

STANDAR OPERASIONAL PROSEDUR

SEKSI PRODUKSI DAN APLIKASI

TAHUN 2020



BALAI EMBRIO TERNAK CIPELANG

2020

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya, kami dapat menyusun dan membuat Standar Operasional Prosedur (SOP) Seksi Produksi dan Aplikasi Balai Embrio Ternak Cipelang Tahun 2020.

SOP ini disusun sebagai pedoman dan standar prosedur operasional pelaksanaan kegiatan Seksi Produksi dan Aplikasi, sehingga semua kegiatan yang merupakan tugas pokok dan fungsi Balai dalam rangka mencapai tujuan dan sasaran serta visi misi yang telah ditetapkan dapat berjalan lancar dan sesuai standar. SOP ini akan memudahkan dan melancarkan semua kegiatan produksi dan aplikasi dalam upaya meraih pencapaian yang optimal baik dari sisi produksi, distribusi, aplikasi serta program pengembangan maupun tugas lain yang telah dibebankan.

Harapan kami, SOP ini benar-benar dapat menjadi petunjuk / standar operasional pelaksanaan semua program/kegiatan Seksi Produksi dan Aplikasi di tahun 2020 dan tahun-tahun yang akan datang. Kami menyadari bahwa penyusunan dan pembuatan SOP ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk perbaikan masa mendatang.

Bogor, Agustus 2020

Kepala Seksi Produksi dan Aplikasi,



Ilyas, S.Pt.

NIP. 19660507 199703 1 002

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iii
 A. PRODUKSI EMBRIO IN VIVO	
1. Persiapan	1
2. Pelaksanaan Produksi Embrio In Vivo	2
 B. PRODUKSI EMBRIO IN VITRO	
1. Persiapan	12
2. Pelaksanaan Produksi Embrio In Vitro	12
 C. STERILISASI ALAT	16
 D. KALIBRASI ALAT	16
 E. INSEMINASI BUATAN (IB)	
1. Persiapan	16
2. Pelaksanaan IB.....	16
 F. TRANSFER EMBRIO (TE)	
1. Persiapan	17
2. Seleksi Resipien	17
3. Alat dan Bahan	17
4. Metode Transfer Embrio	18
5. Persiapan Transfer Embrio	19
6. Pelaksanaan Transfer Embrio.....	19
7. Program Kelahiran Kembar (Twinning)	20
8. Pemeriksaan Kebuntingan (PKb)	21
 G. PEMBERIAN SARAN TEKNIK PRODUKSI DAN TRANSFER EMBRIO	21
 H. JUSTIFIKASI PENGGUNAAN BAHAN-BAHAN KEPERLUAN PRODUKSI EMBRIO YANG KADALUARSA.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
Protokol 1. Standar BET Cipelang (Standar JICA) Berdasarkan Berahi Alami	23
Protokol 2. Standar BET Cipelang (Standar JICA) Berdasar Sinkronisasi Berahi menggunakan Preparat Progesteron (PIRD) dan Penyuntikan SOV secara Intramuskuler.	24

STANDAR OPERASIONAL PROSEDUR SEKSI PELAYANAN TEKNIS PRODUKSI DAN APLIKASI

Balai Embrio Ternak (BET) Cipelang Bogor merupakan salah satu Unit Pelaksana Teknis di Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian dengan SK Mentan No. 286/KPTS/OT.210/4/2002 yang disempurnakan dengan Peraturan Menteri Pertanian No. 57/Permentan/OT.140/5/2013, BET Cipelang mempunyai tugas dan fungsi salah satunya adalah produksi dan aplikasi transfer embrio. Sebagai salah satu Unit Pelaksana Teknis penyedia bibit ternak sapi unggul nasional, BET Cipelang diharapkan mampu untuk melakukan peningkatan mutu genetik ternak sapi melalui teknik biologi reproduksi yaitu dengan kegiatan produksi dan aplikasi transfer embrio (TE) yang pada akhirnya akan mampu menyediakan kebutuhan akan bibit ternak sapi unggul nasional.

Salah satu seksi pelayanan teknis di BET Cipelang yang bertanggung jawab terhadap kegiatan produksi dan aplikasi transfer embrio adalah seksi pelayanan teknis Produksi dan Aplikasi. Di dalam menunjang kelancaran dari kegiatan yang akan dilaksanakan di Seksi Pelayanan Teknis Produksi dan Aplikasi maka diperlukan suatu Standar Operasional Prosedur (SOP) yang akan dijadikan acuan dalam pelaksanaan kegiatan yang ada. Standar Operasional Prosedur yang dituangkan meliputi SOP untuk pelaksanaan kegiatan produksi embrio secara *in vivo*, produksi embrio secara *in vitro*, aplikasi transfer embrio (TE) dan pemberian saran teknis produksi dan transfer embrio. Semua kegiatan yang dilakukan telah melalui suatu sistem manajemen mutu produksi sesuai ISO 9001:2015, hasil produk sesuai dengan SNI Embrio ternak Sapi no SNI 7880:2013, dan untuk kegiatan pengadaan sesuai dengan sistem pengadaan yang diatur dalam peraturan yang dibuat pemerintah, sedangkan untuk lingkungan telah melalui sistem manajemen lingkungan sesuai dengan ISO 14001:2015.

A. PRODUKSI EMBRIO *IN VIVO*

1. Persiapan

- 1.1. Merencanakan kebutuhan bahan-bahan untuk program produksi embrio *in vivo* dan aplikasi transfer embrio.
- 1.2. Bahan, sapi donor yaitu sapi betina yang memenuhi kriteria/syarat-syarat tertentu diantaranya :
 - a. Memiliki keunggulan secara genetik (*genetic superiority*).

