

Jumlah dan Kualitas Embrio Sapi Brahman Cross Setelah Pemberian Hormon FSH dan PMSG

(The Quantity and Quality of Brahman Cross Cattle Embryo After Injected FSH and PMSG)

Adriani*, B Rosadi dan Depison

Fakultas Peternakan Universitas Jambi, Jl. Jambi Muaro Bulian Km 15 Mandalo Darat Jambi 36361
Penulis koresponden email: adrianiyogaswara@yahoo.com

Abstract. Twenty cattles were used in this experiment to determine the quantity and quality of embryo after injected FSH (*follicle stimulating hormone*) and PMSG (*pregnant mare serum gonadotrophin*) in Brahman Cross Cattle. The experiment was assigned into Completely Randomized Design with 5 treatments and 4 replications. The treatments were $T_1 = 4$ mg of FSH twice a day intra-ovary decreased doses, $T_2 = 8$ mg of FSH twice a day intra-ovary decreased doses, $T_3 = 300$ IU of PMSG single dose intra-ovary, $T_4 = 600$ IU of PMSG single dose intra-ovary, $T_5 = 40$ mg of FSH twice a day intramuscular decreased doses. Trial cattle were oestrus synchronized using 15 mg of PGF 2α that gave twice at 11-daily intervals. One day after giving FSH and PMSG was detected the cattle's oestrus. Washing uterus was done at day 7 after AI using mixture of PBS, FCS and streptomycin. Data observed were cow performances, embryo quantity and embryo quality. Results of experiment showed that 19 cattle (95%) responded oestrus synchronized treatment and super ovulation, whereas 1 cattle (5%) did not respond oestrus synchronized treatment and super ovulation. Generally, cattle showed oestrus at 2 – 3 days after giving PGF 2α . Eleven cattle (57,90%) showed oestrus at 2 days after giving PGF 2α whereas the others (8 cattle, 42,10%) showed oestrus 3 days giving PGF 2α . The treatment of giving FSH and PMSG could increase ($P < 0,05$) embryo. T_5 was highest compared the others (T_1, T_2, T_3 and T_4), while T_2 and T_4 were higher than T_1 and T_3 . Produced total embryo was 82 with average $4,3 \pm 5,67$ using FSH and PMSG. 8 embryo (9,76%), 9 embryos (10,90), 20 embryo (24,40%), 16 embryo (19,50%) and 29 embryos (35,40%) were grade A, B, C, D and E respectively. It is concluded that giving of 40 mg FSH intramuscular produce the best embryo donor whereas and giving of FSH 8 mg intraovari was the best efficiency.

Key Words : Brahman Cross Cattle, embryo, PGF 2α PMSG, FSH

Pendahuluan

Teknologi reproduksi sudah lama diketahui dan dimanfaatkan untuk meningkatkan populasi dan mutu genetik sapi, terutama teknologi generasi pertama berupa inseminasi buatan (IB) dan teknologi reproduksi generasi kedua yaitu embrio transfer. Teknologi embrio transfer memberikan keuntungan ganda, yaitu dapat memfasilitasi peningkatan mutu genetik ternak sekaligus memperoleh sapi yang berkualitas genetik tinggi dalam jumlah besar baik dari pejantan maupun dari betina unggul (Gordon, 1996; Perry *et al.*, 2007; Echterkamp *et al.*, 2007). Keuntungan lainnya dari embrio transfer adalah memudahkan embrio didistribusi antar wilayah bahkan antar negara dalam keadaan beku, sehingga tidak perlu mengangkut ternak hidup dalam jarak yang

jauh. Dapat menyediakan stok bibit yang dapat dijual dalam jumlah yang lebih besar, dan eksploitasi perkembangan teknologi reproduksi seperti seksing embrio dan pembelahan embrio (Gordon, 1996; Pfister-Genskow *et al.*, 2004; Lucifero *et al.*, 2006). Tentunya dengan aplikasi teknologi reproduksi tersebut memberikan keuntungan praktis dalam meningkatkan kapasitas reproduksi sapi dengan mutu genetik tinggi sehingga akselerasi peningkatan mutu bibit lebih mudah tercapai.

