(7)

LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING VIII/3
TAHUN ANGGARAN 1999/2001

PENINGKATAN POPULASI DAN MUTU GINETIK MELALUI PRODUKSI KEMBAR IDENTI 4 DAN 8 EMBRIO HASIL FERTILITASI *IN VITRO* SAPI MADURA

Peneliti :

SUZANITA UTAMA, M.Phil., drh

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 003/ XXIII/1/ /2001 Tanggal 1 Januari 2001
Kontrak Nomor : 037/P2IPT/HB/III/2001
Nomor Urut : 01

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

JUNI 2001

LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING VIII/3
TAHUN ANGGARAN 1999/2001

PENINGKATAN POPULASI DAN MUTU GINETIK MELALUI PRODUKSI KEMBAR IDENTI 4 DAN 8 EMBRIO HASIL FERTILITASI *IN VITRO* SAPI MADURA

Peneliti :

SUZANITA UTAMA, M.Phil., drh.
Prof. Dr. LABA MHAPUTRA, M.Sc.
IMAM MUSTOFA, M.Kes.,drh.
PUJISRIANTO, M.Kes.,drh.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 003/ XXIII/1/ /2001 Tanggal 1 Januari 2001
Kontrak Nomor : 037/P2IPT/HB/III/2001
Nomor Urut : 01

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

JUNI 2001

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING

A. Judul Penelitian : Peningkatan populasi dan mutu genetik melalui produksi kembar identik 4 dan 8 embrio hasil fertilisasi *in vitro* sapi Madura

B. Ketua Peneliti
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Suzanita Utama, MPhil., drh.
   b. Jenis Kelamin : Perempuan
   c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata/III-c/131877883
   d. Bidang Keahlian : Reproduksi - Fertilisasi *in vitro*
   e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
   f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga, Surabaya

C. Tim Peneliti

NAMA	Bidang Keahlian	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1. Dr.LabaMahaputra, MSc.	Endokrinologi	FKH/Kebidanan	Unair
2. Imam Mustofa, MKes., drh.	Reproduksi	FKH/Kebidanan	Unair
3. Pudjisrianto, MKes., drh.	Transfer embrio	FKH/Kebidanan	Unair

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
   Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun
   Biaya total yang diusulkan : Rp. 80.000.000,-
   Biaya yang disetujui tahun 2001 : Rp. 12.000.000,-

Surabaya, 21 Juni 2001

Ketua Peneliti,

Suzanita Utama, MPhil., drh.
NIP. 131 877 883

Mengetahui,
Dekan Fakultas

Dr. Ismudiono, MS., drh.
NIP. 130 687 297

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS., drh.
NIP. 130 701 125

RINGKASAN

PENINGKATAN POPULASI DAN MUTU GENETIK MELALUI PRODUKSI KEMBAR IDENTIK 4 DAN 8 EMBRIO HASIL FERTILISASI *IN VITRO* SAPI MADURA **

(Utama, S.* , Mahaputra, L.*, Mustofa, I.*, dan Srianto, P.*, 47 halaman)

Sebagai ternak asli Indonesia, sapi Madura mempunyai kemampuan konversi makanan yang baik, efisiensi reproduksi yang tinggi, serta kualitas karkas yang baik. Dalam kenyataannya sekarang sulit dicari sapi Madura dengan kualitas prima, demikian pula populasinya jauh dari mencukupi kebutuhan konsumsi.

Sejauh ini penelitian telah dilakukan untuk memproduksi embrio sapi Madura berkualitas secara masal dengan teknologi fertilisasi *in vitro* digabung dengan kloning skala kecil (Tahun-1) sedangkan penelitian ini merupakan penelitian lebih lanjut (Tahun-2) yang akan melengkapi dan menyempurnakan.

Penelitian ini bertujuan mencari prosedur pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 yang lebih sedikit menimbulkan gangguan perkembangan, mengetahui kualitas embrio belah dengan kriteria morfologi, persentase blastosis dan jumlah sel total blastosis setelah pembekuan, melihat angka kebuntingan setelah transfer embrio belah dengan dan tanpa zona pelusida pengganti.

Embrio sapi Madura diproduksi secara *in vitro*, dan 42 jam setelah inseminasi, embrio 4 sel dipanen untuk dibelah menjadi 4 dan pada hari-5 embrio 32 sel dipanen untuk dibelah menjadi 8. Hasil penelitian pendahuluan ini menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara persentase blastosis dari kelompok embrio belah-8 dengan kelompok embrio utuh (kontrol) dan embrio belah-4, sedangkan antara kelompok embrio utuh dengan embrio belah-4 tak terdapat perbedaan ($p > 0,05$).