- b. Mempunyai catatan data individu / silsilah keturunan.
 - c. Mempunyai catatan reproduksi (siklus berahi).
 - d. Ternak bebas penyakit
 - PHMS (Penyakit Hewan Menular Strategis)
 - Kelainan reproduksi (Endometritis, Metritis, Pyometra, Cystik Ovary, Hypofungsi Ovary, Retensio plasenta)
 - e. Memiliki sejarah reproduksi yang baik.
 - f. Umur tidak terlalu tua (Sapi diproduksi mulai umur 2 – 10 tahun).
- 1.3. Obat-obatan dan hormon : *Folicle Stimulating Hormone* (FSH), *Prostaglandin F_{2α}* (PGF_{2α}), *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRh), *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG), Oestradiol (Estrogen), Preparat Progesteron, antibiotik, Preparat anastesi, dan lain-lain.
- 1.4. Media : Pemanenan embrio (*Flushing*), Evaluasi embrio dan pembekuan embrio (*Freezing*), diantaranya bahan media yang digunakan adalah :
D-PBS, *Calf serum*, *Lactated Ringer*, *Ethylene Glicol* (EG), BSA, Na Pyruvat, sukrose, Methanol, Antibiotik dan lain-lain.
- 1.5. Peralatan yang dibutuhkan : Plastik *sarung tangan plastik*, Jarum suntik, Sput 1cc, 5cc, 10cc, 20cc, 50cc, *Folley catheter* beserta *stillet*, *Serviks Expander*, botol penampung, *Silicon tube*, *Infusion set*, kapas, *tissue*, mikroskop, *Cawan Petri* bergaris & ukuran 35x10mm, Filter embrio, pipet, pipet pasteur, gunting, pinset, gas bunsen, kikir, bak pemanas air (*Water Bath*), *syring filter* media, *straw* kosong, pipet ballon, *powder/jelly*, label, selotip, mesin *freezing/cryosel*, *stereofom/ice box* dan lain-lain.

2. Pelaksanaan Produksi Embrio *In Vivo*

- 2.1 Penyiapan sapi donor
Sesuai dengan manajemen pemeliharaan sapi donor di Seksi Pemeliharaan Ternak.
- 2.2 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).
- 2.3 Pemasangan Preparat Progesteron, yaitu memasukkan preparat progesteron ke dalam vagina (implant vagina) yang bertujuan untuk sinkronisasi berahi pada sapi donor yang akan diprogram. Jadwal protokol terlampir.

- 2.4 Seleksi Donor, yaitu melakukan pemeriksaan performan, 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.
- 2.5 Superstimulasi/Superovulasi, Sinkronisasi dan Inseminasi
Secara alami sapi betina hanya 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, PGF₂α, Progesteron, hCG. Penggunaan hormon-hormon tersebut disesuaikan dengan prosedur protokol yang digunakan ataupun sesuai dengan anjuran produk untuk program superstimulasi/superovulasi. Jadwal protokol terlampir.
- 2.6 Inseminasi Buatan (IB)
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.
- 2.7 Pemanenan Embrio (Flushing)
Flushing dilakukan pada hari ke-enam sampai ke-delapan setelah IB yang pertama.
Pemanenan embrio dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :
- Penyiapan media *flushing* (Larutan fisiologis + Calf serum 1% + Antibiotik 0,1%) dan preparat anastesi lokal.
 - 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 spool*.
 - 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*, diusahakan 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 intrauterin injektor (*gun spool*) dan sapi donor diinjeksi dengan preparat *Prostaglandin F_{2α}* (*PGF_{2α}*) sebanyak 1 (satu) dosis dengan tujuan meluruhkan CL supaya sapi donor bersiklus kembali.

2.8 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 protokol 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. Jadwal protokol terlampir.

2.9 Evaluasi Embrio

Evaluasi embrio merupakan penilaian kualitatif terhadap fase dan kualitas embrio yang diperoleh disesuaikan dengan standar yang berlaku. Perlakuan selanjutnya adalah:

- a. Hasil *flushing* disaring dengan filter embrio dan dipindahkan ke dalam cawan petri bergaris untuk memudahkan pencarian embrio di bawah mikroskop stereo.
- b. Setelah embrio diperoleh, selanjutnya dikoleksi dalam cawan petri yang berukuran lebih kecil (cawan petri ukuran 35x10mm) yang berisi media *handling* embrio dengan menggunakan perangkat pipet pasteur.
- c. Klasifikasi Embrio; Embrio yang dikoleksi diamati di bawah mikroskop untuk dievaluasi fase dan kualitasnya yang ditentukan berdasarkan standar yang berlaku. Penilaian kualitas embrio berdasarkan kriteria zona *pellucida* yang rata warnanya, kekompakan sel, persentase sel yang mengalami degenerasi, permukaan trophoblast yang rata, warna khas, kekompakan sel, dan ukuran banyaknya *vesicles*.
- d. Penentuan Kualitas Embrio oleh Petugas Quality Control.
Finalisasi atau Penentuan akhir kualitas embrio dilakukan oleh petugas Quality Control dari seksi Produksi dan Aplikasi yang telah ditunjuk.

Kualitas embrio dinilai berdasarkan fase perkembangan (*stage*) dan kualitas (*quality*) embrio. Dengan mengacu pada standar penilaian yang ditetapkan oleh *International Embryo Transfer Society* (IETS), IETS 4th Edition Tahun 2010. Adapun daftar kode fase untuk penilaian perkembangan embrio adalah sebagai berikut :

Fase 1: *Unfertilized*

Fase 2: Embrio dengan 2 s/d 12 sel

Fase 3: *Early Morulla*

Fase 4: *Morulla*

Fase 5: *Early Blastocysts*

Fase 6: *Blastocysts*

Fase 7: *Expanded Blastocysts*

Fase 8: *Hatched Blastocysts*

Fase 9: *Expanded Hatched Blastocysts*

Sedangkan untuk kriteria kualitas embrio diuraikan sebagai berikut :

Kualitas 1 : *Excellent or Good*

- Bentuk embrio simetris dan bulat (*spherical*) dengan *blastomere* yang seragam baik pada ukuran, warna maupun kepadatannya.
- Embrio harus memiliki bentuk yang konsisten dengan perkiraan fase perkembangan embrio itu sendiri. Bentuk *irregular relative minor*.
- Memiliki minimal 85% material selular dalam keadaan *intact* dan massa embrio hidup.
- Zona pelusida harus bulat, mulus, tidak menempel pada cawan petri atau pipet.

Kualitas 2 : *Fair*

- Secara umum memiliki bentuk yang tidak teratur / *irregular* dalam kategori sedang dalam hal massa embrio, ukuran, warna dan kepadatan sel-sel individual.
- Memiliki sel *intact* dan massa embrio hidup minimal sebanyak 50%.

