

## Respons Superovulasi Sapi Peranakan Ongole terhadap Penyuntikan Tunggal *Follicle Stimulating Hormone* ke dalam Ruang Epidural

(*SUPEROVULATION RESPONSES IN ONGOLE CATTLE CROSSBREED TREATED WITH A SINGLE EPIDURAL INJECTION OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE*)

Muhammad Imron<sup>1</sup>, Iman Supriatna<sup>2</sup>,  
Amrozi<sup>2</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Embrio Ternak Cipelang, Kotak Pos 485, Bogor 16004.

Telp: 0251 8211555; Email: hibbanie@gmail.com

<sup>2</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik Patologi dan Reproduksi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jln. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680.

### Abstrak

Pelaksanaan superovulasi secara konvensional dilakukan dengan penyuntikan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) sebanyak dua kali sehari. Hal tersebut memerlukan perhatian khusus dan meningkatkan kemungkinan kesalahan penanganan dalam pelaksanaannya. Penelitian ini dilakukan bertujuan mengkaji respons superovulasi menggunakan penyuntikan dosis tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural pada sapi peranakan ongole (PO). Penelitian terdiri dari dua tahap. Penelitian 1 membandingkan perlakuan kombinasi penyuntikan tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural dan intramuskuler (perlakuan kombinasi epi+i.m.) dengan penyuntikan FSH dua kali sehari secara intramuskuler selama empat hari (perlakuan intramuskuler), menggunakan dosis total masing-masing 400 mg FSH. Respons superovulasi dari kelompok perlakuan epi+i.m (n=4) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan intramuskuler (n=4). Penelitian 2 membandingkan penggunaan dua konsentrasi FSH (280 mg dan 160 mg) yang disuntikan dalam dosis tunggal ke dalam ruang epidural. Sebagai kontrol digunakan data perlakuan epi+im dari penelitian 1. Kelompok perlakuan FSH 280 mg (n=4) menghasilkan total koleksi dan embrio layak transfer (9,00±2,65 dan 3,33±2,52), berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 160 mg (n=4) (2,00±1,26 dan 0,00), P<0,05, tetapi tidak berbeda nyata dengan kontrol (9,33±5,68 dan 3,67±3,21). Disimpulkan bahwa supersovulasi dengan penyuntikan 280 mg FSH dosis tunggal ke dalam ruang epidural menghasilkan embrio layak transfer yang setara dengan penyuntikan dua kali sehari selama empat hari.

Kata-kata kunci: penyuntikan tunggal FSH, ruang epidural, superovulasi, sapi PO

### Abstract

Super-ovulation is conventionally performed by injection of FSH twice daily for four days. This treatment needs frequent attention by farm-personnel and relatively increases the possibility of failures due to mishandling and errors in administration of the treatment. This study was conducted to evaluate the responses of superovulation through a single injection of FSH into epidural space in ongole cattle crossbreed. In Experiment 1, a combination of single dose injection of FSH was applied into epidural space plus intramuscular (epi+i.m group) compared to the group of intramuscular injection of FSH, which was treated twice daily for four days (intramuscular group), using equal total dose of FSH 400 mg. Super-ovulation response of epi+im group (n=4) was not significantly different compared with intramuscular group (n=4). In experiment 2, it compared two treatment of FSH in different concentration (280 mg versus 160 mg) in a single dose applied into epidural space. Data of Epi+im group from experiment 1 was used as control. Group of 280 mg FSH (n=4) resulted total collection of ova/embryo and transferable embryos (9,00±2,65 and 3,33±2,52 respectively) was significantly different compared to the 160 mg group (n=4) (which were 2,00±1,26 and 0,00) P <0,05, although they were not significantly different compared to the control (9,33±5,68 and 3,67±3,21). In conclusion, injection of a single dose of FSH at 280 mg into epidural space result in a comparable transferable embryo which similar to the conventional method that applied intramuscular injection of FSH twice daily for four days.

Keywords: FSH single injection, epidural space, super-ovulation, PO cattle

## PENDAHULUAN

Perlakuan superovulasi bertujuan menginduksi banyak folikel berovulasi untuk menghasilkan banyak oosit sehingga setelah difertilisasi akan dihasilkan banyak embrio layak transfer dan memberikan tingkat kebuntingan yang diharapkan (Bó *et al.*, 2002). Pelaksanaan superovulasi secara tradisional dilakukan dengan penyuntikan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada pagi dan sore selama 3–4 hari dengan dosis menurun untuk menstimulasi perkembangan folikel (Mapletoft dan Bo, 2012; Martins *et al.*, 2012). Hormon FSH memiliki waktu paruh biopotensi yang pendek sehingga umumnya perlakuan penyuntikan FSH secara intramuskuler dilakukan secara berulang untuk menimbulkan efek superstimulasi pertumbuhan folikel pada sapi (Baruselli *et al.*, 2006). Proses tersebut memerlukan alokasi waktu yang lama (*time consuming*) dan diperlukan tenaga khusus dalam teknis pelaksanaannya.

