

MANIPULASI EMBRIO PADA SAPI

Tinda Afriani
James Hellyward
Endang Purwanti
Jaswandi
Ferry Lyzmanto
Mangku Mundana



Andalas University Press

MANIPULASI EMBRIO PADA SAPI

Penulis :

Tinda Afriani
James Hellyward
Endang Purwanti
Jaswandi
Ferry Lyzmanto
Mangku Mundana

Ilustrasi Sampul dan Penata Isi :

Dyans Fahrezionaldo
Safry Y
Ikhsanul Anwar
Metriadi S
Manica W

Hak Cipta pada Penulis

Diterbitkan dan Dicetak Oleh :

Andalas University Press
Jl. Situjuh No. 1, Padang 25129, Telp/Faks. : 0751-27066
email : unandpress@unand.ac.id

Anggota :

Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia (APPTI)

Cetakan :

I. Padang, 2018

ISBN : 978-602-6953-33-9

Hak Cipta dilindungi Undang Undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebahagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari penerbit. Isi di luar tanggung jawab percetakan

Ketentuan Pidana Pasal 72 UU No. 19 Tahun 2002

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000.- (satu juta rupiah) atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000.- (lima milyar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000.- (lima ratus juta rupiah).

“Buku ini kami persembahkan untuk Orang tua, suami/
istri serta anak cucu kami yang teramat kami cintai dan
selalu mendampingi dalam kehidupan sehari-hari”

PRAKATA

Puji beserta syukur atas karunia Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya buku ajar “MANIPULASI EMBRIO PADA SAPI” telah dapat diterbitkan. Buku ajar ini adalah merupakan buku yang dapat dijadikan rujukan bagi mahasiswa fakultas peternakan yang ingin mempelajari segala sesuatu yang berkaitan dengan manipulasi embrio, mulai dari reproduksi, produksi sampai kepada aspek ekonomi serta juga bagi peternak yang ingin mengaplikasikan teknologi manipulasi embrio pada sapi.

Buku ajar ini ditulis berdasarkan hasil studi kasus dari penelitian yang berhubungan dengan teknologi manipulasi embrio dalam peningkatan kualitas dan kuantitas sapi, terutama di Indonesia. Buku ini merupakan kumpulan dari tulisan tentang manipulasi embrio pada sapi yang disusun dengan format baru. Teknologi manipulasi embrio pada sapi dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya MOET, IVF, *sexing* sperma, *sexing* embrio, cloning dan ternak chimera.

Keuntungan dari penerapan teknologi manipulasi embrio yaitu pemanfaatan genetik unggul dari ternak betina dan jantan unggul dalam rangka peningkatan mutu genetik ternak sapi di Indonesia. Selain itu pemanfaatan teknologi dapat digunakan untuk meningkatkan status ekonomi peternak. Semoga buku ini bisa memberi informasi dan mempermudah mahasiswa khususnya dalam mempelajari teknologi manipulasi embrio. Semoga dengan **pemanfaatan teknologi reproduksi manipulasi embrio pada sapi membantu Indonesia swasembada dengan potensi genetik lokal** dapat terwujud.

Padang, Maret 2018

Penulis,

DAFTAR ISI

Prakata	i
Daftar Isi	iii
Daftar Gambar	iv
BAB I Manipulasi Embrio pada Sapi	1
1.1 Pengertian Manipulasi Embrio	3
1.2 Sejarah Manipulasi Embrio	5
1.3 Manfaat Manipulasi Embrio	5
1.4 Sistem reproduksi sapi	7
BAB II Teknik Manipulasi Embrio	19
2.1 <i>Multiple Ovulation Embryo Transfer/ MOET</i>	21
2.2 <i>In Vitro Fertilisation/IVF (one sperm injection)</i>	29
2.3 <i>Sexing Sperma</i>	37
2.4 <i>Sexing Embrio</i>	54
2.5 Kloning	60
2.6 Ternak Chimera	73
BAB III Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Manipulasi Embrio	75
3.1 Tingkat Keberhasilan	77
3.2 Kendala dalam Penerapan Teknologi Manipulasi Embrio	82
3.3 Pasca Manipulasi Embrio pada Sapi	83
BAB IV ASPEK EKONOMI	95
4.1 Aspek Ekonomi	97
BAB V RINGKASAN	99
DAFTAR PUSTAKA	101

DAFTAR GAMBAR

1	Sistem reproduksi ternak betina	8
2	Tanda-tanda berahi (estrus)	9
3	Gambaran ovarium sapi Aceh pada berbagai siklus estrus	12
4	Mekanisme aktivasi oosit oleh spermatozoa pada mekanisme fertilisasi	13
5	Tahapan perkembangan embrio	14
6	Regulasi hormon reproduksi pada sapi	16
7	Inseminasi buatan	29
8	Folikel dan ovarium sapi Bali timor	34
9	Kualitas oosit sapi Bali timor	35
10	Morfologi oosit hasil koleksi ovarium mulai dari A-D	37
11	Skema pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan Putih telur	44
12	Contoh abnormalitas sperma	49
13	Viabilitas sperma dengan pewarnaan Eosin-Negrosin	49
14	Viabilitas sperma dengan pewarnaan Hoechst	49
15	Perbedaan spermatozoa hidup dan mati	49
16	Perkembangan embrio	54
17	Struktur blastula	54
18	Foto elektroforesis pada sapi Pesisir	55
19	Embrio sapi Pesisir yang di biopsi	57
20	Tahapan proses <i>Splitting</i> embrio	62
21	Tahapan kloning dalam pembentukan domba Dolly	64
22	Prosedur umum produksi embrio kloning menggunakan berbagai sumber sel donor	69
23	Embrio sapi tahap 2-32 sel yang diproduksi secara in vitro	79
24	Bentuk sel embrio viable dalam satu bidang pandang mikroskop	83

25	Metode flushing	84
26	Kualitas Embrio	88

BAB I
MANIPULASI EMBRIO PADA SAPI

1.1 PENGERTIAN MANIPULASI EMBRIO

Manipulasi menurut KBBI online adalah tindakan untuk mengerjakan sesuatu dengan tangan atau alat-alat mekanis secara terampil. Manipulasi merupakan sebuah proses rekayasa (penambahan, pengurangan, pengkaburan) sebuah realitas dengan melibatkan alat dan metoda yang telah disusun dengan maksimal, sehingga hasil sesuai dengan keinginan dan tujuan manusia (tujuan pelaksanaan manipulasi). Embrio menurut Gordon (2003) dalam Gunawan *et al.* (2014) merupakan indikator dari berhasilnya proses fertilisasi (pertemuan spermatozoa dan oosit) yang kompleks. Jadi, manipulasi embrio merupakan segala sesuatu yang dilakukan oleh manusia (peneliti dan peternak) untuk merekayasa embrio yang merupakan bagian penting dari perkembangan seekor ternak dilakukan untuk mencapai tujuan pemeliharaan.

Manipulasi embrio sapi adalah proses rekayasa yang dilakukan oleh manusia terhadap embrio sapi baik itu dilakukan sebelum maupun sesudah embrio itu terbentuk, dengan harapan dapat meningkatkan performan produksi sapi.

1. Faktor-faktor Pelaksanaan Manipulasi Embrio

Sapi merupakan ternak utama penghasil daging di Indonesia. Sapi sebagai penghasil daging utama tentunya menghendaki kualitas dan kuantitas genetik yang maksimal. Akan tetapi, saat ini mutu genetik dari sapi lokal Indonesia masih perlu ditingkatkan. Peningkatan mutu genetik dapat dilakukan dengan pemanfaatan teknologi reproduksi yaitu manipulasi embrio. Faktor-faktor yang menjadi pendorong peningkatan pengaplikasian penerapan teknologi manipulasi diantaranya adalah:

- a. Permintaan akan produk peternakan (terutama daging) cenderung mengalami peningkatan
- b. Peningkatan standart mutu produk yang dikehendaki konsumen
- c. Performa produksi sapi yang masih bisa dan perlu ditingkatkan
- d. Peternak menginginkan kondisi ekonomi yang lebih baik

Jiuhardi (2016) menyatakan jumlah penduduk Indonesia yang meningkat dan peningkatan kesadaran masyarakat terhadap pentingnya protein hewani menyebabkan konsumsi protein hewani,

khususnya daging sapi juga meningkat. Permintaan daging sapi yang meningkat tidak diimbangi peningkatan produksi daging sapi dalam negeri, maupun daging sapi nasional. Adapun beberapa permasalahan klasik dalam peningkatan produksi antara lain : jatuhnya mental para pengusaha/birokrat, khususnya dalam hal ini dibawah naungan lembaga pemerintah yakni: Kementerian Pertanian dan Kementerian Perdagangan RI; tata niaga; ego sektoral; penegakan aturan; program pemerintah yang kurang terencana; penyediaan pakan ternak dan pakan; pendampingan dan bimbingan.

Ternak lokal pada umumnya memiliki ukuran badannya relatif lebih kecil namun menyumbang sekitar 70% untuk mencukupi kebutuhan konsumsi daging di Indonesia. Sumbangan ekonomi ternak lokal, dalam kenyataannya, sangat besar dibanding dengan ternak eksotik. Dalam upaya untuk meningkatkan produktivitas ternak lokal maka perlu dipelajari secara mendalam karakteristik, potensi serta permasalahan ternak lokal sebagai basis perencanaan ke depan. Berbagai teknologi cukup tersedia untuk meningkatkan produktivitas ternak lokal, namun penerapannya banyak tergantung pada nilai komersialnya. Ternak sapi lebih banyak mendapat perhatian dari ternak kerbau, begitu juga dengan penerapan teknologi reproduksi (Bamualim dan Wirdayati, 2006).

2. Teknik-teknik Manipulasi Embrio Sapi

Manipulasi embrio sebagai cara rekayasa proses pembentukan embrio, dapat dilakukan pada tahap awal, akhir, pada induk betina, induk jantan, maupun pada embrio yang sudah terbentuk. Hasil akhir yang diharapkan yaitu embrio yang dihasilkan sesuai dengan keinginan dari manusia, sesuai dengan tujuan pemeliharaan (efektif dan efisien). Sebagai proses kompleks manipulasi embrio pada sapi telah dilakukan dengan cara-cara berikut ini :

- **MOET (*multiple ovulation embryo transfer*)**
- **IVF (*in vitro fertilitation*)**
- ***Sexing* Sperma**
- ***Sexing* Embrio**
- **Kloning (*Splitting* embrio)**
- **Ternak Chimera**

Dari cara dalam manipulasi embrio diatas, setiap teknik keunggulan dibandingkan dengan teknik yang lainnya, walaupun tidak menutupi kenyataan masih diperlukan perbaikan untuk peningkatan kualitas embrio yang dihasilkan.

1.2 SEJARAH MANIPULASI EMBRIO

Manipulasi embrio (TE) telah berhasil dilakukan untuk pertama kalinya pada kelinci oleh Walter Heape (Betteridge, 1977; Sudarto, 1985) pada tanggal 27 April 1890 di Inggris. Pada ternak superovulasi dan transfer embrio pertama kali dilakukan oleh Lewis dan Miller pada tahun 1931 (Jillella, 1982 ; Sudarto 1985). Pada tahun 1949 Warwick dan Berry berhasil melakukan pemindahan embrio pada domba dan kambing, disusul keberhasilan pada sapi tahun 1951 (Willet, Black, Casida, Stone, Buckner ; Hafez 1980 ; Sudarto, 1985). Walaupun transfer embrio telah berhasil pada berbagai jenis hewan, kebanyakan peneliti lebih cenderung mengaplikasikan teknologi transfer embrio (TE) pada ternak besar seperti domba, kambing atau sapi (Aliambar, 1981 ; Sudarto, 1985).

Aplikasi teknologi reproduksi pada ternak sapi di Indonesia dalam beberapa dekade terakhir telah menunjukkan perkembangan yang cukup pesat. Hal ini dimulai dengan penerapan teknologi Inseminasi buatan (IB) sekitar tahun 1970-an yang ditandai dengan didirikannya Balai Inseminasi buatan (BIB) Lembang. Aplikasi TE di Indonesia dimulai pada awal dasawarsa 1980-an. Keberhasilan teknologi TE di Indonesia masih sangat beragam dan dampaknya untuk perkembangan maupun peningkatan produktivitas ternak masih sangat minim. Program untuk mengembangkan dan memanfaatkan teknologi TE masih belum terfokus dengan baik. Padahal teknologi ini merupakan salah satu wahana yang sangat penting dalam rangka meningkatkan produktivitas ternak (Situmorang dan Endang, 2004). Teknologi TE memberikan keunggulan lebih dibandingkan dengan IB yaitu dapat meningkatkan mutu genetik dari kedua induk (sisi betina dan jantan) (Davis, 2004 dan Feradis, 2010; Puspita, 2014).

1.3 MANFAAT MANIPULASI EMBRIO

Manfaat dari manipulasi embrio dapat di uraikan dalam beberapa bagian, yaitu:

1. Manfaat transfer embrio menurut Sudarto (1985) adalah meningkatkan jumlah keturunan dari betina yang mempunyai

kualitas unggul (di superovulasi), penyimpanan embrio jangka panjang, transportasi embrio, memperpendek waktu generasi, pemilihan jenis kelamin embrio (*sexing of embryo*), kelahiran kembar (*twin*), memproduksi kembar serupa (*identical twin*), kloning, dan untuk penelitian dan riset.

2. Meningkatkan mutu genetik ternak. Aplikasi teknologi reproduksi dapat meningkatkan mutu genetik (Vivanco-Mackie, 2001; Parera, 2014), dan memungkinkan hewan dengan mutu genetik tinggi untuk memproduksi anak lebih dari kapasitasnya (Baldassarre dan Karatzas, 2004; Parera, 2014).
3. Mempercepat peningkatan populasi.
4. Mencegah penyakit hewan menular yang ditularkan melalui saluran kelamin.
5. Mempercepat pengenalan material genetik baru melalui ekspor embrio.
6. Meningkatkan efektifitas dan efisiensi dalam meningkatkan produksi.
7. Memanfaatkan sumber oosit unggul dari induk unggul yang telah di potong. IVF diharapkan dapat memproduksi embrio sapi dalam jumlah massal (Kainn *et al.*, 2008).
8. Pemisahan spermatozoa dapat meningkatkan efisiensi sapi potong (Situmorang dan Endang, 2004).
9. Peningkatan *breeding* untuk pemilihan bibit unggul (Putri *et al.*, 2015).
10. Kloning dapat meningkatkan pengembangan ilmu pengetahuan, memperbanyak dan mengembangkan bibit unggul, diagnostik dan terapi (Rusda, 2004; Tenriawaru, 2013).
11. Meningkatkan mutu produk daging atau susu (kualitas dan kuantitas).
12. Meningkatkan pendapatan ekonomi peternak. Peningkatan pendapatan peternak secara ringkas adalah :

Penentuan jenis kelamin embrio meningkatkan efisiensi ekonomi dalam TE (Willett dan Hillers, 1994 : Afriani, 2014). Peningkatan efisiensi reproduksi induk sapi menjadi relative lebih baik setelah diinovasi teknologi reproduksi dengan jenis kelamin anak jantan

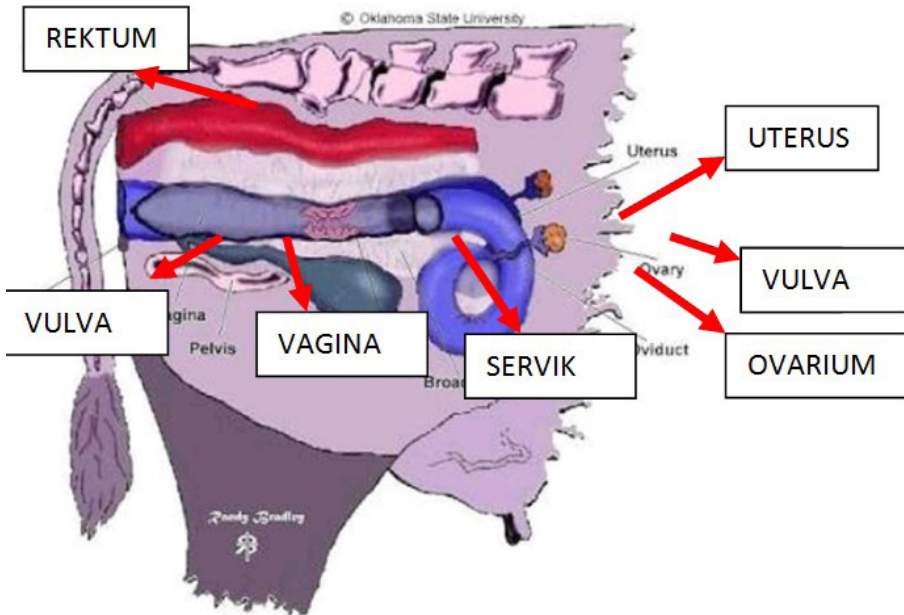
meningkat 12 persen, estimasi ekonomi pada induk sapi yang diaplikasi teknologi reproduksi meningkatkan pendapatan sebesar 22.53 % per bulan (Sumaryadi *et al.*, 2010). Pengamatan berahi merupakan salah satu faktor penting dalam tata laksana reproduksi sapi Bali. Kegagalan dalam deteksi berahi dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan. Akibatnya efisiensi reproduksi menurun sehingga mempengaruhi kebijakan ekonomi dalam pemeliharaan ternak (Siregar, 2011; Mardiansyah *et al.* 2016). Upaya yang dilakukan untuk percepatan estrus antara lain pemberian penambahan CIDR (*Controlled Internal Drug Release*), tetapi harga preparat CIDR ini cukup tinggi, untuk mengatasi masalah ini maka dapat dilakukan melalui penyuntikan hormone gonadotropin (progesteron) dengan penanaman spons dalam vagina. Ditinjau dari segi ekonomis metode ini sangat efisien dan efektif digunakan dalam penyerentakan berahi (Zaenuri, 2001; Mardiansyah, 2016).

Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan salah satu pilihan yang tepat dalam rangka peningkatan efisiensi reproduksi yang mampu meningkatkan efisiensi usaha peternakan, baik dalam skala peternakan rakyat, maupun dalam skala komersial (Saili *et al.*, 1998; Afiati 2004). Maxwell *et al.* (1984) dalam Afiati (2004), efisiensi usaha dalam mengubah rasio spermatozoa X dan Y dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi BSA, waktu atau lama spermatozoa menembus larutan BSA, dan konsentrasi spermatozoa yang akan dipisahkan dalam cairan pengencer.

1.4 SISTEM REPRODUKSI SAPI

Teknologi reproduksi manipulasi embrio tentunya akan berhasil dengan pemanfaatan informasi yang berkaitan dengan sistem reproduksi dan tahapan perkembangan embrio. Karena pada sistem inilah proses dan hasil reproduksi dari ternak (sperma, oosit, embrio) akan berlangsung. Sistem reproduksi pada sapi mencakup keseluruhan sistem yang terlibat langsung dan tidak langsung dalam menunjang sistem reproduksi. hal- hal penting yang perlu diketahui dalam manipulasi embrio adalah: Organ-organ reproduksi, siklus reproduksi, ferlilisasi dan tahapan perkembangan embrio, serta hormon-hormon reproduksi pada sapi.

1.4.1 Organ Reproduksi



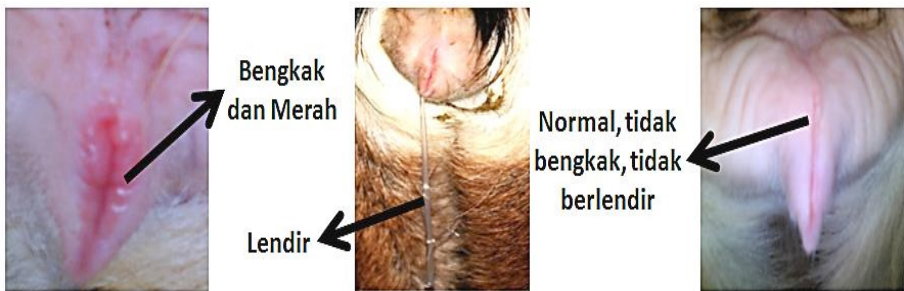
Gambar 1. Sistem reproduksi ternak betina

Organ reproduksi sapi betina terdiri dari uterus sampai vulva. Organ reproduksi ini memiliki peran masing-masing. Ovarium atau indung telur merupakan organ penghasil sel telur (oosit). Pada sapi oosit yang di buahi biasanya hanyalah satu oosit, sehingga sapi disebut sebagai ternak unipara. Secara sekilas organ reproduksi sapi dapat dilihat pada Gambar 1. Sedangkan pada sapi jantan organ reproduksi yang memiliki fungsi yang relevan dengan ovarium adalah testis, dimana spermatozoa terbentuk. Organ reproduksi pada sapi menjadi salahsatu penentu dalam proses pembentukan embrio. Dimana oosit yang dihasilkan oleh ovarium dan spermatozoa yang diproduksi pada testis akan menjadi awal terbentuknya embrio. Organ reproduksi yang terbebas dari penyakit kelamin akan membantu meningkatkan performa produksi sapi.

1.4.2 Siklus reproduksi

Siklus reproduksi dapat dibagi menjadi pebertas, siklus berahi/estrus, perkawinan, kebuntingan dan kelahiran. Siklus estrus merupakan jarak waktu antara satu estrus ke fase estrus berikutnya. Siklus

estrus pada dasarnya dibagi menjadi 4 fase yaitu : **proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus**. Estrus merupakan tanda-tanda awal sapi betina siap untuk kawin. Tanda-tanda estrus untuk setiap ternak akan berbeda-beda, tetapi umumnya estrus dapat ditandai dengan gejala yang dapat dilihat oleh peternak. Tanda-tanda estrus ternak (sapi dan kambing) yang umum dijadikan indikator estrus dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tanda-tanda berahi (estrus) (Syawal, 2015)

Menurut (Saili *et al.*, 2009) intensitas berahi ditentukan menggunakan skor. intensitas berahi dengan skor 1(+) diberikan bagi ternak yang kurang memperlihatkan gejala keluar lendir, keadaan vulva (bengkak, basah, dan merah) kurang jelas, nafsu makan tidak tampak menurun dan kurang gelisah serta tidak terlihat gejala menaiki dan diam bila dinaiki oleh sesama ternak betina, intensitas berahi skor 2(++) diberikan pada ternak yang memperlihatkan semua gejala berahi diatas, kecuali gejala menaiki ternak betina dan diam bila dinaiki sesama betina. Sedangkan intensitas berahi skor 3(+++) diberikan bagi ternak sapi betina yang memperlihatkan semua gejala berahi secara jelas. Gejala berahi yang umum pada sapi Bali antara lain: keluar lendir bening dari vulva, gelisah, berusaha menaiki sapi lain, vulva bengkak berwarna merah, berusaha menaiki sapi lain dan menggosokkan badannya ke sapi lain. Apabila diperhatikan persentase berahi sapi Bali memperlihatkan berahi 100%, dapat diyakini bahwa tampilan berahi seperti inilah yang telah membuat sapi Bali memiliki tingkat kesuburan yang tinggi, yakni mencapai 80% (Suranjaya *et al.*, 2010; Mardiansyah *et al.*, 2016).

Istilah-istilah peternakan sapi diantaranya yaitu sapi dara dan sapi induk. Sapi dara yaitu sapi yang telah mampu untuk mempunyai keturunan, sedangkan sapi induk merupakan sapi yang sudah pernah

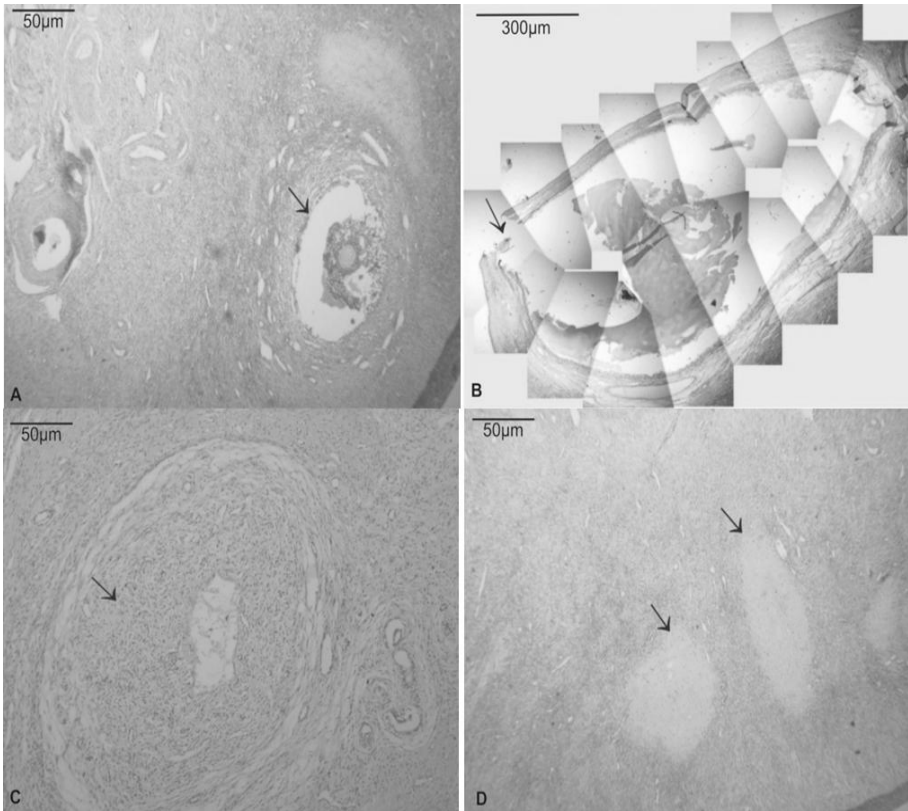
melahirkan. Sapi dara mampu memperlihatkan gejala berahi dengan intensitas yang jelas dengan rata-rata intensitas berahi 2.87 ± 0.35 , sedangkan sapi Bali induk memperlihatkan intensitas sedang dengan rata-rata intensitas berahi 2.27 ± 0.45 dan persentase intensitas berahi setiap skor 1(0%), skor 2(43,3%), skor 3(56,7%). Intensitas berahi sapi Bali dara lebih tinggi daripada sapi induk, permulaan timbulnya berahi (onset berahi) terjadi lebih awal pada sapi induk dibandingkan dengan sapi dara. Sedangkan nilai persentase berahi, *Service Per Conception*, *Non Return Rate*, dan *Conception Rate* pada sapi Bali dara dan induk menunjukkan tidak ada perbedaan nyata ($P > 0,05$) terhadap kedua paritas (Mardiansyah *et al.*, 2016).

Salah satu pengetahuan yang bisa dianggap baru di Indonesia dalam bidang reproduksi hewan adalah tentang dinamika folikuler (*follicular dynamics*) atau secara lebih khusus sering disebut dengan gelombang folikuler (*follicular wave*). Penelitian tentang gelombang folikuler terutama di negara-negara yang telah maju terus-menerus dilakukan terutama dalam kaitannya dengan program-program peningkatan reproduktivitas ternak seperti sinkronisasi estrus (berahi), IB, dan superovulasi pada TE (Hariadi, 2005; Hafizuddin *et al.*, 2012). Dinamika folikuler pada hewan terjadi dalam bentuk gelombang-gelombang perkembangan folikel. Suatu gelombang perkembangan folikel meliputi pertumbuhan serentak sekelompok folikel, satu diantaranya akan menjadi folikel dominan, mencapai ukuran terbesar, serta akan menekan perkembangan folikel-folikel lain yang lebih kecil (Noseir, 2003; Siregar, 2010; Hafizuddin *et al.*, 2012). Pengetahuan dasar dinamika folikuler sangat bermanfaat dalam pemantauan fertilitas sapi (Townson *et al.*, 2002; Hafizuddin *et al.*, 2012), dasar perbaikan dalam manipulasi reproduksi (Evans, 2003; Hafizuddin *et al.* 2012), dan mengklarifikasi kejadian yang berperan dalam vulasi dan sinkronisasi estrus secara lebih cermat, sehingga mempertinggi respon superovulasi.

Manfaat dan kegiatan penelitian fungsi ovarium telah memberikan kontribusi besar untuk pemahaman terhadap keistimewaan ovarium berdasarkan dinamika folikuler (Patil *et al.*, 2007; Hafizuddin, 2012). Regulasi fungsi-fungsi fisiologis ovarium terhadap perkembangan folikel sangat kompleks. Menurut Hariadi (2005) dalam Hafizuddin (2012) pada awal terbentuknya folikel, ternyata folikel-folikel preantral dalam perkembangannya lebih bergantung pada faktor-faktor pertumbuhan lokal dari pada faktor hormonal (gonadotropin). Pada pertengahan perkembangannya, vaskularisasi yang lebih baik

dan tumbuh berkembang dengan pesat oleh pengaruh *FSH* dan *LH* dari hipofisa anterior. Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan folikel tersebut mungkin juga berpengaruh terhadap pola gelombang folikuler. Regulasi fungsi-fungsi fisiologis ovarium terhadap perkembangan folikel sangat kompleks. Menurut Hariadi (2005) dalam Hafizuddin (2012) pada awal terbentuknya folikel, ternyata folikel-folikel preantral dalam perkembangannya lebih bergantung pada faktor-faktor pertumbuhan lokal dari pada faktor hormonal (gonadotropin). Pada pertengahan perkembangannya, vaskularisasi yang lebih baik dan tumbuh berkembang dengan pesat oleh pengaruh *FSH* dan *LH* dari hipofisa anterior. Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan folikel tersebut mungkin juga berpengaruh terhadap pola gelombang folikuler.

Proses pertumbuhan folikel, ovulasi, dan pembentukan CL sangat dipengaruhi oleh sirkulasi hormon reproduksi dalam tubuh. Hipotalamus menghasilkan GnRH berfungsi untuk menstimulasi pengeluaran *FSH* dan *LH* oleh hipofisa anterior sebagai respons terhadap estrogen atau progesteron. Dinamika folikuler pada hewan domestik terjadi dalam beberapa gelombang dengan jumlah gelombang berbeda-beda antar breed maupun antar spesies hewan. Namun dalam satu siklus estrus, hanya satu gelombang yang melepaskan sel telur (oosit) atau disebut juga gelombang ovulatori. Mekanisme yang mengatur dinamika folikuler adalah mekanisme hormonal dan atau mekanisme lokal seperti misalnya, *growth/inhibiting* factors, inhibin, aktivin, folistatin, dan estradiol (estrogen) (Hafizuddin, 2012). Ovarium sapi Aceh memiliki morfometri dan struktur histologis yang berbeda selama fase siklus estrus terjadi. Perbedaan morfometri dan struktur histologis tersebut diduga memiliki peran dalam proses reproduksi pada sapi Aceh (Jallaluddin, 2014). Gambaran ovarium sapi Aceh pada setiap siklus estrus dapat dilihat pada Gambar 3.