Kualitas 3 : *Poor*

- Embrio didominasi bentuk yang tidak teratur pada bentuk massa embrio, ukuran, warna, dan kepadatan individu sel.
- Memiliki sel *intact* dan massa embrio hidup minimal sebanyak 25%.

Kualitas 4 : *Dead or degenerating*

- Embrio degenerasi.
- Oosit.
- embrio 1 sel: tidak hidup/mati.

Embrio yang layak transfer dan dapat dibekukan lebih lanjut adalah embrio yang mencapai perkembangan fase 4 (morulla) sampai dengan fase 8 (hatched blastocyst) dan memiliki kualitas 1 dan 2. Embrio dengan fase 9 (expand hatched blastocyst) dapat dilakukan transfer segar. Embrio dengan kualitas 3 dapat ditransfer segar atau dilakukan kultur untuk perkembangan lebih lanjut. Embrio dengan fase 3 (early morulla) dilakukan kultur untuk perkembangan lebih lanjut.

2.10 Pengecekan/Penilaian Kualitas Embrio (Quality Controle Embryo)

Embrio yang dihasilkan adalah embrio yang berkualitas dan akan didistribusikan kepada konsumen/*stakeholder*. Hal ini sesuai dengan penerapan ISO 9001:2015 tentang System Manajemen Mutu. Untuk

menjamin kualitas embrio maka ditunjuk tim atau petugas khusus *Quality Controlle* (QC), yang memiliki tugas melakukan pengecekan/ penilaian kualitas embrio. Beberapa langkah QC untuk memberikan jaminan mutu embrio adalah sebagai berikut :

- a. Mencatat identifikasi donor yang diflushing/dipanen embrio.
- b. Mengecek kondisi donor yang diflushing/dipanen embrio dari data kesehatan hewan.
- c. Memeriksa dan melakukan pencatatan pemeriksaan secara makroskopis terhadap media hasil flushing.
- d. Memastikan proses penyaringan embrio dan pencarian embrio dilakukan dengan benar, alat-alat yang digunakan harus steril.
- e. Melakukan evaluasi embrio terhadap stadium (stage) dan kualitas (grade) dengan mengacu pada standar kualitas embrio yang tercantum dalam SNI Embrio Ternak – Bagian 1 : Sapi (SNI 7880.1:2013).
- f. Memastikan bahwa hanya embrio yang sesuai standar SNI yang dimasukkan ke dalam straw embrio dengan media PBS apabila akan dilakukan transfer segar, atau media pembekuan embrio (Ethylen Glycol) untuk embrio yang akan dibekukan.
- g. Memeriksa kesesuaian penomoran/pemberian label pada embrio harus sesuai dengan tata cara penomoran embrio yang tercantum dalam SNI Embrio Ternak – Bagian 1 : Sapi (SNI 7880.1:2013).
- h. Memastikan proses pembekuan dan penyimpanan sesuai prosedur yang ditetapkan.
- i. Mencatat hasil pengecekan kualitas (QC) embrio dalam satu formulir.

2.11 Kemasan Embrio

- a. *Straw* transparan dengan ukuran 0.25 ml.
- b. Kondisi kemasan harus tertutup.
- c. Setiap *straw* berisi satu embrio.
- d. Kemasan harus dilengkapi dengan identitas.

2.12 Pengemasan Embrio (Loading)

- a. Media yang digunakan untuk pembekuan embrio disesuaikan dengan metode pembekuan yang digunakan.
- b. *Straw* yang digunakan untuk kemasan embrio berwarna transparan.

- c. Saat memasukkan embrio ke dalam *straw* (loading), posisikan media, rongga udara serta embrio dalam posisi bergantian sesuai dengan metode pembekuan yang digunakan.
- d. Embrio yang layak transfer dan dibekukan dimasukkan dalam *straw* dengan jumlah masing-masing *straw* adalah 1 (satu) embrio.

2.13 Identitas Embrio

Identitas embrio tercantum dalam kode embrio, susunan identitas embrio memuat :

- a. Baris pertama memuat informasi kode produsen, nomor betina dan nomor urut embrio,
- b. Baris kedua memuat informasi kode semen/pejantan dan tanggal pembekuan

Baris 1.	Kode Produsen	Nomor Betina	Nomor Urut Embrio
Baris 2.	Nomor Semen / Pejantan		Tanggal Pembekuan

Contoh Pengkodean Embrio :

<u>BET</u>	<u>80974</u>	<u>1-7-1</u>		BET 80974 1-7-1 200LM0304 070120
Kode produsen	Nomor Betina	Nomor Urut Embrio		
<u>200LM0304</u>	<u>070120</u>			
Nomor Pejantan	Tanggal Pembekuan			

2.14 Pembekuan Embrio

Prosedur pembekuan embrio disesuaikan dengan prosedur pembekuan embrio yang digunakan.