Selain itu, penyuntikan dua kali sehari dapat menimbulkan cekaman terhadap donor yang mungkin bisa menurunkan respons superovulasinya (Bó *et al.*, 1994). Karena itu, penelitian banyak dilakukan untuk mengurangi frekuensi penyuntikan melalui pencampuran FSH dengan media pembawa seperti *polyvinylpyrrolidone* (Suzuki *et al.*, 1994), gel *aluminium hidroxida* (Yoshioka *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2007) atau dengan media *slow release formulation* (Tribulo *et al.*, 2012). Campuran FSH dan media pembawa tersebut disuntikan dengan dosis tunggal secara intramuskuler telah dilaporkan menghasilkan respons superovulasi yang tidak berbeda dengan protokol superovulasi konvensional. Demikian pula Hiraizumi *et al.* (2015) yang melaporkan penyuntikan FSH via subkutan dengan memanfaatkan deposit lemak di bawah kulit juga menghasilkan respons superovulasi pada sapi potong.

Ruang epidural adalah ruang di antara jaringan lapisan terluar medulla spinalis dan kanal vertebral yang dikelilingi oleh jaringan berlemak (Moore dan Dalley, 2006). Banyak tindakan veteriner seperti pemberian obat anestetik dan analgesik disuntikan pada ruang epidural dengan tujuan memperpanjang masa kerjanya (Grubb *et al.*, 2002). Farmakokinetik obat-obatan yang disuntikan ke dalam ruang epidural tergantung banyak faktor antara lain volume media, lipofilisitas (*lipophilicity*), dan

bobot molekulnya (Thurmon *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji penyuntikan tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural, dengan tujuan memicu superovulasi untuk memperoleh oosit yang banyak dan untuk selanjutnya diperoleh embrio layak transfer pada sapi peranakan ongole (PO).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 16 ekor sapi PO dewasa berumur antara 5-7 tahun dengan bobot badan antara 375-450 kg. Semua sapi yang digunakan memiliki nilai *Body Condition Score* (BCS) antara 2,7-3,2 dengan sistem skala penilaian 1-5 dan memiliki siklus berahi yang normal. Sapi kemudian dibagi secara acak menjadi empat kelompok perlakuan. Pakan yang diberikan sebanyak 30-40 kg hijauan/ekor/hari berupa rumput gajah (*Pennisetum purpureum*) dan disuplementasi dengan 2-3 kg pakan konsentrat/ekor/hari. Jenis perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini sudah disetujui oleh Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

### Protokol Superovulasi

**Perlakuan Prasuperovulasi.** Perlakuan prasuperovulasi dilakukan untuk mensinkronkan pertumbuhan gelombang folikel sebelum penyuntikan FSH. Perlakuan ini dimulai dengan pemasangan preparat progesteron intravaginal (Cue-Mate®, mengandung 1,56 mg progesterone dalam dua *pod* silicon, Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty.Ltd., Australia). Sediaan Cue-Mate® dipasang dalam vagina selama tujuh hari menggunakan aplikator khusus yang diberi pelumas gel isotonik. Penyuntikan hormon prostaglandin (Prostavet® C, 5 mg etiproston per 2 mL; Virbac Animal Health, Prancis) dilakukan secara i.m. bersamaan dengan pelepasan Cue-Mate® dan dua hari kemudian diberikan penyuntikan hormon *gonadotrophin releasing hormone*/GnRH (Fertagyl®, Intervet Schering-Plough Animal Health, Jerman) secara i.m. untuk menginduksi terjadinya ovulasi.

**Perlakuan Superovulasi.** Penyuntikan hormon FSH (Follitrophin® V, terdiri dari 400 mg NIH-FSH-P1 dan 20 mL pelarut Bacteriostatic natrium klorida, Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty.Ltd., Australia) dimulai pada saat awal terjadinya pertumbuhan gelombang folikel yang diamati dengan

menggunakan ultrasonografi (USG) dan dihitung sebagai hari ke-0 (H0). Metode penyuntikan dan dosis FSH yang diberikan pada masing-masing kelompok disesuaikan dengan tahapan penelitian. Selanjutnya pada semua kelompok, penyuntikan PGF2 $\alpha$  diberikan pada H2 sore dan H3 pagi secara i.m. diikuti penyuntikan GnRH pada H4 pagi secara i.m. Inseminasi buatan dilakukan tiga kali menggunakan semen beku sapi PO (Balai Inseminasi Buatan, Lembang, Bandung) dengan kode produksi yang sama pada H4 sore, H5 pagi, dan H5 sore.

### **Penelitian 1. Respons superovulasi menggunakan metode penyuntikan FSH dosis tunggal dan harian**

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji respons superovulasi menggunakan penyuntikan tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural dikombinasikan dengan aplikasi i.m. (perlakuan epi + i.m.) dibandingkan dengan penyuntikan FSH harian secara i.m. (perlakuan intramuskuler). Sapi PO sebanyak delapan ekor dibagi secara acak menjadi dua kelompok perlakuan (1 dan 2). Pada kelompok 1, sebanyak 400 mg FSH dilarutkan dalam 20 mL pelarut saline fisiologis (natrium klorida). Perlakuan superovulasi dilakukan dengan penyuntikan FSH secara i.m. pagi dan sore berturut-turut mulai H0 sampai H3 dengan volume 4:4, 3:3, 2:2, 1:1 mL (perlakuan intramuskuler). Untuk kelompok 2, sebanyak 400 mg FSH dilarutkan dalam 10 mL pelarut saline. Penyuntikan FSH dilakukan satu kali pada ruang epidural dan dilanjutkan satu kali secara i.m. pada H0, masing-masing sebanyak 5 mL (perlakuan epi+i.m.).