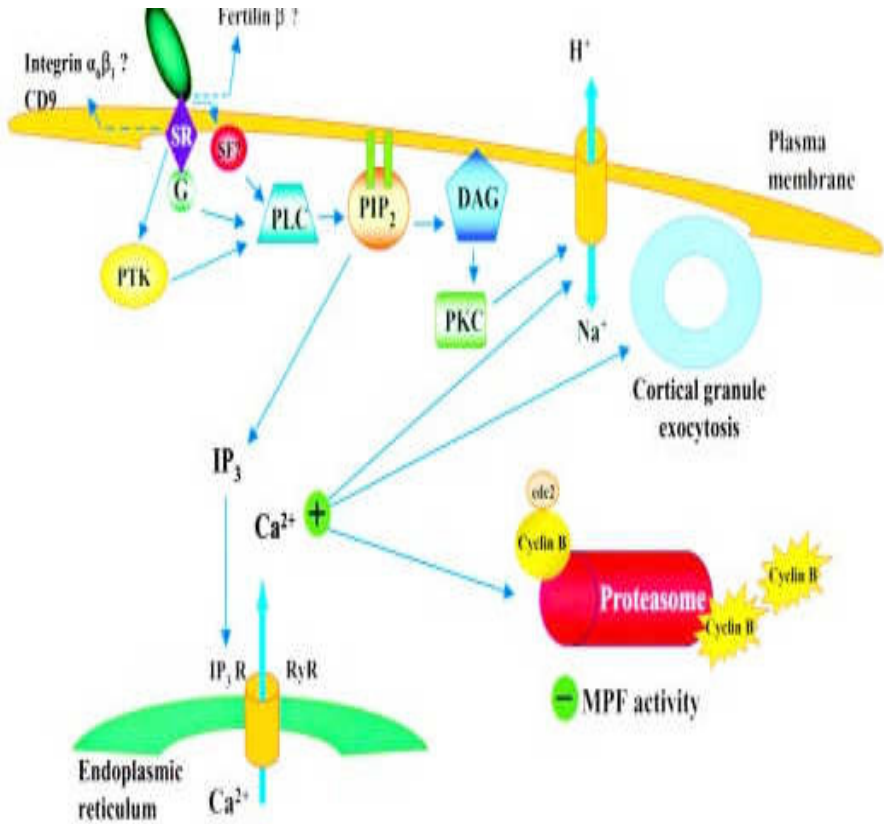


Gambar 3. Gambaran ovarium sapi Aceh pada berbagai fase siklus estrus dengan pewarnaan HE. (A). Proestrus, folikel tersier muda sedang mengalami pematangan dan letaknya masih jauh dari kortek, (B). Estrus, folikel de Graaff sudah pecah/ovulasi, (C). Metastrus, korpus luteum berkembang dan matang dan (D) Diestrus, korpus albicans mengalami degenerasi (Jallaluddin, 2014).

1.4.3 Fertilisasi dan tahapan perkembangan embrio

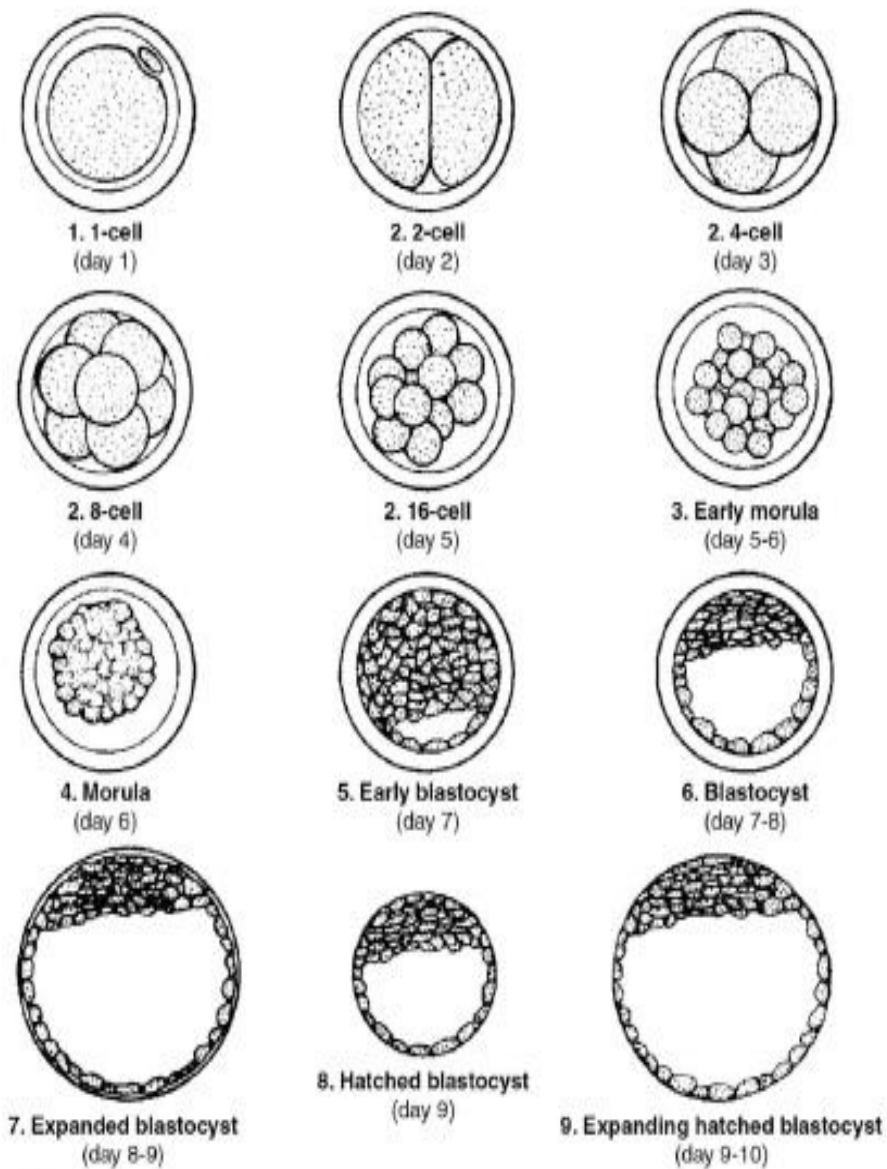
Embrio terbentuk karena bertemunya oosit dan spermatozoa. Proses fertilisasi terdiri dari beberapa tahapan dimulai dari perjalanan spermatozoa yang akan membuahi oosit, penetrasi spermatozoa menembus zona pelusida oosit, fusi antara spermatozoa dan membran plasma oosit serta terjadinya syngami. Syngami adalah saat genom kedua gamet bergabung membentuk genom embrio (Gardner *et al.* 2007; Gunawan *et al.*, 2014). Spermatozoa terlebih dahulu harus melalui tahapan reaksi akrosom sebelum memasuki proses fertilisasi. Reaksi akrosom terjadi karena adanya interaksi antara oosit yang dikelilingi sel kumulus yang mengalami ekspansi dengan integrin yang

spesifik pada membran spermatozoa. Proses tersebut diawali dengan terjadinya kenaikan Ca^{2+} yang masuk melalui membran plasma spermatozoa sehingga memicu terjadinya reaksi akrosom. Oosit yang siap dibuahi adalah oosit yang telah mengalami proses maturasi yaitu pada fase metafase II (MII) yang ditandai dengan terbentuknya badan polar I. Proses aktivasi oosit oleh spermatozoa pada saat fertilisasi dijelaskan oleh Alberio *et al.* (2001) dengan ilustrasi sebagai berikut:



Gambar 4. Mekanisme aktivasi oosit oleh spermatozoa pada mekanisme fertilisasi (Alberio *et al.* 2001) : (Aini, 2016).

Tahapan perkembangan embrio juga member informasi penting dalam manipulasi embrio terutama untuk *sexing* dan *Splitting* embrio. Tahapan perkembangan embrio dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Tahapan Perkembangan Embrio (Robertson dan Nelson 2009); (Puspita, 2014).

Perkembangan embrio terjadi mulai dari proses fertilisasi antara oosit dengan spermatozoa. Oosit yang diperoleh dari hasil ovulasi secara alami atau melalui maturasi secara *in vitro* adalah dalam kondisi matang (siap untuk dibuahi) yaitu pada kondisi metafase II (M- II). Perkembangan selanjutnya terjadi karena adanya aktivasi oleh spermatozoa atau proses aktivasi secara buatan. Aktivasi oosit oleh spermatozoa terjadi pada proses fertilisasi pada saat spermatozoa melakukan inisiasi terhadap fluktuasi Ca^{2+} di dalam oosit sampai terbentuk pronukleus. Fluktuasi Ca^{2+} selama fertilisasi terjadi beberapa jam sampai terbentuknya pronukleus kemudian berhenti dan terjadi lagi pada awal pembelahan mitosis embrio (Jones, 2007; Gunawan *et al.*, 2014).

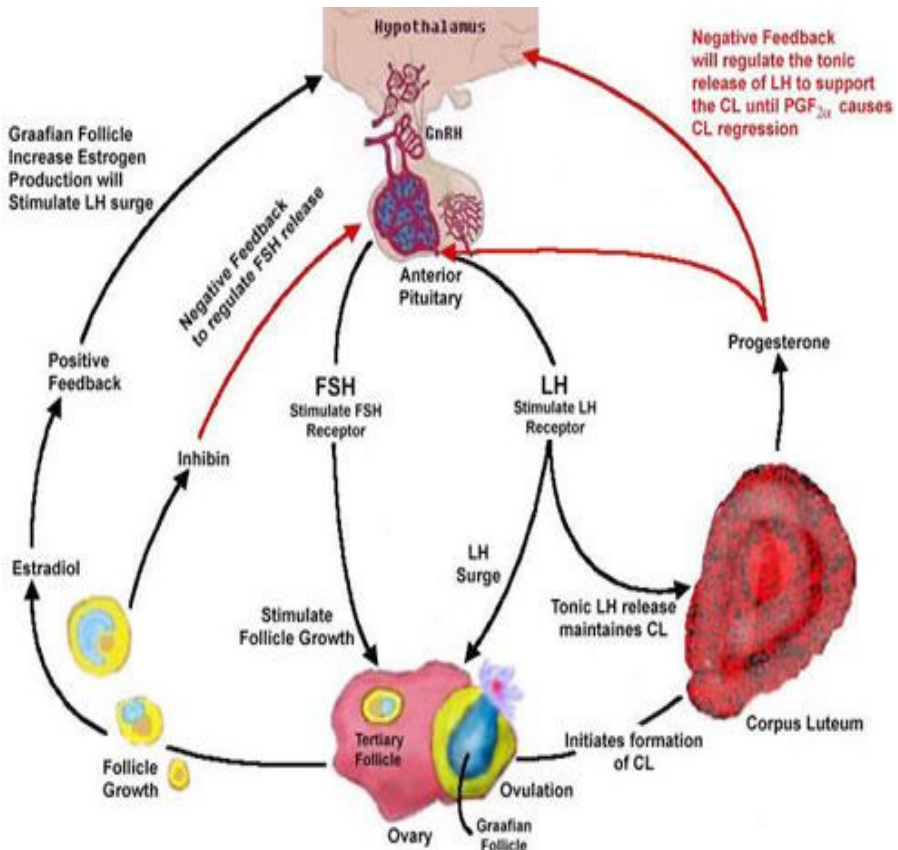
1.4.4 Hormon-hormon reproduksi

Hormon-hormon reproduksi Hormon berasal dari bahasa Yunani "*horman*" yang berarti yang menggerakkan adalah pembawa pesan kimiawi antar sel atau kelompok sel. Hormon digunakan dalam superovulasi untuk merangsang pembentukan sel telur matang yang lebih banyak dari ukuran normal. Hormon yang digunakan adalah hormon gonadotropin eksogen yang berasal dari luar tubuh. Hormon yang dapat digunakan untuk merangsang pembentukan sel telur yang lebih banyak adalah :

- 1) FSH
- 2) LH
- 3) PMSG
- 4) hCG
- 5) hMG
- 6) PGF 2α
- 7) Gabungan dari hormon diatas

Hormon berperan dalam proses ovulasi oosit. Regulasi hormon pada sapi dapat dilihat pada Gambar 6. Kadar hormon reproduksi seperti estrogen dan progesteron berperan dalam menentukan siklus estrus pada seekor ternak betina. Kadar hormon estrogen pada puncak perkembangan folikel atau pada saat estrus pada sapi perah adalah 320 ng/ml, sedangkan kadar progesteron pada saat estrus tidak terdeteksi. Kadar progesteron baru dapat dideteksi mulai hari ke- 4 setelah estrus yaitu 2,4 ng/ml dan terus meningkat menjadi 5,2 ng/

ml, 7,7 ng/ml masing- masing pada hari ke- 6 dan ke- 8 (Valdez *et al.*, 2005; Arimbawa *et al.*, 2012). Menurut McDonald (2000); Arimbawa *et al.* (2012) kadar progesteron pada sapi fase luteal adalah 6,6 ng/ml sedangkan pada sapi yang sedang bunting kadar progesteron adalah > 6,6 ng/ml. Penelitian terhadap kadar hormon reproduksi pada sapi Bali belum banyak dilaporkan sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap kadar hormon estrogen maupun progesteron dalam satu siklus estrus sapi Bali.



Gambar 6. Regulasi hormon reproduksi pada sapi (M A H 2000; Hafizuddin, 2012).

1.4.5 Waktu induksi

Waktu untuk induksi hormon menentukan ketepatan dalam pelaksanaan IB. Waktu penyuntikan hormon eksogen juga berpengaruh terhadap besar kecilnya rangsangan yang diterima oleh setiap organ dan jaringan- jaringan. Kompetensi sel sasaran tergantung kepada banyak faktor, seperti spesies hewan, jenis kelamin, kebuntingan, nutrisi, pencahayaan, kondisi refraktori, suhu, umur, dan hormon-hormon lain di dalam sistem (Turner dan Bagnara, 1988 ; Solihati *et al.*, 2006). Kadar progesteron pada sapi Bali mulai hari ke-0 (estrus) : $0,52 \pm 0,03$, mulai meningkat pada hari ke-4 pada kadar $2,03 \pm 0,06$, mencapai puncak pada hari ke-14 dengan kadar $9,52 \pm 0,06$ dan mulai menurun pada hari ke-15 dengan kadar $7,96 \pm 0,07$ (Arimbawa *et al.*, 2012).

BAB II
TEKNIK MANIPULASI EMBRIO

2.1 MULTIPLE OVULATION EMBRYO TRANSFER/ MOET

Produksi embrio secara in vivo juga dikenal dengan teknologi Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET). Teknologi ini sudah sangat luas diaplikasikan (Cunningham, 1999; Situmorang dan Endang, 2004) seperti di Eropa, Amerika, Jepang, Australia dan Negara maju lainnya. Tujuan dari teknologi ini adalah untuk menghasilkan embrio yang banyak dalam satu kali siklus. Hal ini dapat dicapai dengan penyuntikan hormon gonadotrophin (*FSH*, *PMSG*) secara intra muscular pada siklus berahi hari ke 10. Penyuntikan *PMSG* dilakukan satu kali penyuntikan sedang *FSH* diberikan umumnya 2 x sehari dengan interval waktu 12 jam selama 3-5 hari pemberian.

Dalam pelaksanaan MOET, setidaknya ada 4 tahapan penerapan teknologi yang harus dilalui yaitu:

1. Sinkronisasi estrus
2. Superovulasi
3. Inseminasi buatan
4. Transfer embrio

roduksi embrio dapat mencapai 30 embrio/koleksi, tetapi rata-rata hanya sekitar 5-7 embrio/koleksi yang layak untuk ditransfer atau dibekukan. Sehingga seekor sapi (donor) secara teoritis dapat menghasilkan 20-30 embrio per tahun. Donor yang memberikan respons yang baik pada perlakuan superovulasi pertama juga memberikan respons yang sama pada superovulasi yang berikutnya (Situmorang *et al.*, 1993; Situmorang dan Endang, 2004). Untuk tujuan perbanyak ternak yang berkualitas, teknologi MOET akan sangat efektif, karena yang diperbaiki adalah hewannya (diploid), bukan sekedar up-grading (haploid) seperti pada teknologi IB. Oleh karena itu teknologi TE dapat dipandang sebagai upaya mengganti ternak yang ada dengan populasi baru (*breed replacement*) (Situmorang dan Endang, 2004).

MOET sebagai teknologi in vivo yang dilangsungkan dalam tubuh ternak merupakan rangkaian dari proses yang dimulai dari superovulasi sampai kepada transfer embrio. Produksi embrio in vivo ternak sapi dipengaruhi antara lain oleh respon sapi donor terhadap program superovulasi yang sangat bervariasi, immunoaktifitas hormon superovulasi (*FSH*) serta keterbatasan jumlah sapi donor (Imron *et al.*, 2007).

2.1.1 Superovulasi.

Superovulasi merupakan bagian terpenting dari pelaksanaan MOET. Superovulasi menurut Sudarto (1985) adalah pengadaan ova (oosit) dalam jumlah banyak dari induk donor yang memiliki kualitas genetik yang tinggi. Merupakan salah satu syarat utama yang harus ditempuh sebelum transfer embrio. Superovulasi adalah perlakuan terhadap induk donor untuk mendapatkan sel telur yang diovulasikan lebih banyak dari biasanya dengan memberikan hormon-hormon tertentu dari luar.

Superovulasi memerlukan pemberian sediaan gonadotropin yang kaya akan atau meniru efek *FSH* (*Follicle stimulating hormon*). Disamping itu *FSH* harus ada dalam periode yang cukup untuk memacu pertumbuhan dan pematangan akhir oosit. Sediaan *FSH*, *PMSG*, dan *hMG* (*human menopausal gonadotrohin*) merupakan agen gonadotropin yang digunakan untuk superovulasi. Hasil dari superovulasi, meliputi jumlah dan kualitas embrio, sangat bervariasi dan sulit diramalkan. Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi respon superovulasi pada masing-masing individu donor (Dielman dan Bavers, 1993; Putro, 1995). Faktor penting dalam penerapan superovulasi adalah ternak donor untuk superovulasi, hormon yang di induksi, waktu induksi, cara induksi, pelaksanaan di lapang (kualitas SDM). Superovulasi pada sapi dapat dirangsang dengan penyuntikan hormon-hormon gonadotrophin eksogen. Hormon gonadotrophin eksogen yang sering digunakan untuk superovulasi diantaranya *pregnant mare's serum gonadotrophin* (*PMSG*), *follicle stimulating hormon* (*FSH*) dan *human menopause gonadotrophin* (*hMG*), *luteinizing hormon* (*LH*) atau gabungan dari hormon tersebut dengan dosis yang bervariasi.

Program superovulasi dimulai dengan seleksi donor berdasarkan fase reproduksi dan fase kesehatannya. Setelah itu, sapi donor disinkronisasi dengan implan preparat progesteron intravagina menggunakan *Controlled Internal Drug Release* (*CIDR*) (*Eazi-Breed tm CIDR*, Pharmacia Upjohn) yang mengandung 60 mg medroxy progesteron acetate secara intra vaginal selama 11 hari. Hari pertama pemasangan *CIDR* didefinisikan dengan hari ke-0. Setelah tujuh hari diimplantasi menggunakan *CIDR*, sapi dipalpasi rektal untuk mengetahui status reproduksi dan mengecek kondisi ovarium (fase luteal atau fase folikular). Superovulasi dilakukan dengan injeksi *FSH* secara intra muscular. Penyuntikan *hCG* pada proses superovulasi

dengan menggunakan kombinasi CIDR dan *FSH* menyebabkan peningkatan respon superovulasi dan jumlah CL yang terbentuk pada induk sapi donor Brangus secara nyata. Selain itu juga meningkatkan jumlah CL yang terbentuk, jumlah embrio terkoleksi dan jumlah embrio yang layak transfer. Penyuntikan hCG pada proses superovulasi dengan menggunakan kombinasi CIDR dan *FSH* menyebabkan peningkatan respon superovulasi dan jumlah CL yang terbentuk pada induk sapi donor Brangus secara nyata. Selain itu juga meningkatkan jumlah CL yang terbentuk, jumlah embrio terkoleksi dan jumlah embrio yang layak transfer (Kaiin dan Tappa, 2006).

Manipulasi berahi dan superovulasi dari 10 ekor sampel yang menampakkan berahi secara serentak hanya 8 ekor (80%) dan sisanya diulang dua ekor (20%) dilakukan pengulangan manipulasi berahi. Adapun yang kontrol dalam satu siklus berahi hanya 4 ekor (40%) yang menunjukkan berahi. Seluruh induk menampakkan berahi 100% selama dua siklus berahi, kemudian sapi-sapi yang berahi diineminasi buatan. induk sapi yang diaplikasi teknologi reproduksi memiliki kinerja reproduksi yang lebih baik, walaupun masih terjadi mortalitas anak 18.18%. peningkatan 12 % rasio jenis kelamin anak jantan dari kontrol 60% menjadi 72% pada sapi diinovasi teknologi (Sumaryadi *et al.*, 2010).

Pelaksanaan produksi embrio In Vivo (MOET) (SOP BET Cipelang, 2016)

- a. Penyiapan sapi donor
- b. Pengamatan estrus (berahi) dilakukan pada sapi donor yang akan diprogram berdasarkan berahi alam dan pada sapi donor yang telah diprogram untuk menentukan ketepatan waktu pelaksanaan Inseminasi buatan (IB).
- c. Pemasangan preparat Progesteron, yaitu memasukkan preparat progesteron ke dalam vagina (*implant* vagina) yang bertujuan untuk sinkronisasi berahi pada sapi donor yang akan diprogram.
- d. Seleksi donor, yaitu melakukan pemeriksaan kesehatan dan kondisi organ reproduksi terhadap sapi donor yang akan diprogram superstimulasi/ superovulasi melalui palpasi rektal, serta pemeriksaan kondisi ovarium untuk menentukan status reproduksi (fase folikuler atau fase luteal) sapi donor. Pelaksanaan seleksi donor dapat dilakukan untuk kontrol kondisi reproduksi ternak.

- e. Superstimulasi/Superovulasi, sinkronisasi dan inseminasi secara alami sapi betina melepaskan satu sel telur pada saat estrus. Untuk memperoleh sel telur lebih dari satu pada saat yang bersamaan, maka dilakukan program superstimulasi/superovulasi terhadap sapi donor terpilih. Superstimulasi/superovulasi dilakukan dengan cara menyuntikan hormon- hormon Gonadotropin, hormon yang digunakan antara *FSH*, *PMSG*, *GnRH*, *PGF2 α* , Progesteron, *hCG*. Penggunaan hormon-hormon tersebut disesuaikan dengan prosedur protokol yang digunakan ataupun sesuai dengan anjuran produk untuk program superstimulasi/superovulasi.
- f. Inseminasi buatan (IB) dilaksanakan pada saat sapi donor menunjukkan tanda-tanda estrus (berahi) atau mengikuti prosedur program superstimulasi/superovulasi yang digunakan. Pada program superstimulasi/superovulasi dilakukan lebih dari satu kali sesuai prosedur yang digunakan.

Seleksi donor dan resipien.

Kriteria seleksi donor pada program TE, yaitu melihat nilai genetik baik dan mampu memproduksi embrio layak transfer, nilai jual anak yang tinggi dan kondisi kesehatan yang baik. Kondisi kesehatan donor harus dipelihara dengan tepat melalui karantina, tes darah dan vaksinasi. Resipien yang ideal adalah sapi betina muda dan bebas penyakit, memperlihatkan fertilitas yang tinggi serta mampu melahirkan dan memelihara anak. Sapi resipien harus diuji kesehatan dan keadaan reproduksinya meliputi keabnormalan pada sistem reproduksi, kebuntingan awal dan adanya penyakit. Selain itu harus dikarantina sehingga mudah mengamati kesehatannya, temperatur tubuh, dan beberapa infeksi yang berpengaruh besar terhadap infertilitas dan abortus.

Keberhasilan pelaksanaan aplikasi TE tidak terlepas dari kondisi donor dan resipien. Untuk itu perlu dilaksanakan seleksi, donor yang akan dipakai harus diseleksi dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Memiliki genetik yang unggul (*Genetik superiority*).
- b. Mempunyai kemampuan reproduksi yang tinggi (*High reproductivity*), sehat secara serologis, bebas dari penyakit hewan menular terutama penyakit-penyakit reproduksi seperti Brucellosis, IBR/IPV, EBL, BVD, Leptoiosis, Trichomoniasis dan Vibriosis.

- c. Memiliki nilai pasar tinggi
- d. Sejarah reproduksi diketahui, mempunyai siklus berahi normal dan kemampuan fertilitas tinggi. Jika telah memenuhi kriteria diatas juga harus diperhatikan cara pemeliharaan ternak pakan yang diberikan sehingga diperoleh kondisi optimum.

Seleksi resipien. Pada calon resipien diberikan persyaratan sebagai berikut:

- a. Umur minimal sudah beranak atau dara yang mempunyai performans yang baik, mempunyai berat badan minimal 300 kg
- b. Bebas penyakit menular terutama penyakit reproduksi
- c. Sejarah reproduksi tidak menunjukkan gejala infertil, mempunyai siklus estrus normal, tanda berahi terlihat jelas, intensitas lendir berahi normal dan transparan dan mempunyai interval berahi antara 18 -24 hari

2.1.2 Penyerentakan berahi donor dan resipien.

Pemanfaatan teknologi penyerentakan berahi merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan efisiensi pelaksanaan IB dengan efisiensi reproduksi. Teknologi penyerentakan berahi pada sapi telah berkembang mulai dari metode penyingkiran CL, pemberian hormon gonadotrophin, progesteron, estrogen, prostaglandin serta modifikasi dari hormon-hormon tersebut. Metode aplikasi penyerentakan berahi pada ternak sapi dapat dilaksanakan secara:

- a. Intra muskuler
- b. Intra uterine
- c. Implantasi subkutan
- d. Intra vagina (CIDR dan PRID)

Beberapa negara telah mencoba mengembangkan suatu metode baru untuk penentuan waktu superovulasi pada pelaksanaan produksi embrio yaitu dengan menggunakan preparat progesteron yang dimasukkan intra vagina atau sering disebut *Controlled Internal Drug Release (CIDR)* (Bo *et al.*, 2002).

- e. Lewat makanan (MGA). Setiap metode penyerentakan berahi mempunyai kekurangan dan kelebihan (herdis *et al.*, 1999).

Penyerentakkan atau gertak berahi pada sapi dapat dilakukan dengan bantuan hormon eksogen. Hormon-hormon ini lah yang akan meningkatkan kinerja dari sel aseptor sehingga dapat menunjang terlaksananya manipulasi embrio. Keberhasilan TE sangat tergantung pada sinkronisasi berahi sapi donor dan resipien. Penyerentakkan berahi umumnya menggunakan Prostaglandin F₂α (PGF₂α). Sapi adalah ternak uniparous (ternak yang hanya menghasilkan satu keturunan dalam satu masa kebuntingan), sehingga hanya satu sel telur terovulasi setiap siklus berahi. Superovulasi (menghasilkan banyak sel telur yang diovulasikan), pada donor dapat dilakukan dengan pemberian hormon gonadotropin berupa PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) atau FSH (*Follicle Stimulating Hormone*).

Perlakuan pemberian sumber FSH yang berbeda tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap tingkat superovulasi. Sapi yang disuperovulasi dengan hormon Folltropin-V menghasilkan rata-rata jumlah CL, embrio dan ovum yang lebih tinggi daripada sapi yang disuperovulasi dengan hormon lainnya. Bangsa sapi berpengaruh nyata terhadap nilai response rate, recovery rate, rata-rata jumlah CL dan rata-rata jumlah embrio. Sapi yang menghasilkan jumlah total CL, jumlah embrio dan ovum terkoleksi adalah Simmental. Hal ini diduga karena daya adaptasi sapi Simmental terhadap iklim dan lingkungan lebih baik dibanding sapi lainnya (Prasetyo, 2012).

Sapi Bali (*Bos javanicus*) memiliki kemampuan yang lebih baik ($P < 0,05$) dibandingkan dengan sapi Simmental (*Bos taurus*) dalam melakukan fertilisasi secara *in vitro*, tingkat pembelahan, pembentukan morula, dan blastosis, serta perkembangan pembentukan blastosis pada hari keenam, tetapi perkembangan pembentukan blastosis pada hari ketujuh sampai kesembilan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) (Darlian, 2013). Intensitas berahi sapi Bali dara lebih tinggi daripada sapi induk, permulaan timbulnya berahi (onset berahi) terjadi lebih awal pada sapi induk dibandingkan dengan sapi dara. Sedangkan nilai persentase berahi, service per conception, non return rate, dan conception rate pada sapi Bali dara dan induk menunjukkan tidak ada perbedaan nyata ($P > 0,05$) terhadap kedua paritas (Mardiansyah *et al.* 2016).

Faktor genetik, umur induk dan kondisi tubuh induk mempengaruhi jumlah ternak estrus sebagai respon sinkronisasi estrus. Kondisi tubuh sedang-gemuk merupakan pra syarat untuk mendapatkan respon estrus yang tinggi. Pada saat umur muda 3–5 tahun, ternak

menampilkan reproduksi yang tinggi. Meskipun dipengaruhi oleh grup genetik induk, pola peningkatan proporsi darah Brahman belum terlihat pengaruhnya terhadap jumlah ternak estrus. Sapi induk 50% Brahman dan 75% memiliki respon estrus yang lebih efektif. Penggunaan gen Brahman (*Bos indicus*) untuk membentuk persilangan dengan sapi lokal pada daerah tropis (sub) diperlukan untuk memanfaatkan keunggulan adaptabilitas sapi Brahman terhadap lingkungan panas. Pengamatan tingkat kebuntingan dan kelahiran perlu ditelusuri untuk melihat reproduktivitas sapi Brahman dan persilangannya (Praharani, 2011). Sedangkan Perlakuan pemberian hormon *FSH* pada sapi Brahman terbanyak dalam menghasilkan embrio adalah 40 mg *FSH*, sedangkan perlakuan paling ekonomis adalah pemberian 8 mg *FSH* (Adriani, 2011).

Respons estrus pada sapi anestrus umumnya tinggi. Respons tertinggi (100%) pada perlakuan satu kali penyuntikan progesteron, sedangkan pemberian progesteron dua tahap (2 x 46,87 mg) dan pemberian 62,5 mg progesteron dan 1,0 mg oestradiol benzoat memberikan respon estrus 90%. Kecepatan timbulnya estrus umumnya berkisar antara > 2–3 hari (88,9%) yaitu pada pemberian progesteron dan oestradiol benzoat, sedangkan kecepatan timbulnya estrus pada perlakuan lainnya relatif lebih lama (> 3 – 5 hari). Angka kebuntingan dari jumlah keseluruhan ternak sapi setelah dikawinkan sebanyak 3 kali memberikan persentase yang cukup tinggi (75%). Total angka kebuntingan (89,9%) terjadi pada kelompok perlakuan pemberian progesteron dan oestradiol benzoat, sedangkan angka kebuntingan terendah (60%) terjadi pada perlakuan satu kali pemberian progesteron (Pohan dan Talib, 2010).