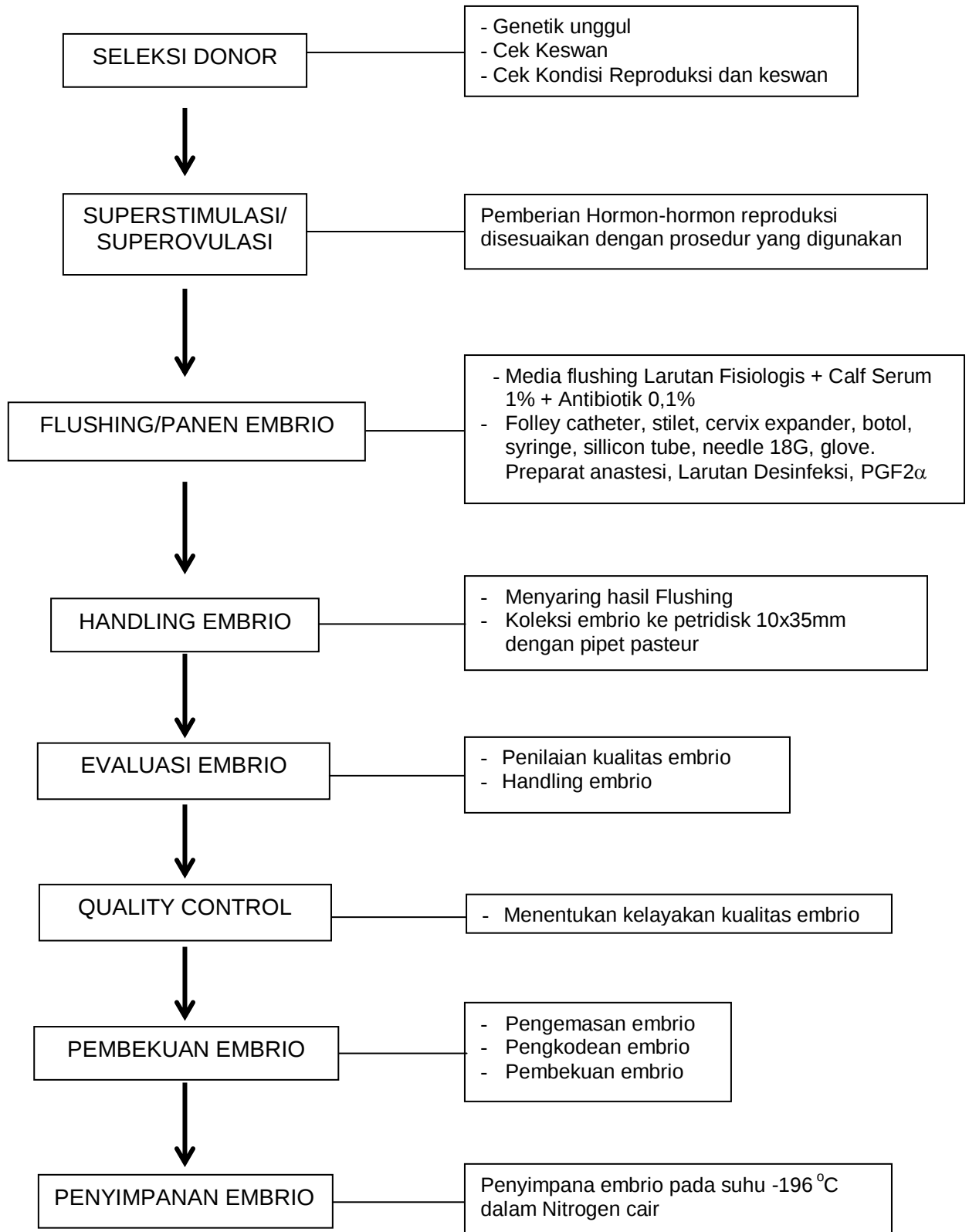
2.15 Penyimpanan Embrio

Straw embrio disimpan dengan menggunakan goblet dalam canister, embrio harus selalu terendam penuh dalam Nitrogen Cair (LN2) dengan suhu -196 °C pada container kriogenik (cryogenic) dengan tujuan untuk menjaga kualitas embrio.