Penentuan lokasi penyuntikan epidural dilakukan dengan cara mengangkat ekor ke atas dan ke bawah sambil meraba celah di antara ruas os koksigea pertama dan kedua. Jarum suntik berukuran 18G ditusukan pada celah tersebut dan diberi sedikit tetesan larutan FSH ke dalam jarum. Posisi penyuntikan dianggap sudah tepat jika terdapat tekanan negatif sehingga larutan FSH di dalam jarum terhisap ke dalam ruang epidural (Iff *et al.*, 2011). Selanjutnya larutan FSH seluruhnya disuntikan pada posisi tersebut.

### **Penelitian 2. Dosis penyuntikan FSH tunggal yang optimal**

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan dosis penyuntikan FSH tunggal ke dalam

ruang epidural yang lebih optimal untuk tujuan superovulasi. Sapi PO yang digunakan dalam tahap ini sebanyak delapan ekor dan dibagi secara acak menjadi dua kelompok (3 dan 4). Pada tahap ini penyuntikan FSH dilakukan satu kali (tunggal) pada ruang epidural dengan dosis 280 mg dalam 5 mL pelarut untuk kelompok 3 (perlakuan epi 70%) dan 160 mg dalam 5 mL pelarut untuk kelompok 4 (perlakuan epi 40%).

### **Koleksi dan Evaluasi Embrio**

Koleksi embrio dilakukan pada H11 dengan metode non bedah yaitu dengan membilas uterus melalui transervikal dengan 500 mL larutan ringer laktat yang disuplementasi 1% *bovine serum* (Sigma-Aldrich, USA) dan antibiotik penisilin-streptomisin 100 IU/mL (Sigma-Aldrich, USA) menggunakan *two way folley catheter* (FHK Fujihira, Jepang) ukuran 18FR. Koleksi embrio dilakukan tiga kali yaitu pada uterus kanan, uterus kiri, dan badan uterus. Volume medium hasil koleksi embrio dikurangi sampai tersisa sekitar 10 mL dengan metode filtrasi menggunakan filter embrio berdiameter 75  $\mu$ m (Agtech inc., USA) dan hasilnya dipindahkan ke cawan patri 100x100 mm (Falcon, USA). Oosit/embrio dalam medium hasil koleksi dicari dan dievaluasi lebih lanjut menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61, Japan) dengan pembesaran antara 50-100 kali. Penilaian embrio dilakukan berdasarkan fase perkembangan embrionya dengan skor 1-9 dan kualitasnya dengan skor 1-4, merujuk pada standar yang ditetapkan dalam *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)* (Stringfellow dan Givens, 2010). Embrio layak transfer adalah embrio yang sudah berkembang minimal mencapai fase 4 (morula) dengan kualitas 1 (*excellent*) dan 2 (*fair*). Embrio degenerasi/jelek adalah embrio yang mengalami kerusakan lebih dari 75% pada sel-sel blastomeranya dan memiliki bentuk yang tidak beraturan (kualitas 3 dan 4). Oosit terfertilisasi adalah embrio yang minimal memiliki dua sel blastomer. Oosit dianggap tidak mengalami fertilisasi jika tidak teramati tanda-tanda pembelahan sel blastomer.

### **Pengamatan Dinamika Ovarium**

Pengamatan dinamika ovarium dilakukan menggunakan USG portabel yang dilengkapi dengan *goggle glass* (Easy Scan Lite, Inggris) dan pemindai/*probe* dengan frekuensi dinamis 4-8 Mhz. Unit utama USG dihubungkan dengan komputer dan data pengamatan direkam dalam

format video. Pengamatan dinamika ovarium dimulai pada saat pelepasan Cue-Mate<sup>®</sup>, sampai H8 untuk mendapatkan data ovulasi, dinamika perkembangan folikel, dan korpus luteum (CL) selama tahapan proses superovulasi.

**Analisis Statistika**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dan data dianalisis dengan *software* statistik (IBM SPSS *statistic version 21 for windows*). Pada penelitian 1, perbedan rata-rata respons perlakuan intramuskuler dan epi + i.m., diuji menggunakan *Independent-Sample T-Test*. Perbedaan persentase perolehan koleksi embrio diuji menggunakan *Chi Square Test*. Pada penelitian 2, respons jumlah folikel, CL dan hasil koleksi embrio dari perlakuan epi 70% dan epi 40% dibandingkan dengan respons perlakuan epi+i.m. hasil penelitian 1 (sebagai kontrol) menggunakan sidik ragam dan jika terdapat perbedaan nyata dilakukan uji lanjut menggunakan *Tukey's multiple comparison test*.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil superovulasi dengan perlakuan kombinasi epi+i.m. menghasilkan respons jumlah CL yang tidak berbeda dibandingkan dengan perlakuan secara intramuskuler, yaitu berturut-turut 11,00±7,20 dan 11,25±4,92 (Tabel 1). Demikian pula jumlah total embrio berhasil dikoleksi pada perlakuan kombinasi epi+im (9,33±5,68), tidak berbeda dengan perlakuan secara intramuskuler (9,75±5,85). Perlakuan