Hubungan antara intensitas berahi dengan konsentrasi estradiol sebesar 0,392 dengan persamaan regresi $y = 3,094 + 0,01x$, y adalah skor intensitas berahi sedangkan x adalah konsentrasi estradiol (Ramli *et al.*, 2016). Sinkronisasi berahi pada program Inseminasi buatan akan meningkatkan kinerja dan efisiensi inseminator karena fase estrus sapi betina akseptor dapat dikontrol dan IB relatif dilaksanakan secara serempak. Penggunaan kombinasi CIDR + OB memperlihatkan rataan persentase berahi 85,7% sedangkan hormon tunggal OB dan reprodin masing-masing 20% dan 20% (Pasambee *et al.*, 2001). Sinkronisasi berahi dengan pemberian hormon progesteron akan menyebabkan penekanan pembebasan hormon gonadotrophin dari pituitaria anterior; penghentian pemberian hormon progesteron akan diikuti dengan pembebasan hormon gonadotrophin secara tiba-tiba yang

berakibat terjadinya berahi dan ovulasi serentak (Wirdahayati, 2010; Mardiansyah *et al.*, 2016).

Bangsa sapi memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap Response Rate, total CL dan total embrio dan ovum terkoleksi serta Recovery Rate. Sumber *FSH* tidak berpengaruh nyata pada Response Rate, total CL, rasio dari CL, total embrio dan Recovery Rate (Prasetyo, 2012). Onset estrus setelah perlakuan bervariasi mulai dari satu sampai lima hari, dengan persentase keserentakan estrus tertinggi (37,5%) muncul lebih dari hari kedua sampai hari ketiga setelah perlakuan. Onset estrus tercepat terjadi pada perlakuan pemberian satu kali penyuntikan 62,5 mg progesterone dan penyuntikan 1,0 mg oestradiol benzoat yaitu 11,1% muncul antara hari ke satu dan ketiga setelah perlakuan. Onset estrus terlama terjadi pada pemberian sekaligus 62,5 mg progesteron yaitu hari keempat sampai kelima sebesar 70%. Persentase estrus 100% terjadi pada perlakuan pemberian 62,5 mg dan perlakuan lainnya sebesar 90%. Secara keseluruhan angka konsepsi masih rendah yaitu 35,7% akan tetapi angka kebuntingan cukup tinggi yaitu 75% (Pohan dan Talib, 2010).

2.1.3 Inseminasi Buatan

Donor yang telah disuperovulasi, dikawinkan melalui IB dari semen pejantan unggul. Dosis semen ditingkatkan agar jumlah sel telur yang dibuahi lebih banyak. Umumnya IB dilakukan dua kali dengan tenggang waktu 12 jam. Aplikasi IB pada dapat dilihat pada Gambar 7. Penanganan semen sapi mulai dari pemilihan pejantan unggul sampai produksi dan penyimpanan semen merupakan hal yang sangat penting diperhatikan untuk menunjang program Inseminasi Buatan. Teknologi Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi yang paling layak diterapkan baik pada sapi perah maupun sapi potong. Penanganan semen sapi mulai dari pemilihan pejantan unggul sampai produksi dan penyimpanan semen merupakan hal yang sangat penting diperhatikan untuk menunjang program inseminasi buatan.



Gambar 7. Inseminasi buatan (Dok. Lab. RPKSH. P2 Bioteknologi LIPI) (Sofyan dan Fifi, 2016)

2.2 IN VITRO FERTILISATION/IVF

Teknologi yang kedua dalam manipulasi embrio adalah fertilisasi in vitro. Pembentukan embrio dilakukan diluar tubuh induk (laboratorium). Teknologi fertilisasi in vitro (IVF) merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan diluar tubuh dalam suatu sistem biakan sel (Hunter, 1995 : Syaiful *et al*, 2011). Ketelitian dalam melakukan setiap kegiatan manipulasi embrio haruslah maksimal untuk menghindari human error agar embrio yang dihasilkan tidak berbeda dengan embrio in vivo.

Oosit atau sel telur merupakan bagian penting dalam teknologi IVF. Teknik IVF dapat menggunakan oosit yang berasal dari hewan yang masih hidup maupun dari oosit hewan yang telah dipotong. Penerapan bioteknologi IVF membutuhkan oosit dalam jumlah yang banyak, selanjutnya oosit akan dimatangkan secara in vitro. IVF membutuhkan sperma, oosit serta kondisi lingkungan yang mendukung efektifitas metabolis dari gamet jantan dan betina (Bracket dan Zuelke, 1993; Syaiful *et al*, 2011). Oosit yang dikoleksi dari rumah potong hewan/ RPH dapat dikoleksi dan dijadikan bahan untuk IVF. Karena oosit menjadi salah satu komponen utama, oosit dari RPH dapat dikoleksi dalam jumlah yang banyak. IVF dapat meningkatkan perbaikan mutu

genetik ternak. Produksi embrio secara *in vitro* mencakup 3 aspek utama yaitu pematangan sel telur (IVM), pembuahan sel telur (IVF) dan pembiakan embrio (IVC) secara *in vitro*.

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa medium maturasi yang digunakan berpengaruh terhadap perkembangan lebih lanjut ke tahap blastosist. Baik medium CR1aa maupun SOF/AA/BSA berpengaruh baik terhadap pembentukan blastosist *in vitro*. Kombinasi pasangan medium maturasi B-199 dan medium kultur SOF/AA/BSA menghasilkan proporsi pembentukan blastosist yang paling tinggi (32%). Disarankan untuk menggunakan medium maturasi dengan penambahan hormon gonadotropin selama berlangsungnya maturasi *in vitro* untuk memperoleh proporsi blastosist yang lebih banyak (Margawati *et al.* 2000).

Kelahiran dari hasil fertilisasi *in vitro* pada sapi dilaporkan tahun 1982. Sel telur umumnya didapat dari ovary berasal dari rumah potong hewan/RPH. Sel telur dikumpulkan dengan metode ***aspirasi*** maupun ***slising***, secepatnya setelah sapi dipotong kemudian dimatangkan secara *in vitro*. Pematangan dilakukan pada media sederhana sampai yang kompleks yang umumnya mengandung hormon estrogen, *FSH*, *LH*, prolactin, progesteron ataupun protein ovary dan peptida (Gordon, 1994). Tahapan produksi embrio secara *in vitro* menurut Imron *et al.* (2007) adalah ovarium yang digunakan diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) terdekat. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam media NaCl fisiologis yang disuplementasi antibiotik pada suhu kamar. Aspirasi dilakukan pada folikel antral yang berdiameter 2-5 mm menggunakan jarum suntik 18 G. Oosit ditampung dalam cawan petri yang berisi mPBS dan kemudian dimaturasi menggunakan medium TCM 199 dalam incubator CO₂ 5% selama 20-22 jam. Sperma yang digunakan untuk fertilisasi adalah sperma beku yang dicairkan dalam air yang bersuhu 30- 35 °C. Sperma dicuci dengan medium BO dan disentrifuse dengan kecepatan 500 G selama 5 menit. Kepadatan populasi sperma diatur pada konsentrasi 5 x 10⁶ sperma/ml. Fertilisasi dilakukan dengan mentransfer oosit yang telah dimaturasi kedalam drop sperma (50 µl) sebanyak 10 oosit per drop. Setelah campuran sperma-oosit diinkubasi sekitar 5 jam dalam inkubator CO₂ 5%, oosit dicuci dan dikultur lebih lanjut menggunakan medium CR1aa (10 embrio per 50 µL drop) dalam inkubator CO₂ pada suhu 38,5 °C.

Embrio yang digunakan lebih lanjut dalam penelitian Imron *et al.* (2007) adalah embrio yang mencapai tahap blastosis lanjut pada hari

ke- 7, 8 atau 9, dan mempunyai bentuk morfologi yang baik dengan ciri- ciri:

- 1). Bentuk bulat oval (spherical);
- 2). Rongga blastosol terbentuk dengan baik, jelas dan menempati lebih dari 60% volume total blastosis;
- 3). Sel-sel blastosis berkembang baik dengan jumlah sel degenerasi maksimal 10%;
- 4). Bentuk dan posisi inner cell mass (ICM) jelas, normal dan berkembang baik (Linares dan King, 1980; Imron *et al.*, 2007).

Herdis (2000) dalam Syaiful *et al.* (2011) embrio yang dihasilkan dari teknologi fertilisasi in vitro dapat di transfer ke ternak resipien untuk membantu percepatan peningkatan populasi ternak. Dengan teknik fertilisasi in vitro, pemanfaatan oosit dari hewan yang dipotong merupakan cara produksi embrio yang ekonomis karena dengan cara ini oosit hewan yang dipotong dapat dimanfaatkan untuk dijadikan bakal bibit, hal ini tentu akan terasa sekali nilai tambahnya. Dalam pemanfaatan oosit hewan yang mati belum semua potensi yang ada dapat dimanfaatkan karena terbatasnya daya hidup oosit, sementara teknologi penyimpanan ovarium yang dapat mempertahankan viabilitas oosit dalam waktu yang cukup lama atau selama transportasi belum tersedia.

Proses produksi embrio secara in vitro memerlukan lingkungan mikro yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio. *Tissue culture medium* (TCM)-199 merupakan media kompleks yang bersifat komersial dan telah digunakan untuk produksi embrio in vitro seperti pada sapi (Boediono *et al.*, 2003; Harissatria dan Hendri, 2016). *Tissue culture medium* (TCM) 199 yang secara luas digunakan untuk pertumbuhan embrio dari hewan dan ternak (Boediono *et al.*, 1995; Djuwita *et al.*, 1995; Harissatria dan Hendri, 2016). Aplikasi teknologi reproduksi berbantuan dapat digunakan untuk upaya peningkatan kualitas genetika ternak dan membantu mengatasi masalah yang berkaitan dengan keinginan untuk mempunyai keturunan.

2.2.1 Fertilisasi mikro (*One Sperm Injection*)

Teknologi reproduksi berbantuan (IVF) yang telah banyak diterapkan pada hewan percobaan dan manusia adalah fertilisasi mikro dengan

cara ICSI. Pada metode tersebut, spermatozoa secara mekanik dimasukkan secara langsung ke dalam sitoplasma sel telur dengan bantuan *mikromanipulator* (Boediono, 2001; Gunawan *et al.*, 2014). Walaupun teknik ICSI dianggap sederhana, tetapi dalam aplikasinya melibatkan berbagai macam persoalan termasuk masalah peralatan dan kemampuan teknik operator sehingga akan memengaruhi tingkat keberhasilan ICSI.

Keberhasilan fertilisasi dengan metode ICSI untuk memproduksi embrio sampai kelahiran anak telah dilaporkan sapi (Goto *et al.*, 1990; Gunawan *et al.*, 2014). Perkembangan embrio terjadi mulai dari proses fertilisasi antara oosit dengan spermatozoa. Oosit yang diperoleh dari hasil ovulasi secara alami atau melalui maturasi secara *in vitro* adalah dalam kondisi matang (siap untuk dibuahi) yaitu pada kondisi metafase II (M- II). Melihat potensi pemanfaatan teknologi reproduksi berbantuan yaitu metode ICSI dalam mengatasi hambatan dalam fertilisasi dan metode aktivasi dalam perbaikan tingkat perkembangan embrio, maka penelitian ditujukan untuk mengetahui perkembangan embrio sapi setelah fertilisasi menggunakan metode ICSI dan aktivasi dengan konsentrasi strontium yang berbeda (Gunawan *et al.*, 2014). Fertilisasi dengan metode ICSI dan dilanjutkan aktivasi dengan strontium konsentrasi 20 mM selama 6 jam, dapat meningkatkan keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio dari tahap 2 sel sampai dengan blastosis (Gunawan *et al.*, 2014). Dalam peternakan sapi potong kelahiran anak sapi jantan lebih baik menggunakan teknologi IVF ataupun TE karena menunjukkan hasil angka kebuntingan dan penentuan jenis kelamin jantan 35.4 dan 95.7 % sedangkan teknologi AI menunjukkan hasil lebih rendah 30% dan 94,88% (Pellegrino *et al.*, 2016).

Bioteknologi embrio telah berkembang dalam produksi embrio *in vitro* sebagai salah satu teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology*, ART). Penggunaan teknologi reproduksi berbantuan pada hewan ternak, satwa langka, dan manusia telah berlangsung dalam waktu yang lama, seperti penggunaan teknik Inseminasi buatan (IB), fertilisasi *in vitro*, dan teknologi fertilisasi mikro dikenal dengan *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) (Gunawan *et al.*, 2014). Metode ICSI yang digunakan pada penelitian ini mengikuti prosedur Boediono (2001) dengan modifikasi. Proses ICSI menggunakan mikroskop inverted (Nikon Diapot, Japan) dan micromanipulator (Narisige, Japan), dimulai dengan melakukan aspirasi spermatozoa menggunakan mikropipet injeksi

berdiameter bagian luar 10 μm dan diameter dalam 5- 7 μm . Oosit difiksasi menggunakan mikropipet holding berdiameter bagian luar 100-150 μm dan berdiameter bagian dalam 20-40 μm . Pada proses ICSI oosit diarahkan sedemikian rupa sehingga badan kutub I berada pada posisi arah jam 12 atau jam 6. Spermatozoa diinjeksikan pada arah jam 3 yang merupakan sudut 90° terhadap badan kutub I untuk menghindari rusaknya inti sel yang berada di dekat badan kutub I. Setelah ICSI, oosit kemudian diaktivasi menggunakan strontium dengan perlakuan konsentrasi 0, 10, 20, dan 30 mM dalam modifikasi medium BO (Brackett dan Oliphant, 1975) tanpa Ca²⁺ dan Mg²⁺, ditambah bovine serum albumin (BSA) 10 mg/ml, dan dikultur selama 6 jam dalam incubator CO₂ (Gunawan *et al.*, 2014).

Perkembangan embrio sapi hasil ICSI dan aktivasi dengan strontium setelah dikultur dalam medium SOF selama 48 jam mencapai tahap 2 sel, kultur 72 jam mencapai tahap 4 sel, kultur 96-120 jam mencapai tahap 8 sel, kultur 144-168 jam mencapai tahap morula dan kultur 192 jam mencapai tahap blastosis. Hasil yang diperoleh menunjukkan perkembangan embrio sapi tertinggi pada perlakuan S1 dan S2 dibandingkan perlakuan kontrol/S0 dan S3. Pada penelitian ini tingkat pembelahan embrio mencapai 50% dan blastosis 15,63%. Suttner *et al.* (2000) dalam Gunawan *et al.* (2014) melaporkan perkembangan embrio hasil ICSI dan aktivasi dengan kalsium ionofor yang dikultur dalam medium SOF mencapai pembelahan embrio 79,6% dan blastosis 28,2%. Perkembangan embrio in vitro tahap 2 sel mencapai blastosis dipengaruhi oleh lingkungan luar untuk mendukung perkembangannya. Tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dihasilkan dengan menggunakan media kultur sangat beragam, khususnya embrio yang diperoleh melalui proses fertilisasi in vitro atau dari satu sel, jumlah dan daya hidup embrio yang dihasilkan masih rendah dapat disebabkan salah satunya adalah kondisi kultur yang suboptimum (Djuwita *et al.*, 2000). Pengaruh lain disebabkan konsentrasi spermatozoa, osmolaritas dan pH medium, serta kondisi kultur yang meliputi suhu, keseimbangan gas O₂ dan CO₂.

Fertilisasi (IVF) dilakukan dengan metode Brackett & Oliphant (BO), selama 7 jam didalam CO₂ inkubator seperti pada maturasi in vitro. Pengembangan embrio (IVC) dilakukan didalam CO₂ inkubator seperti pada maturasi dan fertilisasi in vitro. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan pada hari ke-2, ke-6 dan ke-8 masing-masing untuk pembelahan, morula dan blastosist. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi media IVM dan IVC berpengaruh

nyata ($P < 0.05$) terhadap pembelahan sel telur dan pembentukan blastosist. Kombinasi B-199/SOF (T4) menghasilkan rataan blastosist lebih tinggi (32%) dari perlakuan lainnya (T3= 29%; T2=T1= 23%). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa medium kultur SOF/AA/BSA atau CR1aa mempunyai kemampuan yang serupa untuk digunakan dalam pengembangan embrio secara in vitro (Margawati *et al.*, 2000).

Perkebangan embrio secara in vitro dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Faktor genetik dipengaruhi oleh induk dan pejantan sedangkan faktor lingkungan dipengaruhi oleh diameter oosit, ukuran ovarium, metode aspirasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas morfologi oosit adalah umur, ukuran ovarium, jumlah folikel antral, aliran darah stromal ovarium dan petanda hormonal seperti follicle stimulating hormon (Adnyana, 2006; Papera, 2014). Menurut Gordon (2003) dalam Papera (2014) ukuran ovarium tidak mempengaruhi jumlah oosit yang dihasilkan, namun jumlah dan kualitas oosit dipengaruhi oleh jumlah folikel yang terdapat pada ovarium. Oosit hasil koleksi dari RPH dapat dilihat pada Gambar 8.



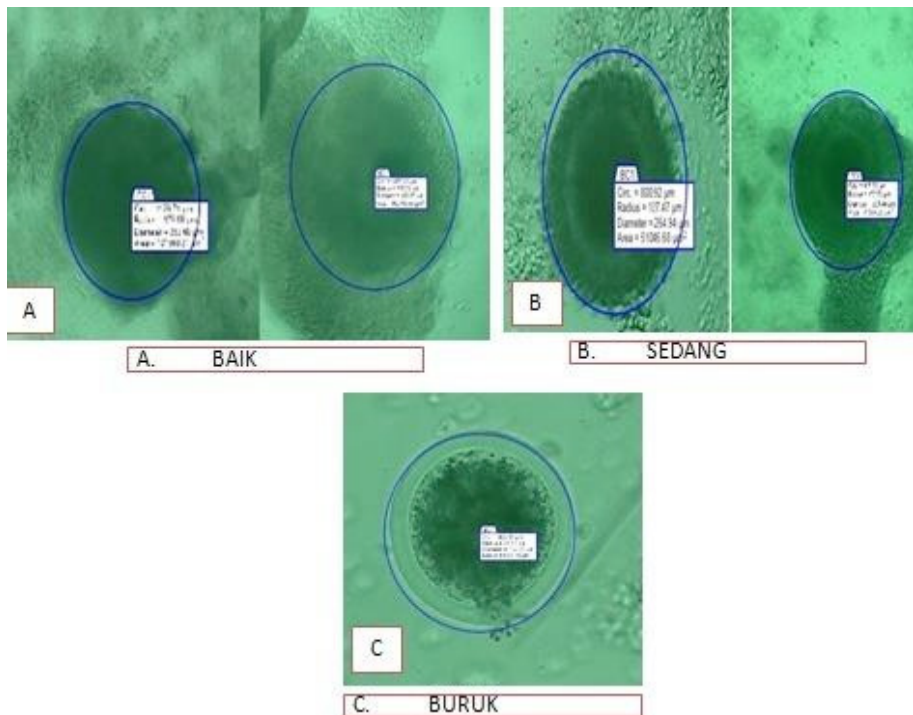
Gambar 8. Folikel dan Ovarium sapi Bali Timor (Papera, 2014).

2.2.2 Kualitas oosit

Kualitas morfologi oosit tidak memiliki perbedaan ($P > 0,05$) terhadap berbagai ukuran ovarium. Kualitas oosit kategori A (29,78%) dan kategori B (42,55%) yang diperoleh dari ovarium kelompok III lebih banyak dari kelompok II (kategori A 25%, kategori B 36%) dan kelompok I (kategori A 19,23 %, kategori B 26,92%), sedangkan

diameter oosit tidak berpengaruh terhadap persentase kualitas morfologi oosit yang dihasilkan secara in vitro. Perlu dilakukan penelitian lanjutan berkaitan dengan kemampuan perkembangan oosit sapi Bali-Timor yang diperoleh dari ukuran ovarium dan diameter oosit yang berbeda hingga stadium blastosis (Parera, 2014).

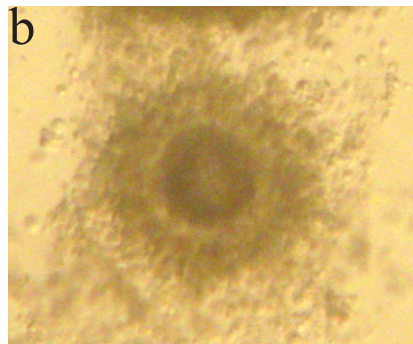
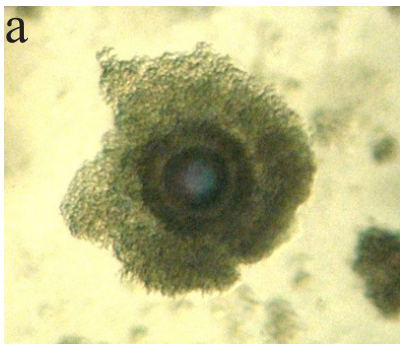
Penilaian terhadap kualitas oosit sebagai salah satu upaya melakukan seleksi terhadap oosit yang akan dimaturation sangat mempengaruhi keberhasilan produksi embrio in vitro. Morfologi oosit berdasarkan kekompakan dan jumlah lapisan sel kumulus berakibat positif terhadap maturasi, fertilisasi dan pertumbuhan serta perkembangan embrio in vitro (de Wit *et al.*, 2000; Goeseels dan Panich, 2002; Papera, 2014). Tidak satupun oosit gundul mampu mencapai embrio tahap 8-16 sel (Khurana dan Niemann, 2000; Papera, 2014). Kualitas oosit memberikan pengaruh terhadap pematangan oosit (maturasi), perkembangan dan kemampuan embrio untuk tetap bertahan hidup dan pemeliharaan pada kebuntingan dan perkembangan fetus risher, 2004; Papera, 2014).

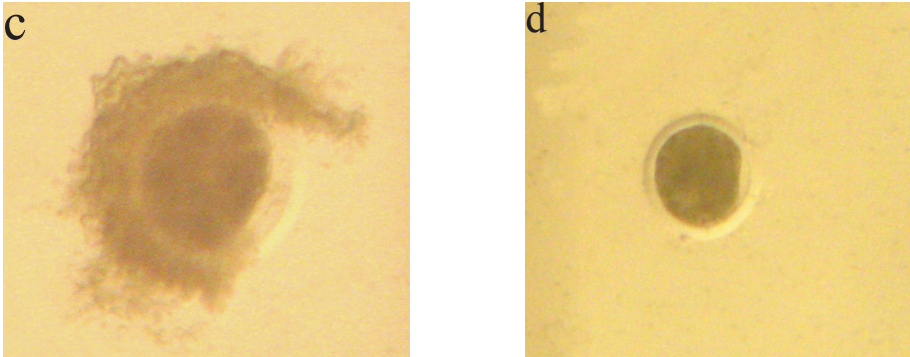


Gambar 9. Kualitas oosit sapi Bali Timor (Papera, 2014)

Penentuan kualitas oosit dapat dilakukan dengan melakukan beberapa evaluasi terhadap oosit yang akan digunakan pada proses fertilisasi *in vitro*. Seleksi oosit yang banyak digunakan adalah pemilihan oosit berdasarkan morfologi sel cumulus yang berada di sekitar oosit (Alvarez *et al.*, 2009; Lonergan *et al.*, 1996; Papera, 2014). Teknik grading dengan mengevaluasi sel-sel kumulus oosit yang kompleks dapat mengidentifikasi kualitas oosit dengan lebih mudah dan objektif. Keberadaan sel kumulus mendukung pematangan oosit sampai pada tahap metafase II dan berkaitan dengan pematangan sitoplasma yang diperlukan untuk kemampuan perkembangan setelah fertilisasi. Umumnya oosit dengan kumulus yang multilayer digunakan dalam produksi embrio secara *in vitro*. Menurut Gordon (2003); Papera (2014) kriteria pemilihan oosit yang berkualitas baik dapat dilihat dari bagian plasma yang homogen, sel cumulus yang kompak mengelilingi zona pelusida. Pertumbuhan oosit ditandai dengan peningkatan diameter oosit dan pertumbuhan ukuran dari organel-organel seperti kompleks golgi, retikulum endoplasmik halus, butir lemak, peningkatan proses transkrip untuk sintesis protein. Tahap pematangan oosit ditandai dengan beberapa proses perkembangan inti oosit (Hafez dan Hafez, 2000; Papera, 2014)

Ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama 2 jam menghasilkan persentase jumlah oosit dengan kualitas morfologi A dan B yang lebih baik jika dibandingkan dengan ovarium yang mengalami perlakuan transportasi selama lebih dari 2 jam. Disarankan ovarium yang digunakan untuk produksi embrio secara *in vitro* sebaiknya menggunakan ovarium dengan perlakuan transportasi selama 2 jam setelah proses pemotongan sapi (Budiyanto *et al.*, 2013).





Gambar 10. Morfologi Oosit hasil koleksi ovarium mulai dari A-D, oosit kualitas A-D (Budianto *et al*, 2013).

2.3 SEXING SPERMA

Penentuan jenis kelamin anak sebelum dilahirkan lebih menguntungkan dari segi ekonomis, karena selain dapat menekan biaya pemeliharaan juga dapat menunjang program breeding dalam pemilihan bibit unggul. Tujuan tersebut akan tercapai apabila dilakukan dengan cara menginseminasikan seekor betina berahi dengan spermatozoa yang sudah dipisahkan (spermatozoa berkromosom X atau spermatozoa berkromosom Y) (Hafez, 2004; Putri *et al.*, 2015). Pengontrolan jenis kelamin dapat dimulai dari pengkondisian saluran reproduksi ternak betina agar lebih baik bagi spermatozoa X dari spermatozoa Y atau sebaliknya sampai dengan pemisahan spermatozoa X dan Y sebelum dilakukan IB (inseminasi buatan) atau IVF (in vitro fertilization) (Sukra *et al.*, 1989; Afati, 2004). Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan salah satu pilihan yang tepat dalam rangka peningkatan efisiensi reproduksi yang mampu meningkatkan efisiensi usaha peternakan, baik dalam skala peternakan rakyat, maupun dalam skala komersial (Saili *et al.*, 1998; Afiani, 2004). Pemisahan spermatozoa merupakan upaya untuk mengubah proporsi perolehan spermatozoa yang berkromosom sejenis (X atau Y) dengan metode tertentu, sehingga berubah dari proporsi normal (rasio alamiah), 50% banding 50%.

Klasifikasi spermatozoa pembawa kromosom X atau Y berdasarkan luasan kepala spermatozoa sapi dengan tiga parameter fitur (luas, perimeter, dan diameter) yang menggunakan metode *Support Vending Machine* (SVM). Hasil analisis berdasarkan data eksperimen, data yang

diklasifikasikan salah sebanyak 2-6 data dari 11 data pengujian. Jika dilihat dari bentuk citra yang diklasifikasikan salah, ternyata citra-citra tersebut muncul dengan bentuk yang kurang sempurna (terputus/error) dikarenakan data yang didapat kurang bagus pada golongan spermatozoa X. Mengingat tingkat kesamaan antara background dan foreground pada golongan spermatozoa X yang relatif sama, maka bisa dimaklumi seandainya SVM tidak mampu mengklasifikasikan dengan benar. Meskipun demikian hasil akurasi yang didapat dalam percobaan penelitian ini menunjukkan nilai 75% tingkat akurasi dalam pencocokan spermatozoa pembawa kromosom X atau Y (Wahyudi, 2015).

Penggunaan sperma seksing beku (>90% sperma X dan dosis 10×10^{-6}) lebih menguntungkan secara ekonomi dalam pelaksanaan MOET pada sapi Holstein dara (Hayakawa *et al.*, 2009). Evaluasi terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali dalam kondisi segar menunjukkan hasil yang sesuai dengan standar untuk diproses lebih lanjut menjadi semen cair. Pengencer Tris Kuning Telur masih perlu perbaikan untuk mencapai 40% atau lebih (Salmah, 2014).

Kualitas dari sperma yang akan digunakan menjadi penentu untuk keberhasilan teknologi manipulasi embrio. Dimana sperma yang digunakan haruslah sperma yang berasal dari pejantan unggul. Seksing dapat juga diaplikasikan bagi perusahaan pembibitan dan balai IB untuk menguji pejantan unggul dengan jumlah betina yang sedikit (Hohenboken, 1999; Suciani, 2015).

Tahapan dalam pelaksanaan seksing spermatozoa menurut Suciani (2015) adalah :

- a. Pembentukan jenis kelamin
- b. Pemisahan Spermatozoa

2.3.1 Pembentukan Jenis Kelamin

Keberadaan spermatozoa dalam proses pembentukan jenis kelamin pada kebanyakan makhluk hidup khususnya mamalia, mempunyai arti penting, karena spermatozoa menentukan jenis kelamin seekor ternak. Proses ini melibatkan penggabungan antara kromosom seks yang dibawa oleh spermatozoa dan kromosom seks yang dibawa oleh ovum (sel telur). Berdasarkan kromosom seks yang dibawanya, spermatozoa pada mamalia dapat dibedakan atas spermatozoa pembawa kromosom X (spermatozoa X) dan spermatozoa pembawa kromosom

Y (spermatozoa Y). Dalam suatu perkawinan, jika spermatozoa Y yang berhasil membuahi telur, anak yang akan dilahirkan adalah jantan, dengan komposisi kromosom secara normal yaitu XY. Hal ini terjadi karena dalam proses pembentukan jenis kelamin, spermatozoa Y yang mengandung gen *Testis determining factor* (tidak dimiliki oleh spermatozoa X) akan mengarahkan pertumbuhan gonad primordial untuk membentuk testes. Selanjutnya, testes (sel-sel Sertoli) akan menghasilkan hormon *Anti Mullerian duct factor* yang dapat meredakan pertumbuhan Mullerian duct, sehingga saluran reproduksi betina (*oviduct, uterus, cervix* dan vagina) tidak terbentuk. Selain itu, testes (sel-sel *Leydig*) juga mensekresikan hormon testosteron yang menyebabkan maskulinisasi pada foetus dan membantu dalam proses pembentukan penis dan scrotum serta merangsang pertumbuhan *Wolffian duct* untuk membentuk epididymus, vas deferens, dan seminal vesicle. Sebaliknya jika spermatozoa X yang berhasil membuahi sel telur, maka akan dilahirkan anak betina dengan komposisi kromosom yang normal, yaitu XX. Ketidakhadiran gen testes determining factor akan menyebabkan gonad primordial berubah menjadi ovarium. Selanjutnya ovarium (sel-sel granulosa dan sel-sel theca) akan mensekresikan hormon estrogen yang merangsang pertumbuhan *Mullerian duct* untuk membentuk saluran reproduksi betina (Gilbert, 1988 dalam Saili *et al.*, 1998: Suciani, 2015).

Preparat ulas spermatozoa dibuat dari masing-masing fraksi semen dengan pewarnaan diferensial menggunakan larutan eosin 2%, selanjutnya pengukuran panjang dan bagian terlebar kepala spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 10 x 100 dengan menggunakan lensa mikrometer. Jumlah spermatozoa yang dihitung dari masing-masing fraksi adalah 200 sel spermatozoa, yang berukuran kepala lebih besar dari kontrol dikategorikan sebagai spermatozoa X, sedangkan bila ukuran kepala lebih kecil dari kontrol dikategorikan sebagai spermatozoa Y (Saili, 1999; Afiti, 2004). Salah satu cara dalam memprediksi spermatozoa X dan spermatozoa Y adalah dengan evaluasi secara morfometrik, yaitu mengukur bagian terlebar dan panjang kepala spermatozoa.