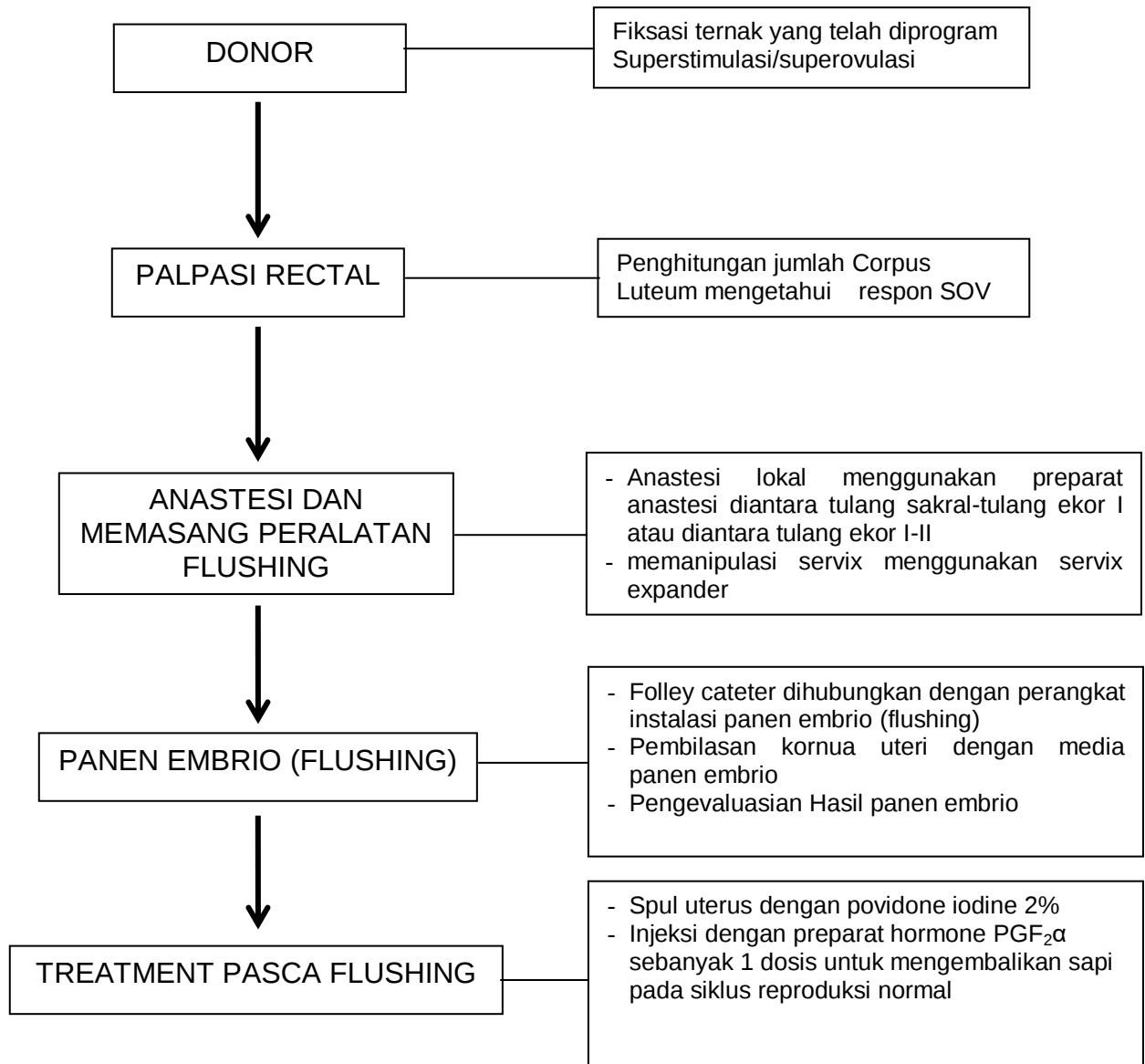
2.16 Evaluasi Sapi Donor

Evaluasi sapi donor dilakukan untuk mengetahui perkembangan produksi embrio yang dihasilkan dan permasalahan yang terjadi pada setiap individu sapi donor. Pada sapi donor yang mengalami gangguan reproduksi sehingga tidak produktif menghasilkan embrio, yaitu sapi-sapi donor yang diprogram SOV 3 kali berturut-turut tidak menghasilkan embrio, maka akan diberikan rekomendasi kepada seksi Pemeliharaan Ternak untuk selanjutnya dilakukan perawatan untuk pemulihan. Selama dalam masa perawatan/pemulihan, sapi donor tersebut akan terus dipantau perkembangannya oleh seksi Pemeliharaan Ternak sampai dengan sapi donor siap untuk dilakukan produksi embrio kembali oleh seksi Produksi dan Aplikasi.

**BAGAN 5. PROSEDUR PROGRAM DONOR
DAN PRODUKSI EMBRIO *IN VIVO***



BAGAN 6. PROSEDUR FLUSHING EMBRIO



B. PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO*

1. Persiapan

- 1.1 Merencanakan kebutuhan bahan-bahan untuk program produksi embrio *in vitro* dan aplikasi transfer embrio.
- 1.2 Media yang harus disiapkan antara lain media transportasi dan penyimpanan ovari dari RPH, media untuk aspirasi oosit, maturasi oosit, mencuci semen (sperma), mengencerkan semen, fertilisasi dan untuk kultur.
- 1.3 Peralatan yang harus disiapkan : gunting, pinset, alkohol 70%, tissue steril, jarum 18G, cawan petri bergaris, cawan petri 35x10 mm, spuit 5 ml, termos, sarung tangan plastik, inkubator CO₂, centrifuge, *water bath*, timbangan analitik, gas bunsen, kikir, *straw* kosong, *powder/jelly*, label, selotip, mesin *freezing/cryosel*, *stereofom/ice box* dan lain-lain.

2. Pelaksanaan Produksi Embrio *In vitro*

2.1 Koleksi Ovarium

- a. Ovarium dari sapi betina yang baru dipotong di RPH langsung disimpan dalam media handling ovarium, pada suhu ruang dan diberi kode betina yang dipotong.
- b. Lama waktu transportasi ovarium dari RPH sampai ke laboratorium maksimal sampai 8 jam. Selama dalam perjalanan ovarium disimpan dalam termos supaya suhu stabil.

2.2 Aspirasi Oosit

- a. Ovarium dibersihkan dan dicuci dari ligamen dan organ yang masih menempel dengan media handling ovarium kemudian dimasukkan dalam gelas piala dengan media yang sama, setelah itu gelas piala diletakkan di atas plat penghangat supaya suhu tetap stabil pada 37,5°C.
- b. Aspirasi oosit dari ovarium dengan menggunakan spuit 5ml dan jarum 18G yang telah diisi media aspirasi, hasil aspirasi yang diperoleh dikumpulkan dalam cawan petri bergaris untuk memudahkan pencarian oosit.
- c. Pencarian oosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo, oosit dikumpulkan pada cawan petri 35x10mm yang berisi media aspirasi.
- d. Penyeleksian oosit dilakukan dengan kriteria kualitas oosit sebagai berikut :
 - Kualitas A : oosit tertutup sel kumulus kompleks yang tebal
 - Kualitas B : oosit tertutup kumulus tipis

- Kualitas C : oosit tidak tertutup sel kumulus (denuded)
 - Kualitas D : sel kumulus dan sitoplasma sudah rusak/degenerasi (expanded)
- e. Oosit dengan kualitas A dan B yang dilakukan maturasi.
- 2.3 Invitro Maturasi Oosit (IVM)
- a. Mencuci oosit pada media TCM-199.
 - b. Oosit dengan kualitas A dan B dimasukkan dalam media maturasi yang telah ditutup dengan mineral oil lalu dibilas untuk menghilangkan sisa media aspirasi.
 - c. Setelah dibilas 1-2x dimasukkan pada drop media Maturasi yang ditutup mineral oil, lalu disimpan dalam CO₂ inkubator pada suhu temperatur 38,5 °C dan kandungan CO₂ 2-5% selama 18 - 24 jam.
- 2.4 Fertilisasi *In vitro* (IVF)
- a. Menyiapkan media fertilisasi.
 - b. Menyiapkan sperma yang akan digunakan untuk fertilisasi dengan melakukan prosedur kapasitasi sperma sesuai dengan metode yang digunakan.
 - c. Penentuan konsentrasi sperma sesuai dengan yang dipersyaratkan.
 - d. Cuci oosit yang telah dimaturasi dengan media pencuci oosit (Oosit Washing Solution/OWS).
 - e. Fertilisasi dilakukan dengan cara memasukkan oosit yang telah dimaturasi dan dicuci dengan OWS ke dalam drop sperma, lalu dimasukkan ke dalam inkubator CO₂, selama 5 – 18 jam. Hari dilakukan fertilisasi dihitung sebagai hari ke-0.
- 2.5 Invitro Kultur / IVC
- a. Oosit yang telah difertilisasi selanjutnya dicuci dengan media kultur dan dipisahkan dari sperma, lalu dimasukkan ke dalam drop kultur (5 µl media/oosit) dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂, selama 10 hari dengan pengamatan berkala.
 - b. Hari ke-2 setelah fertilisasi dilakukan pengamatan perkembangan pembelahan embrio.
 - c. Pengamatan perkembangan Blastosis dilakukan pada hari ke 6-9 setelah fertilisasi.