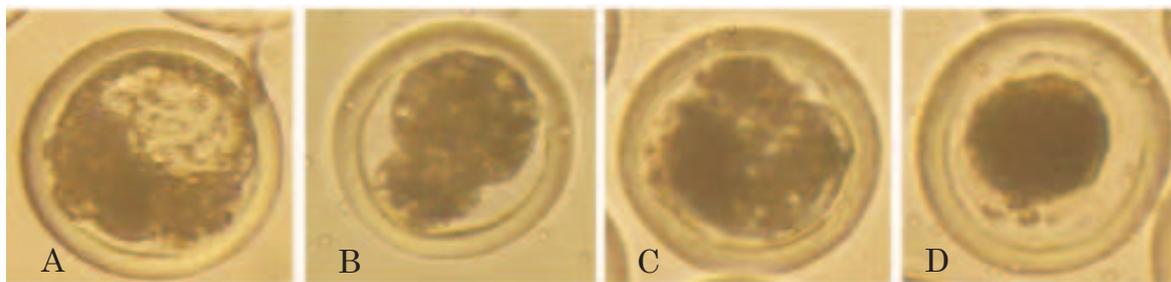
superovulasi kombinasi epi+i.m. juga menghasilkan respons yang tidak berbeda nyata pada parameter lain yang diamati dibandingkan perlakuan FSH intramuskuler, yaitu berturut-turut: jumlah embrio layak transfer (3,66±3,21 dan 3,5±2,64), oosit terfertilisasi (6,33±5,51 dan 7,25±4,99), dan embrio yang mengalami degenerasi (2,67±2,3 dan 3,75±2,75).

Embrio layak transfer sapi PO yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki fase perkembangan fase 4 (morula), fase 5 (blastosis awal), dan fase 6 (blastosis). Fase perkembangan yang bervariasi sangat besar, dapat menjadi indikator bahwa kualitas embrio yang dihasilkan kurang baik dan mungkin tidak menghasilkan tingkat kebuntingan yang diharapkan (Bó dan Mapletoft, 2013). Embrio fase 6 kualitas 1 (Gambar 1A) dan embrio fase 4 kualitas 2 (Gambar 1B) masuk dalam kategori layak transfer, sedangkan embrio degenerasi (Gambar 1C) dan oosit (Gambar 1D) masuk dalam kategori embrio tidak layak transfer.

Protokol penyuntikan tunggal FSH ke dalam ruang epidural dikombinasikan dengan penyuntikan i.m. dalam penelitian ini memberikan respons superovulasi yang setara dengan protokol superovulasi konvensional. Hal tersebut karena ruang epidural terdiri dari lemak dalam bentuk semi likuid, limfatik, arteri dan beberapa jaringan lain (Ogan, 2012). Diduga bahwa lapisan lemak pada ruang epidural mampu memperlambat penyerapan hormon FSH secara langsung ke pembuluh darah dan memperpanjang durasi beredarnya di dalam pembuluh darah sehingga dapat memberikan pengaruh superstimulasi pertumbuhan folikel. Lee *et al.* (2003) menyatakan obat-obatan yang

Tabel 1. Respons superovulasi menggunakan perlakuan penyuntikan *follicle stimulating hormone* (FSH) berturut-turut selama empat hari sebanyak dua kali sehari secara i.m. (perlakuan intramuskuler) dan penyuntikan tunggal FSH via epidural plus intramuskuler (perlakuan epi+i.m.).

	Perlakuan penyuntikan FSH		P
	Intramuskuler (n = 4)	Epi+i.m (n = 4).	
Korpus luteum	11,25±4,92	11,00±7,2	0,96
Total koleksi ova/embrio	9,75±5,85	9,33±5,68	0,98
Oosit terfertilisasi	7,25±4,99	6,33±5,51	0,92
Embrio layak transfer	3,50±2,64	3,66±3,21	0,70
Oosit tidak terfertilisasi	2,50±1,29	3,30±1,00	0,59
Embrio degenerasi	3,75±2,75	2,67±2,30	0,59
<i>Recovery rate</i> (%)	78,43	84,81	0,36



Gambar 1. Beberapa fase perkembangan dan kualitas embrio sapi peranakan ongole (PO). A. Embrio fase 6 kualitas 1. B. Embrio fase 4 kualitas 2 . C. Embrio fase 2 kualitas 4 D. Oosit

disuntikan ke dalam ruang epidural secara farmakokinetik berdifusi dalam lemak epidural, kemudian berredifusi dengan dura mater sampai akhirnya dengan vena epidural. Lebih lanjut Lee *et al.* (2005) melaporkan ruang epidural bersifat sangat hidrofobik karena dikelilingi oleh banyak lemak epidural. Sementara itu FSH merupakan hormon dari golongan glikoprotein dan bersifat hidrofilik yang tidak larut dalam lemak (Jiang 2014). Karena itulah, hormon FSH yang hidrofilik menjadi lebih lama untuk diabsorpsi ke dalam peredaran darah karena terhambat di ruang epidural yang bersifat hidrofobik. Hiraizumi *et al.*, (2015) juga melaporkan bahwa jumlah lemak yang ada pada lokasi penyuntikan FSH dalam protokol superstimulasi secara subkutan sangat berpengaruh terhadap proses perlambatan absorpsi FSH.