Faktor lingkungan juga mempengaruhi kualitas sperma yang dihasilkan oleh sapi jantan, salah satunya iklim. Secara umum musim kemarau memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan musim hujan terhadap kualitas semen sapi Bali yang meliputi volume, warna, motilitas individu, konsentrasi, PTM, nilai RR dan produksi semen beku namun memberikan hasil yang sama terhadap pH semen (Aisah *et al.* 2017).

2.3.2 Metode Pemisahan Spermatozoa

Beberapa metode pemisahan spermatozoa (Saili *et al.*, 1998; Suciani, 2015) yang dapat dilakukan adalah menggunakan:

- a. Kolom albumin
- b. Kecepatan sedimentasi
- c. Sentrifugasi dengan gradient densitas percoll
- d. Motilitas dan pemisahan elektroforesis
- e. *Isoelectric focusing*
- f. Teknik manipulasi hormonal
- g. H-Y antigen,
- h. *Flow sorting*, dan
- i. Metode penyaringan menggunakan kolom *sephadex*. Metode yang dianggap paling valid diantara beberapa metode tersebut adalah metode kolom albumin dan metode penyaringan menggunakan kolom Shepadex

Spermatozoa *sexing* merupakan salah satu hasil teknologi reproduksi yang dinilai sebagai alternatif yang menjanjikan dalam upaya efisiensi reproduksi untuk menghasilkan anak dengan jenis kelamin sesuai keinginan. Spermatozoa *sexing* telah diaplikasikan untuk Inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio dengan hasil bervariasi. Persentase tingkat kebuntingan pada sapi mencapai 52% (Morotti *et al.*, 2014; Aini *et al.*, 2016). Lebih lanjut, Pellegrino *et al.* (2016) dalam Aini *et al.* (2016) melaporkan bahwa keberhasilan kebuntingan melalui teknik transfer embrio sebesar 35.4%. Teknik *sexing* spermatozoa dilakukan melalui pemisahan kromosom X dan Y berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi, kandungan DNA, perbedaan protein makromolekul pada kedua kromosom serta perbedaan berat dan pergerakan spermatozoa (Yan *et al.*, 2006; Aini *et al.*, 2016).

Diperkirakan kandungan DNA spermatozoa kromosom X adalah 3-5% lebih banyak dibandingkan dengan kromosom Y (Grant dan Chamley 2007; Sureka 2013 : Aini *et al.*, 2016). Berdasarkan kriteria tersebut, maka telah dikembangkan berbagai teknik pemisahan spermatozoa seperti metode *flow cytometer* (Blondin *et al.* 2009; Jo *et al.* 2014 : Aini *et al.*, 2016), metode Gradient Percoll (Machado *et al.* 2009; Villamil *et al.* 2012 : Aini *et al.*, 2016) serta metode gradient BSA.

Metode pemisahan menurut Saili (1999) dalam Afiati (2004) yaitu semen sapi yang ditampung (ejakulat) dicuci dengan penambahan medium BO (*Brackett-Oliphant*) dan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Medium BO ditambahkan kembali pada endapan semen sampai konsentrasi menjadi 150 juta sel per mililiter. Satu mililiter sampel dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi kolom albumin bertingkat 10% dan 30%, kemudian dibiarkan selama satu jam pada suhu 28 °C. Fraksi semen bagian atas dipisahkan dari fraksi semen bagian bawah dengan menyedot masing-masing fraksi menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung centrifuge, kemudian dicuci menggunakan medium BO dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit.

Perbedaan potensial antara spermatozoa X dan Y adalah kandungan DNA, sensitivitas pH dan perbedaan morfologi kepala serta motilitas. Perbedaan yang utama adalah kontribusi dari kromosom seksnya, yaitu spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak pada inti spermatozoa yang terdapat dalam kepalanya, sehingga ukuran kepala spermatozoa X lebih besar. Spermatozoa Y ukuran kepalanya kepalanya lebih kecil, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak serta kemungkinan mengandung materi genetik dan DNA lebih sedikit dibandingkan dengan spermatozoa X.

Terdapat perbedaan persentase besar ukuran kepala spermatozoa antara spermatozoa kelompok kontrol dengan yang dipisahkan dengan menggunakan *percoll* dan putih telur. Terdapat perbedaan persentase Motilitas dan Viabilitas spermatozoa antara kelompok kontrol dengan yang dipisahkan dengan menggunakan *percoll* dan putih telur. Efektivitas *percoll* dan putih telur dalam memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y tidak berbeda nyata yaitu 79,9: 78,3% (Mahaputra *et al.*, 2012).

Aplikasi seksing semen pada sapi potong dapat mengurangi interval antara induk dan sapi dara, serta dapat meningkatkan nilai jual. Aplikasi teknologi seksing embrio menjadi salah satu teknologi yang menjanjikan (Hall dan Glaze, 2014). Pemisahan spermatozoa X dan Y dengan menggunakan metode kolom yang mengandung larutan BSA didasarkan pada perbedaan motilitas (kecepatan pergerakan) antara spermatozoa X dan Y dalam menembus larutan yang mengandung BSA. Pemisahan spermatozoa dilakukan dengan cara memasukan sampel semen ke dalam kolom yang berisi larutan BSA. Kolom yang

digunakan dilengkapi dengan kran pada masing- masing bagian (atas dan bawah) untuk memudahkan pengambilan semen pada setiap bagian proses pemisahan. Sedangkan larutan BSA yang digunakan mengandung campuran Tris (*hydroxy-methyl aminomethan*), asam sitrat, fruktosa, BSA dan aquades. Sampel semen dibiarkan selama kurang lebih dua jam untuk mengendap. Pada proses ini diharapkan spermatozoa Y akan bergerak lebih cepat menembus larutan BSA, karena memiliki bentuk dan ukuran yang lebih kecil dan kandungan DNA nya lebih sedikit dibanding spermatozoa X. Selanjutnya semen bagian bawah dan atas diambil dengan cara memutar kran pada masing-masing bagian dan ditampung dengan menggunakan tabung sentrifuge. Sentrifuge masing-masing bagian semen pada kecepatan 2.800 – 3.200 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan endapan semen yang bersih, sedangkan supernatannya dibuang. Endapan semen tersebut selanjutnya diencerkan kembali dengan menggunakan jenis pengencer awal, kemudian disentrifuge untuk mendapatkan endapan semen yang lebih bersih.

Hasil *sentrifuge* selanjutnya diencerkan dengan menggunakan pengencer yang mengandung Tris, glukosa, asam sitrat, kuning telur, dan aquades dengan perbandingan sama 1 : 1. Semen yang diseksing sangat bermanfaat dalam program IB, ET, dan PEIV. Semen hasil seksing ini telah diuji coba di lapangan. IB sapi dara menggunakan semen hasil seksing menghasilkan angka kebuntingan yang sama baiknya antara dosis rendah ($1-1,5 \times 10^6$ sperma) maupun dosis tinggi (3×10^6 sperma), sehingga dosis rendah cukup memadai untuk pelaksanaan IB. Semen beku yang hasil seksing yang dipakai dalam PEIV menghasilkan perkembangan embrio sampai tahap blastosis mencapai 18-26% (Lu *et al*, 2001; Suciani, 2015).

Metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumin didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y dan filtrasi gel sephadex yaitu berdasarkan ukuran kepala spermatozoa telah dilaporkan berhasil memisahkan spermatozoa X dan Y (Situmorang *et al.*, 2003; Trinil, 2004 : Situmorang dan Endang, 2004). Prinsip dari metode kolom albumin ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi (Y) akan mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat, sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada medium yang mempunyai konsentrasi rendah.

Keuntungan dari penggunaan metode kolom albumin adalah :

- a. Metode ini mudah diperoleh, diterapkan di lapang,
- b. Harga terjangkau
- c. Dapat mempertahankan kualitas dan kuantitas spermatozoa selama proses pemisahan (persentase kebuntingan menggunakan spermatozoa pascapemisahan sperma X dan Y adalah berturut-turut 64,75% dan 58% untuk metode pemisahan albumin dan sephadex (Situmorang *et al.*, 2003; Situmorang dan Endang, 2004). Hasil yang selaras dilaporkan oleh Ekayanti *et al.* (2004) dalam Situmorang dan Endang, 2004 dimana kualitas spermatozoa pasca pemisahan masih cukup baik untuk digunakan dalam pembuahan sel telur secara *in vitro*.

Teknologi pemisahan sperma X dan Y menjadi sangat potensial digunakan untuk meningkatkan produksi embrio baik secara *in vivo* maupun *in vitro* untuk menghasilkan anak dengan jenis kelamin yang diharapkan. Untuk usaha ternak potong, maka *crossbred* embrio XY lebih diinginkan dan sebaliknya untuk usaha sapi perah dan pengganti induk sapi potong lebih menginginkan embrio XX (Situmorang dan Endang, 2004).

Pemisahan spermatozoa merupakan salah satu upaya efisiensi dalam mengubah rasio spermatozoa X dan Y. Salah satu yang dianggap baik yang dilakukan untuk memisahkan sperma sapi adalah metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) yang menghasilkan 75–80% sperma Y. Penggunaan metode pemisahan dengan kolom albumin ini menghasilkan pemisahan terbaik untuk sperma sapi dan manusia (Krzyzaniak dan Hafez, 1993 : Puspita, 2014).

Evaluasi terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali dalam kondisi segar menunjukkan hasil yang sesuai dengan standar untuk diproses lebih lanjut menjadi semen cair. Motilitas spermatozoa semen beku pada pengencer Andromed masih berada diatas 40% yaitu $50,8 \pm 6,14\%$ dan TKT hanya $25,8 \pm 4,43\%$. Untuk persentase hidup spermatozoa, Andromed memiliki nilai $54,2 \pm 5,03\%$ dan TKT $33,3 \pm 2,64\%$. Tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap abnormalitas spermatozoa semen beku sapi Bali pada kedua pengencer dimana nilai masing-masing untuk pengencer Andromed dan TKT adalah $13,2 \pm 2,73\%$ dan $14,3 \pm 3,51\%$. Pengencer Tris Kuning Telur masih perlu perbaikan

untuk mencapai 40% atau lebih (Salamah, 2014). Karakteristik spermatozoa sebelum pemisahan menurun bila dibandingkan dengan karakteristik spermatozoa setelah pemisahan, tetapi penurunan ini masih mempunyai nilai yang layak bagi pelaksanaan inseminasi buatan. Penggunaan albumin mampu memisahkan spermatozoa X dari spermatozoa Y. Efektifitas usaha dalam perolehan spermatozoa X dan Y dengan kolom albumin dapat diketahui melalui pengujian secara biologis, berupa perolehan angka kebuntingan dan perbandingan jenis kelamin anak yang dilahirkan hasil inseminasi dengan masing-masing fraksi semen hasil pemisahan (Afiati, 2004).

Karakteristik spermatozoa sebelum pemisahan menurun bila dibandingkan dengan karakteristik spermatozoa setelah pemisahan, tetapi penurunan ini masih mempunyai nilai yang layak bagi pelaksanaan inseminasi buatan. Penggunaan albumin mampu memisahkan spermatozoa X dari spermatozoa Y. Efektifitas usaha dalam perolehan spermatozoa X dan Y dengan kolom albumin dapat diketahui melalui pengujian secara biologis berupa perolehan angka kebuntingan dan perbandingan jenis kelamin anak yang dilahirkan hasil inseminasi dengan masing-masing fraksi semen hasil pemisahan (Afiati, 2004).



Gambar 11. Skema Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Menggunakan Putih Telur (Susilawati, 2002; Susilawati 2014).

Percepatan populasi melalui IB dapat didukung oleh teknologi pemisahan sperma X dan sperma Y sehingga dapat diperoleh jenis kelamin anak sesuai harapan. Untuk memenuhi kebutuhan akan daging, maka diperlukan banyak anak sapi jantan untuk penggemukan sehingga IB dengan menggunakan straw sperma Y diharapkan dapat mempercepat pemenuhan kebutuhan bibit jantan dibandingkan jika IB dengan menggunakan straw semen biasa. Demikian juga untuk memperoleh ternak betina pada sapi perah kita dapat menggunakan straw X pada IB, sehingga dapat diperoleh lebih banyak ternak sapi perah betina yang dapat memproduksi susu. Rendahnya motilitas sperma X atau Y hasil pembekuan menjadi kendala untuk digunakan dalam IB (Tappa *et al.*, 2000 : Puspita, 2014). Penggunaan sperma hasil pemisahan pada fertilisasi *in vitro* dapat membuktikan bahwa embrio yang berkembang merupakan embrio jantan jika difertilisasi dengan sperma Y atau embrio betina jika dibuahi dengan sperma X. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan melakukan *karyotyping* embrio paruh, yang memerlukan waktu relatif singkat untuk mengetahui hasil yang diinginkan dibandingkan jika difertilisasi secara *in vivo* yang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mengetahui hasilnya menjadi anak sapi jantan atau betina (Puspita, 2014). Efektivitas *percoll* dan putih telur dalam memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y tidak berbeda nyata yaitu 79,9: 78,3% (Mahaputra *et al.*, 2012).

Metode *sexing* spermatozoa sapi pembawa kromosom X atau Y menggunakan metode support vector machine, rata-rata dari luasan, perimeter, dan diameter kepala pada spermatozoa sapi dapat dijadikan sebagai parameter dalam klasifikasi spermatozoa sapi pembawa kromosom x atau y. Hasil penelitian ini juga menunjukkan tingkat akurasi dalam penentuan spermatozoa pembawa kromosom x dan y pada sapi mencapai nilai 75% (Wahyudi, 2015).

Upaya pemisahan spermatozoa mempunyai beberapa keuntungan, antara lain dapat meningkatkan kemungkinan untuk memperoleh jenis kelamin ternak yang sesuai dengan keinginan dan dapat terhindar dari kemungkinan lahirnya ternak betina yang bersifat freemartin (Gordon, 1994; Wahyudi, 2015). Untuk memperoleh bakalan sapi yang akan dikembangkan, diperlukan teknologi untuk memisahkan pembawa kromosom X dan Y. Untuk mendapatkan anak sapi jantan yang lebih banyak, diperlukan sperma pembawa kromosom Y sedangkan untuk betina diperlukan kromosom X sebelum digunakan pada Inseminasi buatan (IB) (Mardiyah, E. 2006; Wahyudi, 2015).). Beberapa hasil penelitian sebelumnya telah dilakukan evaluasi spermatozoa sapi

secara morfometrik dengan mengukur panjang dan bagian terlebar dari kepala spermatozoa di bawah mikroskop fluorescences dengan bantuan alat micrometer yang dilaporkan bahwa dapat mengklasifikasi spermatozoa pembawa kromosom X atau Y (Saili, 1994; Afiati, 2004). Penentuan ukuran kepala spermatozoa sapi sangat membantu dalam penentuan metode pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y khususnya dalam menentukan konsentrasi kolom albumin (Quinlivan *et al.*,1982; Wahyudi, 2015). Pada penelitian separasi spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, memberikan sebuah informasi bahwa ukuran kepala spermatozoa pembawa kromosom X/betina lebih besar daripada spermatozoa pembawa kromosom Y/jantan (Ke-hui Cui *et al.*,1993; Wahyudi, 2015). Spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak di kepalanya, sehingga mengakibatkan ukuran kepala spermatozoa X lebih besar (Hafez,2008; Susilawati, 2014). Spermatozoa yang mengandung kromosom X (spermatozoa X) jika terjadi fertilisasi akan menghasilkan embrio betina, sedangkan spermatozoa spermatozoa Y akan menghasilkan embrio jantan, karena pada kromosom Y terdapat *Sex Determining Region Y gen* (SRY) yang menentukan terbentuknya testis pada hewan jantan (Bianchi, 1991; Graves, 1994 dan Koopman, 1995; Susilawati, 2014).

Panjang dan lebar kepala spermatozoa sapi kira-kira 8–10 μm dan 4–4,50 μm , tebal kepala 0,50–1,50 μm , bagian tengah spermatozoa mempunyai panjang 10–15 μm dan diameternya sekitar 1 μm , panjang ekor spermatozoa adalah 35–45 μm dengan diameter 0,4–0,8 μm , sedangkan panjang keseluruhan spermatozoa mencapai 50–70 μm (Toelihere, 1985; Susilawati, 2014). Hasil penelitian Susilawati *et al.* (1999) dalam ; Susilawati, 2014) menjelaskan bahwa pengukuran 2000 kepala spermatozoa sapi didapatkan panjang kepala rata-rata $8,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$ dan lebar kepala rata-rata $4,12 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Hasil pengukuran besar kepala spermatozoa (panjang x lebar) pada semen segar diperoleh rata-rata $32,75 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$. Spermatozoa Y umumnya lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan dengan spermatozoa X, sehingga spermatozoa Y lebih cepat dan lebih banyak bergerak serta kemungkinan materi genetik dan DNA yang dikandung spermatozoa Y lebih sedikit dari pada spermatozoa X (Schilling dan Thormahlen, 1976; Sumner dan Robinson, 1976; Ericsson dan Glass, 1982 dalam Hafez, 2008; Susilawati, 2014).

Apabila dilakukan sentrifugasi, maka spermatozoa X cenderung lebih cepat membentuk endapan dibandingkan dengan spermatozoa Y

(Mohri, 1987). Spermatozoa Y bergerak ke arah katoda (Ericsson and Glass, 1982 dalam Hafez, 2008). Berdasarkan perbedaan-perbedaan tersebut, berkembang metode pemisahan spermatozoa dengan menggunakan kolom albumin, *velocity sedimentation*, sentrifugasi dengan *gradien densitas*, motilitas dan pemisahan elektroforesis, isoelectric focusing, H-Y antigen, flow sorting dan sephadex column (Hafez, 2008 dan De Jonge dkk., 1997). Dari sekian banyak metode pemisahan spermatozoa X dan Y yang paling umum digunakan adalah pemisahan berdasarkan pada perbedaan densitas atau motilitas. Pemisahan spermatozoa dengan *flow cytometry* dapat memisahkan spermatozoa X dan Y dibandingkan dengan metode pemisahan yang lain, tetapi alat yang digunakan harganya mahal, sehingga sulit diaplikasikan. Metode pemisahan lain yang lebih murah, valid, lebih mudah dihasilkan dan diaplikasikan adalah filtrasi menggunakan sephadex column yang dapat menghasilkan spermatozoa X sebesar 70-75 % (Beernink, 1986; Hafez, 2008; Susilawati, 2014).

Susilawati, 2014 menyatakan kegunaan dari metode pemisahan spermatozoa adalah:

1. Menghasilkan lebih banyak betina yang superior untuk induk atau peremajaan dan menghasilkan susu, daging dan kulit atau bulu.
2. Menghasilkan lebih banyak jantan yang dikeluarkan dari betina dan dilakukan cross breeding, contoh: *dairy-beef cross*.
3. Menghasilkan pejantan untuk diambil keturunannya
4. Untuk program *progeny* dilakukan tes pada pejantan muda.
5. Menghindari intersex pada anak yang lahir kembar.

Salah satu cara dalam memprediksi spermatozoa X dan spermatozoa Y adalah dengan evaluasi secara morfometrik, yaitu mengukur bagian terlebar dan panjang kepala spermatozoa (Afiati, 2004).

2.3.3 Kualitas Spermatozoa

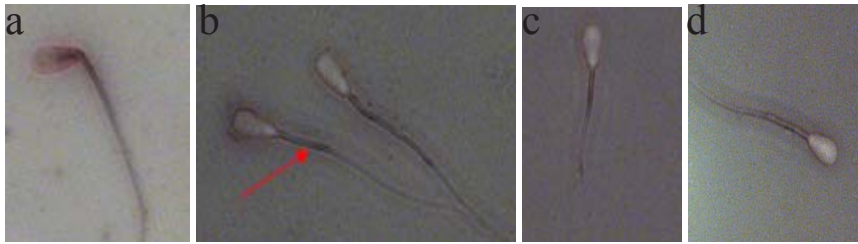
Kualitas semen segar yang diamati adalah: volume, konsistensi, warna, pH, konsentrasi, viabilitas, dan motilitas; sedangkan kualitas spermatozoa hasil *sexing* yang diamati adalah motilitas, pH, dan ukuran besar kepala spermatozoa. Melalui empat kali kolektif, didapatkan rata-rata volume semen segar sebanyak $3,83 \pm 0,29$ ml, konsistensi encer-sedang, pH 7,0, konsentrasi $2126,67 \pm 513,16$ juta/

ml, viabilitas $81,33 \pm 3,52\%$, motilitas $83,33 \pm 2,89\%$ dan gerak massa progresif (+++). Hasil *sexing* spermatozoa setelah disimpan pada suhu 5°C selama 6 hari, menunjukkan motilitas perlakuan A (53,75%) pada fraksi atas lebih tinggi ($P < 0,05$) dibanding perlakuan B (46,25%) dan C (45,0%); sedangkan pH tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (berkisar 7,30 hingga 7,45); demikian halnya ukuran besar kepala tidak menunjukkan perbedaan antar perlakuan (berkisar 34,05–34,92 μm). Kondisi *post thawing*, motilitas *sexed sperm* pada semua perlakuan tampak sangat rendah, yakni berkisar 1,67–6,25% (fraksi atas) dan 0,00–6,25% (fraksi bawah) (Pamungkas *et al.*, 2004).

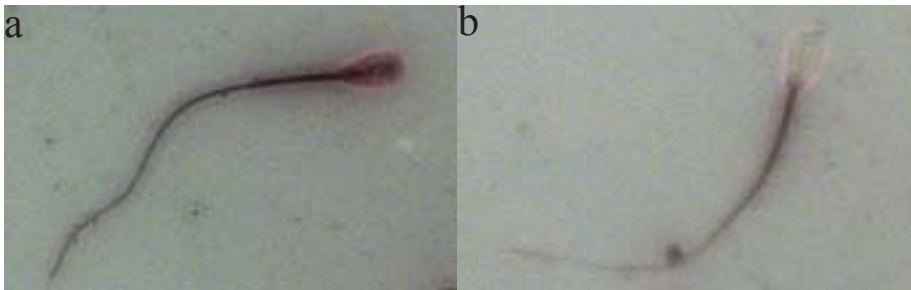
Berdasarkan penelitian Puspita (2014), dapat disimpulkan bahwa sperma beku sapi PO hasil pemisahan dengan kolom BSA 5–10% (sperma X dan sperma Y) mempunyai kemampuan fertilisasi yang cukup baik untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*. Evaluasi secara makroskopis meliputi warna, pH, bau, konsistensi, dan volume, sedangkan evaluasi mikroskopis meliputi gerakan massa, konsistensi, persentase motilitas, persentase hidup, persentase abnormal, dan presentase membran plasma utuh. Persentase motilitas, MPU (membran plasma utuh) dan abnormalitas spermatozoa sebelum pemisahan (Afiati, 2004).

Energi yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa tersimpan dalam bentuk senyawa ATP (*Adenosin Triphosphat*) dan didukung oleh Hafez (1993) dalam Afiati (2004) yang menyatakan bahwa salah satu faktor utama yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah ketersediaan energi ATP. Motilitas spermatozoa Y lebih tinggi dibandingkan motilitas spermatozoa X (75% : 70,83%) (Afiati, 2004). Hal ini terjadi karena adanya perbedaan kecepatan spermatozoa X dan Y dalam menembus larutan albumin. Spermatozoa Y dengan bentuk dan ukuran yang lebih kecil, serta mengandung DNA yang lebih sedikit mempunyai motilitas yang lebih tinggi dibandingkan spermatozoa X (Goodall & Roberts, 1976; Afiati, 2004).

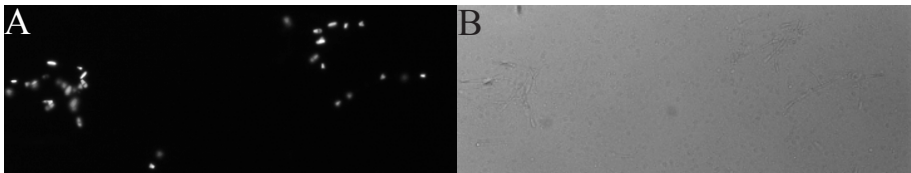
Abnormalitas atau kelainan dari spermatozoa menjadi salah satu faktor penghambat keberhasilan IB maupun TE. Abnormalitas dapat berasal dari internal maupun lingkungan. Sehingga dalam penanganan untuk *sexing* spermatozoa harus dilakukan secara teliti dan seksama dimulai dari proses koleksi sperma. Bentuk-bentuk abnormalitas dan viabilitas dari sperma dapat dilihat pada gambar 12-15.



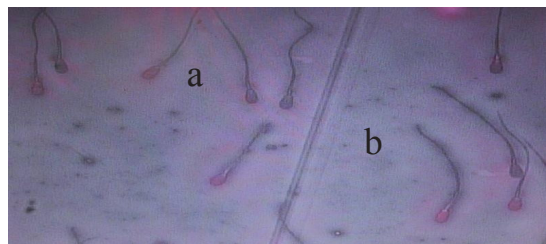
Gambar 12. Contoh abnormalitas spermatozoa: (A) Detached head; (B) Pearshape; (C) Undeveloped; (D) Spermatozoa normal (Putri *et al.*, 2015).



Gambar 13. Viabilitas Sperma dengan pewarnaan Eosin-Negrosin: (A) Sperma yang telah mati; (B) Sperma yang masih hidup (Putri *et al.*, 2015).



Gambar 14. Viabilitas Sperma dengan pewarnaan Hoechst: (A) Sperma yang telah mati; (B) Sperma yang masih hidup (Putri *et al.*, 2015).



Gambar 15. Perbedaan Spermatozoa hidup dan mati A (hidup), B (mati) (Salmah, 2014).

Keberhasilan kebuntingan dan ketepatan jenis kelamin pedet yang dilahirkan merupakan pembuktian akhir dari aplikasi IB dengan sperma *sexing* ini. Pada penelitian ini, kesesuaian jenis kelamin sperma X mencapai 87% dan sperma Y mencapai 89.5% (Gunawan *et al.*, 2015). Aplikasi IB dengan sperma *sexing* bertujuan untuk meningkatkan efisiensi dalam usaha peternakan yang dijalankan. Pada peternakan sapi potong mengharapkan kelahiran pedet jantan untuk bakalan penggemukan, sedangkan pada peternakan sapi perah mengharapkan kelahiran pedet betina untuk menghasilkan susu (Gunawan *et al.*, 2015).

Metode *sexing* menggunakan gradient BSA dinilai efisien dan sederhana dibandingkan dengan metode-metode lainnya. Teknik pemisahan spermatozoa dengan gradient BSA dianggap tidak memanipulasi spermatozoa secara berlebihan, selain itu spermatozoa dipaparkan pada medium BSA yang juga sering ditambahkan pada pengencer semen, sehingga diharapkan mampu mencegah terjadinya penurunan kualitas spermatozoa setelah proses pemisahan. Afiati (2004) dalam Aini *et al.* (2016) melaporkan bahwa persentase spermatozoa hasil *sexing* gradient albumin diprediksi membawa kromosom X sebesar 80.88% dan Y sebesar 58.82% dengan motilitas sesudah proses *sexing* mencapai 75.00%. Lebih lanjut dilaporkan oleh Kaiin *et al.* (2008) bahwa motilitas spermatozoa *sexing* gradien kolom BSA 5-10% sesudah thawing tidak berbeda dengan spermatozoa *unsexing* yaitu 45% serta mampu menghasilkan spermatozoa *sexing* dengan motilitas yang lebih tinggi pada gradien bawah. Persentase motilitas tersebut masih memenuhi syarat sesuai standar SNI untuk keperluan Inseminasi buatan (IB) (Aini *et al.*, 2016).

Salah satu upaya untuk menghasilkan anak sesuai harapan dapat dilakukan dengan cara seksing spermatozoa berkromosom X atau Y sebelum dilakukan program inseminasi buatan. Inseminasi dengan semen pembawa kromosom X akan didapatkan pedet betina penerus keturunan dengan kualitas yang baik. Sedangkan inseminasi dengan spermatozoa pembawa kromosom Y akan didapatkan pedet jantan yang lebih menguntungkan. Sapi jantan tumbuh lebih cepat dan porsi karkasnya lebih tinggi dari pada porsi karkas sapi betina, sehingga meningkatnya jumlah anak jantan, berarti memperbaiki penampilan per tumbuhan dan peningkatan berat potong. Berdasarkan perbedaan tujuan usaha tersebut, maka pengaturan jenis kelamin dapat menekan perolehan ternak dari jenis kelamin yang kurang dibutuhkan. Dengan demikian apabila semen sapi yang sudah dipisahkan berdasarkan

jenis kelaminnya dipakai untuk Inseminasi Buatan, maka efisiensi produksi akan dapat ditingkatkan.

Rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y umumnya adalah 50 % X dan 50% Y. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengubah rasio tersebut pada ternak dengan maksud untuk dapat mengendalikan jenis kelamin anak dari suatu kelahiran. Manipulasi semen ternak melalui seksing merupakan salah satu cara utama untuk memperoleh anak dengan jenis kelamin tertentu. Sperma seksing digunakan untuk Inseminasi buatan dapat menghasilkan perolehan ternak dari jenis kelamin yang dikehendaki dengan genetik tertentu. Disamping itu peningkatan genetik dalam kelompok ternak dapat menjadi lebih cepat. Keberhasilan penggunaan bovine serum albumin (BSA) dan ovalbumin sebagai media pemisahan spermatozoa diawali oleh Ericsson et al. (1973) dalam Afriani *et al.*(2014). Selanjutnya ditambahkan oleh Udin *et al.* (2006 : Afriani *et al.*, 2014), salah satu usaha yang dilakukan pada teknik IVF (Fertilisasi In Vitro) adalah mencoba memodifikasi medium yang digunakan untuk meningkatkan viabilitas spermatozoa sehingga mampu membuahi oosit.

Afriani *et al.* (2014) menyatakan penggunaan bovine serum albumin ini sudah banyak dilakukan oleh peneliti sebelumnya diantaranya (Max-Well *et al.* 1984; Afriani *et al.*, 2014) yang menggunakan untuk pemisahan spermatozoa X dan Y pada sapi, (Jaswandi,1992 ; Afriani *et al.*, 2014) memisahkan spermatozoa X dan Y pada sapi perah dan (Hendri 1992; Afriani *et al.*,2014) melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y pada kambing. Namun pada penelitian sebelumnya lebih mengarahkan pada pengaruh pengencer dalam proses pemisahan kromosom X dan Y, sedangkan yang menjadikan waktu sebagai perlakuan belum pernah dilakukan. Pelapisan spermatozoa dengan menggunakan media TALP dan bovine serum albumin 4% dengan membiarkan sperma berenang ke bawah (swim down) pada fertilisasi in vitro, dengan mengamati lamanya waktu yang tepat dalam hal pemisahan spermatozoa kromosom X dan Y. Harapannya media TALP dan BSA tersebut berfungsi untuk seleksi jenis kelamin serta berperan pada proses pemisahan antar plasma semen dengan spermatozoa. Persentase rasio jenis kelamin jantan lebih banyak dibandingkan dari yang betina. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Jaswandi, 1992 ; Afriani *et al.*, 2014) yang melakukan pemisahan sperma pada sapi perah menggunakan larutan BSA 6% dan 10% dan mengungkapkan dengan fraksi semen bagian bawah didapatkan rasio jenis kelamin jantan dan betina (62,5% : 37,5%).