Teknologi reproduksi yang merupakan rangkaian kegiatan *moultiple ovulation and embryo transfer* (MOET) meliputi kegiatan sinkronisasi estrus, superovulasi, kriopreservasi, kloning dan embrio transfer, serta rekayasa embrio banyak dilakukan pada sapi perah (Gordon, 1996; Pfister-Genskow *et al.*, 2004), masih sedikit data ilmiah pendukung penerapan

teknologi reproduksi pada sapi Brahman cross khususnya yang dipelihara di daerah tropis dengan kondisi lapangan. Salah satunya dengan memanfaatkan teknologi reproduksi dalam memproduksi embrio yang berkualitas baik dengan jumlah yang banyak.

Supaya embrio yang didapat melebihi kemampuan alami sapi terutama untuk sapi-sapi unggul, maka dilakukan teknik superovulasi untuk meningkatkan jumlah ovum yang diovulasikan dengan pemberian hormon secara eksogen (Ginter *et al.*, 2002; Duggavathi *et al.*, 2005). Hormon utama yang umum untuk superovulasi adalah FSH dan PMSG. Hormon ini merupakan gonadotropin yang telah digunakan secara ekstensif sebagai preparat untuk menghasilkan ovulasi yang lebih banyak dari kondisi alaminya (superovulasi) dengan hasil yang bervariasi (Guilbault *et al.*, 1992; Bo *et al.*, 1998; Lucifero *et al.*, 2006). Secara umum pemakaian hormon secara eksogen relatif mahal, sehingga perlu dicarikan metode pemberian yang lebih hemat. Pemberian hormon secara intramuskuler sudah umum digunakan, namun pemakaian secara intraovari belum banyak dilakukan. Cara ini lebih menguntungkan karena hormon yang digunakan lebih sedikit. Hasil penelitian Adriani *et al.* (2006) mendapatkan penggunaan FSH dosis 2 mg dan 4 mg secara intraovari pada sapi Simbrah menghasilkan corpus luteum (CL) lebih rendah daripada 40 mg secara intramuskuler.

Berdasarkan pemikiran di atas, maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian hormon FSH dan PMSG terhadap jumlah dan kualitas embrio pada sapi Brahman Cross.

Metode Penelitian

Percobaan menggunakan 20 ekor sapi Brahman cross dalam kisaran umur 3 - 6 tahun, mempunyai bobot badan antara 332–85 kg, mempunyai siklus birahi yang normal berdasarkan pengamatan 2 kali birahi, pernah beranak 1-2 kali, dan tidak mempunyai riwayat penyakit reproduksi. Dua bulan sebelum perlakuan dimulai sapi-sapi percobaan dipelihara secara intensif untuk menyeragamkan kondisi tubuh dan penyesuaian sapi dengan kondisi lingkungan percobaan. Selama pemeliharaan secara

intensif sapi-sapi percobaan mendapat tambahan pakan konsentrat sebanyak 3 kg/ekor/hari sampai selesainya percobaan. Setelah percobaan berlangsung 2 bulan dilakukan sinkronisasi birahi dengan menggunakan 15 mg PGF₂α sebanyak dua kali dengan interval 11 hari.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok yang terbagi menjadi 5 perlakuan yang terdiri atas 4 kelompok ulangan. Perlakuan dimulai hari ke-9 (h-0 saat estrus). Perlakuan terdiri atas T₁ = 4 mg FSH, 2x sehari i.o. dosis menurun 0.7, 0.6, 0.4, 0.3 selama 4 hari, 15 mg PGF₂α (h-12). T₂ = 8 mg FSH 2 x sehari i.o. dosis menurun 1.4, 1.2, 0.8, 0.6 selama 4 hari, 15 mg PGF₂α (h-12)., T₃ = 300 IU PMSG dosis tunggal i.o. 15 mg PGF₂α pada H-12; 250 µg GnRH saat estrus, T₄ = 600 IU PMSG dosis tunggal i.o 15 mg PGF₂α pada H-12; 250 µg GnRH saat estrus dan T₅ = 40 mg FSH, 2 x sehari i.m. dosis menurun 7, 6, 4, 3 selama 4 hari, 15 mg PGF₂ α (h-12)

