ESE, 1993. Horses. In (Hafez ESE, eds). *Reproduction in Farm Animals*. 6th edition. Pennsylvania: Lea and Febiger, pp 361 – 384.
- Hamilton RJ, Sewell PA, 1979. Introduction to high performance liquid chromatography. London: Chopman and Hall.

- Hunter RHF, 1995. Diferensiasi, pubertas dan siklus birahi, teknik pendewasaan gamet in vitro, fertilisasi, biakan embrio dan penyimpanan jangka panjang in vitro. Dalam *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Edisi 1. Bandung: ITB, hal 2 – 295.
- Hyttel P, Fair I, Callsen H, Greve I, 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23 – 32.
- Itsuo S, 1990. Textbook for the group training course in twinning and in vitro fertilization technology for cattle. Japan International Cooperation Agency. pp 31 – 42.
- Kanagawa H, Mazni OA, Valdez CA, 1989. Oocyte maturation and in vitro fertilization in farm animals. *Biotechnology For Livestock Production*. FAO Plkenum Press.
- Kim DH, Korg HG, Han SW, Kim HK, Ko DS, Lee HJ, Lee HT, Chung KS, 2000. Developmental capacity of mouse oocyte derived from in vitro and in vivo grown preantral follicles. *Proceedings of The Annual Conference International Embryo Transfer Society. Theriogenology* 53 (1) : 456.
- Knobil E, Neill JD, 1994. *The Physiology of Reproduction*. Volume 2 B. New York: Raven Press, pp 2122 – 2125.
- Mahaputra L, Hariadi M, Hardjopranjoto S, 1990. Radioimmunoassay of milk progesterone to monitor reproductive performance in smallholder dairy herds in Indonesia. Proc The Final Research Coordination Meeting. Vienna IAEA.
- Mahaputra L, Hinting A, Hermadi HA, Mustofa I, Utama S, Wirjatmadja R, 1994. Teknik pembuatan embrio beku dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi Madura. Hibah Bersaing II/2 Dirjen Depdikbud.
- Mahaputra L, Hinting A, Hermadi HA, Mustofa I, Utama S, Pudjisrianto, 1995. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi. Hibah Bersaing II/3 Dirjen Dikti Depdikbud.
- Mahaputra L, 1997. Analisis progesteron dan estradiol 17 β dalam serum dan tinja untuk diagnosis kebuntingan pada kuda. *Jurnal Pasca Sarjana Universitas Airlangga* 6 (2): 111 – 115.

- Mahaputra L, Hinting A, Utama S, Mustofa I, Hermadi HA, Pudjisrianto, 1998. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio beku (fertilisasi in vitro dalam upaya pembuatan kembar identik dan fraternal pada sapi). Hibah Bersaing II/5 Dirjen Dikti Depdikbud.
- Mahaputra L, Simorangkir D, Ernawati R, 2000. Pembuatan embrio jantan dan betina secara terpisah serta pengembangan cell line sebagai pemicu pertumbuhan dengan pengetrapan teknologi bayi tabung pada sapi. Hibah Bersaing VII/2 Dirjen Dikti Depdikbud.
- Murphy BD, Martinuk SD, 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*: 1 – 2 Abs.
- Mustofa I, 1995. Pengaruh penyuntikan pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) dan waktu penyuntikan human chorionic gonadotropin (hCG) yang berbeda terhadap profil estrogen serum dan beberapa variabel reproduksi sapi perah. Tesis, Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Mustofa I, Mahaputra L, Utama S, 1999. Identifikasi kinerja serum sapi Frisian Holstein dan kuda birahi dalam media maturasi oosit terhadap perkembangan sigot sapi Madura. *Jurnal Penelitian Unair* 7 (2): 42 – 51.
- Povokofiev MI, Ernst LK, Suraeva NM, Lagutina IS, Udavlennikova NN, Kesyan AZ, Dolgohatskiy AI, 1992. Bovine oocyte maturation fertilization and further development in vitro and after transfer into recipient. *Theriogenology* 38: 461 – 469.
- Putro PP, 1993. Aplikasi teknologi transfer embrio: perkembangan folikel dan profil perogesteron pada sapi perah yang disuperovulasi. Yogyakarta: Proc Forum Komunikasi Hasil Penelitian Bidang Peternakan, hal 22 – 24.
- Siswanto R, 1989. Pengaruh dosis PMSG terhadap daya superovulasi pada sapi Friesian. Skripsi, FKH Univ Airlangga.
- Stabenfeldt GH, Edqvist LE, 1993. Female reproductive processes. In (Swenson MJ, Reece WO, eds). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11th edition. Ithaca: Comstock Publ Ass, pp 687 – 68.
- Sukra Y, Djuwita I, Fahrudin M, 1996. Penerapan teknologi IVF dalam upaya peningkatan populasi serta produksi sel oviduk dan serum domba. Laporan PHB FFH IPB.

- Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Bousquet D, 2000. Influence of LH during in vitro maturation on bovine embryo production. In Proceeding of The Annual Conference International Embryo Transfer Society. Theriogenology 53 (1): 473.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, 2001. Hormone structures and synthesis. In Human Physiology. The Mechanism of Body Function. 8th edition. New York: Mc Graw Hill, pp 262 – 270.
- Widjiati S, Rimayanti, 2001. Seleksi ukuran folikel terhadap profil transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi in vitro. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Dik Rutin 2001.
- Yuliani E, 1997. Pengaruh penambahan serum dalam media TCM 199 dan CR 1 terhadap perkembangan embrio kambing lokal. Tesis, Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.

Lampiran

1. JUSTIFIKASI ANGGARAN

1.1. Anggaran Untuk Komponen Peralatan

No	Peralatan	Kegunaan	Satuan	Total
1.	Veno Jack 10 ml	Menampung Darah	2 Boks	600.000,-
2.	Alat Suntik 50 cc	Pengambilan Darah	20 Biji	300.000,-
3.	Jarum Suntik	Pengambilan Darah	2 Boks	100.00,-
4.	Filter Millipore 0,22 μ m	Filtrasi Darah	2 Boks	800.000,-
5.	Mikro Pipet	Pengambilan Spesimen KCKT/HPLC	2 Unit	1.000.000,-
6.	Yellow Tip	Memisahkan Serum	1 Bok	200.000,-
7.	Sephadex Columm	Fase Diam KCKT	1 Unit	13.000.000,-
8.	Sarung Tangan	Proteksi Dari Hormon	10 Biji	100.000,-
Total Keseluruhan (Rp)				16.100.000,-

1.2. Anggaran Untuk Bahan Aus (Material Penelitian)

No	Bahan Kimia	Kegunaan	Satuan	Total
1.	Dietieter	Ekstraksi Serum	5 Liter	500.000,-
2.	Metanol Absolut	Penguapan Serum	5 Liter	500.000,-
3.	Asetonetril	Fase Mobil KCKT	1 Unit	1.600.000,-
4.	PMSG Standard	Standarisasi	3 Vial	2.400.000,-
5.	Estradiol (E2) Standard	Standarisasi	3 Vial	1.200.000,-
No	Alat Tulis Kantor	Kegunaan	Satuan	Total
1.	Kertas HVS 70 & 80 g	Penulisan Laporan	4 Rim	100.000,-
2.	Tinta Komputer Hitam	Pencetakan Laporan	1 Unit	400.000,-
3.	Tita Komputer Warna	Pencetakan Laporan	1 Unit	700.000,-
Total Keseluruhan (Rp)				7.400.000,-

Lampiran (Lanjutan: Justifikasi Anggaran)

1.3. Anggaran Untuk Perjalanan

No	Perjalanan	Tujuan	Total
1.	Di beberapa kota/wilayah di Jawa Timur (Surabaya, Mojokerto, Gresik, Malang)	Koleksi Darah Kuda	1.000.000,-
2.	Dalam Kota Surabaya	Membeli/Persiapan Bahan dan Alat Penel.	250.000,-
3.	Kampus C ke Kampus B	Pemeriksaan Spesimes Serum	250.000,-
Total Keseluruhan (Rp)			1.500.000,-