---

* Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
** HB VIII/3Tahun 2001 No. 037/P2IPT/III/2001

Pada percobaan kedua, pada hari-6 embrio belah-4 dan embrio belah-8 dibekukan dalam nitrogen cair selama 14 hari dengan kombinasi teknik vitrifikasi dan *open pulled straw* (OPS). Krioprotektan berupa kombinasi ethylene glygol (EG) dan dimethyl sulphoxide (DMSO) sedangkan dalam pencairan (*thawing*) digunakan 0,2 M sukrosa. Dua puluh empat jam setelah pencairan, pada embrio utuh (kontrol), embrio belah-4 dan embrio belah-8 didapatkan berturut-turut 94, 91 dan 96 % embrio yang kembali ke morfologi normalnya. Setelah dikultur kembali, pada hari-8 pada embrio utuh dan embrio belah-4 didapatkan perbedaan yang nyata antara persentase blastosis pada kelompok tanpa pembekuan dan dengan pembekuan ($p < 0,05$) tetapi tidak terdapat perbedaan pada jumlah sel blastosis ($p > 0,05$). Pada embrio belah-8 tak dijumpai adanya perbedaan baik pada persentase blastosis hari-8 maupun jumlah sel total antara kelompok tanpa pembekuan dan dengan pembekuan ($p > 0,05$).

Dalam percobaan ketiga, dua belas embrio belah-4 hari-8 ditransfer ke 3 ekor resipien dengan zona pelusida pengganti dan ke 3 ekor resipien lainnya tanpa zona pelusida pengganti. Resipien berupa sapi Friesian Holstein (FH) telah disinkronkan birahinya dengan satu kali penyuntikan 25 mg PGF2α. Transfer non bedah dilakukan pada hari-7 dengan masing-masing resipien menerima 2 embrio belah pada kornua ipsilateral. Angka kebuntingan didasarkan pada hasil pemeriksaan kadar progesteron darah hari-22 dan palpasi rektal pada hari-62. Dari uji statistik tidak didapatkan adanya perbedaan angka kebuntingan antara kelompok transfer dengan zona pelusida pengganti dan kelompok transfer tanpa zona pelusida pengganti. Angka kebuntingan awal hasil transfer embrio belah-4 adalah 33,3 %.

Dengan diperolehnya protokol pembuatan embrio sapi Madura belah-4 dan –8 ini perlu diteliti teknik seksing embrio yang tepat sehingga teknik ini bisa diterapkan untuk produksi masal embrio sapi Madura berkualitas dengan jenis kelamin yang diinginkan. Demikian pula penelitian untuk meningkatkan angka kebuntingan pasca transfer akan menunjang keberhasilannya.

SUMMARY

POPULATION AND GENETIC IMPROVEMENT THROUGH *IN VITRO* PRODUCTION OF FOUR AND EIGHT IDENTICAL MADURA CATTLE EMBRYOS **

(Utama, S.*, Mahaputra, L.*, Mustofa, I.*, and Srianto, P.*, 47 pages)

As indigenous livestock of Indonesia, Madura cattle have considerable food conversion, reproduction efficiency and carcass quality. Nowadays, it is difficult to look for Madura cattle with premium quality besides the population is far from meeting consumption demand.

So far, a research had been performed to gross produce Madura cattle embryos of high quality by means of in vitro fertilization and small scale cloning (year-1). This present research (year-2) is a more advance study to complete and perfect the previous one.

This study was aimed to define the slicing procedure of the embryos into four and eight with the least disturbance on development, to determine embryo quality based on morphology criterion, percentage of blastocyst and blastocyst cell number after vitrification, also to find pregnancy rates after transfer of the sliced embryos with or without surrogate zona pellucida.

Madura cattle embryos were produced in vitro, and 42 hours after insemination, four-cell embryos were harvested to be sliced into four and at day-5, 32-cell embryos were harvested to be sliced into 8. Result of this preliminary study revealed a significant difference ($p < 0.05$) between percentage of blastocyst of one-eighth embryos group with whole embryo (control) group and one-fourth embryos group meanwhile there was no difference ($p > 0.05$) between whole embryos group and one-fourth embryos group.