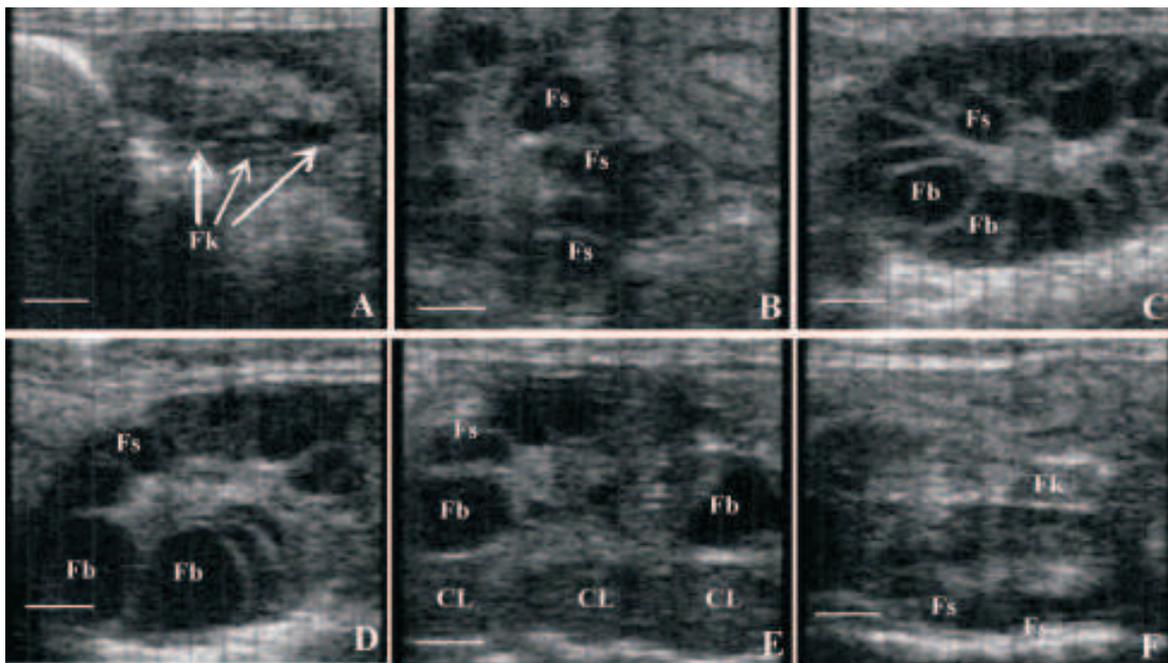
Metabolisme FSH pada sapi relatif cepat dengan waktu paruh biopotensi antara 2-5 jam dan keberadaannya di dalam peredaran darah sudah tidak terdeteksi setelah 10–12 jam (Demoustier *et al.*, 1988). Konsentrasi FSH dalam sirkulasi tergantung dari tingkat penyerapan di lokasi penyuntikan, karena penyerapan yang cepat akan diikuti dengan pembersihan yang cepat (Tribulo *et al.*, 2011). Lebih lanjut Kimura *et al.* (2007) menyatakan folikel yang terpapar konsentrasi FSH yang besar dalam waktu pendek terlihat tidak mampu mempertahankan pertumbuhannya sampai ovulasi. Karena itu pada protokol superstimulasi konvensional diperlukan penyuntikan FSH berulang dalam interval waktu tertentu untuk memicu superstimulasi pada sapi (Bó *et al.*, 2008).

Penyuntikan FSH pada perlakuan kombinasi epi+i.m. dilakukan saat awal gelombang pertumbuhan folikel yang ditandai dengan teramatinya banyak folikel kecil pada

ovarium melalui pengamatan menggunakan USG (Gambar 2A). Pengaruh penyuntikan sudah terlihat pada H2 ditandai dengan adanya kelompok folikel berukuran sedang mendominasi populasi folikel pada kedua ovarium (Gambar 2B). Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Hiraizumi *et al.* (2015). Terdeteksinya folikel besar (diameter di atas 9 mm) secara dominan teramati pada H4 dan sebagian mengalami ovulasi pada H5 dan H6. Koleksi embrio dilakukan pada H11 setelah penyuntikan FSH (Gambar 2E). Folikel besar yang tidak ovulasi mengalami atresia dan ovarium kembali memiliki populasi folikel yang normal sekitar satu minggu setelah koleksi embrio (Gambar 2F).

Superovulasi melalui penyuntikan FSH ke dalam ruang epidural pada sapi sampai saat ini baru dilaporkan oleh Tasdemir *et al.* (2011) dan belum ada rujukan metode dan dosis yang disarankan untuk menghasilkan respons superovulasi yang optimal. Hasil pengamatan dengan USG pada ovarium menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi epi+i.m. cenderung merangsang pertumbuhan folikel yang berlebihan dan banyak folikel besar yang tidak mengalami ovulasi (Gambar 2D). Karena itu, penyuntikan FSH pada penelitian ke-2 dilakukan hanya satu kali pada ruang epidural dengan dosis diturunkan menjadi 280 mg (epi 70%) dan 160 mg (epi 40%).

Hasil pengamatan dengan USG pada penelitian ke-2 menunjukkan tidak ada perbedaan jumlah folikel kecil (diameter 2-4 mm) yang diamati pada H0–H6 pada perlakuan epi 70% dan epi 40% dibandingkan dengan kontrol (kombinasi epi+i.m) (Gambar 3A). Penyuntikan FSH dalam penelitian ini dimulai pada saat awal gelombang folikel yang ditandai dengan terjadinya banyak pertumbuhan folikel kecil. Hal tersebut didasarkan pada laporan hasil