IB dilakukan 2 kali yaitu inseminasi pertama setelah 12 jam tanda-tanda birahi terlihat, kemudian dilakukan lagi 12 jam berikutnya untuk menjamin terjadinya fertilitas yang tinggi.

Pada hari ke tujuh pasca IB dilakukan panen embrio dengan cara pembilasan uterus (*flushing*). Pembilasan uterus dilakukan dengan menggunakan medium *bovine buffer saline* sebanyak 500 ml yang ditambah dengan 1% FCS (*fecal calf serum*) dan 5 ml *streptomycin*. Sapi donor yang dipanen atau *diflusing* ditempatkan pada kandang jepit untuk memudahkan penanganan, pembilasan uterus, dan pemeriksaan jumlah CL.

Alat yang digunakan pada proses *flushing* adalah kateter foley dengan cara memasukkan kateter ke dalam kornua uteri melalui servix. Setelah kateter memasuki cornua uteri, maka dilakukan pemompaan udara sebanyak 10 – 20 ml ke dalam balon pada ujung karet kateter (tergantung pada ukuran uterus)

Setelah terfiksir dengan baik, maka pembilasan uterus dilakukan dengan memasukkan cairan medium sekitar 400 – 500 ml pada setiap cornua uteri. Proses pemasukan dan pengeluaran cairan ke dalam kornua uteri dilakukan beberapa kali dengan spuit plastik yang disambung dengan pipa karet. Setelah dilakukan pengurutan pada bagian apek cornua

uterus, cairan yang masuk segera dikeluarkan kembali ditampung ke dalam tabung volume 500 ml yang sudah disterilkan. Setiap akhir dari pembilasan uterus dilakukan pengisapan larutan yang mungkin masih tertinggal di dalam uterus dengan menggunakan spuit. Pada saat pembilasan uterus selesai, udara dari dalam balon karet dikeluarkan dengan melepas tutup udara dan kateter ditarik keluar secara perlahan.

Cairan hasil pembilasan uterus secepatnya dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan embrio. Jika cairan pembilasan uterus ini belum dapat diperiksa langsung, maka cairan ini harus ditempatkan pada *water bath* dengan menggunakan suhu 37°C. Proses pemeriksaan embrio yang diperoleh dengan cara menyaring cairan pembilasan menggunakan filter embrio ukuran 22 mikron, sehingga cairan yang tertinggal dalam filter embrio setinggi 1 – 2 cm. Setelah itu cairan pembilasan ini dituangkan ke dalam cawan petri untuk diperiksa di bawah mikroskop stereo.

Setelah embrio didapat dilakukan seleksi terhadap kualitas embrio berdasarkan penampilan morfologisnya. Hasil seleksi embrio ini dikelompokkan berdasarkan grade dari A sampai dengan grade E (Tabel 1).

Variabel dan Analisis Statistik

Variabel yang diukur adalah lamanya muncul birahi setelah perlakuan, jumlah embrio yang berhasil dipanen, dan kualitas embrio yang dihasilkan.

Keragaman semua data yang dikumpulkan selama penelitian, serta pengaruh perlakuan yang diberikan dianalisis menggunakan sidik ragam sesuai dengan rancangan yang digunakan (Steel dan Torrie, 1991).