Afriani *et al.* (2014) menyatakan pemisahan spermatozoa kromosom X dan Y didapatkan bahwa spermatozoa kromosom Y lebih banyak jumlahnya dari pada spermatozoa dengan kromosom X. Hal ini sesuai dengan pendapat Max-well *et al.* (1984) dalam Afiati (2004) berpendapat efisiensi usaha mengubah rasio spermatozoa X dan Y dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi BSA, waktu atau lamanya spermatozoa menembus larutan BSA, dan konsentrasi spermatozoa yang akan dipisahkan dalam cairan pengencer. Selanjutnya Hendri (1992) menambahkan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y ternak kambing dengan metode kolom menggunakan bovine serum albumin (BSA) 6%, imbangan jenis kelamin jantan dan betina setelah perlakuan adalah 65 % : 35 % (Afriani, *et al.*, 2014).

Keberadaan spermatozoa dalam proses pembentukan jenis kelamin mempunyai arti penting, karena sebagai penentu jenis kelamin seekor ternak. Berdasarkan kromosom seks yang dibawanya, spermatozoa mamalia dapat dibedakan atas spermatozoa pembawa kromosom X dan spermatozoa pembawa kromosom Y. Jika spermatozoa Y berhasil membuahi telur, anak yang akan dilahirkan adalah jantan, dengan komposisi kromosom secara normal yaitu XY. Sebaliknya jika spermatozoa X yang berhasil membuahi sel telur, maka akan dilahirkan anak betina dengan komposisi kromosom yang normal, yaitu XX. Beberapa metode pemisahan spermatozoa yang sudah dilakukan adalah menggunakan kolom albumin, kecepatan sedimentasi, sentrifugasi dengan gradient densitas percoll, motilitas dan pemisahan elektroforesis, isoelectric focusing, teknik manipulasi hormonal, H-Y antigen, flow sorting serta penyaringan menggunakan kolom Sephadex. Metode yang dianggap paling valid diantara beberapa metode tersebut adalah metode kolom albumin dan metode penyaringan menggunakan kolom Sephadex (Saili dkk., 1998 : Sofyan dan Fifi, 2016). Pemisahan Spermatozoa dengan metode kolom Bovine Serum Albumin (BSA) didasarkan pada perbedaan motilitas (kecepatan pergerakan) antara spermatozoa X dan Y dalam menembus larutan yang mengandung BSA (Sofyan dan Fifi, 2016).

Bag *et al.* (2002) dalam Putri *et al.* (2015) pendinginan dan pembekuan dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan membran akrosom spermatozoa. Kerusakan membran inipada gilirannya akan menurunkan viabilitas spermatozoa bahkan dapat menyebabkan kematian bagi spermatozoa. Membran sperma berfungsi sebagai sarana transportasi energi dalam bentuk ATP yang dihasilkan

oleh enzim didalam mitokodria melalui siklus kreb, dengan demikian dapat dinyatakan bahwa sperma yang motil progresif harus memiliki membran yang utuh. Di sisi lain sebenarnya kutuhan membran sangat penting artinya bagi sperma, karena jika membran sperma rusak tidak dapat diperbaiki lagi. Sperma yang membrannya rusak memiliki daya fertilisasi yang rendah, karena membran yang rusak selain tidak dapat diperbaiki, juga mengakibatkan cairan intraseluler keluar, sedangkan cairan ini mengandung molekul (unsur-unsur) yang sangat dibutuhkan saat bersatunya sperma dan sel telur dalam proses fertilisasi (Jalius 2011; Putri *et al.*, 2015). Motilitas spermatozoa segar dan before freezing sapi Simmental lebih tinggi daripada sapi Limmousin dan FH, dan tidak ada perbedaan *post thawing motility*, *recovery rate*, dan *longivitas* spermatozoa pada ketiga bangsa tersebut (Komariah *et al.*, 2013).

Kualitas semen sapi Simental hasil sex separasi yang digunakan cukup layak untuk inseminasi, dan terjadi pergeseran anak yang dilahirkan kembar, serta terjadi peningkatan efisiensi reproduksi induk sapi menjadi relative lebih baik setelah diinovasi teknologi reproduksi dengan jenis kelamin anak jantan meningkat 12 persen. Hal ini sejalan dengan Estimasi ekonomi pada induk sapi yang diaplikasi teknologi reproduksi meningkatkan pendapatan sebesar 22.53 % per bulan (Sumaryadi *et al.*, 2010). motilitas spermatozoa segar dan before freezing sapi Simmental lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan sapi Limousin dan FH, sedangkan hasil PTM, *longivitas*, dan *recovery rate* tidak berbeda nyata pada ketiga bangsa tersebut (Komariah *et al.*, 2013).

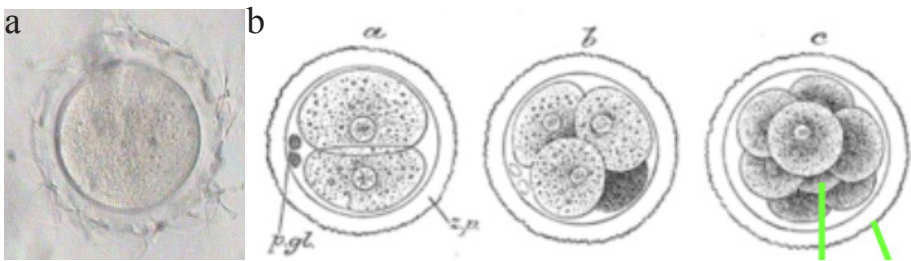
Sexing spermatozoa sebelum dan setelah pendinginan menunjukkan hasil yang tidak berbeda terhadap motilitas dan level pH antar perlakuan. Hasil *sexing* setelah pendinginan sampai 6 hari menunjukkan motilitas spermatozoa yang cukup baik, yakni di atas 45%. Namun demikian setelah pembekuan, motilitas spermatozoa masing-masing perlakuan tampak rendah, yakni di bawah 7%. Hasil *sexing* dengan menggunakan Albumin, setelah pendinginan selama 6 hari, perlakuan A (imbangan 1 : 0,5) menunjukkan motilitas spermatozoa tertinggi dibanding perlakuan (fraksi atas) (Pamungkas *et al.*, 2004).

2.4 SEXING EMBRIO

Embrio sebagai hasil dari pembuahan oleh spermatozoa dan oosit dapat dimanipulasi dengan cara *sexing* dimana, *sexing* embrio dapat dilakukan pada berbagai tahap perkembangan embrio.

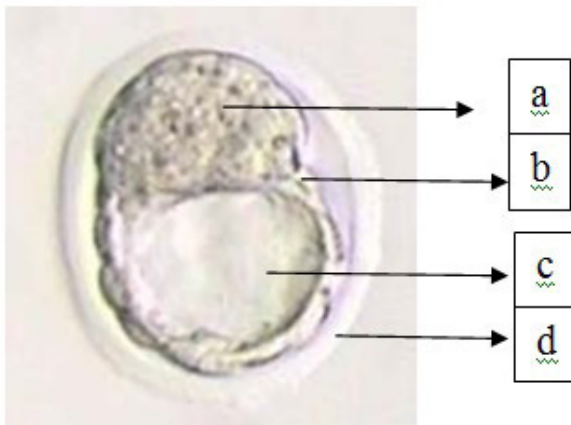
2.4.1 Tahapan perkembangan embrio

- Morula, merupakan hasil dari proses pembelahan yang terdiri dari sel-sel blastomer.



Gambar 16. Perkembangan embrio, a. Zigot, b. Morula (hasil pembelahan/cleavage)

- Blastula, dimana struktur blastosis adalah blastosul, inner cell mass, trofoblas, dan zona pellusida.

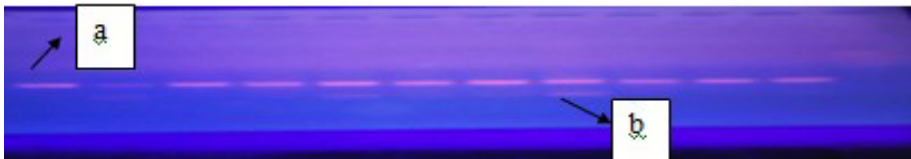


Gambar 17. Struktur blastula, a-d (inner cell mass, trofoblas, Blastosul, dan zona pellusida)

Jenis kelamin embrio dapat ditentukan sebelumnya dan penentuan jenis kelamin embrio (*sexing* embrio) dapat dilakukan pada berbagai tahap perkembangan embrio baik pada tahap morula maupun blastula. Pembentukan kelamin telah dimulai semenjak terjadinya pembuahan (Salisbury dan Vandemark, 1985). Embrio yang dikoleksi 7 hari setelah donor diinseminasi harus berada pada stadium morulla. Morula tersusun lebih kurang 32 sel dengan blastomer yang sulit dibedakan satu samalainnya karena merupakan massa sel dan sel-sel morula adalah totipoten dan pada hari ke 7 atau 8 berada pada stadium blastula (Udin, 2012 : Afriani, 2014).

Windsor *et al.* (1993); Afriani (2014) melakukan penentuan jenis kelamin embrio sebelum kebuntingan dengan menggunakan teknik analisis karyotipe. Dengan teknik karyotyping mempunyai sensitivitas sangat tinggi dengan efisiensi sebesar 95% dan akurasi 98%. Dari semua metode penentuan jenis kelamin yang ada maka PCR lebih baik dibandingkan metode yang lain karena lebih simple, lebih akurat, cepat dan tidak mahal (Chen, Zi-rong and Song-dong, 2007 : Afriani, 2014). Peura *et al.* (1991); Faber *et al.* (2003) dan Manna *et al.* (2003); Afriani (2014) melaporkan bahwa keberhasilan penentuan jenis kelamin ini tergantung pada amplifikasi Y- kromosom urutan DNA sebagai indikator khusus. Untuk embrio berjenis kelamin jantan ditentukan oleh dua fragmen (XY) dan embrio berjenis kelamin betina ditentukan oleh satu fragmen (XX). Jarak antara IB dan ovulasi pada sapi perah tidak mempengaruhi rasio kelamin embrio berumur 7 hari (Roelofs *et al.*, 2006).

Penentuan jenis kelamin dengan menggunakan 3 sel, 4-6 sel dan 7 sel telah dilakukan oleh Lacaze *et al.* (2008) juga Zohir dan Allam (2010) dalam Afriani (2014) menggunakan blastomer lebih dari 3 sel dimana embrio dibiopsi dengan microblade dan penentuan jenis kelamin embrio dengan menggunakan PCR.

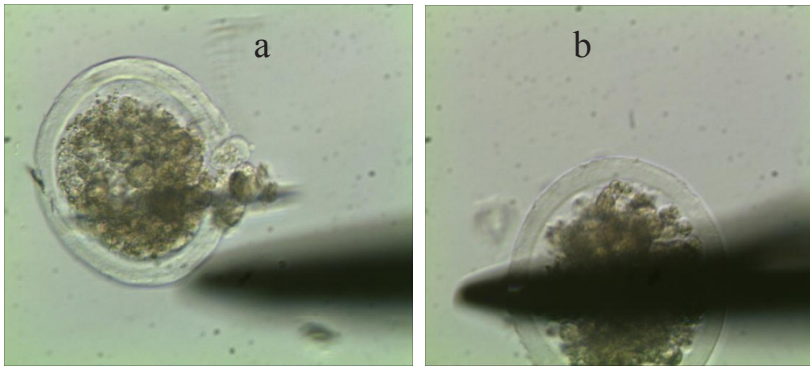


Gambar 18. Foto elektroforesis pada sapi Pesisir. a. Embrio betina dengan 1 band (XX) dan b. embrio jantan dengan 2 band (XY) (Afriani, 2014).

Keberhasilan penentuan jenis kelamin embrio dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah tingkat keberhasilan perkembangan embrio (umur embrio) dan jumlah sel yang di biopsi. Embrio tahap morula merupakan embrio dengan ciri-ciri tersusun lebih kurang 32 sel, morula berbentuk bulat akibat pembelahan sel terus menerus, keberadaan blastomer satu sama lain sangat rapat dan kompak sel pada tahap morula bersifat totipotency. Sel embrio pada tahap pertama pembelahan sel setelah pembuahan adalah satu-satunya sel yang totipoten. Tahapan perkembangan morula selanjutnya berkembang menjadi blastula. Pembelahan telah menghasilkan lebih dari 100 sel. Blastula biasanya menyerupai lapisan bola sel yang mengelilingi rongga berisi cairan. Pada blastula, sel-sel bagian dalam akan membentuk bakal janin atau embrioblas (inner cell mass), sedangkan bagian luarnya membentuk trofoblas (Afriani, 2014).

Untuk memperoleh materi genetik yang akan dideteksi melalui PCR dalam penentuan jenis kelaminnya maka embrio dibiopsi terlebih dahulu. Optimalisasi keberhasilan penentuan jenis kelamin (*sexing* embrio) sangat ditentukan oleh teknik biopsi yang digunakan. Biopsi dengan mikroblade adalah salah satu metoda biopsi dari embrio untuk mengambil blastomer sebelum dilakukan penentuan jenis kelamin embrio. Biopsi embrio mempengaruhi viabilitas dan perkembangannya embrio. Kerusakan embrio sebagai hasil dari prosedur biopsi sangat kecil dan persentase hidup tertinggi pada embrio setelah biopsi yaitu pada pada tahap embrio 8 sel dibandingkan tingkat awal (Gianaroli, 2000 : Afriani, 2014).

Salah satu alternatif untuk mengoptimalkan tingkat keberhasilan *sexing* embrio adalah dengan menggunakan umur embrio atau tahap perkembangan embrio yang sempurna dan jumlah blastomer yang lebih sedikit. Ini berkaitan dengan viabilitas embrio dan efektifitas dalam penentuan jenis kelamin embrio (*sexing* embrio), maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan menggunakan 1 dan 2 sel dalam penentuan jenis kelamin embrio pada sapi Pesisir (Afriani, 2014).



Gambar 19. Embrio sapi Pesisir yang dibiopsi. A. Blatomer yg keluar setelah biopsi. B. Perusakan zona pellusida dengan microblade (Afriani *et al.*, 2014)

2.4.2 Metode-metode *sexing* embrio

Penentuan jenis kelamin embrio dapat dilakukan melalui beberapa cara yaitu:

- ***Karyotyping***
- **Deteksi antigen H-Y**
- **Penentuan ikatan enzim X dan identifikasi yang berdasarkan kepada kromosom Y seperti in situ hibridisasi**
- **Uji kromatin, dan PCR (*polymerase chain reaction*).**

Sexing embrio dapat dilakukan dengan mengekstraksi satu sel/blastomer dari morula dengan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Morula tersebut kemudian dikultur kembali sampai menjadi blastosist. Dengan menggunakan metode ini kebenarannya dapat mencapai 99% seperti yang telah dilaporkan oleh Kirpatrick dan Monson (1993); Situmorang dan Endang (2004) dimana telah di *sexing* sebanyak 40 in vitro biopsied embryos lalu dikultur kembali kemudian 18 embrio yang telah dibiopsy telah ditransfer pada resipien dan 12 ekor telah berhasil bunting. Kelemahan *sexing* embrio adalah disamping mempengaruhi kualitas embrio juga memerlukan peralatan yang cukup mahal dan operator yang terlatih, sehingga penerapan teknologi ini secara ekonomis masih terbatas. Pemisahan spermatozoa sebelum inseminasi ataupun pembuahan secara in vitro menjadi alternatif yang perlu dipertimbangkan untuk mendapatkan

embrio dengan sex yang diinginkan. Penelitian telah dilakukan untuk pemisahan spermatozoa pembawa khromosom X dan Y dengan cara sedimentasi, sentrifugasi, elektroforesis, dan penggunaan antigen. Akan tetapi semuanya ternyata tidak efektif karena spermatozoa yang telah mengalami proses menurunkan kemampuannya untuk memfertilisasi sel telur. Di Amerika kini telah dilakukan sorting sperma dengan alat *flow cytometry*. Walaupun sorting telah berhasil 90% benar namun fertilitasnya menurun dan konsentrasi sperma yang didapat sangat rendah. Prospek penggunaan sistem ini secara komersial masih jauh dari sempurna, untuk itu penelitian di bidang ini terus dilakukan (Situmorang dan Endang, 2004).

Teknologi pemisahan sperma betina (X) dan jantan (Y) pada saat ini telah dikembangkan. Teknik ini dapat digunakan untuk mendapatkan anak dengan jenis kelamin sesuai harapan. Aplikasi teknologi ini dalam industri peternakan sapi akan sangat membantu dalam pengadaan bibit sapi potong atau sapi perah. Peternak sapi potong akan lebih mengharapkan kelahiran anak sapi jantan untuk penggemukan, sedangkan peternak sapi perah mengharapkan lebih banyak anak sapi betina yang lahir untuk produksi susu. IB dengan menggunakan straw jantan (Y) dapat mempercepat pemenuhan kebutuhan akan bibit jantan dibandingkan dengan jika IB menggunakan straw biasa (tanpa pemisahan). Hal tersebut dapat memenuhi kebutuhan akan daging karena akan lebih banyak anak sapi jantan untuk penggemukan.

Metode pemisahan sperma sapi yang sudah banyak digunakan di luar negeri menggunakan *flow cytometry* yang secara akurat dapat mengukur kandungan DNA sperma sehingga dapat dibedakan antara sperma pembawa jenis kelamin betina (X) atau pembawa jenis kelamin jantan (Y). Selain itu terdapat metode pemisahan sperma lainnya seperti sedimentasi, elektroforesis, filtrasi Sephadex G-50, sentrifugasi, kolom albumin (BSA) dan metode lainnya (Garner, 2001 ; Kainn *et al.*, 2008). Akurasi hasil *sexing* dengan metode *flow cytometry* diperkirakan mencapai 90% (Seidel & Garner, 2002), sedangkan (Johnson & Seidel 1999; Kainn *et al.*, 2008)) menyatakan bahwa dengan *sexing* sperma menggunakan *flow cytometry* dapat diperoleh 85%-95% kelahiran anak dengan jenis kelamin sesuai. Harga peralatan *flow cytometry* yang cukup mahal mendorong pengembangan teknik yang lebih sederhana yaitu dengan metode kolom albumin dengan menggunakan serum albumin sapi (BSA). Berdasarkan penelitian sebelumnya diperoleh bahwa konsentrasi BSA 5%-10% memberikan hasil optimum dalam memisahkan sperma X dan Y pada sapi

penelitian (Kainn *et al.*, 2003; Kainn *et al.*, 2008). Penggunaan sperma hasil pemisahan pada fertilisasi *in vitro* dapat membuktikan bahwa embrio yang berkembang merupakan embrio jantan jika difertilisasi dengan sperma Y dan embrio betina jika difertilisasi dengan sperma X. Teknik IVF yang menggunakan sperma hasil pemisahan dapat memproduksi embrio dengan jenis kelamin betina atau jantan, kemudian embrio-embrio yang diperoleh ditransfer ke induk resipien untuk mendapatkan anak dalam jumlah banyak dengan jenis kelamin sesuai harapan (jantan atau betina). (Cran *et al.* 1993; Kainn *et al.*, 2008) telah melakukan IVF dengan sperma hasil pemisahan X (kemurnian 79%) dan sperma Y (kemurnian 70%). Sebanyak 9 embrio ditransfer, masing-masing 2 embrio dan diperoleh 4 ekor induk bunting dan melahirkan 3 anak sapi jantan dan 3 anak sapi betina, hasil ini sesuai dengan jenis kelamin sperma yang digunakan dan *sexing* embrio blastosis dengan PCR sebelumnya (Cran *et al.*, 1995 : Kainn *et al.*, 2008).

Jumlah oosit yang dapat membelah menjadi embrio tahap 2 sel pada oosit yang difertilisasi dengan sperma X (45,8%) dan sperma Y (39,6%) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan oosit yang difertilisasi dengan sperma yang tidak dipisahkan (51,5%). Penggunaan sperma hasil pemisahan dalam fertilisasi *in vitro* masih mampu memfertilisasi oosit dan menghasilkan embrio tahap 2 sel. Perkembangan embrio tahap 2 sel selanjutnya mencapai tahap morula dan blastosis tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara oosit yang difertilisasi dengan sperma X (42,9%), sperma Y (40,9%) maupun sperma yang tidak dipisahkan (52,4%). Proses perkembangan embrio pada tahap 2 sel mencapai tahap morula dan blastosis lebih banyak dipengaruhi oleh proses kultur embrio. Embrio tahap morula dan blastosis yang dihasilkan semuanya disimpan dalam keadaan beku. Embrio tahap morula hasil fertilisasi dengan sperma pembawa kelamin jantan (Y) berhasil terimplantasi dan berkembang dalam uterus resipien. Satu ekor anak sapi lahir berkelamin jantan dari dua resipien yang bunting di Konawe. Hal tersebut sesuai dengan jenis kelamin sperma yang digunakan pada saat fertilisasi *in vitro* (Kainn *et al.*, 2008).

2.5 KLONING

Secara umum, kloning dapat dilakukan dengan teknik embryo *Splitting*, blastomere dispersal, dan nuclear transfer atau somatic cell nuclear transfer. Secara umum, kloning dapat dilakukan dengan teknik Embryo *Splitting*, blastomere dispersal, dan nuclear transfer atau somatic cell nuclear transfer.

2.5.1 Embryo *Splitting*

Pada teknik ini, kumpulan totipoten praembrio sebelum diletakkan ke dalam resipien, dipilah menjadi dua, yang kemudian menghasilkan dua embrio identik. Cara ini sering terjadi secara alamiah, yaitu dalam proses yang menghasilkan kembar identik. Manipulasi mikro embrio merupakan kloning dalam pembentukan kembar identik. Kembar buatan identik telah berhasil dilakukan dengan pembelahan embrio (*Splitting* embrio). Pembelahan embrio ini dilakukan dengan menggunakan suatu pisau pembelah mikroskopis untuk menembus zona pelucida. Embrio yang berumur 7 hari dibelah menjadi dua bagian yang terdiri atas kira-kira 64 sel. Separuh dari hasil belahan itu kemudian dibungkus kembali dengan pembungkus alam yang terpisah (suatu zona pelucida dari embrio yang kurang baik atau yang tidak dibuahi). Pembungkus yang kuat namun lentur (zona pelucida) yang menyelimuti bola sel, memungkinkan penempatan embrio di dalam uterus induk lain untuk dititipkan selama jangka waktu bunting. Embrio yang telah dibelah dapat dibekukan dan bila dialihkan/ditransfer pada waktu yang berbeda akan menghasilkan kembar identik yang berbeda umurnya.

Splitting Embrio

Teknologi lain yang dapat digunakan untuk optimalisasi produksi embrio adalah dengan teknik *Splitting* yaitu memotong embrio menjadi dua bagian yang sama. Potongan embrio yang dihasilkan dalam proses *Splitting* selanjutnya disebut "demi embrio". Teknik *Splitting* embrio dilaporkan telah dilakukan pada ternak sapi (Utsumi dan Iritani, 1990; Lopez *et al.*, 2001, Hozumi, 2001; Norman *et al.*, 2002). Dengan melakukan *Splitting* pada embrio, diharapkan akan mampu meningkatkan jumlah embrio yang dapat ditransfer kepada sapi resipien sehingga pada akhirnya akan meningkatkan persentase kebuntingan per embrio utuh yang dihasilkan. Namun karena untuk efisiensi teknis sebagian besar embrio yang diproduksi disimpan

dalam bentuk embrio beku (Anon, 2006) perlu dikaji apakah embrio beku masih memungkinkan untuk dilakukan *Splitting*.

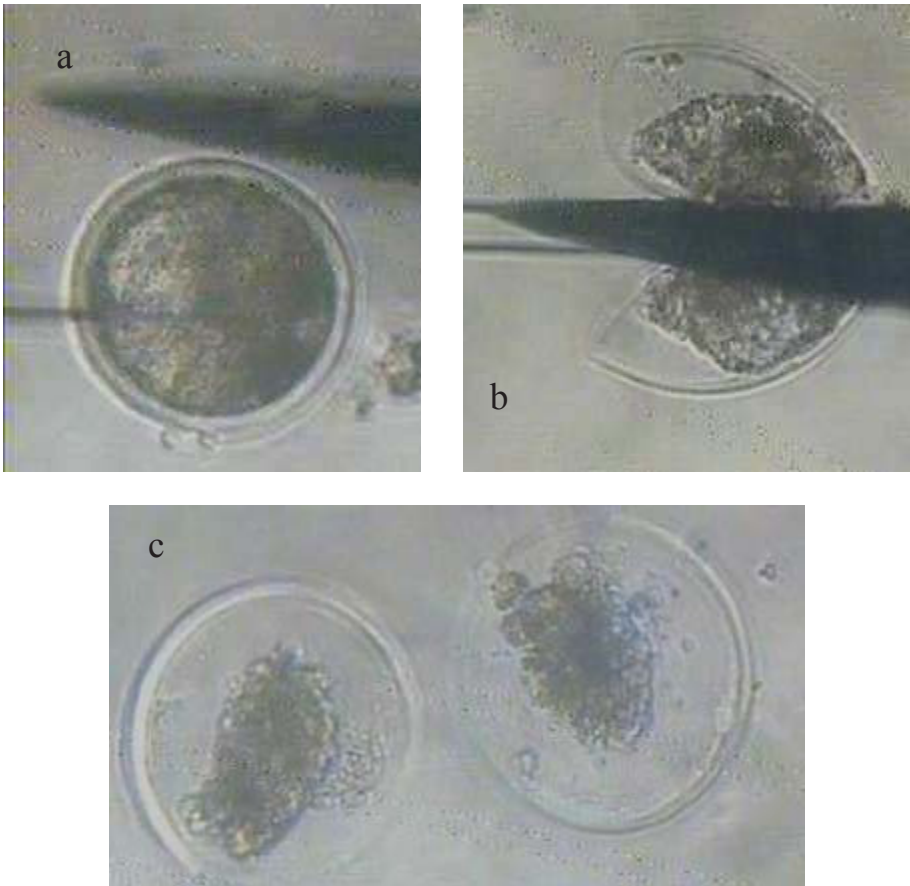
Pembelahan embrio secara fisik telah berhasil menghasilkan kembar identik pada domba, sapi, babi dan kuda (Brem, 1995). Walaupun secara teoritis pembelahan dapat dilakukan beberapa kali, tetapi sampai saat ini tingkat keberhasilannya masih sangat rendah. Embrio sapi pada stadium akhir dan blastosist dapat dibelah menjadi dua bagian, setengahnya dapat dikembalikan langsung kedalam uterus dan sebahagian sisanya dapat segera ditransfer ke resipien. Teknik *Splitting* ini dimasa depan mempunyai prospek yang sangat bagus, terutama pada ternak yang mempunyai nilai ekonomis tinggi (sapi perah). Akan tetapi penyempurnaan agar tingkat keberhasilannya lebih baik lagi dan aplikasinya lebih mudah dan murah perlu terus dilakukan (Situmorang dan Endang, 2004).

Teknologi *Splitting* embrio diharapkan dapat menjadi alternatif untuk optimalisasi penambahan jumlah embrio yang dapat ditransfer ke resipien per embrio utuh. *Splitting* embrio dapat dilakukan pada embrio beku yang memiliki kriteria tertentu dengan kualitas hasil setara dengan embrio segar (Imron *et al.*, 2007).

Imron *et al.* (2007) menyatakan embrio yang dapat digunakan untuk *Splitting* yaitu:

- 1) Embrio sapi in vitro segar;
- 2) Embrio in vitro beku yang telah dicairkan, dikultur selama 24 jam. *Splitting* embrio dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan oleh boediono (2005); Imron *et al* (2007) (gambar 20).

Spliting embrio merupakan metode alternatif yang dapat dilakukan untuk memperbanyak jumlah embrio yang dapat ditransfer. Embrio beku memiliki potensi dan kualitas yang sebanding dengan embrio segar untuk dilakuan *Splitting* jika telah dikultur dan diseleksi secara morfologi. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat kebuntingan dari transfer demi embrio segar maupun beku akan sangat berguna dalam menilai efisiensi aplikasi *Splitting* embrio di tingkat lapang (Imron *et al.* 2007).



Gambar 20. Tahapan proses *Splitting* embrio. a) Goresan kecil pada dasar cawan petri (tanda panah); b) *Splitting* embrio; c) Demi embrio sesaat setelah *splitting*.

2.5.2 Blastomere dispersal

Dimulai dengan pemisahan secara mekanik sel-sel individual sebelum pembentukan blastosit (sel-sel awal membentuk bola yang berisi cairan).

2.5.3 Nuclear transfer atau Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)

Pada teknik ini dibutuhkan dua sel, yaitu sel donor dan sel telur. Teknik ini melibatkan beberapa tahap penting, termasuk: (1) penyediaan ovum yang sudah matang, (2) pengeluaran kromosom yang terdapat dalam ovum (enucleation), (3) transfer inti sel hewan yang dikloning

ke dalam ovum enucleasi, (4) aktivasi embrio yang baru terbentuk sehingga menginisiasi perkembangan embrionik, (5) kultur embrio in vitro, dan (6) transfer embrio yang dikloning ke induk resipien (Hine, 2004; Tenriawaru, 2013).

Ciptadi (2007) menyatakan perkembangan ilmu genetika modern dan biologi molekuler telah memungkinkan isolasi dan manipulasi gen-gen terseleksi yang tidak diragukan lagi akan dapat mempercepat modifikasi-modifikasi genetik pada berbagai spesies hewan dan ternak. Pada masa yang akan datang potensi produksi embrio ternak hasil kloning melalui rekayasa transfer nukleus (TN) sangat besar, terutama jika dikaitkan dengan manipulasi genetik untuk menghasilkan individu hewan yang spesifik misalnya untuk tujuan produksi biofarmasi, perbaikan karakter produksi ternak, resistensi terhadap penyakit dll, dengan hanya memerlukan waktu satu generasi.

Perkembangbiakan ternak-ternak superior banyak bergeser dari perkawinan alam kearah rekayasa reproduksi mulai dari Inseminasi buatan (IB), transfer embrio (TE), in vitro fertilisasi (IVF) dan yang terakhir kloning hewan dan ternak. Pada rekayasa kloning dengan TN, sel donor nukleus baik berupa sel embrionik maupun sel somatik telah digunakan baik dalam bentuk segar dan beku. Konsep genome resources bank dan teknologi reproduksi dimana termasuk di dalamnya aplikasi inseminasi buatan, embrio transfer dan in vitro fertilization telah mulai dicobakan pada populasi hewan liar pada sekitar tahun 1990. Perkembangan terakhir dengan tingkat keberhasilan teknologi reproduksi yang makin baik menyebabkan suatu harapan yang sangat besar bagi preservasi spesies-spesies hewan langka. Keberhasilan yang pertama dari penggunaan teknologi kloning pada hewan langka adalah laporan keberhasilan lahirnya gaur jantan (*B.gaurus*) yang merupakan hasil transfer nukleus interspesies sel somatik gaur pada oosit sapi (*B. taurus*) yang kemudian ditransfer kedalam induk resipien sapi domestik pada akhir November 2000. Produksi embrio rekonstruksi hasil secara in vitro menggunakan transfer nukleus mempunyai potensi yang sangat baik di masa datang dari aspek genetik dan ekonomi.