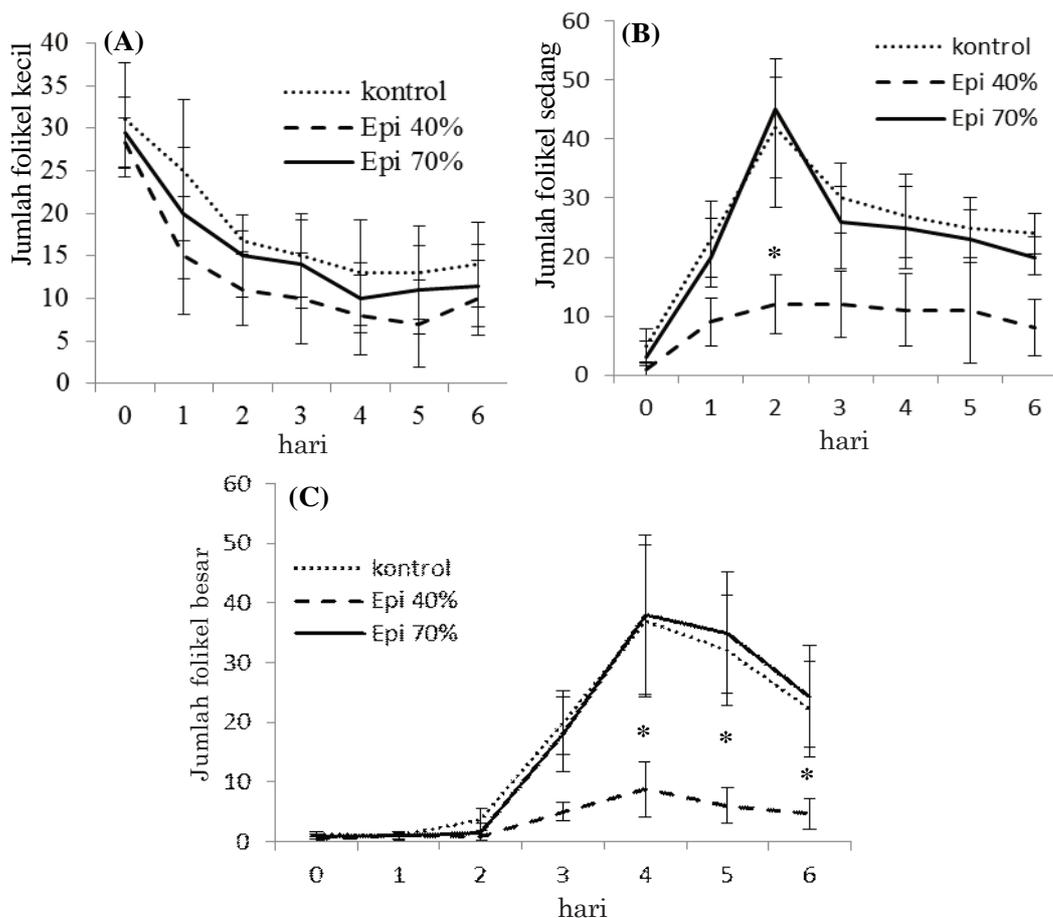
Gambar 2. Pengamatan dinamika ovarium dengan menggunakan ultrasonografi (USG) pada sapi peranakan ongole (PO) yang diberi perlakuan kombinasi epi+i.m. A. Penyuntikan *follicle stimulating hormone*/FSH (H0), B. Penyuntikan prostaglandin-F<sub>2</sub> $\alpha$ /PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (H2), C. Penyuntikan *gonadotrophin releasing hormone*/GnRH (H4) D. Folikel besar yang tidak ovulasi (H8). E. Koleksi embrio (H11). F. Satu minggu setelah koleksi embrio. Fk: Folikel kecil. Fs: Folikel sedang. Fb: Folikel besar. CL: korpus luteum. Bar = 10 mm.

penelitian Bó dan Mapletoft (2014) yang menyatakan respons superovulasi akan menjadi optimal jika perlakuan superstimulasi folikel dimulai pada saat awal terjadinya gelombang pertumbuhan folikel. Perlakuan gonadotropin yang dimulai lebih cepat atau lebih lambat satu hari dari terjadinya awal gelombang folikel, akan mengurangi respons superovulasi dibandingkan dengan memulai perlakuan tepat pada saat terjadinya awal gelombang folikel (Bó *et al.*, 2008).

Respons perlakuan penyuntikan FSH sudah terlihat pada hari H2, ditandai dengan terdeteksinya folikel medium berdiameter 4-9 mm pada perlakuan epi 70% dan kontrol yang sangat nyata lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan epi 40%,  $P < 0,01$  (Gambar 3B). Namun, jumlah folikel sedang pada H2 melebihi jumlah folikel kecil yang teramati menggunakan USG pada H0. Hal tersebut diduga, penyuntikan FSH terutama pada perlakuan epi 70% dan kontrol mampu menstimulasi pertumbuhan folikel yang lebih kecil tetapi tidak teramati dengan USG (diameter  $\pm 1$  mm), karena USG yang digunakan dalam penelitian ini hanya

memiliki frekuensi dinamis 4-8 Mhz. Lebih lanjut Jaiswal *et al.* (2009) menyatakan bahwa folikel berdiameter 1 mm akan memulai pertumbuhannya dengan adanya pengaruh FSH, sehingga setelah dua hari folikel sudah berkembang menjadi folikel antral berukuran sedang yang dapat diamati dengan mudah menggunakan USG.