Hasil dan Pembahasan

Sinkronisasi Birahi

Sinkronisasi birahi menggunakan PGF2 α dua kali injeksi dengan interval 11 hari memberi respons yang baik dengan angka 95% sapi (19 sapi birahi). Sementara 5% sapi (1 ekor) tidak memberikan respons. Hasil penelitian ini sama dengan beberapa hasil penelitian terdahulu yaitu keberhasilan birahi dengan sinkronisasi pada sapi berkisar antara 62 – 100% (Pazaran, 1989; Xu dan Burton, 2000; Walsh *et al.*, 2007). Sementara pemberian PGF2 α pada kambing menghasilkan angka birahi sebesar 88.2 - 100% (Artiningsih *et al.*, 1996 Adriani *et al.*, 2003).

Umumnya sapi memperlihatkan tanda-tanda birahi setelah 2 - 3 hari pemberian PGF2 α . Sebanyak 11 ekor sapi (57,90%) memperlihatkan tanda-tanda birahi setelah 2 hari pemberian PGF2 α , sementara sebanyak 8 ekor (42,11%) sapi lainnya memperlihatkan tanda-tanda birahi setelah 3 hari pemberian PGF2 α . Hasil ini relatif sama dengan beberapa hasil penelitian pada sapi FH yang muncul birahi setelah pemberian PGF2 α sekitar 39 – 56 jam (Hartantyo, 1983; Bader *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2007). Menurut Suzuki dan Santo (1985) bahwa sapi yang telah diberi PGF2 α akan timbul birahi 2 – 3 hari berikutnya.

Produksi Embrio

Berdasarkan kegiatan sinkronisasi birahi dan pemberian beberapa hormon eksogen FSH dan PMSG untuk merangsang ovulasi dan embrio yang berhasil dipanen berdasarkan perlakuan pada sapi Brahman Cross disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Kualitas embrio berdasarkan penampilan morfologisnya

No.	Grade	Penampilan Morfologis
1.	A (excellent)	Konformasi umum sempurna, embrio bersih, granulasi sempurna
2.	B (good)	Konformasi umum sempurna, embrio bersih, terdapat sedikit debris di dalam embrio
3.	C	Konformasi umum baik, sebagian kecil sel embrio degenerasi, terdapat sedikit debris di dalam embrio
4.	D	Konformasi kurang baik, sebagian sel embrio degenerasi, terdapat banyak debris di dalam embrio
5.	E	Konformasi jelek, sebagian besar atau sel embrio rusak, banyak debris di dalam embrio

Sebanyak 17 ekor sapi (89,50%) di *flushing* pada hari ke tujuh setelah inseminasi buatan, sementara 2 ekor (10,50%) tidak di *flushing*. Masing-masing perlakuan T₁, T₃ dan T₄ hanya dilakukan pada 3 ekor sapi, sementara pada perlakuan T₂ dan T₅ dilakukan *flushing* pada semua sapi. Tidak dilakukannya *flushing* pada 2 ekor sapi tersebut disebabkan ukuran serviknya kecil sehingga sulit dilalui oleh kateter pembilas. Disamping itu jumlah CL yang dihasilkan sedikit, sehingga tidak efisien untuk proses *flushing*.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian FSH dan PMSG meningkatkan jumlah embrio yang dihasilkan ($P < 0,05$). Perlakuan T₅ memberikan pengaruh nyata lebih tinggi daripada perlakuan T₁, T₂, T₃ dan T₄. Sementara perlakuan T₂ dan T₄ nyata lebih tinggi daripada perlakuan T₁ dan T₃. Jumlah embrio total yang dipanen pada penelitian ini sebanyak 82 dengan rata-rata $4,30 \pm 5,67$ dan kisaran embrio yang diperoleh 3 – 26. Hasil penelitian ini relatif sama dengan Takadomi *et al.* (1993) yang memperoleh rata-rata embrio $4,80 \pm 2,30$ pada perlakuan 30 mg FSH dosis berulang dua kali sehari. Rataan embrio yang diperoleh dari penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian terdahulu pada sapi Simbrah yang mendapatkan rata-rata embrio 1.3 per donor (Adriani *et al.*, 2006). Menurut Screenan (1983) bahwa ovulasi dapat berkisar antara 0 – 53.