2.6 Evaluasi Embrio

Evaluasi embrio merupakan penilaian kualitatif terhadap fase dan kualitas embrio yang dikultur disesuaikan dengan standar yang berlaku. Pelaksanaan evaluasi dilakukan sebagai berikut :

- a. Klasifikasi Embrio; Embrio yang dikultur diamati di bawah mikroskop untuk dievaluasi fase dan kualitasnya yang ditentukan berdasarkan standar yang berlaku. Penilaian kualitas embrio berdasarkan kriteria zona pellucida yang rata warnanya, kekompakan sel, persentase sel yang mengalami degenerasi, permukaan trophoblast yang rata, berwarna khas, kekompakan sel, dan ukuran banyaknya vesicles. Kualitas embrio dinilai berdasarkan fase perkembangan (*stage*) dan kualitas (*quality*) embrio. Dengan mengacu pada standar penilaian yang ditetapkan oleh International Embryo Transfer Society (IETS).

Adapun daftar kode fase untuk penilaian perkembangan embrio adalah sebagai berikut:

Fase 1: *Unfertilized*

Fase 2: Embrio dengan 2 s/d 12 sel

Fase 3: *Early Morulla*

Fase 4: *Morulla*

Fase 5. *Early Blastocysts*

Fase 6: *Blastocysts*

Fase 7: *Expanded Blastocysts*

Fase 8: *Hatched Blastocysts*

Fase 9: *Expanded Hatched Blastocysts*

Sedangkan kriteria untuk kualitas embrio diuraikan sebagai berikut :

Kualitas 1 : *Excellent or Good*

- Bentuk embrio simetris dan bulat (*spherical*) dengan blastomer yang seragam baik pada ukuran, warna maupun kepadatannya.
- Embrio harus memiliki bentuk yang konsisten dengan perkiraan fase perkembangan embrio itu sendiri. Bentuk *irregular relative minor*.
- Memiliki minimal 85% material selular dalam keadaan intact dan massa embrio hidup.
- Zona pelusida harus bulat, mulus, tidak menempel pada cawan petri atau pipet.

Kualitas 2 : *Fair*

- Secara umum memiliki bentuk yang tidak teratur (irregular) dalam kategori sedang dalam hal massa embrio, ukuran, warna dan kepadatan sel-sel individual.
- Memiliki sel intact dan massa embrio hidup minimal sebanyak 50%.

Kualitas 3 : *Poor*

- Embrio didominasi bentuk yang tidak teratur pada bentuk massa embrio, ukuran, warna, dan kepadatan individu sel.
- Memiliki sel intact dan massa embrio hidup minimal sebanyak 25%.

Kualitas 4 : *Dead or degenerating*

- Embrio degenerasi
- Oosit
- embrio 1 sel: tidak hidup/mati.

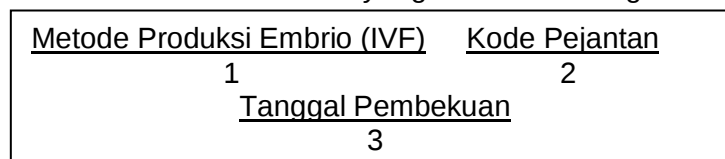
Embrio yang layak transfer atau yang dibekukan lebih lanjut adalah embrio yang mencapai fase perkembangan fase 6 (*Blastocysts*) sampai dengan fase 8 (*hatched blastocyst*) dan memiliki kualitas 1. Panen embrio dilakukan pada hari ke 6, 7, 8, dan 9 setelah fertilisasi.

- b. Embrio yang layak transfer dilakukan aplikasi TE pada resipien atau dibekukan, sedangkan embrio yang belum layak transfer dan masih hidup dilakukan kultur untuk perkembangan lebih lanjut sampai hari ke 9 setelah fertilisasi.

2.7 Pengkodean *Straw*

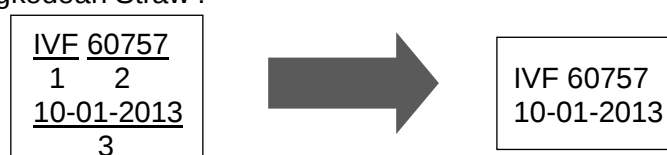
Pengkodean *Straw* menggunakan kertas label berwarna putih dengan sistem penulisan berdasarkan urutan informasi yang diuraikan sebagai berikut:

Gambar :



- 1 Metode produksi embrio (IVF)
- 2 Kode pejantan
- 3 Tanggal produksi (tanggal pembekuan)

Contoh Pengkodean *Straw* :



C. STERILISASI ALAT

Kegiatan sterilisasi alat merupakan rangkaian proses pembersihan dan pencucihamaan peralatan yang digunakan untuk seluruh kegiatan proses produksi embrio. Jenis prosedur sterilisasi yang digunakan disesuaikan dengan jenis bahan dari alat yang dipakai. Sterilisasi alat-alat yang digunakan sesuai dengan prosedur metode sterilisasi yang digunakan.

D. KALIBRASI ALAT

Alat-alat yang digunakan di laboratorium produksi embrio yang memiliki skala pengukuran akan dilakukan perencanaan, perawatan dan kalibrasi secara rutin. Alat-alat tersebut dikalibrasi dan diverifikasi secara berkala. Kalibrasi dilakukan oleh Lembaga Kalibrasi dengan jangka waktu 1-2 tahun sekali disesuaikan dengan alat yang bersangkutan ataupun berdasarkan pemakaian sedangkan verifikasi dilakukan setiap 1 (satu) bulan sekali.

E. INSEMINASI BUATAN (IB)

1. Persiapan

- 1.1 Merencanakan kebutuhan bahan-bahan untuk kegiatan IB, waktu pelaksanaan pengamatan berahi dan waktu IB.
- 1.2 Peralatan yang perlu dipersiapkan adalah : Gun IB, *sheat* IB, sarung tangan plastik, gunting *straw*, pinset, termometer, formulir IB.
- 1.3 Bahan-bahan yang digunakan adalah : Semen beku, ternak donor, kapas alkohol, *tissue*.

2. Pelaksanaan IB

Pelaksanaan IB dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- 2.1 Pengamatan berahi pada sapi donor yang diistirahatkan dari produksi dan calon donor.
- 2.2 IB dilaksanakan $\pm$ 8 jam setelah menunjukan gejala berahi.
- 2.3 Posisikan ternak pada posisi diam.
- 2.4 Thawing straw semen dengan menggunakan air hangat (34°C - 36°C) selama 25 – 30 detik.
- 2.5 Straw semen di lap dengan menggunakan tissue kering.
- 2.6 Masukan straw semen kedalam AI gun kemudian potong bagian penutup straw.