Jumlah folikel besar (di atas 9 mm) pada perlakuan kontrol ( $35,00 \pm 10,10$ ) dan epi 70% ( $38,00 \pm 15,38$ ) pada H4, H5, dan H6 sangat nyata lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan epi 40% ( $8,75 \pm 5,30$ ),  $P < 0,01$  (Gambar 3C). Namun demikian, jumlah folikel besar banyak yang tidak mengalami ovulasi dalam penelitian ini pada H6. Rendahnya tingkat ovulasi yang terjadi kemungkinan disebabkan folikel kurang merespons LH walaupun sudah diberikan GnRH pada H4. Lebih lanjut Souza *et al.* (2011) menyatakan bahwa proses superovulasi dapat menurunkan kemampuan folikel untuk mengalami ovulasi terkait dengan kurangnya reseptor gonadotropin pada folikel atau terjadi defisiensi pada bagian lain yang terlibat dalam proses ovulasi. Protokol superovulasi tidak



Gambar 3. Respons dinamika ovarium pada sapi peranakan ongole (PO) dengan perlakuan epi 70% (280 mg *follicle stimulating hormone*/FSH), epi 40% (160 mg FSH) dan kombinasi epi+i.m. (400 mg/kontrol). A. Perkembangan jumlah folikel kecil (diameter folikel 2-4 mm). B. Perkembangan jumlah folikel sedang (diameter folikel 4-9 mm). C. Perkembangan jumlah folikel besar (diameter lebih dari 9 mm). \*) Rataan jumlah folikel pada perlakuan epi 40% sangat nyata lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan epi 70% dan kontrol ( $P < 0.01$ ). H0: penyuntikan FSH. H2: penyuntikan prostaglandin-F2 $\alpha$ /PGF2 $\alpha$ . H4: Penyuntikan *gonadotrophin releasing hormone*/GnRH.

menginduksi pematangan dan diferensiasi folikel untuk menghasilkan folikel yang berespons terhadap LH surge, sehingga akan ada kemungkinan bahwa ada folikel besar hasil superstimulasi yang tidak mengalami ovulasi (Diaz *et al.*, 2014).

Jumlah CL yang dihasilkan pada perlakuan epi 70% (10,66 $\pm$ 4,93), kontrol (11,0 $\pm$ 7,20), dan epi 40% (3,50 $\pm$ 1,29) tidak berbeda,  $P = 0,12$  (Tabel 2). Berbagai penelitian melaporkan penggunaan dosis mulai dari 100 hingga 900 mg FSH menghasilkan respons superovulasi yang bervariasi dan tidak dapat diprediksi (Bo dan Mapletoft, 2014). Namun, Baruselli *et al.* (2011) menyatakan bahwa dosis penggunaan hormon FSH untuk superovulasi pada sapi *Bos indicus* sebaiknya lebih rendah dibandingkan *Bos*

*taurus* untuk menghindari respons yang berlebihan.

Hasil koleksi embrio menunjukkan bahwa perlakuan epi 70% (9,00 $\pm$ 2,65) dan kontrol (9,33 $\pm$ 5,68) menghasilkan jumlah total embrio/oosit nyata lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan epi 40% (2,00 $\pm$ 1,26),  $P = 0,04$ . Tidak ada perbedaan yang teramati antara hasil embrio dengan kualitas layak transfer pada perlakuan epi 70% (3,33 $\pm$ 2,52) dibandingkan dengan kontrol (3,67 $\pm$ 3,21), sedangkan perlakuan epi 40% tidak menghasilkan embrio yang layak transfer.

Jumlah embrio yang tidak layak transfer dalam penelitian ini lebih banyak dibandingkan jumlah yang layak transfer. Tingginya jumlah embrio yang tidak layak transfer kemungkinan disebabkan tingginya konsentrasi estradiol hasil

Tabel 2. Respons superstimulasi dengan metode epi 70%, epi 40% dan kombinasi epi+i.m (kontrol) pada sapi PO.

	Kontrol (n = 4)	Epi 70% (n = 4)	Epi 40% (n = 4)	P
Jumlah corpus luteum/CL	11,00±7,20	10,66±4,93	3,50±1,29	0,12
Total ova/embrio	9,33±5,68 <sup>a</sup>	9,00±2,650 <sup>a</sup>	2,00±1,26 <sup>b</sup>	0,04
Embrio layak transfer	3,67±3,21 <sup>a</sup>	3,33±2,52 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,05
Degenarasi	2,67±2,30	3,00±1,0	1,00±0,50	0,11
Embrio tidak terfertilisasi	3,00±1,0	2,67±3,79	2,00±0,96	0,55

\*) *superscript* yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata, P<0.05

superstimulasi Kanitz *et al.* (2002) dan penurunan kualitas oosit yang berhubungan dengan *premature germinal vesicle breakdown* (Bó dan Mapletof, 2014). Dari sisi spermatozoa, Saacke *et al.* (1998) melaporkan bahwa jumlah aksesori spermatozoa per oosit jauh lebih rendah pada sapi yang disuperstimulasi (1,1 spermatozoa) dibandingkan pada sapi yang mengalami ovulasi tunggal (21,2 spermatozoa) yang menegaskan bahwa lebih sedikit jumlah sel spermatozoa yang mencapai atau melakukan penetrasi pada sapi yang disuperstimulasi. Souza *et al.* (2011) juga menyatakan bahwa proses superstimulasi dapat memengaruhi lingkungan optimal saluran reproduksi yang dapat mengganggu proses fertilisasi atau perkembangan embrio yang tidak optimal.