Secara umum pemberian PMSG menghasilkan embrio yang lebih rendah dibandingkan dengan sapi yang diberi FSH. Adanya PMSG dalam sirkulasi darah setelah

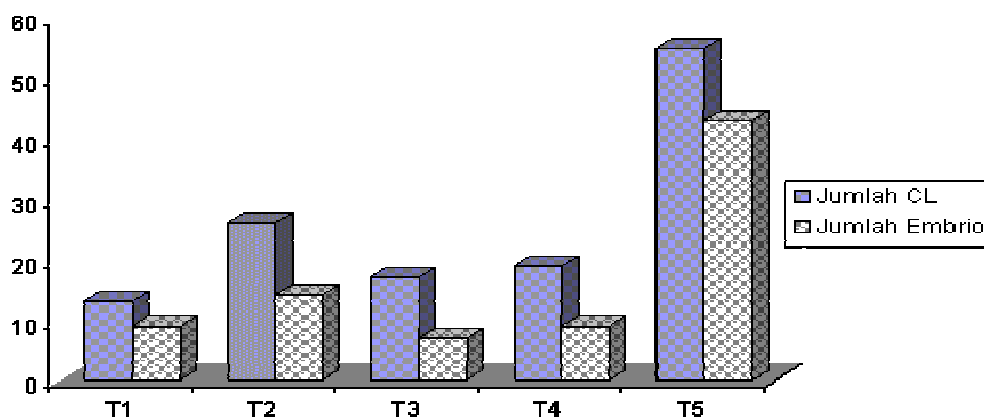
ovulasi berpengaruh negatif terhadap embrio. Pemberian PMSG menimbulkan konsentrasi estradiol lebih tinggi dibandingkan dengan FSH. Selain itu kemungkinan disebabkan oleh variasi respons antara individu dalam satu spesies, perbedaan potensi, jenis, dan kemurnian preparat gonadotropin (Bowen dan Pidenda, 1989).

Perbandingan antara jumlah embrio yang berhasil dipanen dengan jumlah CL yang dihasilkan adalah 82 : 130 (63,10%). Berdasarkan masing-masing perlakuan perbandingan antara embrio yang berhasil dipanen dengan jumlah CL yang dihasilkan dari persentase terbesar berturut-turut adalah perlakuan T₅ dengan perbandingan 43 : 55 (78,20%), kemudian perlakuan T₁ dengan perbandingan 9 : 13 (69,20%), T₂ dengan perbandingan 14 : 26 (53,80%), T₄ dengan perbandingan 9 : 19 (47,40%) dan perbandingan paling kecil adalah perlakuan T₃ sebesar 7 : 17 (41,20%) (Gambar 1).

Hasil ini lebih tinggi daripada penelitian terdahulu yang mendapatkan embrio sebanyak 53% dari CL yang ada (Schmitz, 1986). Pada Simbrah yang mendapatkan embrio sebanyak 26,80% dari jumlah CL yang ada (Adriani *et al.*, 2006). Adanya embrio yang tidak ditemukan diduga karena ova yang diovulasikan tidak dapat ditangkap oleh fimbriae atau ova tertahan dalam tuba fallopii sehingga tidak sampai ke uterus. Newcomb (1980) menyatakan bahwa adanya embrio yang tidak ditemukan dapat terjadi karena rusaknya embrio sehingga zona pellusida berpisah dengan blastomer dan menyulitkan pencarian embrio.