Gambar 21. Tahapan kloning dalam pembentukan domba Dolly

Kloning dengan transfer nukleus pertama kali dilaporkan pada ternak domba dan kemudian juga berhasil dilakukan pada berbagai jenis ternak lainnya seperti sapi, babi, kelinci, kambing dll (Prather *et al.*, 1987, Heyman and Renard, 1996). Namun demikian, walaupun rekayasa reproduksi ini mengalami kemajuan yang sangat pesat, pada saat ini efisiensi produksi embrio hasil rekonstruksi dengan transfer nukleus masih rendah, karena masih banyak faktor yang belum sepenuhnya dikuasai seperti kualitas oosit, metode kultur embrio kloning, tipe sel donor, atau perlunya sinkronisasi siklus sel donor-sitoplasma resipent (Kato and Tsunoda, 1992).

Metode produksi embrio kloning menggunakan donor sel somatik pada berbagai spesies ternak berawal dari sukses dan lahirnya domba Dolly, hasil kloning embrio yang direkonstitusi menggunakan donor sel somatik mammary gland dan sel epitel fetal fibroblast. Aplikasi rekayasa produksi embrio kloning ini pada ternak lokal di Indonesia perlu dilakukan dengan pertimbangan utama :

- (1) Sebagai metode alternatif atau sarana untuk konservasi genetic resources spesies hewan langka dan ternak lokal unggul sekaligus untuk mempercepat peningkatan kualitas genetik ternak lokal yang ada,

- (2) Sebagai antisipasi terhadap era pasar bebas dengan kemungkinan ekspor dan impor embrio ternak hasil kloning, dan
- (3) Sebagai data genetik dampak aplikasi kloning pada ternak lokal di Indonesia di masa datang. (Ciptadi, 2005).

Pengembangan teknik SCNT

a. Teknik Roslin

Ian Wilmut dan Keith Campbell menggunakan teknik Roslin ini pada saat mengkloning domba Dolly. Pada teknik ini, sel donor diseleksi dari sel kelenjar mammae domba betina berbulu putih (Finn Dorset). Sel tersebut kemudian dikultur secara *in vitro* dalam medium yang nutrisinya hanya cukup untuk mempertahankan kehidupan sel. Hal ini dimaksudkan agar sel menghentikan seluruh gen yang aktif dan memasuki stadium Gap Zero (G0). Selanjutnya sel telur dari domba betina Blackface dienukleasi dan diletakkan di sebelah sel donor. Satu sampai delapan jam setelah pengambilan sel telur, diberikan kejutan listrik untuk memfusikan kedua sel tersebut.

Pada saat yang sama, pertumbuhan embrio diaktifkan. Jika embrio ini dapat bertahan, embrio tersebut selanjutnya ditransfer ke dalam uterus induk resipien. Induk resipien tersebut akan mengandung hasil kloning tersebut hingga siap untuk dilahirkan.

b. Teknik Honolulu

Teknik ini terakreditasi atas nama Teruhiko Wakayama dan Ryuzo Yanagimachi dari Universitas Hawaii. Tim ilmuwan dari Universitas Hawaii tersebut menggunakan teknik ini untuk menghasilkan tiga generasi tikus kloning yang secara genetik identik pada bulan Juli 1998. Wakayama melakukan pendekatan terhadap masalah sinkronisasi siklus sel yang berbeda dengan Wilmut. Wakayama awalnya menggunakan tiga tipe sel, yaitu sel sertoli, sel otak, dan sel cumulus sebagai sel donor. Sel sertoli dan sel otak berada dalam stadium G0 secara alamiah dan sel cumulus hampir selalu berada pada stadium G0 ataupun G1. Sementara itu, sel telur tikus yang tidak dibuahi digunakan sebagai sel resipien. Setelah dienukleasi, sel telur memiliki inti donor yang dimasukkan ke dalamnya. Nukleus donor diambil dari sel-sel dalam hitungan menit dari setiap ekstrak sel tikus tersebut. Setelah satu jam, sel-sel telah menerima nucleus-nukleus

yang baru. Sel-sel tersebut kemudian ditumbuhkan dalam medium kultur yang mengandung cytochalasin B. Cytochalasin B berfungsi untuk menghentikan pembentukan badan polar. Sel-sel tersebut dibiarkan berkembang menjadi embrio-embrio. Embrio-embrio tersebut selanjutnya ditransplantasikan ke induk resipien dan akan tetap berada di uterus sampai siap dilahirkan. Setelah terbukti bahwa tekniknya dapat menghasilkan klon yang hidup, Wakayama membuat klon dari klon dan membiarkan klon yang asli untuk melahirkan secara alamiah untuk membuktikan bahwa mereka memiliki kemampuan reproduksi secara sempurna (Rusda, 2004).

c. Teknik Lainnya

Ine (2004) mengemukakan bahwa metode terbaru yang lebih efisien untuk kloning mencit telah dilakukan oleh Baguisi dan Overstrom (2000) dengan menggunakan metode enuklease kimiawi yang dikombinasikan dengan injeksi langsung inti donor untuk menghasilkan anak yang hidup. Namun, metode baru ini masih memerlukan percobaan tambahan pada spesies lain untuk menentukan efektivitasnya.

William B. Hurlbut (dalam Murti, 2008) mengemukakan gagasannya untuk memodifikasi sel embrio agar tidak mampu berkembang menjadi embrio normal yang mampu berimplantasi, yang disebut dengan *Altered Nuclear Transfer* (ANT). Teknik ANT merupakan pengembangan teknik SCNT untuk mengatasi masalah etika. Modifikasi teknik ANT meliputi pemanfaatan retrovirus untuk menyisipkan RNAi pada sel donor inti sebelum ditransfer ke sel oosit resipien. RNAi (RNA interference) merupakan potongan kecil RNA yang dapat menginduksi penghancuran mRNA tertentu sebelum dapat mengkode pembentukan protein di sitoplasma. Keberadaan RNAi diharapkan dapat menghambat ekspresi gen yang bertanggung jawab terhadap proses pembentukan trofoblas, sehingga diharapkan embrio menjadi cacat dan tidak dapat berimplantasi.

Pada tahun 1980an untuk pertama kali dilaporkan kloning pada domba (Willadsen, 1986; Cunningham, 1999). Tahun 1996 telah dilaporkan suatu hasil kloning domba yang berasal dari sel somatik jaringan kelenjar susu. Yang terbaru adalah keberhasilan kelahiran delapan ekor pedet hasil kloning yang berasal dari sel epitel jaringan reproduksi sapi betina dewasa (Campbell *et al.*, 1996; Wilnut *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998). Keberhasilan dari

teknologi ini akan memberi peluang yang besar terhadap kemajuan IPTEK peternakan di masa yang akan datang. *Splitting* maupun kloning juga akan sangat bermanfaat dalam membantu program konservasi secara *in vitro* (cryogenic preservation) (Situmorang dan Endang, 2004).

2.5.4 Perkembangan Kloning Hewan

Kloning hewan telah muncul sejak awal tahun 1900, tetapi contoh hewan kloning baru dapat dihasilkan lewat penelitian Wilmut *et al* pada tahun 1996 dan untuk pertama kali membuktikan bahwa kloning dapat dilakukan pada hewan mamalia dewasa (Hine, 2004; Tenriawaru, 2013). Menurut Budidaryono(2009), kloning pada hewan dimulai ketika para pakar biologi reproduksi Amerika, Briggs dan King, pada tahun 1952 berhasil membuat klon katak melalui teknik *Transplanting Genetic Material* dari suatu sel embrional katak ke dalam sel telur katak yang telah diambil intinya.

Pada tahun 1962, Gurdon melakukan transplantasi nukleus sel usus katak (somatik) yang telah mengalami diferensiasi ke dalam sel telur katak yang telah diambil intinya. Sel telur berinti sel intestinum tersebut kemudian berkembang menjadi klon katak (Arnold, 2009). Selanjutnya pada tahun 1967, Mintz berhasil melakukan transplantasi sel somatik embrional pada stadium blastula dan morula ke dalam rahim seekor tikus sehingga dihasilkan klon tikus (Budidaryono, 2009). Sampai saat ini, telah banyak peneliti yang melaporkan keberhasilannya membuat hewan klon yang dihasilkan dari teknik transplantasi inti sel somatik. Beberapa diantaranya adalah sapi jantan bernama Gene yang berhasil dikloning oleh Infigen Inc. dari sebuah sel fetus pada tahun 1997, kambing bernama Mira yang dikoning dari sel embrionik oleh Genzyme Transgenic Corporation and Tufts University pada tahun 1998. Pada tahun yang sama, peneliti dari Universitas Hawaii berhasil mengkloning tiga generasi tikus dari sel cumulus. Pada tahun 2000, Universitas Teramo di Italia mengkloning muflon dari sel dewasa dan tim peneliti PPL Therapeutics berhasil memproduksi beberapa babi yang dikloning dari sel dewasa yang diberi nama Millie, Christa, Alexis, Carrel, dan Dotcom. CC, kucing betina pertama berhasil diklon oleh Genetics Saving Clone pada tahun 2001. Dua tahun setelahnya, Trans Ova Genetics an Advanced Cell Technologies memproduksi banteng pertama yang diklon dari sel dewasa. Kijang dan keledai pertama juga berhasil diklon pada tahun 2003.

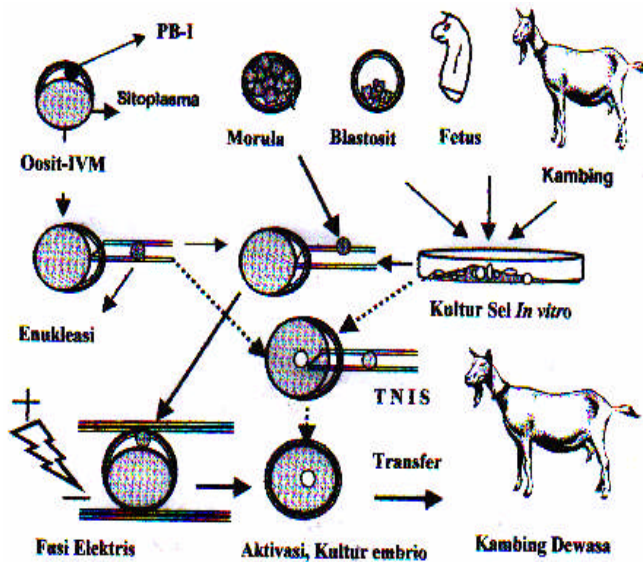
Fakta dari hewan kloning dari berbagai spesies telah diproduksi oleh sejumlah laboratorium menunjukkan begitu besarnya keinginan untuk memproduksi atau mengkloning hewan dengan genotip-genotip spesifik. Disamping itu, ada juga permintaan untuk mengkloning hewan-hewan yang bergenetik unggul. Spesies hewan lainnya yang menjadi target kloning adalah hewan-hewan yang sudah hampir punah, hewan steril, infertil, ataupun hewan mati. Dengan keberhasilan ini, para ilmuwan tertantang untuk melakukan kloning pada manusia, baik berupa kloning reproduktif untuk menghasilkan individu utuh maupun berupa kloning terapeutik untuk diaplikasikan pada berbagai penyakit dengan terapi sel stem (Tenriawaru, 2013).

Proses enukleasi sel telur dapat dilakukan secara mekanik dengan menggunakan teknik mikromanipulasi. Sedangkan proses introduksi sel donor dapat dilakukan dengan teknik mikroinjeksi (Setiawan, 2008). Sementara itu, Hangbao (2004) mengemukakan bahwa sel donor dan sel penerima transfer nucleus difusikan oleh getaran listrik tunggal secara langsung melalui elektroda tipe jarum. Teknik- teknik yang diperlukan untuk menyempurnakan tahapan-tahapan ini agak berbeda antar spesies. Demikian halnya dengan efisiensi setiap tahap juga bervariasi bagi spesies hewan (Setiawan, 2008). Teknik SCNT ini merupakan teknik yang paling sering digunakan dalam penelitian kloning hewan. Aplikasi dari teknik SCNT ini adalah pada penelitian kloning reproduktif dan kloning terapeutik. Pada kloning reproduktif, setelah sel klon mengalami pembelahan hingga tahap blastosit, embrio selanjutnya ditransfer ke induk resipien (*surrogate mother*) untuk dilahirkan secara normal. Sedangkan pada kloning terapeutik, setelah embrio mencapai tahapan blastosit, embrio dikultur secara *in vitro* dalam medium spesifik untuk idiferensiasikan menjadi berbagai jenis sel untuk kegunaan terapeutik. Manipulasi kondisi kultur dengan menggunakan medium selektif merupakan metode standar untuk seleksi organisme (Freshney, 2000).

Pelaksanaan kegiatan penelitian transfer nukleus meliputi serangkaian persiapan produksi sel donor dan sel resipien, transfer nukleus dan kultur embrio hasil rekonstruksi. Kloning menggunakan donor sel somatic mempunyai potensi yang sangat bagus baik pada tingkat riset maupun aplikasi di bidang peternakan, kedokteran dan konservasi plasma nutfah hewan dan ternak. Semenjak keberhasilan kloning domba Dolly, maka ternak kloning yang lahir dan hidup normal telah dilaporkan pada berbagai spesies. Berdasarkan pada sumber sel donor, maka ada duasumber utama yaitu nukleus sel embrionik

(morula dan blastosis) serta sel somatik dari fetus dan hewan dewasa (Ciptadi, 2007).

Pada perkembangan terbaru telah memungkinkan adanya transfer nukleus interspesies, misalnya antara *Bos gaur* dan *Bos banteng* dengan *Bos taurus*. Dari berbagai riset telah dilaporkan bahwa sitoplasma oosit bovine dapat melakukan reprogramming nukleus dari spesies lain (Shi *et al.*, 2003). Lebih jauh dikatakan bahwa nukleus dari domba, babi, kera dan tikus menunjukkan adanya respon positif reprogramming awal setelah di transfer ke sitoplasma bovine, berdasarkan terjadinya pembelahan dan perkembangan hingga terbentuknya blastosis sekitar 10 – 15 % hingga ada yang lahir hidup. Hasil ini memacu para peneliti untuk menggunakan model alternatif ini sebagai cara konservasi spesies langka mamalia. Keberhasilan rekayasa TN tersebut dilakukan dengan menggunakan masing-masing jenis sel donor somatik fibroblast *Bos gaur*, fetal fibroblas kerbau, granulosa sel *Ovis orientalis musimon*. Namun, saat sel donor nukleus sel somatik manusia ditransferkan pada sel oosit enukleasi, hanya 6 dari 56 sel rekonstruksi yang mampu berkembang menjadi 4 – 16 sel. Diduga masih ada inkomptabilitas yang tinggi antara komponen sel donor dan sitoplasma dengan makin jauhnya jarak antara spesies (Ciptadi, 2007).



Gambar 22. Prosedur umum produksi embrio kloning menggunakan berbagai sumber sel donor (Ciptadi, 2005): (Ciptadi, 2007).

Penggunaan sel somatik pada transfer nukleus pada sapi menghasilkan tingkat fusi nukleus-sitoplasma sekitar 50 – 80% (Goto et.al, 1999). Penggunaan MGE menghasilkan 56 + 7 % terjadi fusi, dimana 85 % mengalami cleavage dan 35 % mencapai fase blastosit (Kishi et.al, 2000). Hasil lain justru diperoleh tingkatl fusi sekitar 69 % dengan menggunakan mammary gland cells yang diperoleh dari rumah potong hewan, bukan dari kolostrum (Goto et.al. 1999). Semenjak Wilmut pada tahun 1987 mempublikasikan keberhasilannya dengan lahirnya domba hasil transfer nukleus menggunakan sel *mammary glands* (MG) dan sel *fetal fibroblast*, beberapa penelitian akhirnya juga berhasil memproduksi ternak klonning dengan menggunakan sel somatis yang lain seperti sel kumulus, sel oviduct, sel granulosa, jaringan otot longisimus thoracis atau sel fibroblast pada mencit, sapi dan kambing (Shiga et.al, 1999, Baguisi et.al., 1999, Cibelli *et al*, 1998). Sementara itu penggunaan susu *kolostrum-Mamarry Glands Cells- Epithel* (MGE) sebagai sumber sel donor (sel epithel) pertama kali dilaporkan oleh Kishi *et al.* (2000) karena cara memperolehnya yang relatif lebih mudah.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa penggunaan sel somatik sebagai donor embrio rekonstitusi menghasilkan tingkat kematian embrio dini (pregnancy lost), perkembangan yang abnormal termasuk didalamnya berat lahir yang tinggi dan abnormalitas placenta (Garry et.al, 1996, Hill et.al., 1999; Kishi et.al, 2000) dan hal ini diduga terkait dengan masalah-masalah kurang sempurnaan protokol transfer nukleus itu sendiri. Lebih lanjut dikatakan, ketidaksempurnaan reprogramming kultur donor sel, atau kekurangan dalam IVM dan kultur sistem embrio yang digunakan. Semua kekurangan ini selanjutnya diduga akan menyebabkan pola yang kurang sesuai dari ekspresi gen pada fase-fase pembentukan embrio, perkembangan fetus dan placenta, sehingga akhirnya juga berpengaruh pada kematian embrio dini atau gagalnya kebuntingan ternak. Protokol produksi sel donor, misalnya sel MGE, diperoleh dari kolostrum kambing yang baru melahirkan dalam 48 jam, dilakukan koleksi dalam botol steril dan disimpan dalam 4 °C hingga 5 jam, diencerkan dalam DPBS (GIBCO) dengan perbandingan 1:1, disentrifugasi 500 g selama 5 menit pada temperatur 4 °C. Sel-sel yang mengendap kemudian diencerkan kembali dalam 50 ml DPBS dan disentrifugasi ladi dan diulang 3 kali.

Sel resipien yang digunakan adalah oosit matang (M-II) baik yang diperoleh dari pemanenan *in vivo* maupun hasil maturasi *in vitro*. Oosit ini sebelumnya dilakukan enukleasi atau pengambilan inti sebelum bisa digunakan sebagai oosit resipien. Maturasi oosit

secara *in vitro* dilakukan dalam medium kultur TCM 199 dengan suplemantasi hormon gonadotrophin dan serum dalam inkubator 5 % CO₂, temperatur 39 °C dengan kelembaban maksimum dalam drop 50 ul/10 COC yang dilapisi mineral oil. Sel-sel kumulus dilepaskan dengan melakukan pemaparan sel oosit.

2.5.5 Kloning dalam Industri Pembibitan Sapi

Contoh kloning sapi sangat menjanjikan untuk diaplikasikan dengan skala luas. Hal ini didasarkan fakta bahwa embrio klon dapat diproduksi dengan efisien dan angka kebuntingan hasil kloning juga relatif tinggi. Pemeliharaan kebuntingan dan harapan hidup anak yang rendah menjadi kendala utama untuk menyebarluaskan aplikasi teknologi ini pada sapi. Permintaan pasar untuk sapi kloning adalah sapi yang mempunyai nilai genetik dan nilai jual yang tinggi diantaranya sapi pejantan yang mempunyai nilai jual semen potensial yang tinggi dan induk betina yang menghasilkan pendapatan signifikan dari produksi embrio. Kloning sel somatik dalam usaha pembibitan komersial dapat menjamin kualitas produk, keseragaman, dan konsistensi. Untuk mewujudkan hal ini dibutuhkan efisiensi yang lebih tinggi dan biaya yang lebih rendah pada proses produksi kloning. Sebagian upaya kloning difokuskan pada ternak sapi transgenik dengan memanfaatkan genotip-genotip yang sudah diketahui melalui modifikasi genetik (Brink *et al*, 2000; Murray, 1999). Genotipe superior dapat diperbanyak menggunakan teknik kloning dan digabungkan dengan transgenesis untuk mengintroduksi sifat-sifat yang terkait karakteristik sekunder seperti resistensi terhadap penyakit dan fertilitas. Sifat-sifat ini belum dipertimbangkan dalam skema seleksi konvensional tetapi sekarang mendapat perhatian lebih intens, salah satu alasannya adalah untuk kesejahteraan ternak yang telah berkembang menjadi isu penting dalam segala aspek pemanfaatan hewan untuk keperluan manusia. Hambatan utama teknologi ini adalah tingginya angka kehilangan embrio (rata-rata 5% embrio klon yang berkembang sampai lahir) (Faber *et al*, 2003).

2.5.6 Bioetika Kloning Hewan

Berbagai keberhasilan dalam teknologi kloning menunjukkan semakin memungkinkannya terciptanya klon manusia. Hal ini memicu tanggapan keras dari kaum moralis dan menjadi bahan perdebatan para pakar yuridis, politikus, agamawan, tenaga medis, masyarakat, dan para pakar bioteknologi itu sendiri. Perdebatan tentang kloning

ini terus terjadi, baik dalam hal kloning binatang maupun kloning manusia. Menurut Ihwan (2009), kelompok kontra kloning diwakili oleh George Annos, seorang pengacara kesehatan di Universitas Boston dan kelompok pro kloning diwakili oleh Panos Zavos. Kelompok kontra berpendapat bahwa kloning akan memberi dampak buruk bagi kehidupan. Sementara itu, kelompok yang mendukung kloning berpendapat bahwa kloning sangat dibutuhkan oleh manusia sebab cloning ini dapat digunakan untuk memproduksi organ-organ tubuh pengganti organ yang rusak. Hal ini sangat bermanfaat dalam bidang kesehatan. Selain itu, kloning juga diharapkan dapat menjadi alternatif untuk melestarikan hewan langka. Pada dasarnya, penerapan teknologi membutuhkan dimensi etis sebagai sebuah pertimbangan. Ilmu pengetahuan dan teknologi berfungsi untuk mengembangkan nilai-nilai kemanusiaan dan bukan untuk menghancurkan nilai-nilai tersebut (Djati, 2003). Satu hal yang paling esensi untuk setiap karya cipta adalah apapun bentuk teknologinya, manfaat yang diperoleh harus lebih besar dari dampak yang ditimbulkannya (Budidaryono, 2009). Oleh karena itu, penerapan teknologi kloning harus mempertimbangkan faktor bioetika, sosial, kultural, yuridis, moral, dan masalah keamanan. Apabila ditinjau dari masalah keamanan, teknik kloning SCNT masih menimbulkan masalah genetis serius. Sebagian besar hewan hasil kloning mengalami cacat genetis dan pertumbuhan abnormal. Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa masalah pembiakan sel secara *in vitro* yang dilangsungkan dalam waktu yang cukup lama akan menyebabkan sel-sel tersebut mengalami transformasi kromosomal, sehingga memungkinkan sel-sel tersebut menjadi sel-sel tumor atau kanker (Djati, 2003). Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut masih harus terus dilakukan untuk mengurangi resiko cacat genetis dan keabnormalan tersebut.

Budiningsih (2009) mengemukakan bahwa paling sedikit ada tiga hal yang harus dipenuhi dalam penerapan teknologi kloning, yaitu sebagai berikut:

1. Prosedur untuk kloning reproduktif hewan harus diperbaiki sedemikian rupa sehingga tingkat abnormalitas yang terjadi pada hewan yang diklon; termasuk primata, tidak melebihi tingkat yang diamati yang diamati pada prosedur teknologi reproduksi buatan.
2. Metode baru harus dikembangkan untuk menunjukkan bahwa embrio manusia preimplantasi yang dihasilkan harus normal dalam hal imprinting dan reprogramming.

3. Metode monitoring harus dikembangkan untuk mendeteksi - secara efektif dan komprehensif - dampak efek terkait pada kloning embrio preimplantasi dan janin.

Selain itu, setiap proyek kloning hendaknya didahului oleh suatu taksiran yang cermat terhadap bahaya-bahaya yang mungkin terjadi di dalamnya dan dibandingkan dengan manfaat yang diperoleh. Sampai saat ini, teknologi kloning reproduktif pada hewan dengan tujuan meningkatkan mutu pangan dan kualitas daging serta sebagai upaya untuk melestarikan hewan langka jelas diperbolehkan. Tetapi kloning reproduktif yang menghasilkan manusia duplikat atau kembaran identik yang berasal dari sel induk dengan cara implantasi inti sel tidak dapat dibenarkan. Sedangkan kloning manusia untuk tujuan terapi (kloning terapeutik) dianggap etis (Rusda, 2004). Pada tahun 2001, House of Lords Inggris menyetujui kloning embrio manusia. Persetujuan itu memuat berbagai peraturan, diantaranya adalah embrio hasil kloning hanya untuk kepentingan medis. Selain itu, dalam proses pengkloningan tidak boleh terjadi pencampuran antara gen manusia dan hewan. Embrio tidak boleh dikembangkan hingga berusia 9 bulan sebab pada fase ini embrio bisa tumbuh layaknya janin manusia (Pareanom, 2001).

Manipulasi mikro embrio merupakan kloning dalam pembentukan kembar identik. Kembar buatan identik telah berhasil dilakukan dengan pembelahan embrio (*Splitting embrio*). Pembelahan embrio ini dilakukan dengan menggunakan suatu pisau pembelah mikroskopis untuk menembus zona pelucida. Embrio yang berumur 7 hari dibelah menjadi dua bagian yang terdiri atas kira-kira 64 sel. Separuh dari hasil belahan itu kemudian dibungkus kembali dengan pembungkus alam yang terpisah (suatu zona pelucida dari embrio yang kurang baik atau yang tidak dibuahi). Pembungkus yang kuat namun lentur (zona pelucida) yang menyelimuti bola sel, memungkinkan penempatan embrio di dalam uterus induk lain untuk dititipkan selama jangka waktu bunting. Embrio yang telah dibelah dapat dibekukan dan bila dialihkan/ditransfer pada waktu yang berbeda akan menghasilkan kembar identik yang berbeda umurnya.

2.6 TERNAK CHIMERA

Dibentuk dengan cara meramu blastomer berbagai jenis ternak. Sel-sel dari beberapa embrio dapat digabungkan dalam suatu zona pelucida

untuk menghasilkan seekor hewan yang merupakan kombinasi dari beberapa hewan yang telah digabung. Misalnya anak sapi chimera dihasilkan dengan menggabungkan blastomer dari *Bos taurus* (sapi Eropah) dan *Bos indicus* (sapi India), kemudian dialihkan ke resipien untuk dikandung sampai lahir. Demikian pula antara domba dan kambing, dengan prosedur yang sama telah dilahirkan turunan berbadan domba berwajah kambing. Komposisi tubuh maupun fenotipe ternak chimera ditentukan oleh jumlah blastomer dari masing-masing jenis yang telah diramu. Proses ini masih terus dalam proses penelitian, memerlukan biaya yang mahal, dan memakan waktu yang panjang. Prosedurnya juga jauh lebih sulit dari pembelahan embrio, karena pada dasarnya melibatkan teknik bedah mikroskopis. Dua embrio atau lebih diambil pada tahapan awal perkembangannya, zona pelucidanya dilepaskan, lalu dua embrio atau lebih itu diletakkan bersama-sama dan terjadilah percampuran material genetik di dalam satu zona pelucida yang sama. Chimera ini kemudian dipindahkan ke dalam induk resipiennya. Demikianlah perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) di bidang reproduksi ternak tersebut yang dapat diaplikasikan pada subsektor peternakan untuk meningkatkan populasi, produksi dan produktivitas ternak baik secara kualitas maupun kuantitas. Namun, yang menjadi kendala dalam pemanfaatan dan aplikasi teknologi tersebut terutama di negara-negara berkembang seperti di Indonesia adalah keterbatasan dalam hal peralatan dan dana serta tenaga ahli yang terampil. Khusus di Indonesia, aplikasi kemajuan mutakhir di bidang teknologi reproduksi ternak itu, yang banyak dilaksanakan ke petani peternak baru sampai pada tahap penggunaan Inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio (TE) (Suciani, 2015).

Ternak chimera dibentuk dengan menggabungkan blastomer berbagai jenis ternak. Sel-sel dari beberapa embrio dapat digabungkan dalam suatu zona pelucida untuk menghasilkan seekor hewan yang merupakan kombinasi dari beberapa hewan yang telah digabung. Misalnya anak sapi chimera dihasilkan dengan menggabungkan blastomer dari *Bos taurus* (sapi Eropa) dan *Bos indicus* (sapi India), kemudian dititipkan ke resipien untuk dikandung sampai lahir. Demikian pula antara domba dan kambing. Komposisi tubuh maupun fenotipe ternak chimera ditentukan oleh jumlah blastomer dari masing-masing jenis yang telah diramu. Prosedur ini jauh lebih sulit dari pembelahan embrio, karena melibatkan teknik bedah mikroskopis.

BAB III
FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KEBERHASILAN
MANIPULASI EMBRIO

Faktor Yang Mempengaruhi Keberhasilan Manipulasi Embrio

Salah satu faktor utama yang mempengaruhi aplikasi embrio transfer adalah kemampuan untuk membekukan embrio seperti halnya spermatozoa sehingga memudahkan penyimpanan dan transportasi. Teknologi pembekuan embrio yang dihasilkan secara *in vivo* maupun *in vitro* sudah banyak dilaporkan (Voekel dan Hu, 1992; Situmorang *et al*, 1993; Han *et al*, 1994). Menurut Gordon (1994) krioprotektan yang biasa digunakan untuk pembekuan sel dibagi dua kelompok yaitu 1) kelompok *extrasellular* yaitu krioprotektan yang mempunyai molekul yang besar dan tidak mampu menembus *membrane* antara lain PVP (Polivinil pirolidon), sukrosa, rafinosa, laktosa, dll., dan 2) kelompok krioprotektan *intraselular* yaitu dengan molekul kecil dan dapat melewati *membrane* termasuk antara lain *glycerol*, *dimethylsulfiuxida* (DMSO), *ethylene glycol*, *1,2 propanideol*. Krioprotektan *ethylin glycol* dilaporkan lebih baik dibanding DMSO maupun *glycerol* (Situmorang *et al*, 1993; Wahyuningsih *et al*, 2003). Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan pembekuan adalah antara lain 1), lama pemaparan (Taha dan Schellander, 1992) dimana lama pemaparan 20-30 menit lebih baik dibanding 5 dan 10 meni (Rayos *et al*, 1994), 2) konsentrasi rioprotektan (Vicente dan Garcia Ximenez, 1994) (Situmorang dan Endang, 2004).

Reproduksi ternak sangat dipengaruhi oleh faktor nutrisi/pakan. Dalam melaksanakan TE sinkronisasi antara embrio dengan *endometrium* resipien sangat berpengaruh pada keberhasilan implantasi embrio (Situmorang dan Endang, 2004).