1.4. Pengeluaran Lain

No	Lain-lain	Kegunaan	Satuan	Total
1.	Film dan Cuci Cetak	Dokumentasi	2 Rol	500.000,-
2.	Analisis Data	Evaluasi Hasil	-	500.000,-
3.	Diskusi/Seminar/Laporan	Evaluasi Penelitian & Publikasi	-	2.000.000,-
4.	Pemeliharaan/Perbaikan Alat	Pemeliharaan KCKT/HPLC	-	2.000.000,-
Total Keseluruhan (Rp)				5.000.000,-

mpiran

DUKUNGAN TERHADAP PELAKSANAAN PENELITIAN

2.1 Dukungan aktif yang sedang berjalan: TIDAK ADA.

2.2 Dukungan yang sedang dalam tahap pertimbangan: TIDAK ADA.

SARANA

3.1.Laboratorium

Nama	Kegunaan	Kapasitas
Kimia Analisis Instrumental Fakultas Farmasi Unair	Menetapkan Kadar PMSG	Memadai
Biologi Molekuler Tropical Disease Centre Unair	Isolasi dan Purifikasi PMSG Dari Serum Kuda	Memadai
Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Grati Pasuruhan	Uji Biologis Melalui Penanganan Kasus Hipofungsi Ovarium Pada Sapi	Memadai
Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair	Uji Biologis Melalui IVM dan IVF.	Memadai

3.2.Peralatan Utama yang Tersedia

Alat	Lokasi	Kegunaan	Kapasitas
KCKT/HPLC	Lab.Kimia Analisis Instr. FF Unair.	Penetapan Kadar PMSG	Memadai
Mikroskop Stereo Disecting	Lab.Kebid.Vet FKH Unair	Evaluasi Oosit/Embrio	Memadai
SDS PAGE	Lab. Biomol. TDC Unair	Isolasi/Purifi hasi PMSG	Memadai

mpiran : DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI

Nama lengkap : drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes.
 NIP : 132 014 463
 Pangkat/ Golongan : Penata Muda Tk. I/ III B
 Jabatan Pokok : Asisten Ahli
 Tempat/Tanggal Lahir : Surabaya, 15 Oktober 1966
 Jenis Kelamin : laki – laki
 Bidang Keahlian : Fisiologi
 Kesatuan/ Perguruan tinggi : Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR
 Alamat Kantor : Lab. I. Faal FK Unair
 Jl. Prof. Moestopo 47 Surabaya
 Tel. (031) 5023621
 Alamat Rumah : Demak Selatan IV/41 Surabaya
 Tel. (031) 5324002
 e-mail : kps@telkom.net

Pendidikan

No	Perguruan Tinggi	Kota	Tahun Lulus	Bidang Spesialis	Titel/ Ijazah/ Diploma
1.	UniversitasAirlangga	Surabaya	1988		SKH
2.	UniversitasAirlangga	Surabaya	1990		DRH
3.	UniversitasAirlangga	Surabaya	1998	Fisiologi	Mkes (S2)

Lampiran : DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI
Drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes

Pengalaman Riset

No	Judul Riset	Tahun
1.	Pengaruh Pemberian Rebusan Daun Jambu Biji, Teh, dan Angsana terhadap Kualitas Telur Ayam Ras	1990
2.	Pengaruh Pemberian Yodium terhadap Kadar HDL Tikus Putih	1992
3.	Pengaruh Pemberian Limbah Kertas terhadap Histopatologi Hati dan Ginjal Mencit .	1993
4.	Pengaruh Latihan Renang dan Fatigue Exercise Terhadap Kadar Kolesterol Darah pada Tikus Wistar	1994
5.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Pacar Banyu terhadap Kontraksi Uterus Tikus Putih	1994
6.	Pengaruh Pemberian Infusa Temulawak / <i>Curcuma rose</i> terhadap Kontraksi Uterus Tikus Putih.	1995
7.	Pengaruh Pemberian Ekstrak Bawang Putih (<i>Allium sativus</i>) terhadap Ketahanan Fisik Mencit	1996
8.	Pengaruh Pemberian Teh Hijau terhadap Kecepatan Laju Endap Darah Perifer Tikus Putih.	1997
9.	Pengaruh Pemberian Infusa Temulawak / <i>Curcuma rose</i> terhadap Kontraksi Otot Polos Trachea Marmut.	1998
10.	Pengaruh Latihan Fisik dan Puasa terhadap Absorpsi Glukosa Otot Skelet Tikus Putih.	1998
11.	Pengaruh Pemberian Infus Temulawak terhadap Kontraksi Jantung Kura.	1999
12.	Pengaruh Pemberian Taurin terhadap Ketahanan Fisik Tikus Putih	2000
13.	Penelitian Pendahuluan tentang Pola Hubungan antara Derajat Intensitas Latihan Olahraga dengan Derajat Stres Oksidatif.	2001