- 2.7 Selubungkan plastic shet IB pada AI gun.
- 2.8 Posisikan tangan kiri memegang cervix.
- 2.9 Vulva di lap menggunakan tissue non alkohol hingga bersih dari kotoran.
- 2.10 Disposisikan semen pada posisi cincin ke 4 dari cervix.
- 2.11 Melakukan pencatatan dan pengarsipan.

F. TRANSFER EMBRIO (TE)

1. Persiapan awal

Merencanakan : kebutuhan bahan-bahan untuk kegiatan TE, waktu pelaksanaan pengamatan berahi, seleksi resipien dan waktu TE.

2. Seleksi Resipien

Ternak yang dapat dijadikan resipien harus memenuhi persyaratan:

- 2.1 Ternak resipien adalah dara atau induk dalam kondisi tidak bunting, memiliki organ reproduksi baik dan memiliki catatan reproduksi / siklus berahi normal;
- 2.2 Performa tubuh baik dan sehat dengan *Body Condition Score* (BCS) 2,5-3,5 pada skala 5 untuk sapi perah, dan BCS 5-6 dengan skala 9 untuk sapi potong dan kerbau;
- 2.3 Sehat, tidak menunjukkan gejala klinis penyakit hewan menular strategis;
- 2.4 Terseleksi setelah palpasi rektal, pada salah satu ovarium memiliki *corpus luteum* (CL) fungsional.
- 2.5 Tidak pernah mengalami gagal bunting lebih dari 2 kali.

3. Alat dan Bahan

3.1 Alat

Peralatan yang perlu dipersiapkan adalah : Gun TE, spuit 5ml, jarum suntik 18G, *sheat* TE dan *outer sheat*, sarung tangan plastik, gunting *straw*, pinset, tempat/alat thawing, termometer, form seleksi resipien dan aplikasi transfer embrio.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah : embrio, resipien, preparat anastesi, kapas alkohol, air hangat, *tissue*.

4. Metode Transfer Embrio

Metode yang digunakan :

4.1 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 pada formulir Seleksi resipien dan aplikasi TE.

4.2 Transfer embrio beku ada 2 (dua) metode yaitu :

4.2.1 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.

4.2.2 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, 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. *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.

5. Persiapan Transfer Embrio

- 5.1 Untuk mempersiapkan resipien yang sesuai, dapat ditempuh dengan 3 cara yaitu secara alami (berahi alam), sinkronisasi dengan preparat hormon prostaglandin ($\text{PGF}_2\alpha$) dan sinkronisasi menggunakan preparat progesteron. Untuk transfer embrio segar, resipien dipersiapkan dan disamakan berahinya (sinkronisasi) dengan donor yang akan dipanen embrio (flushing).
- 5.2 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.
- 5.3 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.

6. Pelaksanaan Transfer Embrio

Pelaksanaan transfer embrio dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- 6.1 Pemeriksaan pada kondisi ovarium untuk memastikan keberadaan *corpus luteum* (CL).
- 6.2 Melakukan anestesi epidural dengan preparat anestesi.

- 6.3 Melakukan *thawing* embrio 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).
- 6.4 Label embrio dibuka dan ditempelkan pada formulir Aplikasi TE.
- 6.5 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.
- 6.6 Aplikasi TE dilakukan dengan cara mendeposisikan embrio pada sepertiga depan apex kornua yang terdapat CL (ipsilateral).

7. 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 :

7.1 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 Embryo Transfer).

7.2 Sinergi antara Aplikasi IB dan TE

Metode ini dilakukan dengan aplikasi TE yang dilaksanakan pada hari ke 6-8 setelah aplikasi IB. Untuk program ini pendeposisian embrio dilakukan berseberangan dengan kornua yang terdapat CL (Contralateral). Dengan metode ini, program aplikasi TE tidak mengganggu program IB yang telah direncanakan oleh inseminator sehingga program ini dapat berjalan selaras dan saling mendukung. Untuk menghindari kesalahan penentuan definisi antara pedet hasil IB dan TE, maka bangsa embrio yang digunakan dalam aplikasi TE berbeda dengan bangsa resipien atau bangsa pejantan yang digunakan pada aplikasi IB.

Syarat resipien yang digunakan untuk program twinning :

- a. Memiliki kondisi reproduksi yang baik
- b. Sapi dara atau induk dengan umur maksimal 7 tahun
- c. Performa tubuh baik dengan siklus berahi normal
- d. Tidak terjangkit penyakit menular
- e. Terdapat CL fungsional setelah dilakukan pemeriksaan palpasi rektal
- f. Berada pada kawasan *Village Breeding Center* (VBC) dengan sistem monitoring yang intensif

8. Pemeriksaan Kebuntingan (PKb)

Pemeriksaan kebuntingan dilaksanakan 2 (dua) sampai 3 (tiga) bulan setelah pelaksanaan aplikasi TE. Setelah dilaksanakan pemeriksaan kebuntingan petugas melaporkan hasil pemeriksaannya. Pelaksana kegiatan PKb adalah seksi yantek pemeliharaan ternak dan yang melakukan pelaporan adalah seksi Informasi dan Penyebaran Hasil.

G. PEMBERIAN SARAN TEKNIK PRODUKSI DAN TRANSFER EMBRIO

Kegiatan memberikan saran teknik produksi dan aplikasi TE diberikan pada *Stakeholder* yang merencanakan atau telah melakukan kegiatan produksi dan transfer embrio di daerah. Saran teknik produksi dan transfer embrio diberikan jika menurut perencanaan atau hasil evaluasi kegiatan yang telah dilakukan, ada tahap kegiatan, bahan atau media yang digunakan dianggap belum optimal atau perlu mendapatkan perbaikan. Semua saran teknik yang diberikan mengacu pada SOP dari masing-masing kegiatan yang dilakukan. Bentuk pemberian saran teknik ini dapat berupa:

1. Kunjungan ke lapangan

Saran teknik dilakukan dengan melakukan dialog langsung antara petugas BET Cipelang dengan *Stakeholder* di daerah saat melakukan kegiatan produksi dan atau transfer embrio di lapangan.