3.1 TINGKAT KEBERHASILAN

Keberhasilan pembuahan sangat dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas spermatozoa (Situmorang dan Endang, 2004). Dari sisi produksi embrio, *Splitting* embrio mampu meningkatkan jumlah embrio yang diproduksi per embrio utuh awal yang dihasilkan. Persentase keberhasilan *Splitting* pada embrio beku mencapai 130,4%, sedangkan persentase keberhasilan *Splitting* pada embrio segar menghasilkan 138,1%. Artinya terdapat penambahan embrio yang *viable* sekitar 30% terhadap total produksi embrio, jika dilakukan proses *Splitting* pada embrio utuh segar maupun beku. Lopez *et al*. (2001) menyatakan bahwa meskipun *Splitting* embrio akan sedikit menurunkan *viabilitas* embrio, tetapi tingkat keberhasilan transfer embrio akan meningkat karena jumlah embrio yang dihasilkan menjadi dua kali lebih banyak. Persentase keberhasilan *Splitting*

embrio diduga akan lebih tinggi jika embrio yang digunakan untuk *Splitting* berasal dari embrio yang diproduksi secara *in vivo* Hasler (1992) (Imron *et al.*, 2007).

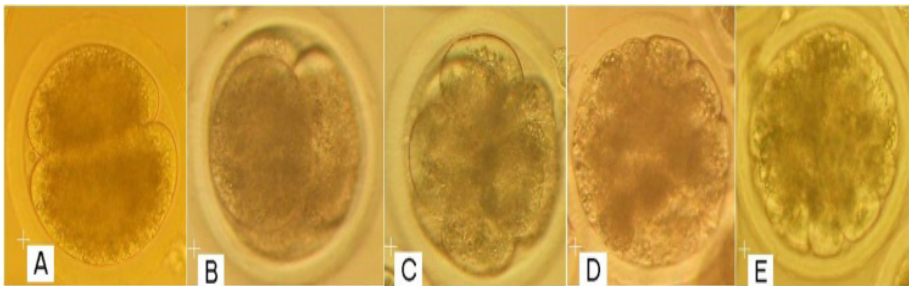
Penerimaan dan kesuksesan TE sangat berkembang setelah koleksi dan TE saat ini sudah dapat dilakukan dengan cara non-operasi, sehingga akan memudahkan pelaksanaannya disamping biayanya relative lebih ekonomis (Kuzan dan Seidel, 1986). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan TE dengan non operasi yaitu antara lain keterampilan dan pengalaman inseminator (Park *et al.*, 1991; Thieber dan Nibart, 1992), sinkronisasi antara donor dan resipien (Ashworth, 1992) dan metode sinkronisasi dan deteksi estrus (Roche, 1989; Senger, 1993) (Situmorang dan Endang, 2004).

Faktor yang tidak kalah penting dalam keberhasilan superovulasi yang akan mempengaruhi keberhasilan TE adalah pengetahuan tentang alat reproduksi sapi betina, kondisi kesehatan, jarak atau interval dari setelah melahirkan, kondisi nutrisi, stres dan musim (Feradis 2010). Sapi donor yang digunakan mempunyai kriteria bergenetik unggul, mempunyai kemampuan reproduksi dan memiliki keturunan yang bernilai ekonomi tinggi (Grimes 2008). Selain itu, syarat sapi donor yang baik antara lain adalah memiliki saluran reproduksi yang normal dan sejarah postpartum yang baik. Sapi donor memiliki siklus estrus yang teratur semenjak muda. Tidak memiliki lebih dari dua ekor pedet setiap konsepsi. Kelahiran pedet sebelumnya berjarak kurang lebih 365 hari. Tidak ada sejarah distokia dan penyimpangan reproduksi. Sapi donor tidak ada cacat genetik maupun cacat konformitas. Sapi donor harus pada tingkat gizi yang sesuai karena sapi yang terlalu gemuk maupun terlalu kurus akan mengurangi tingkat kesuburan (OSU 2010). Jenis dan umur sapi yang digunakan dalam program transfer embrio memberikan pengaruh terhadap jumlah embrio yang diperoleh. Bangsa sapi yang memberikan rata-rata embrio layak transfer paling baik adalah bangsa sapi Limousin. Bangsa sapi Angus memberikan hasil terbaik dalam pencapaian persentase embrio layak transfer. Umur sapi donor yang memberikan hasil optimal dalam program produksi embrio adalah sapi donor yang berumur tiga dan empat tahun (Puspita, 2014).

Keberhasilan kebuntingan dan ketepatan jenis kelamin pedet yang dilahirkan merupakan pembuktian akhir dari aplikasi IB dengan sperma *sexing* ini. Pada penelitian ini, kesesuaian jenis kelamin sperma X mencapai 87% dan sperma Y mencapai 89.5%. Situmorang *et al.* (2014) melaporkan bahwa IB dengan sperma *sexing* hasil pemisahan

dengan albumin telur pada sperma X mencapai 65%. Kendala dalam peningkatan produktivitas sapi di peternakan rakyat adalah manajemen pemeliharaan yang belum baik. Kebutuhan pakan masih tergantung dengan musim, pada musim penghujan ternak mendapat pakan hijauan yang melimpah, akan tetapi pada saat musim kemarau mengalami kekurangan pakan dan hanya diberikan pakan jerami kering. Pencatatan sistem pembibitan yang lemah dengan tidak adanya pencatatan silsilah ternak yang dipelihara juga menyebabkan program pembibitan yang dijalankan belum terarah dengan baik (Gunawan *et al.*, 2015).

Keberhasilan perkembangan embrio secara *in vitro* menggunakan spermatozoa *sexing* X dan Y hasil pemisahan gradien BSA ditentukan berdasarkan persentase embrio yang membelah (Aini *et al.*, 2016). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan perkembangan dan stadium pembelahan embrio yang diproduksi secara *in vitro* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) dengan persentase 47.77% (X); 48.25% (Y) serta 54.43% (Kontrol). Hasil penelitian ini didukung oleh laporan Underwood *et al.* (2010a) bahwa proses *sexing* spermatozoa secara umum tidak menyebabkan terjadinya penurunan perkembangan embrio. Kemampuan perkembangan embrio tersebut mengindikasikan bahwa spermatozoa *sexing* yang digunakan mempunyai daya fertilisasi yang baik. Keberhasilan perkembangan oosit yang telah difertilisasi ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk membelah dan melanjutkan perkembangan. Inisiasi perkembangan awal embrio didukung oleh ketersediaan mRNA dan aktivitas transkripsi oleh maternal sebelum aktivasi genom dimulai. Graf *et al* (2014b) menyatakan bahwa aktivasi genom pada embrio sapi dimulai pada stadium pembelahan 8 hingga 16 sel. Sintesis protein baru sebagai penanda dimulainya aktivasi genom pada embrio sapi mulai terjadi pada stadium pembelahan 4 hingga 8 sel.



Gambar 23. Embrio sapi tahap 2-32 sel yang diproduksi secara *in vitro*; tahap pembelahan 2 sel (A); 4 sel (B); 8 sel (C); 16 sel (D) dan 32 sel (E); perbesaran 200x (Aini *et al.*, 2016)

Transisi dari maternal ke embrio ditandai dengan aktifnya transkripsi oleh genom embrio karena mRNA maternal dan protein yang tersimpan pada oosit mengalami degradasi (Graf *et al.* 2014; Aini *et al.*, 2016).). Apabila terjadi kegagalan proses tersebut maka menyebabkan hambatan ekspresi gen sehingga embrio tidak mampu mengalami pembelahan lebih lanjut. Selama masa transisi tersebut, nukleus memprogram aktivasi proses transkripsi oleh genom embrio yang sebelumnya mengalami inaktivasi. Keberhasilan aktivasi genom ditandai dengan kemampuan embrio melakukan transkripsi mRNA serta tidak lagi bergantung pada maternal genom (Graf *et al.* 2014; Aini *et al.*, 2016).

Tidak semua proses manipulasi embrio membuahkan hasil embrio yang berkualitas tinggi, seperti penelitian Mikkola (2015) yang meneliti tentang kebuntingan sapi yang di transfer embrio hasil seksing embrio dan embrio konvensional. Mortalitas anak sapi jantan dengan embrio seksing lebih tinggi dibandingkan embrio konvensional (Mikkola, 2015).

3.1.1 Faktor keberhasilan kloning

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kloning sampai saat ini, hewan klon yang berhasil diproduksi jumlahnya cukup banyak, diantaranya adalah domba, sapi, kambing, kelinci, kucing, dan mencit. Sementara itu, tingkat keberhasilan kloning masih rendah pada hewan anjing, ayam, kuda, dan primata (Setiawan, 2008). Walaupun keberhasilan produksi hewan kloning dengan menggunakan teknik SCNT telah berhasil pada beberapa spesies, namun produksi hewan kloning masih sangat rendah dengan tingkat efisiensi kurang dari 1% (Hine, 2004; Tenriawaru, 2013). Menurut Setiawan (2008), parameter yang dijadikan sebagai tolak ukur keberhasilan SCNT adalah kemampuan sitoplasma pada sel telur untuk mereprogram inti dari sel donor dan juga kemampuan sitoplasma untuk mencegah terjadinya perubahan secara epigenetik selama dalam perkembangannya. Dari semua penelitian yang telah dipublikasikan, tercatat hanya sebagian kecil saja dari embrio hasil rekonstruksi yang berkembang menjadi individu muda yang sehat dan umumnya laju keberhasilan kurang dari 4%.

Domba Dolly merupakan satu- satunya klon yang berhasil lahir setelah dilakukan 276 kali percobaan. Demikian halnya dengan tikus kloning yang diproduksi oleh Teruhiko Wakayama dan Yanagimachi

yaitu hanya 3 kloning dari sekitar 100 kali percobaan. Edwards, et. all. (2003) mengemukakan bahwa sedikitnya ada lima periode kegagalan kloning hewan, yaitu: (1) masa praimplantasi yang ditandai dengan 16 > 65% dari sel embrio gagal berkembang menjadi morula atau blastokista; (2) usia fetus 30 – 60 hari dapat terjadi kematian 50-100% embrio yang ditandai dengan tidak adanya detak jantung embrio, plasenta hypoplastik, dan sebagian berkembang dengan kotiledon rudimenter; (3) keguguran spontan pada trisemester kedua kehamilan yang disebabkan oleh janin abnormal dan membran janin menebal dan mengalamiedema; (4) trisemester ketiga (usia janin 200-265 hari) yang ditandai dengankematian janin hydrallantois, dan pada beberapa kasus terjadi edema parah; (5) tingkat keberlangsungan hidup yang rendah setelah kelahiran akibat komplikasi. Embrio yang dihasilkan setelah kelahiran seringkali mengalami kelainan, seperti obesitas dan kematian pada usia dini. 3. Ada beberapa variabel yang mempengaruhi tingkat keberhasilan kloning diantaranya adalah spesies, tipe sel donor inti, modifikasi genetik, ovum resipien, perlakuan terhadap sel donor sebelum transfer inti, dan teknik transfer inti.

Setiawan (2008); Tenriawaru, (2013), penyebab timbulnya berbagai masalah dalam kloning hewan adalah adanya kesalahan saat pemrograman material genetik (reprogramming) dari sel donor. Sedangkan menurut HangBao (2004); Tenriawaru, (2013 faktor penyebab ketidakefisiensian kloning, yaitu tahapan siklus sel donor, ketidaklengkapan pemrograman ulang nukleus, dan tipe sel donor yang digunakan. Banyak tipe sel yang telah digunakan untuk transfer inti, diantaranya adalah sel-sel cumulus dan mural granulose. Walaupun demikian, ada suatu indikasi bahwa tipe sel dan stadium siklus sel saat transfer inti dapat mempengaruhi efisiensi kloning. Stadium G0/G1 menjadi stadium terbaik (Hine, 2004; Tenriawaru, 2013). Selain itu, apabila salah satu tahap kloning kurang optimal, maka akan berpengaruh pada produksi embrio atau transfer embrio.

Edwards *et al.* (2003)); Tenriawaru, (2013), mengemukakan bahwa prosedur kloning juga memberikan kontribusi terhadap kematian embrio dan janin. Hal ini disebabkan karena enukleasi oosit mengurangi 5-15% atau lebih ooplasma; penggunaan sinar ultraviolet dalam prosedur mengakibatkan perubahan integritas membran, meningkatkan serapan metionin, mengubah aktivitas sintesis protein dan aktivitas mitokondria; penggunaan listrik untuk menginjeksi sel telur mengakibatkan perubahan integritas membran

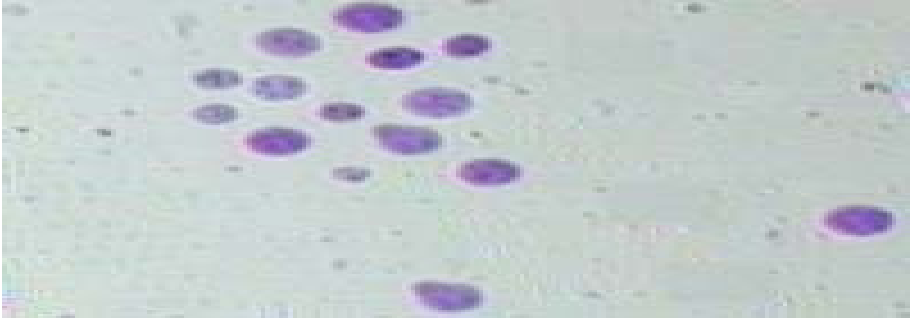
sel telur; dan penggunaan bahan kimia untuk pengaktifan embrio. Hal lain yang mungkin menjadi penyebab kegagalan kloning adalah adanya penolakan immunologis uterus induk terhadap janin transfer dan perubahan halus dalam struktur kromatin dan/atau ekspresi gen.

3.2 KENDALA DALAM PENERAPAN TEKNOLOGI MANIPULASI EMBRIO

Transfer embrio yang diproduksi dengan sperma hasil seleksi menurunkan angka kebuntingan sekitar 12% jika dibandingkan dengan embrio yang diproduksi dengan semen konvensional (*ansexing*). Angka kematian anak sapi jantan lebih tinggi dibandingkan embrio konvensional (Mikkola *et al.*, 2015). Faktor penghambat teknologi MOET adalah respons donor yang masih sangat bervariasi terhadap perlakuan hormon sehingga satu individu dapat menghasilkan sampai 30 embrio sedang individu yang lain tidak ada dan hal ini baru dapat diketahui setelah pemberian hormon (Hafez 1995). Disamping itu harga hormon yang cukup tinggi juga menjadi faktor pembatas didalam aplikasi teknologi MOET secara luas (Situmorang dan Endang, 2004).

Produksi embrio sapi secara *in vivo* banyak menemui kendala antara lain karena respon sapi donor terhadap program superovulasi sangat bervariasi, keterbatasan jumlah sapi donor dan immunoaktifitas hormon superovulasi (*FSH*) yang tidak stabil sehingga jumlah produksi embrio *in vivo* sulit dibuat target yang pasti (Anonimous, 2006; Gong *et al.*, 1993; Keller dan Teepker, 1990; Kanitz *et al.*, 2003 : Imron, *et al.* 2007). Alternatif lain untuk produksi embrio yang dapat dilakukan yaitu dengan memproduksi embrio *in vitro* (IVF). Tetapi karena oosit yang digunakan untuk IVF berasal dari Rumah Potong Hewan yang tidak jelas tetuanya, mutu genetik embrio *in vitro* tidak dapat dipertanggungjawabkan sehingga pedet yang dihasilkan dari embrio *in vitro* tidak dapat digunakan sebagai bibit dasar (Imron, *et al.* 2007).

Beberapa penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa kualitas dan viabilitas embrio sapi yang diproduksi secara *in vivo* lebih baik dibandingkan dengan embrio yang diproduksi secara *in vitro* (Crosier *et al.* 2000; Mmcevoy *et al.* 2001; Greve 2002), sehingga embrio *in vivo* akan lebih tahan dan memiliki daya hidup lebih tinggi terhadap perlakuan *Splitting* dibandingkan dengan embrio *in vitro*. Sel-sel embrio yang degenerasi/mati akan hancur dan terlihat seperti debris (kotoran) dalam pewarnaan Giemsa (Imron *et al.*, 2007).



Gambar 24. Bentuk sel-sel embrio viable dalam satu bidang pandang mikroskop (Imron *et al.*, 2007)

Rendahnya angka perkembangan embrio yang diperoleh disebabkan oleh beberapa faktor antara lain kualitas oosit (Lonergan dan Fair 2008) serta sistem kultur yang digunakan (Nedambale *et al.* 2006; Underwood *et al.* 2010b; Setiadi dan Karja 2013). Lebih lanjut, Meirelles *et al.* (2004) melaporkan bahwa rata-rata laboratorium kehilangan 60-70% kemampuan oosit yang berhasil difertilisasi untuk berkembang menjadi embrio. Hal ini karena oosit yang digunakan untuk produksi embrio secara *in vitro* dikoleksi dari ovarium yang pada umumnya berasal dari individu yang berbeda, sehingga terjadi variasi kemampuan untuk berkembang menjadi embrio lebih lanjut. Oleh karena itu diperlukan kemampuan teknik pemilihan oosit yang lebih cermat sehingga mampu menghasilkan embrio dengan kualitas baik supaya mampu melakukan aktivasi genom untuk mendukung perkembangan dan kelangsungan hidupnya (Meirelles *et al.*, 2004; Aini *et al.*, 2016). Spermatozoa *sexing* metode gradien BSA mempunyai kemampuan fertilisasi dan mendukung perkembangan embrio yang sama dengan spermatozoa *unsexing*. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi ketepatan jenis kelamin embrio yang diproduksi secara *in vitro* menggunakan spermatozoa *sexing* X dan Y (Aini *et al.*, 2016).

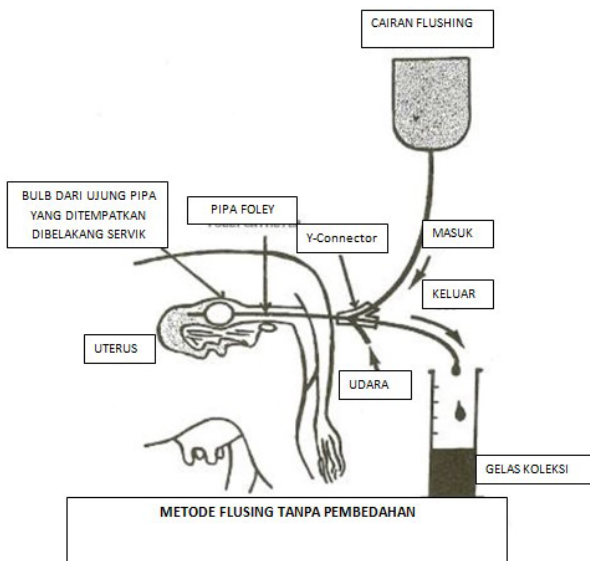
3.3 PASCA MANIPULASI EMBRIO PADA SAPI

Proses manipulasi embrio menghasilkan embrio yang memiliki mutu genetik tinggi, karena berasal dari induk jantan dan betina yang unggul. Serangkaian proses yang telah dilakukan akhirnya akan bermuara pada proses transfer embrio pada ternak yang dikenal dengan ternak resipien. Ternak resipien dapat berasal dari bangsa sapi yang berbeda.

Tahapan yang harus dilalui setelah proses manipulasi embrio (MOET dan *sexing* spermatozoa) sebelum dapat dimanfaatkan sebagai bibit unggul dimulai dari kegiatan koleksi embrio atau lebih dikenal dengan istilah flushing.

3.3.1 Panen/Koleksi Embrio.

Panen embrio dapat dilakukan dengan pembedahan atau tanpa pembedahan. Panen embrio melalui pembedahan dilakukan pada ternak kecil seperti kambing dan domba, sedangkan untuk ternak besar seperti sapi, kerbau dan kuda kedua cara tersebut dapat dipakai. Cara tanpa pembedahan pada ternak besar sekarang ini lebih populer, karena sarana dan pelaksanaannya lebih sederhana dan resikonya lebih kecil dibandingkan dengan cara pembedahan. Cara memanen embrio tanpa pembedahan dilakukan dengan membilas uterus menggunakan cairan penyangga steril yang dimasukkan melalui Foley catheter yang dilengkapi balon penyumbat melewati cervix. Pada ternak sapi, embrio berpindah dari oviduct ke uterus antara hari ke 3 sampai 5 sesudah ovulasi. Waktu untuk memanen embrio yang terbaik pada saat berumur 6 – 7 hari. Pada umur ini embrio berada pada fase blastosis belum diimplantasikan pada dinding uterus (endometrium). Koleksi embrio dapat dilihat pada Gambar 25.



Gambar 25. Metode Flushing

Flushing dilakukan pada hari keenam sampai kedelapan setelah IB yang pertama. Pemanenan embrio dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Penyiapan media flushing (Larutan fisiologis + Calf serum 1% + Antibiotik 0,1%) dan preparat anastesi lokal.
- b. Penyiapan peralatan : Folley Catheter, stilet, Cervic expander, selang silikon, botol penampung media, jarum suntik 18 G, spuit 50cc, 20cc, 10cc, 5cc, gunting, plastik sarung tangan plastik, intra uterin injector/gun spul.
- c. Fiksasi ternak pada kandang jepit kemudian keluarkan feses dari rektum dan dilakukan pengecek ovarium untuk mengetahui jumlah corpus luteum (CL) terhadap sapi donor yang telah diprogram superstimulasi/ superovulasi tersebut.
- d. Anastesi epidural dilakukan dengan menggunakan preparat anastesi lokal, pemasukan preparat anastesi dilakukan diantara tulang sakral- tulang ekor I atau diantara tulang ekor I-II. Setelah anastesi bereaksi dilakukan fiksasi terhadap ekor ternak.
- e. Pembersihan sekitar vulva dengan air bersih, kemudian disinfeksi dengan kapas alkohol dan dikeringkan dengan kertas tissue.
- f. Memanipulasi servik dengan menggunakan servik expander untuk mempermudah pembukaan servik, kemudian dimasukkan Folley catheter dan diposisikan dalam sepertiga apex depan kornua uteri kiri/kanan dan balon catheter diisi udara sesuai dengan besar diameter lumen uterus (10-15 ml) dengan menggunakan spuit 20cc untuk fiksasi folley catheter.
- g. Selanjutnya stilet dikeluarkan, kemudian folley catheter disambung dengan perangkat alat flushing yang dihubungkan dengan media flushing dan wadah hasil flushing.
- h. Flushing dilakukan dengan cara membilas kornua uteri secara berulang- ulang menggunakan media flushing dengan volume setiap pembilasan antara 10-60 ml (sesuai kapasitas kornua uteri), hal tersebut dilakukan sampai media flushing habis, kegiatan tersebut dilakukan pada kornua uteri kanan dan kiri secara bergantian. Hasil flushing ditampung dalam wadah hasil flushing, usahakan volume media flushing yang masuk ke dalam kornua sama dengan volume hasil flushing.

- i. Setelah selesai flushing, kemudian uterus di-spool dengan antibiotik/antiseptik sebanyak 10-50 ml dengan menggunakan intrauterine injektor (gun spool) dan sapi donor diinjeksi dengan preparat. Prostaglandin F 2 α (PGF 2 α) sebanyak 1 (satu) dosis dengan tujuan meluruhkan CL supaya sapi donor bersiklus kembali.

3.3.2 Interval Flushing/Panen Embrio

Sapi donor akan dilakukan flushing setiap 2-4 bulan sekali sehingga dalam 1 (satu) tahun dapat dilakukan 3-5 kali flushing atau tergantung dari protocol produksi embrio yang diadopsi. Sapi donor akan diistirahatkan setelah 3-5 kali flushing atau 1 (satu) tahun diproduksi. Mekanisme pengistirahatan sapi donor dilakukan dengan membuntingkan sapi donor tersebut atau dengan tidak dilakukan produksi embrio selama minimal 6 (enam) bulan.

Keberhasilan teknologi TE dengan menggunakan embrio baik secara *in vivo* maupun *in vitro* ditunjukkan dengan keberhasilan menghasilkan anak yang dilahirkan dengan kualitas yang diinginkan. Kesiapan ternak resipien sangat memegang peranan penting. Koleksi dan TE saat ini sudah dapat dilakukan dengan cara non-operasi, sehingga akan memudahkan pelaksanaannya disamping biayanya relatif lebih ekonomis. Keberhasilan transfer embrio segar dapat mencapai 55–65%, sedangkan embrio beku sekitar 50–60% (Hasler , 1995). Teknik ini akan mampu meningkatkan kualitas genetik ternak sampai 10% (Lohuis, 1995) yang jauh diatas metoda konvensional yang hanya sekitar 2–5% (Situmorang dan Endang, 2004).

Koleksi embrio dilakukan pada hari ketujuh sampai hari kedelapan setelah berahi saat sebagian besar embrio sudah memasuki ujung cornua uterus. Masa tersebut adalah ketika embrio berada dalam tahap morula sampai blastocyst (Grimes 2008). Teknik koleksi embrio dilakukan dengan dua cara yaitu teknik bedah dan non bedah (Herren 2000). Pemanenan embrio tidak dilakukan lebih awal karena sebelum hari ke-4 embrio masih berada di oviduk yang dipisahkan dari uterus oleh utero tubal junction. Embrio akan ditranspor menuju ke uterus pada hari ke-4 sampai hari ke-5 setelah estrus. Embrio yang dikoleksi pada hari ke-9 berada dalam tahapan mulai keluar dari zona pelusida. Setelah keluar dari zona pelusidanya, embrio menjadi sulit untuk diidentifikasi. Pada hari ke-11 hampir semua embrio telah keluar dari zona pelusida karena peningkatan diameter embrio secara drastis. Hari

ke-12 sampai ke-13 embrio mulai memanjang (elongated). Hari ke-14 sampai hari ke-15 bentuk embrio sangat panjang. Hari ke-18 sampai ke-19 embrio hampir memenuhi cornua uteri. Koleksi memungkinkan dilakukan sampai hari ke-17 dengan teknik non bedah tetapi potensi terjadinya kerusakan atau cacat pada embrio sangat besar sejak hari ke-14 (Seidel dan Elsden 1989).

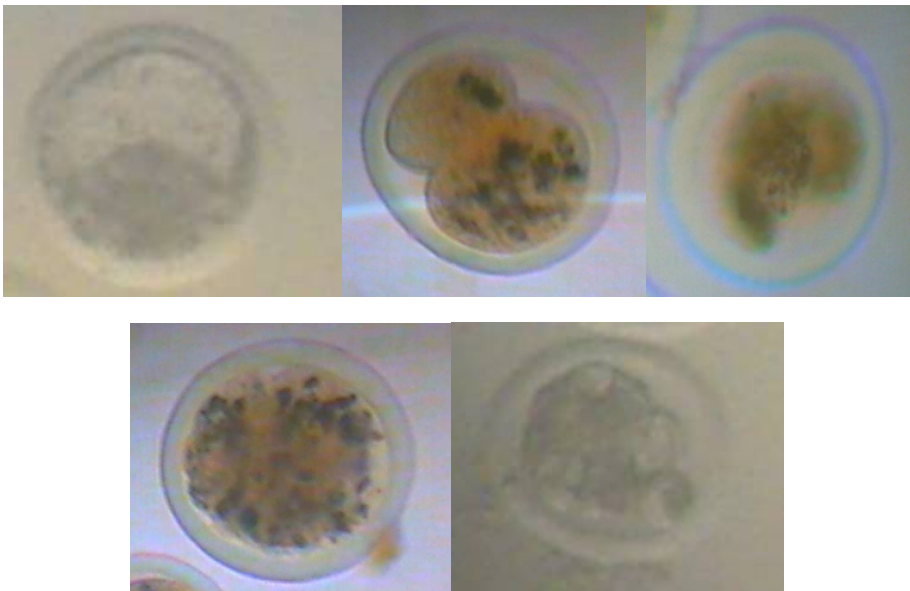
Perkembangan embrio sapi hasil ICSI dan aktivasi dengan strontium setelah dikultur dalam medium SOF selama 48 jam mencapai tahap 2 sel, kultur 72 jam mencapai tahap 4 sel, kultur 96-120 jam mencapai tahap 8 sel, kultur 144-168 jam mencapai tahap morula dan kultur 192 jam mencapai tahap blastosis. Hasil yang diperoleh menunjukkan perkembangan embrio sapi tertinggi pada perlakuan S1 dan S2 dibandingkan perlakuan kontrol/S0 dan S3. Pada penelitian ini tingkat pembelahan embrio mencapai 50% dan blastosis 15,63%. Hasil ini masih lebih rendah dibandingkan dari hasil penelitian Suttner *et al.* (2000) yang melaporkan perkembangan embrio hasil ICSI dan aktivasi dengan kalsium ionofor yang dikultur dalam medium SOF mencapai pembelahan embrio 79,6% dan blastosis 28,2%. Perkembangan embrio in vitro tahap 2 sel mencapai blastosis dipengaruhi oleh lingkungan luar untuk mendukung perkembangannya. Tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dihasilkan dengan menggunakan media kultur sangat beragam, khususnya embrio yang diperoleh melalui proses fertilisasi in vitro atau dari satu sel, jumlah dan daya hidup embrio yang dihasilkan masih rendah dapat disebabkan salah satunya adalah kondisi kultur yang suboptimum (Djuwita *et al.*, 2000). Pengaruh lain disebabkan konsentrasi spermatozoa, osmolaritas dan pH medium, serta kondisi kultur yang meliputi suhu, keseimbangan gas O₂ dan CO₂ (Boediono *et al.*, 2000; Gunawan *et al.*, 2014).

Embrio beku Embrio beku yang digunakan dalam penelitian Imron *et al.*, 2007 adalah embrio yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut: 1) terdapat pertambahan ukuran diameter embrio; 2) terjadi reekspansi blastosol; 3) terbentuknya kembali ICM dan trophoblas. Imron *et al.* (2007) menyatakan pembekuan embrio dilakukan dengan menggunakan prosedur vitrifikasi standar Balai Embrio Ternak. Embrio diekuilibrasikan dalam 3 macam media vitrifikasi. Equilibrisasi dilakukan pada suhu ruang (22 °C) masing-masing selama lima menit dalam media pembekuan VS 1 dan VS 2. Setelah itu embrio diekuilibrasikan dalam VS 3 dan dimasukkan dalam straw yang sebelumnya telah diisi dengan media mPBS yang mengandung sukrose 0,5 M. Proses

equilibrasi dalam VS 3 sampai ke tahap pencelupan straw kedalam nitrogen cair dilakukan dalam waktu kurang dari satu menit.

3.3.3 Penilaian dan Penyimpanan Embrio.

Seluruh embrio yang terkoleksi harus dievaluasi di bawah mikroskop pembesaran 100–200 kali terkait perkembangan sel, bentuk dan kualitas embrio. Embrio yang telah diklasifikasikan disimpan dalam medium penyimpanan sebelum ditransfer ke resipien atau dibekukan. Pembekuan dalam nitrogen cair pada temperatur -196°C dapat dijadikan pilihan untuk menyimpan selama waktu yang dikehendaki. Keberhasilan pembekuan embrio tanpa menurunkan daya hidupnya merupakan salah satu faktor tersebar luasnya penggunaan teknologi TE. Transfer Embrio Ke Resipien. Transfer embrio dapat dilakukan dengan pembedahan atau tanpa pembedahan. Metode pembedahan cenderung lebih tinggi dan lebih konsisten tingkat kebuntingannya, tetapi lebih membutuhkan tenaga yang terampil, sehingga cara tanpa pembedahan lebih banyak menjadi pilihan, karena lebih cepat dan sederhana, dengan angka kebuntingan sama dengan tanpa pembedahan.