Tabel 2. Jumlah embrio pada sapi Brahman Cross berdasarkan perlakuan pemberian hormon FSH dan PMSG

Perlakuan	Jumlah sapi (ekor)	Jumlah Embrio	Jumlah CL	Rataan Embrio	Sapi yang Dibilas
T ₁	4	9	13	$2,25 \pm 1,71$ c	3
T ₂	4	14	26	$3,50 \pm 3,79$ b	4
T ₃	4	7	17	$1,75 \pm 1,26$ c	3
T ₄	3	9	19	$3,00 \pm 2,50$ b	3
T ₅	4	43	55	$10,75 \pm 10,24$ a	4
Jumlah	19	82	130	$4,30 \pm 5,67$	17



Gambar 1. Jumlah CL dan jumlah embrio sebagai respons pemberian hormon FSH dan PMSG

Tabel 3. Kualitas Embrio pada Sapi Brahman Cross Berdasarkan Perlakuan pemberian hormon FSH dan PMSG

Perlakuan	Sapi yang dibilas	Jumlah Embrio	Kualitas Embrio				
			A	B	C	D	E
T ₁	3	9	1	1	2	2	3
T ₂	4	14	3	2	6	1	2
T ₃	3	7	-	1	1	-	5
T ₄	3	9	-	1	3	2	3
T ₅	4	43	4	4	8	11	16
Jumlah	17	82	8	9	20	16	29

Persentase embrio yang ditemukan dengan perlakuan yang diberikan PMSG (T₃ dan T₄) lebih rendah yaitu 41,20% dan 47,40% dibandingkan pemberian FSH. Hal ini diduga karena sapi yang mendapat perlakuan PMSG banyak terdapat lendir dan darah yang ikut bersama cairan pembilasan sehingga menyulitkan pencarian embrio. Produksi lendir ini dipengaruhi oleh hormon estrogen yang dihasilkan sebagian folikel yang belum ovulasi, karena waktu paruh PMSG yang lebih panjang yaitu antara 5 – 6 hari (Gordon, 1996).

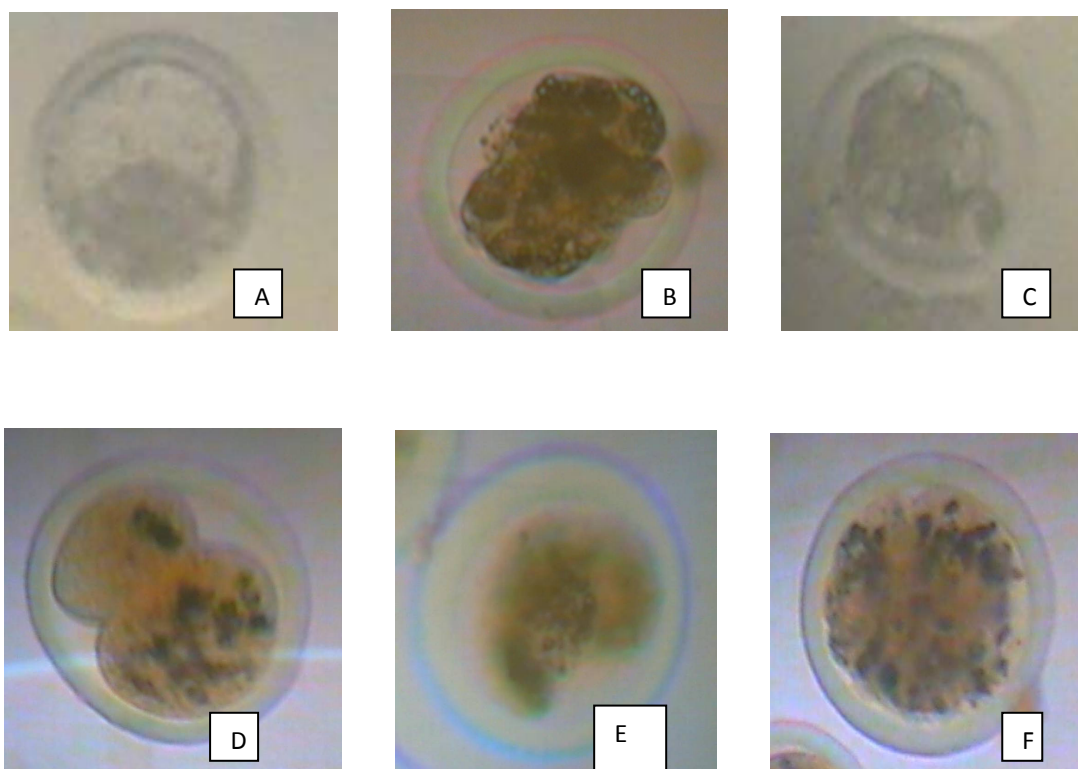
Kualitas Embrio

Kualitas embrio yang diperoleh pada sapi Brahman cross berdasarkan perlakuan pemberian hormon FSH dan PMSG disajikan pada Tabel 3.