2. Kunjungan ke BET Cipelang

Saran teknik diberikan kepada *Stakeholder* yang sedang berkunjung ke BET Cipelang.

3. Surat atau surat elektronik

Saran teknik diberikan dengan membalas surat, surat elektronik (email) atau BET Cipelang secara aktif memberikan beberapa saran teknis kegiatan yang sebaiknya dilakukan sebelum kegiatan utama dilaksanakan

4. Informasi melalui website

Website BET Cipelang yang beralamatkan di betcipelang.ditjenpkh.pertanian.go.id menyediakan banyak informasi yang berhubungan dengan produksi dan transfer embrio. *Stakeholder* di lapangan dapat menggunakan media ini untuk mendapatkan informasi/saran teknik terkait teknologi produksi dan transfer embrio. Pertanyaan juga dapat dikirimkan melalui menu yang tersedia pada website ini.

H. JUSTIFIKASI PENGGUNAAN BAHAN DAN MEDIA KEPERLUAN PRODUKSI EMBRIO YANG KADALUARSA

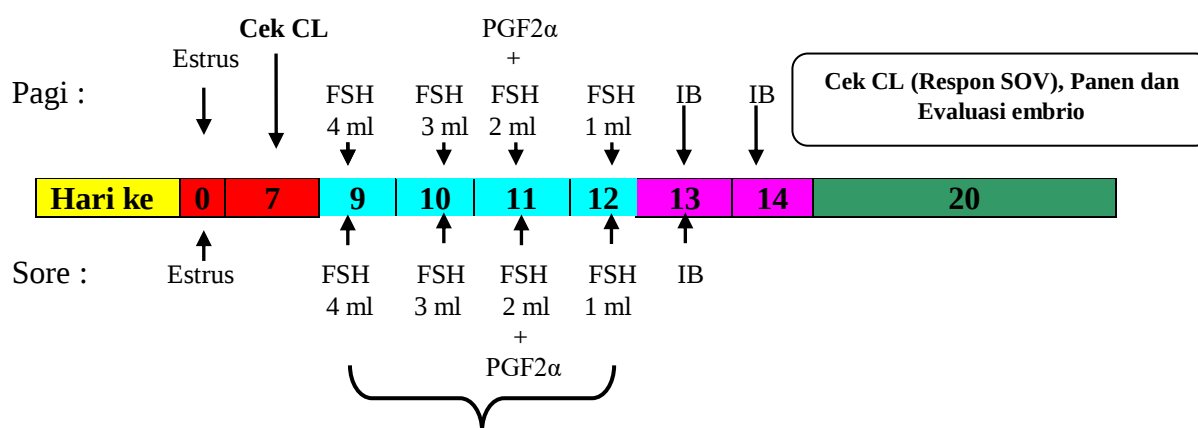
Bahan dan media produksi embrio yang telah melewati tanggal kadaluarsa masih dapat digunakan kembali setelah dilakukan pemeriksaan dan justifikasi oleh dokter hewan. Pemeriksaan bahan dan media dilakukan terhadap bentuk, warna, bau, pH dan homogenitas. Apabila tidak terjadi perubahan terhadap bentuk, warna, bau dan pH, tidak terbentuk kristalisasi dan tidak ada perubahan dari bening menjadi keruh (berubah) maka masih dapat dimanfaatkan. Namun apabila terjadi perubahan dari satu atau lebih kriteria tersebut diatas maka tidak dapat dipergunakan.

Bahan dan media yang sudah tidak dapat dipergunakan dikumpulkan dan diserahkan ke bagian pengelola limbah Balai Embrio Ternak disertai Berita Acara Serah Terima Barang, untuk dilakukan pemusnahan sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Lampiran untuk Point 2. Pelaksanaan Produksi Embrio In Vivo

Protokol 1. Standar BET Cipelang (Standar JICA) Berdasar Berahi Alam

Metode Superovulasi Berdasarkan Berahi Alam



FSH /20ml pelarut

Penjelasan :

Hari ke:	Waktu	Perlakuan	Keterangan
0	Pagi	Estrus	
7	Pagi	Cek CL ➡ ada CL = Layak	
9	Pagi	Iject 4 ml FSH	
	Sore	Iject 4ml FSH	
10	Pagi	Iject 3 ml FSH	
	Sore	Iject 3ml FSH	
11	Pagi	Iject 2 ml FSH dan PGF2α	
	Sore	Iject 2 ml FSH dan PGF2α	
12	Pagi	Iject 1ml FSH	
	Sore	Iject 1 ml FSH	
13	Pagi	IB	
	Sore	IB	
14	Pagi	IB	
20	Pagi	Flushing dan Inject PGF2α	

Protokol 2. Standar BET Cipelang (Standar JICA) Berdasarkan Sinkronisasi Berahi menggunakan Preparat Progesteron (PIRD) dan Penyuntikan SOV secara *Intramuskuler*.

Superovulasi Berdasarkan Sinkronisasi Cue-Mate Dengan Penyuntikan Dua kali sehari dosis menurun

Pagi	Pasang Cue-Mate	FSH 4 ml	FSH 3 ml	FSH 2 ml + PGF2 α	FSH 1 ml +	IB	IB	Panen dan evaluasi embrio
Hari ke	0	9	10	11	12	13	14	20
Sore		FSH 4 ml	FSH 3 ml	FSH 2 ml + PGF2 α + Cabut CIDR	FSH 1 ml	IB		

FOLLTROPIN 400mg /20ml pelarut

Penjelasan :

Hari ke:	Waktu	Perlakuan	Keterangan
0	Pagi	Pasang Cue-Mate	
9	Pagi	Iject 4 ml FSH	
	Sore	Iject 4ml FSH	
10	Pagi	Iject 3 ml FSH	
	Sore	Iject 3ml FSH	
11	Pagi	Iject 2 ml FSH dan PGF2 α	
	Sore	Iject 2 ml FSH, Inject PGF2 α dan Cabut Cue-Mate	
12	Pagi	Iject 1ml FSH	
	Sore	Iject 1 ml FSH	
13	Sore	IB	
14	Pagi	IB	
20	Pagi	Flushing dan Inject PGF2 α	