Gambar 26. Kualitas embrio (Adriani *et al.* 2011)

3.3.4 Kriopreservasi

Kriopreservasi adalah suatu penyimpanan beku dalam waktu lama pada suhu minus 196°C dalam media yang mengandung krioprotektan. Prinsip terpenting dari kriopreservasi adalah pengeluaran sebagian besar air intraseluler dari sel-sel sebelum membeku. Krioprotektan digunakan untuk menghindari terbentuknya kristal-kristal es besar yang dapat merusak sel dan mencegah keluarnya air terlalu. Krioprotektan intraseluler (gliserol, dimethylsulfoxide (DMSO), etilen glikol, dan 1,2 propanadiol) dan krioprotektan ekstraseluler yaitu (polivinil pirolidon (PVP)). Sampai saat ini krioprotektan yang paling banyak digunakan adalah yang memiliki daya penetrasi terhadap membran sel yaitu gliserol dan DMSO. Kriopreservasi Spermatozoa. Pembekuan spermatozoa diawali dengan pengenceran semen untuk mencegah terjadinya cold shock. Penambahan gliserol ke dalam semen setelah pendinginan berfungsi sebagai krioprotektan intraseluler, digunakan untuk melindungi semen selama pembekuan dan thawing, sehingga perubahan permeabilitas membran sel dan perubahan pH dapat dicegah. Pengencer harus isotonis dengan spermatozoa, karena pengencer hipotonis dan hipertonis akan mengubah transfer air melalui membran sel dan dapat merusak integritas membran sel spermatozoa. Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur (TKT) dapat digunakan untuk memperbanyak volume dan mencegah perubahan pH (buffer) (Sofyan dan Fifi, 2016).

3.3.5 Pencairan Embrio

Pencairan (warming) embrio dilakukan dengan cara mengeluarkan straw dari dalam nitrogen cair, dibiarkan dalam udara terbuka selama 5-6 detik dan kemudian dicelupkan kedalam air pada suhu ruang (22 °C) (Imron *et al.*, 2007).

3.3.6 Transfer Embrio (SOP BET Cipelang, 2016)

Persiapan Transfer Embrio

- a. Untuk mempersiapkan resipien yang sesuai, dapat ditempuh dengan 3 cara yaitu secara alami (berahi alam), sinkronisasi dengan preparat hormon prostaglandin (PGF 2 α) dan sinkronisasi menggunakan preparat progesteron. Untuk transfer embrio segar, resipien dipersiapkan dan disamakan berahinya (sinkronisasi) dengan donor yang akan dipanen embrio (flushing).

- b. Jika resipien tersebut berahi, periksa dan amati kondisi berahinya seperti derajat berahi, konsistensi dan tingkat kejernihan lendir harus normal. Lakukan pencatatan tanggal berahi resipien tersebut.
- c. Pada hari keenam/ketujuh setelah berahi atau sehari sebelum ditransfer, dilakukan pemeriksaan kembali kondisi ovarium, apabila terdapat Corpus Luteum (CL) fungsional baik ovarium kiri maupun kanan, dapat dilakukan aplikasi TE.

Pelaksanaan Transfer Embrio

Pelaksanaan transfer embrio dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a) Pemeriksaan pada kondisi ovarium untuk memastikan keberadaan corpus luteum (CL).
- b) Melakukan anastesi epidural dengan preparat anastesi.
- c) Melakukan thawing embrio dengan cara straw diambil dari kontainer, diamkan di udara/suhu ruang selama 10 detik, kemudian dimasukkan ke dalam air bersuhu 38,5° C sampai media terlihat mencair (\pm 10-15 detik).
- d) Label embrio dibuka dan ditempelkan pada formulir Aplikasi TE.
- e) Straw dikeringkan dengan tissue, potong ujung straw pada bagian sumbat laboratorium kemudian dimasukkan ke dalam gun TE dan tutup dengan sheat TE steril yang dibungkus outer sheat, kemudian dilakukan aplikasi TE ke resipien.
- f) Aplikasi TE dilakukan dengan cara mendeposisikan embrio pada sepertiga depan apex kornua yang terdapat CL (ipsilateral).

Seleksi Resipien

Ternak yang dapat dijadikan resipien harus memenuhi persyaratan:

- a. Ternak resipien adalah dara atau induk dalam kondisi tidak bunting, memiliki organ reproduksi baik dan memiliki catatan reproduksi / siklus berahi normal;
- b. Performa tubuh baik dan sehat dengan Body Condition Score (BCS) 2,75-3,25 pada skala 5 untuk sapi perah, dan BCS 5-6 dengan skala 9 untuk sapi potong dan kerbau;

- c. Sehat, tidak menunjukkan gejala klinis penyakit hewan menular strategis;
- d. Terseleksi setelah palpasi rektal, pada salah satu ovarium memiliki corpus luteum (CL) fungsional.
- e. Tidak pernah mengalami gagal bunting lebih dari 2 kali.

3.3.7 Metode Transfer Embrio (BET Cipelang, 2016).

Metode yang digunakan :

Transfer embrio segar (fresh) dengan cara sebagai berikut :

- a. Resipien dipersiapkan dan disamakan berahinya (sinkronisasi) dengan donor yang akan dipanen embrio (flushing).
- b. Resipien yang akan di TE disiapkan terlebih dahulu dengan mengecek keberadaan Corpus Luteum (CL) fungsional.
- c. Embrio yang telah dipanen dengan kualitas 123, kemudian diloading ke dalam straw dengan media PBS.
- d. Straw yang telah berisi embrio dimasukkan ke dalam gun TE, kemudian dilakukan aplikasi TE ke resipien.
- e. Lakukan pencatatan tanggal pelaksanaan TE, kode resipien, kode embrio, posisi deposisi embrio dan petugas TE pada formulir aplikasi TE.

Transfer embrio beku langsung (direct) dengan cara sebagai berikut :

- a. Embrio yang digunakan pada metode ini adalah embrio yang telah dibekukan.
- b. Thawing dilakukan dengan cara, straw diambil dari kontainer, diamkan di udara/suhu ruang selama 10 detik, kemudian dimasukkan ke dalam air bersuhu 38,5°C sampai media terlihat mencair (\pm 10-15 detik).
- c. Buka label embrio dan tempelkan pada formulir Aplikasi Transfer Embrio.
- d. Straw dikeringkan dengan tissue, potong ujung straw pada bagian sumbat laboratorium lalu dimasukkan ke dalam gun TE dan kemudian dilakukan aplikasi transfer embrio ke resipien.
- e. Lakukan pencatatan tanggal pelaksanaan TE, kode resipien, kode embrio, posisi deposisi embrio dan petugas TE pada formulir aplikasi TE.

Transfer embrio beku bertahap (step wise) dengan cara sebagai berikut:

Metode stepwise digunakan untuk mengevaluasi viabilitas (daya hidup) embrio yang telah dibekukan, sebelum dilakukan aplikasi transfer embrio.

- a. Alat dan bahan yang digunakan dalam metode ini adalah : PBS, Ethylene glikol (EG), serum, pipet pasteur, cawan petri 35x10 mm, mikroskop stereo.
- b. Penyiapan media yang digunakan pada metode stepwise yaitu : EG 6.6%, EG 3.3% dan PBS yang disuplementasi dengan 20% serum.
- c. Thawing dilakukan dengan cara, straw diambil dari kontainer, diamankan di udara/suhu ruang selama 10 detik, kemudian dimasukkan ke dalam air bersuhu 38,5 °C sampai media terlihat mencair (\pm 10-15 detik).
- d. Straw dipotong pada kedua sisinya untuk mengeluarkan embrio, lalu ditampung pada cawan petri 35x10 mm.
- e. Evaluasi embrio dilakukan di bawah mikroskop stereo, embrio dengan daya hidup di atas 50% yang dinyatakan layak transfer.
- f. Embrio yang telah dinyatakan layak transfer, kemudian diloading ke dalam straw dengan media PBS.
- g. Straw yang telah berisi embrio dimasukkan ke dalam gun TE, kemudian dilakukan aplikasi TE ke resipien.
- f. Lakukan pencatatan tanggal pelaksanaan TE, kode resipien, kode embrio, posisi deposisi embrio dan petugas TE pada formulir aplikasi TE.

Program Kelahiran Kembar (Twinning)

Program kelahiran kembar (twinning) adalah suatu usaha optimalisasi reproduksi ternak sapi betina sehingga diharapkan akan dilahirkan dua ekor pedet untuk satu kali masa beranak. Metode yang digunakan untuk menghasilkan kelahiran kembar yaitu:

Transfer Embrio Duplet

- a. Transfer dua embrio

Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan 2 (dua) embrio untuk satu kali aplikasi TE pada resipien.

b. *Splitting* embrio (pemotongan embrio)

Metode ini hanya dilakukan secara terbatas pada embrio in vivo yang dihasilkan dari program produksi embrio in vivo atau MOET (Multiple Ovulation and Embrio Transfer).

BAB IV
ASPEK EKONOMI

4.1 ASPEK EKONOMI

Pelaksanaan manipulasi embrio yang merupakan serangkaian kegiatan terstruktur tentunya membutuhkan modal untuk pembelian alat dan bahan manipulasi. Harapannya produksi yang didapatkan akan memberikan pendapatan yang berlebih dibandingkan dengan tanpa penerapan teknologi manipulasi embrio. Efektif dan efisien adalah kunci dalam kesuksesan pelaksanaan usaha peternakan. Dengan harapan biaya produksi yang dikeluarkan dapat terbayar dengan produktivitas yang lebih baik. Produktivitas usaha peternakan dengan pengaplikasian manipulasi embrio dapat memberikan sumbangan peningkatan pendapatan bagi peternak, baik yang mengaplikasikan secara langsung maupun penggunaan produk hasil produksi manipulasi embrio. Estimasi ekonomi pada induk sapi yang diaplikasikan teknologi reproduksi meningkatkan pendapatan sebesar 22.53 % per bulan (Sumaryadi *et al.*, 2010). motilitas spermatozoa segar dan before freezing sapi Simmental lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan sapi Limousin dan FH, sedangkan hasil PTM, *longivitas*, dan *recovery rate* tidak berbeda nyata pada ketiga bangsa tersebut (Komariah *et al.*, 2013).

Mengulang pembahasan yang telah dipaparkan pada bab-bab sebelumnya maka aspek ekonomi dari penerapan manipulasi embrio pada sapi dapat dilist sebagai berikut :

- a. MOET. Manipulasi dapat meningkatkan kualitas genetik. Penerimaan dan kesuksesan TE sangat berkembang setelah koleksi dan TE saat ini sudah dapat dilakukan dengan cara non-operasi, sehingga akan memudahkan pelaksanaannya disamping biayanya relative lebih ekonomis (Kuzan dan Seidel, 1986).
- b. Sinkronisasi estrus. Upaya yang dilakukan untuk percepatan estrus antara lain pemberian penambahan CIDR (*Controlled Internal Drug Release*), tetapi harga preparat CIDR ini cukup tinggi, untuk mengatasi masalah ini maka dapat dilakukan melalui penyuntikan hormone gonadotropin (progesteron) dengan penanaman spons dalam vagina. Ditinjau dari segi ekonomis metode ini sangat efisien dan efektif digunakan dalam penyerentakan berahi (Zaenuri, 2001; Mardiansyah, 2016).
- c. Manipulasi dapat mengurangi biaya produksi satu ekor sapi (IVF). Herdis (2000) dalam Syaiful *et al.* (2011) embrio yang dihasilkan dari teknologi fertilisasi in vitro dapat di transfer ke ternak resipien untuk membantu percepatan peningkatan populasi ternak. Dengan teknik fertilisasi in vitro, pemanfaatan

oosit dari hewan yang dipotong merupakan cara produksi embrio yang ekonomis karena dengan cara ini oosit hewan yang dipotong dapat dimanfaatkan untuk dijadikan bakal bibit, hal ini tentu akan terasa sekali nilai tambahnya. Dalam pemanfaatan oosit hewan yang mati belum semua potensi yang ada dapat dimanfaatkan karena terbatasnya daya hidup oosit, sementara teknologi penyimpanan ovarium yang dapat mempertahankan viabilitas oosit dalam waktu yang cukup lama atau selama transportasi belum tersedia.

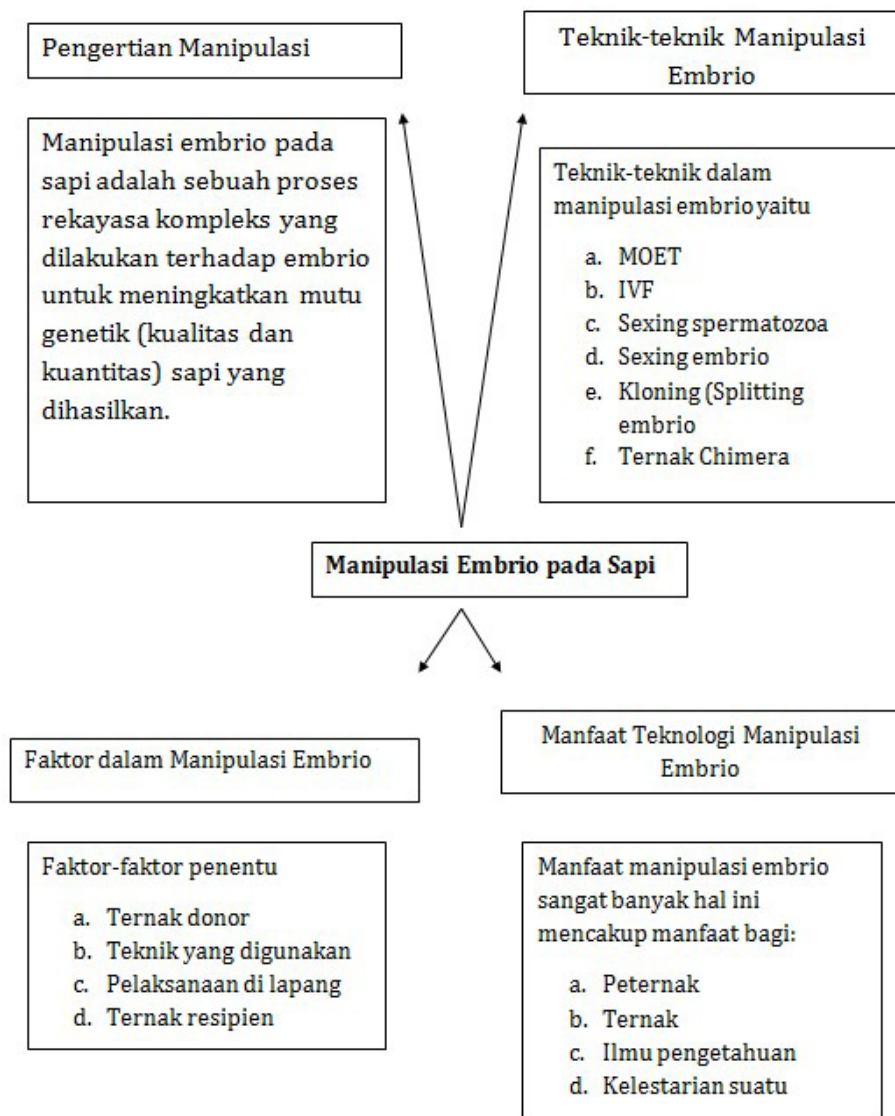
- d. Peningkatan produksi dengan tercapainya tujuan produksi (seksing spermatozoa). Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan salah satu pilihan yang tepat dalam rangka peningkatan efisiensi reproduksi yang mampu meningkatkan efisiensi usaha peternakan, baik dalam skala peternakan rakyat, maupun dalam skala komersial (Saili *et al.*, 1998; Afiati 2004). Penentuan jenis kelamin anak sebelum dilahirkan lebih menguntungkan dari segi ekonomis, karena selain dapat menekan biaya pemeliharaan juga dapat menunjang program breeding dalam pemilihan bibit unggul. Tujuan tersebut akan tercapai apabila dilakukan dengan cara menginseminasikan seekor betina berahi dengan spermatozoa yang sudah dipisahkan (spermatozoa berkromosom X atau spermatozoa berkromosom Y) (Hafez, 2004; Putri *et al.*, 2015).
- e. Dengan teknik kloning dapat menghasilkan ternak eksotik yang memiliki harga jual yang mahal. Produksi embrio rekonstruksi hasil secara *in vitro* menggunakan transfer nukleus mempunyai potensi yang sangat baik di masa datang dari aspek genetik dan ekonomi.

Secara umum teknologi manipulasi embrio menguntungkan dari aspek ekonomi akan tetapi dalam penerapannya pelaksanaan yang optimum sangat dikehendaki. Pelaksanaan ini meliputi kualitas sumber daya manusia sebagai manipulator, dengan penerapan fungsi-fungsi manajemen. Fungsi manajemen ini meliputi *planning, organizing, actuating, controlling* (P,O,A,C).

- a. *Planning* (perencanaan)
- b. *Organizing* (pengaturan)
- c. *Actuating* (pelaksanaan)
- d. *Controlling* (pengontrolan)

BAB V
RINGKASAN

RINGKASAN



DAFTAR PUSTAKA

- Adriani, B. Rosadi dan Depison. 2011. Jumlah dan kualitas embrio sapi Brahman cross setelah pemberian hormone *FSH* dan *PMSG*. *Jurnal animal production* 11 (2) : 96-102.
- Afiati.F. 2004. Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. *Media Peternakan* 27 (1) : 16-20.
- Afriani. T, Z. Udin, Jaswandi, dan S. Asmairicen. 2011. Pengaruh Waktu Pelapisan Spermatozoa Sapi Pada Media TALP yang Disuplementasi bovine serum albumin (BSA) Terhadap Jenis Kelamin Embrio In vitro. *Jurnal Peternakan Indonesia*, Juni 2011 Vol. 13 (2). ISSN 1907-1760.
- Afriani. T. 2014. Optimalisasi Penentuan Jenis Kelamin Embrio Pada Tahap Morula Dan Blastula Dengan Menggunakan Pcr Pada Sapi Pesisir. Artikel. Tesis.Padang : Universitas Andalas Press.
- Aini. A.N, M.A. Setiadi, N.W.K. Karja. 2016. Kemampuan Fertilisasi Spermatozoa *Sexing* dan Perkembangan Awal Embrio Secara In Vitro pada Sapi. Bogor: JSV 34 (2).
- Aini.A.N. 2016. Kemampuan Fertilisasi Spermatozoa *Sexing* dan Perkembangan Awal Embrio Secara In Vitro Pada Sapi. Tesis. Bogor : IPB Press.
- Aisah.S, N. Isnaini, S. Wahyuningsih. 2017. Kualitas semen segar dan recovery rate sapi bali pada musim yang berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 27 (1): 63 – 79.
- Arimbawa.I.W.P. 2012. Gambaran hormone progesterone sapi Bali selama satu siklus estrus. *Indonesia Medicus Veterinus* 1 (3) : 330-336.
- Bamualim. A dan Wirdahayati R. B. 2006. Peran Teknologi dalam pengembangan ternak lokal.Prosiding peternakan 2006.
- Boediono, A. 1995. Aplikasi Bioteknologi Reproduksi Pada Hewan Ternak Dalam Rangka Peningkatan Produksi Dan Kualitas. Bogor : 6 (Edisi Khusus).
- Budiyanto. A, S. Gustari, D. Anggoro, D. Jatmoko, S. Nugraheni, E.W. Nugraha, D. Asta. 2013. Kualitas morfologi oosit sapi peranakan Ongole yang dikoleksi secara in vitro menggunakan variasi waktu transportasi. *Acta Veterinaria Indonesiana* 1 (1) : 15-19.

- Ciptadi. G. 2007. Pemanfaatan Teknologi Kloning Hewan Untuk Konservasi Sumber Genetik Ternak Lokal Melalui Realisasi Bank Sel Somatis. Malang : J. Ternak Tropika Vol. 6, No. 2; 60-65, 2007
- Darlian. F. 2013. Pembentukan blastosis pada embrio sapi yang difertilisasi secara in vitro dengan semen sapi Bali (*Bos Javanicus*) dan semen sapi Simmental (*Bos Taurus*). [Skripsi] : IPB press.
- Direktorat Jenderal Peternakan Dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian. Standar Operasional Prosedur (SOP) Seksi Produksi Ddn Aplikasi (PA). Balai Embrio Ternak Cipelang Direktorat Jenderal Peternakan Dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.
- Kaiin.E.M, S. Said dan B. Tappa. 2008. Kelahiran Anak Sapi Hasil Fertilisasi secara in Vitro dengan Sperma Hasil Pemisahan. Bogor : Media Peternakan, April 2008, hlm. 22-28. ISSN 0126-0472.
- Gunawan. M, E.M. Kaiin, dan S. Said. 2015. Aplikasi Inseminasi buatan dengan sperma *sexing* dalam meningkatkan produktivitas sapi di peternakan rakyat. Science direct : Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1): 93-96, Maret 2015.
- Gunawan.M,M.Fahrudin,danA.Boediono.2014.Perkembanganembrio sapi setelah fertilisasi Menggunakan metode intracytoplasmic Sperm injection (icsi) dan aktivasi Dengan strontium. Jurnal kedokteran hewan 8 (2) : 154-157.
- Hafizuddin, T.N. Siregar, M. Akmal. 2012. Hormon dan peanannya dalam dinamika folikuler pada hewan domestic. JESBIO 1 (1) : ISSN: 2302-1705.
- Hall.J.B and J.B.g. Jr. 2014. REVIEW : System application of sexed semen in beef cattle. The Science direct : Professional Animal Scientist 30 (2014):279–284.
- Harissatria dan J.Hendri. 2016. Fertilitas dan Persentase Embrio Kerbau Sampai Morula yang Dikultur dengan Penambahan Glutathione Secara In Vitro. Jurnal Peternakan Vol 13 No 1 Februari 2016 (12 - 18) : ISSN 1829 – 8729.
- Hayakawa.H, T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta, Y. Aoyagi. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. Science direct : Theriogenology 71 (2009) 68–73.
- Herdis, M. Surachman, I. Kusuma, dan E.R. Suhana. 1999. Peningkatan efisiensi reproduksi sapi melalui Penerapan teknologi penyerentakan berahi. WARTAZOA 9 (1) : 1-5.

- Imron, M, A. Boediono, I. Supriatna. 2007. Viabilitas Demi Embrio Sapi In Vitro Hasil *Splitting* Embrio Segar dan Beku. JITV 12 (2) : 118-123.
- Jalaluddin.M. 2014. Morfometri dan karakteristik histologi ovarium sapi Aceh (*bos indicus*) selama siklus estrus. Medika Veterina 8 (1) : 66-68.
- Jiuhardi. 2016. Kajian tentang impor daging sapi di Indonesia. Forum Ekonomi 17 (2) : 75-91.
- Kaiin .E.M, S. Said , B. Tappa. 2008. Kelahiran anak sapi hasil fertilisasi secara in vitro dengan sperma hasil pemisahan. Media Peternakan 31(1): 22-28.
- Kaiin, E.K., M. Gunawan, S. Said dan B. Tappa. 2004. Fertilisasi Dan Perkembangan Oosit Sapi Hasil IVF dengan Sperma Hasil Pemisahan. Bogor : Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2004.
- Kaiin.E.M dan B. Tappa. 2006. Induksi Superovulasi dengan Kombinasi CIDR, Hormon *FSH* dan hCG pada Induk Sapi Potong. Media peternakan 29 (3) : 141-145.
- Komariah, I. Arifiantini., F.W. Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan Friesian Holstein terhadap proses pembekuan. Buletin Peternakan 37(3): 143-147.
- Mahaputra, L., M. Mafruchati., N. Triaksono., R.D. Aries. 2012. Pemisahan Spermatozoa Sapi Limousin yang Memiliki Kromosom X dan Y dengan Percoll dan Putih Telur Ayam. JBP 14 (3) : 172-175.
- Mardiansyah, E. Yuliani, S. Prasetyo . 2016. Respon Tingkah Laku Berahi, Service Per Conception, Non Return Rate, Conception Rate pada Sapi Bali Dara dan Induk yang Disinkronisasi Berahi dengan Hormon Progesteron. Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia 2 (1): 134 – 143.
- Margawati.E.T, E. M. Kaiin, K. Eriani , N.D. Y Nthi, Dan Indriawati. 2000. Pengaruh media ivm dan ivc pada perkembangan embrio Sapi secara in vitro. JITV 5(4) : 1-5.
- Mikkola, M, M. Andersson, J. Taponen. 2015. Transfer of cattle embryos produced with sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality. Theriogenology xxx : 1–5.
- Pamungkas, D, L. Affandhy, D.B. Wijono, A. Rasyid dan T. Susilawati. 2004. KUALITAS spermatozoa sapi po hasil *sexing* dengan teknik sentrifugasi menggunakan Gradien putih telur dalam beberapa

- Imbangan tris-buffer: semen. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2004 : 36-43.
- Parera, H. 2014. Pengaruh Ukuran Ovarium Dan Diameter Oosit Terhadap Kualitas Morfologi Oosit Sapi Bali-Timor Yang Dikoleksi Secara In Vitro. *Jurnal Kajian Veteriner* : 2 (2) : 143-150.
- Pasambee, D, A. Ella, dan Yusuf. 2001. Upaya Peningkatan Produktivitas Sapi Potong Melalui Penerapan Teknologi Sinkronisasi Berahi dan Introduksi Inseminasi Buatan. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner : 135-140.
- Pellegrino, C.A.G, F. Morotti, R.M. Untura, J.H.F. Pontes, M.F.O. Pellegrino, J.P. Campolina, M.M. Seneda, F.A. Barbosa, M. Henry. 2016. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 86 : 888–893.
- Pohan, A, C. Talib. 2010. Aplikasi hormone progesterone dan estrogen Pada betina induksi sapi bali anestrus postpartum yang digembalakan di timor barat, Nusa Tenggara timur. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2010 : 18-24.
- Praharani, L. 2011. Respon sinkronisasi estrus sapi brahman dan Persilangannya. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2011 : 68-74.
- Prasetyo, D. 2012. Tingkat superovulasi pada beberapa bangsa sapi dengan sumber follicle stimulating hormon (*FSH*) yang berbeda. [Skripsi] : IPB Press.
- Puspita, I.S.A. 2014. Evaluasi Kualitas Embrio Hasil Produksi Embrio In Vivo Pada Sapi Dengan Bangsa dan Umur Yang Berbeda. Skripsi : IPB Press.
- Putri, R.D.A, M. Gunawan., E.M. Kaiin. 2015. Uji kualitas sperma *sexing* sapi Friesian Holstein (FH) pasca thawing. PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON. Volume 1, Nomor 8, Desember 2015 ISSN: 2407-8050. Halaman: 2057-2061 DOI: 10.13057/psnmbi/m010835.
- Putro, P.P. 1995. Teknik Superovulasi Untuk Transfer Embrio Pada Sapi. *Bul. FKH-UGM XIV* (1), Bandung.
- Ramli, M, T.N. Siregar, C.N. Thasmi, Dasrul, S. Wahyuni, dan A. Sayuti. 2016. Hubungan antara intensitas estrus dengan konsentrasi estradiol pada sapi aceh pada saat inseminasi. *Medika Veterinaria* 10 (1): 27-30.

- Roelofs, J.B, E.B. Bouwman, H.G. Pedersen, Z. Riestra Rasmussen, N.M. Soede, P.D. Thomsen , B. Kemp. 2006. Effect of time of artificial insemination on embryo sex ratio in dairy cattle. Science direct : Animal Reproduction Science 93 : 366–371.
- Salmah, N. 2014. Motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa semen beku sapi bali pada pengencer Andromed dan tris kuning telur. [Skripsi] : UNHAS Press.
- Situmorang, P dan Endang, T. 2004. aplikasi dan inovasi teknologi transfer embrio (TE) untuk pengembangan sapi potong. Bogor : Lokakarya Nasional Sapi Potong 2004.
- Sophian. E dan F. Afiati. 2016. Peranan Bioteknologi Reproduksi Dalam Peningkatan Kualitas Ternak. Bogor : Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. BioTrends Vol.7 No.1 Tahun 2016.
- Suciani. 2015. Teknologi Reproduksi Dalam Upaya Meningkatkan Produktivitas Ternak. Bali : Universitas Udayana press.
- Sudarto. 1985. Manfaat Dan Prospek Masa Depan Dari Transfder Embrio [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor Press.
- Sumaryadi. M.Y, D. M. Saleh , B. Haryanto, D. Herdiansah. 2010. Kajian Aspek Reproduksi dan Estimasi Ekonomi pada Ternak Sapi yang di Inovasi Teknologi Reproduksi. Agripet : Vol (10) No. 1: 1-6.
- Susilawati.T. 2014. *Sexing* spermatozoa Hasil Penelitian Laboratorium dan Aplikasi pada Sapi dan Kambing. UB Press.
- Syaiful.F.L, R. Saladin, Jaswandi, dan Z. Udin. 2011. Pengaruh waktu fertilisasi dan sistem inkubasi yang berbeda terhadap tingkat fertilisasi sapi lokal secara in vitro. Jurnal Peternakan Indonesia 13 (1) : 27-35.
- Syawal, M. 2015. Efektivitas Metode Aplikasi Hormon Progesteron, PGF2 α Dan HCG Dalam Peningkatan Efisiensi Reproduksi Kambing PE Anestrus Postpartum [Skripsi]. IPB Press, Bogor.
- Tenriawaru.E.P. 2013. Kloning Hewan. Jurnal Dinamika 4 (1) : 49 – 61. ISSN 2087 – 7889.
- Wahyudi.M.H. 2015. Klasifikasi spermatozoa sapi pembawa Kromosom x atau y dengan menggunakan Metode support vector machine. [Tesis] : ITS Press.

RIWAYAT HIDUP



Penulis di lahirkan di Jakarta, pada tanggal 26 April 1962. Penulis merupakan anak ke empat dari tujuh orang bersaudara dari pasangan ayah H.Taufik Effendi dan ibu Hj, Janizar (*almarhumah*).

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di Sekolah Dasar Agnes Kotamadya Padang pada tahun 1974, pendidikan menengah pertama di SMP Maria Kotamadya Padang pada tahun 1977 dan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri I Padang tahun 1981. Pada tahun 1981 penulis diterima di Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang dan memperoleh gelar Sarjana (Ir) pada tahun 1986. Pada tahun 1993 penulis mengikuti pendidikan pascasarjana di Program pascasarjana Universitas Andalas dan memperoleh gelar Master Pertanian (MP) pada tahun 1997.

Sejak tahun 1987 penulis diterima bekerja sebagai dosen pada Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang, dan terhitung semenjak tahun 2007 penulis mengikuti program Doktor pada program Studi Ilmu Ternak-Program Pascasarjana Universitas Andalas dan selesai pada tahun 2014.

Penulis menikah dengan Ir.H. Zedril pada tahun 1990 dan dikarunia 5 orang putra yang bernama Nadia Ayu Putri, Edo Afrinaldi, Ella Afrianti, Muhammad Fadhli dan Nurul Hafitzah Zetinia.

Padang, Maret 2018

Penulis

Tinda Afriani