Keseluruhan percobaan menggunakan FSH dan PMSG berhasil ditemukan total embrio sebanyak 82. Dari jumlah tersebut sebanyak 8 embrio (9,76%) termasuk grade A, sebanyak 9

embrio (10,90%) termasuk grade B, sebanyak 20 embrio (24,40%) termasuk grade C, sebanyak 16 embrio (19,50%) termasuk grade D dan sebanyak 29 embrio (35,40%) termasuk grade E.

Embrio yang akan ditransfer ke resipien adalah embrio grade A, B dan C, sedangkan embrio grade D dan E tidak digunakan. Penelitian ini menghasilkan 37 embrio (45,10%) yang akan ditransfer ke resipien, sementara sebanyak 45 embrio (54,99%) tidak ditransfer. Sapi yang paling banyak menghasilkan embrio yang layak transfer adalah perlakuan T₅ sebanyak 16 (43,20%), kemudian diikuti perlakuan T₂ sebanyak 11 (29,70%), perlakuan T₁ sebanyak 4 (10,80%), perlakuan T₄ sebanyak 4 (10,80%), dan terakhir perlakuan T₃ sebanyak 2 (5,40%). Berdasarkan kualitas embrio yang diperoleh, maka perlakuan menggunakan 8 mg FSH dan 40 mg FSH mendapatkan kualitas yang jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Gambar 2).



Gambar 2. Embrio berdasarkan Kualitasnya

Berdasarkan biaya yang dikeluarkan untuk menghasilkan embrio layak transfer, maka perlakuan 8 mg FSH memberikan biaya paling murah yaitu sekitar Rp. 100.000,- per embrio. Sementara perlakuan 40 mg FSH mengeluarkan biaya Rp. 198.000,- per embrio. Perhitungan ini hanya berdasarkan pemakaian hormon saja. Namun jumlah embrio yang dihasilkan per ekor sapi donor terdapat pada perlakuan T5 (40 mg FSH).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbanyak dalam memproduksi embrio layak transfer per ekor sapi adalah 40 mg FSH, sementara perlakuan paling ekonomis dalam menghasilkan embrio layak transfer 8 mg FSH per ekor sapi.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan pada DP2M DIRJEN DIKTI atas Dana penelitian melalui Hibah Bersaing dengan nomor kontrak 007/SP2H/DP2M/III/2008 tanggal 6 Maret

2008. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada kepala Balai Pembibitan Ternak Unggul Dwiguna Sapi dan Ayam Sembawa Palembang beserta staf dan Kepada Balai Embrio Transfer Cipelang Bogor beserta staf yang telah banyak membantu sarana dan prasarana serta tenaga sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

Daftar Pustaka

- Adriani A, Sudono, T Sutardi, W Manalu dan I-K Utama. 2003. Optimalization of kids and milk yield of Etawah-Grade does by superovulation and zinc supplementation. *J. Forum Pascasarjana IPB* 26:335-352.
- Adriani A, Sudono, T Sutardi, W Manalu dan I-K Utama. 2004. The effect of superovulation and dietary zinc in does on the prepartum and postpartum growth of her kids. *J. Pengembangan Peternakan Tropis* 29:177-183.
- Adriani A, Depison, B Rosadi, Y Supriondo dan Isroli. 2006. Peningkatan Populasi Sapi Simbrah melalui Bioteknologi Reproduksi dan Penyimpanan Embrio Beku. *J. Penelitian Universitas Jambi Seri Sains* 8:55-62.