Lampiran : DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI
Drh. Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes

Pengalaman Publikasi

1. Pengaruh Pemberian Limbah Kertas terhadap Histopatologi Hati dan Ginjal Mencit, Media Kedokteran Hewan Vol III 1994.
2. Pengaruh Pemberian Infusa Temulawak / *Curcuma rose* terhadap Kontraksi Uterus Tikus Putih, KONAS IX dan Seminar Nasional IAIFI, Semarang 1995.
3. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum*) Terhadap Kemampuan Fisik Mencit, KONAS IX dan Seminar Nasional IAIFI, Semarang, 1995.
4. Pengaruh Pemberian Teh Hijau Terhadap Lama Waktu Perdarahan dan Jumlah Platelet pada Tikus Putih, Jurnal Penelitian UNAIR Vol. 5 No.1 LEMLIT UNAIR, 1997.
5. Kombinasi Renang Aerobik dan Diet Restriction terhadap Absorpsi 3,5 Methil D Glucose Otot Gastrocnemius Tikus Putih, KONAS X dan Seminar Nasional, Bandung, 1998
6. Radikal Bebas Pada Latihan Aerobik, Seminar IAIFI Cab. Surabaya, Nopember 1999
7. Glucose Transporter (GLUT), Seminar IAIFI Cab. Surabaya, Pebruari 2001
8. Penelitian Pendahuluan Tentang Pola Hubungan antara Derajat Intensitas Latihan pada Tikus dengan Derajat Stres Oksidatif, Seminar IAIFI Cab. Surabaya Mei 2001
9. Tekhnik Super Ovulasi ,Seminar IAIFI Cab. Surabaya, Agustus 2001
10. Pengaruh Exercise Terhadap Translokasi Glucose Transporter 4 (GLUT4). Seminar Nasional IAIFI, Malang 2001.
11. Pengaruh Buah Alpukat Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Hiperglikemia, Seminar Nasional IAIFI, Malang 2001
12. Penelitian Pendahuluan Tentang Pola hubungan antara Derajat Latihan Olah raga dengan Derajat Stres Oksidatif. Majalah Ilmu Faal Indonesia Vol 1. No 1 2002
13. Pengaruh Renang dan Pengurangan Diet Terhadap terhadap Absorpsi 3,5 Methil D Glucose Otot Soleus. Majalah Ilmu Faal Indonesia Vol 1 No.1 2002

Surabaya, 20 Mei 2002

Peneliti,


Kuncoro Puguh Santoso, M.Kes, Drh
NIP. 132 014 463

mpiran : **DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**

Widjiati, Msi, Drh

ngalaman Riset

No.	Tahun	Judul Penelitian	Biaya/Sponsor	Keterangan
1.	2001	Viabilitas oosit sapi setelah proses vitrifikasi dengan krioprotektan etilin glycol.	Dik Rutin	Anggota
2.	2001	Seleksi ukuran folikel terhadap profil transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi <i>in vitro</i>	Dik Rutin	Ketua
3.	2000	Pengaruh ekstrak n-butanol Gandarusa Vulgaris Nees terhadap penetrasi spermatozoa dalam proses fertilisasi <i>in vitro</i>	OPF	Anggota
4.	2000	Hambatan hesperitin <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i> terhadap penetrasi spermatozoa dalam proses fertilisasi <i>in vitro</i>	Iptek Dok	Anggota
5.	2000	Pengaruh hesperitin terhadap kultur <i>in vitro</i> embrio mencit	OPF	Ketua
6.	1999	Pengaruh ekstrak diklometan Gandarusa Vulgaris Nees terhadap proses spermatogenesis mencit	SPP / DPP	Anggota
7.	1999	Pengaruh ekstrak diklometan Gandarusa Vulgaris Nees terhadap gambaran histopatologi organ hati dan ginjal mencit	Iptek Dok	Anggota
8.	1999	Efek inhibitor fraksi diklometan dan methanol dari <i>Justicia Gandarusa</i> Bum. F. terhadap enzim hialuronidase mencit	Iptek Dok	Anggota

mpiran :

DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**Widjiati, Msi, Drh**

No.	Tahun	Judul Penelitian	Biaya/Sponsor	Keterangan
9.	1999	Uji toksisitas daun Gandarusa <i>Vulgaris Nees</i> terhadap gambaran darah dan histopatologi hati, ginjal, dan usus mencit jantan	DP3M	Anggota
10	1998	Penggunaan sel-sel granulose pada kultur <i>in vitro</i> embrio mencit terhadap satu sel	DIP / OPF	Ketua
11.	1997	Pengaruh gandarussa <i>vulgaris nees</i> terhadap kultur <i>in vitro</i> embrio mencit	SPP / DIP	Ketua
12.	1997	Pengaruh hesperidin sebagai inhibitor enzim hyloronidase spermatozoa mencit pada pencegahan fertilisasi <i>in vitro</i>	Iptek Dok	Anggota
13.	1996	Kultur <i>in vitro</i> Embrio mencit dalam Brinster	DIP / OPF	Ketua
14.	1996	Pengaruh fosfat, glukosa dan kombinasinya dalam medium kultur <i>in vitro</i> terhadap perkembangan embrio mencit	Tesis	Ketua
15.	1994	Efek terato genik alkil benzene sulfonate pada tikus putih	DIP / OPF	Ketua
16.	1995	Pengaruh air kali Surabaya terhadap efek terato genik dan gambaran histopatologi hati dan ginjal tikus putih	DIP / OPF	Ketua

mpiran : **DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**

Widjiati, Msi, Drh

ftar Publikasi

Purnomo, B. dan Widjiati 1992. Peningkatan produksi mudigah paruh melalui metode manipulasi mikro. Media Kedokteran Hewan.

Ajik, A., M. Moenif., R. Darsono, Arimbi dan Widjiati 1994. Pengaruh limbah pabrik kertas terhadap efek terato genik dan hitopatologi hati dan ginjal mencit. Media Kedokteran Hewan.

Mafruchati., M. dan Widjiati 1996. Kultur *In vitro* Embrio Mencit dalam Medium Brinster. Biomorfo.

Prajogo, B., A. Hinting, L. Hamdani dan Widjiati 1997. Pengaruh hesperidin sebagai inhibitor enzim hialuronidase spermatozoa mencit pada pencegahan fertilisasi *in vitro*. Perhiba.

Luqman, E.M., Widjiati, M. Mafruchati, B. Poernomo dan H.A. Hermadi 1997. Pengaruh pemberian Prostaglandin F2 alfa dan Prostaglandin E1 terhadap fertilitas spermatozoa mencit jantan. Media Kedokteran Hewan.

Widjiati, Y. Sukra, B. Purwantara dan L. Djuwita 1997. Pengaruh glukosa dalam medium kultur *in vitro* terhadap perkembangan embrio mencit. Media Kedokteran Hewan.

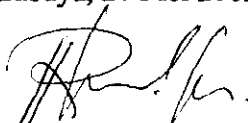
Widjiati, M. Matruchati, B. Purnomo, E. Luqman dan H.A. Hermadi 1998. Penggunaan sel-sel granulose pada kultur *in vitro* embrio mencit tahap satu sel. Media Kedokteran Hewan.

Widjiati, B. Prajogo, dan H.A. Hermadi 1998. Pengaruh gandarussa vulgans ness terhadap kultur *in vitro* embrio mencit. Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia, Malang.

Widjiati, E.S. Pangestue dan Budiarto 1998. Peran fosfat dalam medium kultur *in vitro* terhadap perkembangan embrio tahap preimplantasi. Media Kedokteran Hewan.

10. Widjiati, B. Prajogo dan E.M. Luqman 2000. Uji toksisitas daun Gandarussa vulgaris Ness terhadap gambaran darah dan histopatologi hati, ginjal dan usus mencit jantan. Jurnal Penelitian Universitas Airlangga.

Surabaya, 20 Mei 2002



(Drh. Widjiati, MSi)

NIP. : 131 887 882