Penelitian ini menunjukkan bahwa penyuntikan FSH pagi dan sore selama empat hari pada protokol supersovulasi konvensional dapat disederhanakan menjadi penyuntikan FSH tunggal ke dalam ruang epidural 70% dan menghasilkan embrio layak transfer yang tidak berbeda nyata. Penggunaan protokol ini sangat berdampak dalam menghemat waktu pelaksanaan supersovulasi, mengurangi alokasi tenaga teknis di lapangan, menurunkan frekuensi penanganan (*handling*), dan tingkat cekaman pada sapi donor. Protokol supersovulasi dengan dosis penyuntikan FSH tunggal ke dalam ruang epidural secara teknis mudah dilakukan sehingga protokol ini dapat diterapkan secara lebih luas di lapangan.

### SIMPULAN

Penyuntikan tunggal hormon FSH ke dalam ruang epidural dapat digunakan untuk tujuan supersovulasi dan menghasilkan embrio layak

transfer yang setara dengan protokol supersovulasi konvensional.

### SARAN

Dalam penelitian ini banyak folikel dominan yang tidak mengalami ovulasi sehingga kajian lebih lanjut dapat dilakukan untuk lebih memahami pengaruh perlakuan supersovulasi terhadap mekanisme fisiologi dan hormonal pertumbuhan folikel sampai ovulasi pada sapi PO.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh beasiswa dari Kementerian Pertanian Republik Indonesia tahun 2012-2015. Kami juga mengucapkan banyak terima kasih kepada pimpinan dan staff Balai Embrio Ternak Cipelang, Bogor yang telah memfasilitasi dan membantu terlaksananya kegiatan dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Baruselli PS, Ferreira RM, Salesa JNS, Gimenes LU, Sá Filhoa MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76: 1583–1593
- Baruselli PS, Sa´ Filho MF, Martins CM, Nasser LF, MFG, Nogueira, Ciro M, Barros, Bo´ GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65: 77–88

- Bó GA, Mapletoft RJ. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81: 38–48
- Bó GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod* 10(3): 344-348
- Bó GA, Guerrero DC, Adams GP. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69: 81–87
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53–72.
- Bó GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42: 963–975
- Demoustier MM, Beckers JF, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard JL, Ectors F. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30: 379–386.
- Diaz FCF, Khan MIR, Adams GP, Sirard MA, Singh J. 2014. Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Anim Reprod Sci* 149(1): 80-89
- Grubb TL, Riebold TW, Crisman RO, Lamb LD. 2002. Comparison of lidocaine, xylazine, and lidocaine-xylazine for caudal epidural analgesia in cattle. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 29: 64–68.
- Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, Hashiyada Y. 2015. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology* 83: 466–473
- Iff I, Franz S, Mosing M, Lechner T, Moens YPS. 2011. The use of an acoustic device to identify the epidural space in cattle. *The Veterinary Journal* 187: 267–268
- Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 72: 81–90
- Jiang X. 2014. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *PNAS* 109(31): 12491-12496.
- Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner H, Pöhlend R. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev* 42: 587-599.
- Kimura K, Hirako M, Iwata H, Aoki M, Kawaguchi M, Seki M. 2007. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* 68: 633–639
- Lee I, Yamagishi N, Oboshi K, Ayukawa Y, Sasaki N, Yamada H. 2005. Distribution of new methylene blue injected into the caudal epidural space in cattle. *The Veterinary Journal* 169: 257–261
- Lee I, Yamagishi N, Oboshi K, Ayukawa Y, Sasaki N, Yamada H. 2003. Effect of epidural fat on xylazine-induced dorsolumbar epidural analgesia in cattle. *The Veterinary Journal* 165: 330–332.
- Martins CM, Rodrigues CA, Vieira LM, Mapletoft RJ, Bó GA, Sá Filho MF, Baruselli PS. 2012. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 78: 974–980
- Mapletoft R, Bó G. 2012. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24: 278–283.
- Moore K, Dalley A. 2006. *Clinically Oriented Anatomy*. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore. Lippincott, Williams & Wilkins. Hlm. 163-164
- Ogan SF. 2012. Anatomy and Clinical Importance of the Epidural Space, Epidural Analgesia-Current Views and Approaches.

- <http://www.intechopen.com/books/epidural-analgesia-current-views-and-approaches/anatomyand-clinical-importance-of-the-epidural-space>
- Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 50: 117-128.
- Souza AH, Silva EPB, Cunha AP, Gumen A, Ayres H, Brusveen DJ, Gunther JN, Wiltbang MC. 2011. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology* 75(4): 722-733.
- Suzuki T, Yamamoto M, Oe M, Takagi M. 1994. Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Vet Rec* 135: 41-42.
- Stringfellow DA, Givens MD. 2010. Manual of the international embryo transfer society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. Fourth Edition. Illinois-USA. International Embryo Transfer Society.
- Tasdemir U, Satilmi M, Karaahin T, Kizil SH, Kaymaz M, Imai K. 2012. The effect of single epidural plus intramuscular injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 59: 211-216
- Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ. 1996. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia*, 3rd ed. Baltimore. Lea & Febiger MD. Hlm. 115-147.
- Tribulo A, Roganc D, Tribulo H, Tribulo R, Alasinod RV, Beltramod D, Biancod I, Mapletoft RJ, Bó GA. 2011. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 129: 7-13
- Tribulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Mapletoft RJ, Bo GA. 2012. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* 77: 1679-1685.
- Yoshioka H, Inama Y, Matsuda H, Matoba S, Kimura K, Imai K. 2008. Effect of two different doses of FSH in aluminium hydroxide gel by a single injection on estrus and superovulatory response in Holstein cattle. *Reprod Fert and Dev* 20(1): 572-580