- Artiningsih MN, B Purwantara, RK Achjadi dan IK Utama. 1996. Effect of pregnant mare serum gonadotrophin injection on litter size young Etawah-cross does. *J. Ilmu Ternak dan Vet.* 2:11-16.
- Bader JF, FN Kojima, DJ Schafer, JE Stegner, MR Eilersieck, MF Smith, and DJ Patterson, 2005. A comparison of progestin-based protocols to synchronize ovulation and facilitate fixed-time artificial insemination in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 83:136-143
- Bo GA, H Tribulo, M Caccia and R.Tribullo. 1998. Superovulatory response of beef heifers treated with estradiol benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal device. *Theriogenology* 49: 375 (Abst).
- Duggavethi R, PM Bartlewski, E Agg, S Flint, DMW Barrett, and NC Rawlings. 2005. The effect the manipulation of follicle stimulating hormone (FSH)-peak characteristics on follicular wave dynamics in sheep: Does an ovarian-independent endogenous rhythm in FSH secretion exist. *Biol. Reprod.* 72:1466-1474.
- Echternkamp SE, RA Cushman, MF Allan, RM Thallman and KE Gregory. 2007. Effects of ovulation rate and fetal number on fertility in twin-producing cattle. *J. Anim. Sci.* 85:3228-3238.
- Ginter OJ, DR Bergfelt, MA Beg, and K Kot, 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reprod.* 124:474-482.
- Gordon I. 1996. Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. CAB International, Oxon, UK.
- Guiltbault LA, JG Lussier and F Grasso. 1992. Interrelationship of hormonal and ovarian responses in superovulated response heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 37: 1027-1040.
- Hartantyo S, S Subagyo dan M Untoro. 1983. Pengaruh Prostaglandin terhadap Performans Reproduksi Sapi PO. *Proc. Pertemuan Ilmiah Ruminansia Besar.* Puslitbangnak, Balitbang, Deptan. Bogor.
- Lucifero D, J Suzuki, V Bordignon, J Martel, C Vigneault, J Therrien, LC Smith, and JM Trasler. 2006. Bovine NSRPN methylation imprint in oocyte and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol. of Reprod.* 75: 531-538.
- McMillan KL, RI Henry, VK Terife, and P Philips. 1990. Calving patterns in seasonal dairy herds. *New Zealand Veterinary J.* 38:151-155.
- Pazaran HAG. 1989. Effect of reduction doses of PGF 2 α administered into the uterus of Holstein Frisian cows. *Anim. Bredd. Abstr.* 57: 294.
- Perry GA, MF Smith, AJ Roberts, MD MacNeil, and TW Geary. 2007. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85:684-689.
- Pfister-Genskow M, C Mayer, LA Childs, JC Larson, T Peterson, and JM Betthaoser. 2005. Identification of differentially expressed genes in individual bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer; Improper Reprogramming of gene required for development. *Biol. of Reprod.* 72: 546-555.
- Steel RGD dan JH Torrie. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT. Gramedia. Pustaka Utama Jakarta.
- Suzuki T and H Santo 1985. A Textbook for the Training Course in cattle Embryo Transfer. Fukushima National Livestock Breeding Station. Japan International Cooperation Agency.
- Takadomi T, Y Aoyagi, M Konishi, H Kishi, K Taya, G Watanabe, and S Sasamoto. 1993. Superovulation in Holstein heifers by single injection of FSH using PVP. *Theriogenology* 39: 327 (Abst).
- Walsh RB, SJ LeBlanc, TD Duffield, DF Kelton, JS Walton and KE Leslie. 2007. Synchronization of estrus pregnancy risk in anestrous dairy cow after treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. *J. Dairy Sci.* 90:1139-1148.
- Xu ZZ, and LJ Burton. 2000. Estrus Synchronization of Lactating Dairy Cows with GnRH, Progesterone, and Prostaglandin F2 α . *J. Dairy Sci.* 83:471-476.