---

* Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

** HB VIII/3 Tahun 2001 No. 037/P2IPT/III/2001

In the second experiment, at day-6 the sliced embryos were frozen in liquid nitrogen for 14 days with combination of vitrification technique and open pulled straw (OPS) method. Cryoprotectant used were ethylene glycol (EG) and dimethylsulphoxide (DMSO) whereas in thawing 0.2 M sucrose were utilized. Twenty-four hours after thawing, in whole embryo (control) group, one-fourth embryos group and one-eighth embryos group was obtained respectively 94, 91 and 96 % embryos recovered to their normal morphology. After putting back into culture, at day-8 in whole embryos group and one-fourth embryos group, there was a significant difference between the percentage of day-8 blastocyst in groups with and without vitrification ($p < 0.05$). On one-eighth embryos group there was no difference, either in percentage of day-8 blastocyst and blastocyst cell number in groups with and without vitrification ($p > 0.05$).

In the third experiment, twelve day-8 quarter embryos were transferred into 3 recipients with surrogate zona pellucida and into 3 recipients without surrogate zona pellucida. The recipients were Holstein friesian synchronized the oestrus cycle by single injection of 25 mg PGF2α. Non surgical transfer were performed at day-7 with each recipient received 2 quarter embryos at ipsilateral cornua. Pregnancy rates were based on result of blood progesterone assay at day-22 and rectal palpation at day-62. From statistical analyses it was not found any different pregnancy rate between the group of transfer with surrogate zone pellucida and the group of transfer without surrogate zona pellucida. Early pregnancy rate from transferring quarter embryo was 33.3 %.

With the invention of protocol for production four and eight identical Madura cattle embryos a research on embryo sexing is needed therefore these techniques will be able to be applied for mass production of high quality Madura cattle embryo with the desired sex. Furthermore, a research on increasing the pregnancy rate after transfer will properly support the success.

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian dan laporan ini dapat diselesaikan.

Penelitian ini dilakukan dalam rangka ikut mencari jalan keluar bagi masalah kurangnya penyediaan sapi potong dari dalam negeri. Dengan penerapan hasil penelitian ini diharapkan sapi Madura yang asli Indonesia dan merupakan sapi potong yang digemari dagingnya dapat diproduksi secara cepat. Produksi kembar identik sapi Madura, selain dapat meningkatkan kuantitas dan kualitas secara cepat, juga dapat memberikan dukungan bagi pengembangan penelitian-penelitian di bidang peternakan. Demikian pula prosedur dalam penelitian ini yang merupakan hasil akhir dari serentetan percobaan-percobaan untuk mendapatkan masing-masing metode yang tepat dalam setiap bagian kecil dari keseluruhannya, dapat pula dipakai sebagai model bagi pengembangan teknologi ini pada jenis sapi lainnya atau bahkan bagi hewan ternak lainnya.

Pada kesempatan ini ucapan terima kasih kami sampaikan kepada yang terhormat

1. Pimpinan Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan,
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
4. Kepala Laboratorium Kebidanan Veteriner FKH Unair
5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Adalah layak bila terdapat kekurangan-kekurangan dalam penelitian dan penulisan laporan ini. Untuk menambah manfaatnya, saran dan kritik yang membangun diharapkan.

Surabaya, 21 Juni 2001

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

halaman

DAFTAR LAMPIRAN

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Menggunakan metode yang semula dikembangkan untuk embrio tikus, Wilmut dan Rowson, 1973 melaporkan kebuntingan sapi pertama dari embrio yang dibekukan. Secara mendasar, kriopreservasi embrio terdiri dari empat langkah : 1). Embrio diletakkan dalam larutan krioprotektan, 2). Embrio didinginkan dalam kondisi sehingga sedikit atau sama sekali tak ada cairan intraseluler yang membeku ketika dicelupkan ke dalam nitrogen cair untuk penyimpanan, 3). Embrio dihangatkan ke temperatur fisiologis untuk meneruskan fungsi normal, 4). Krioprotektan dihilangkan dengan pengenceran (Leibo dan Loskutoff, 1993).

Kualitas embrio adalah salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pembekuan dan pencairan kembali embrio hasil fertilisasi *in vitro*. Faktor-faktor lainnya adalah umur embrio, stadium perkembangan embrio, krioprotektan, pH media pembekuan, proses pembuatan dan sistem kultur saat produksi embrio (Hasler *et al.*, 1997). Oleh sebab itu evaluasi pasca pembekuan dapat dipakai sebagai salah satu kriteria kualitas embrio (Han *et al.*, 1994; Kuwayama, 1995).

Beberapa peneliti (Saito *et al.*, 1994; Mahmoudzadeh *et al.*, 1995) melaporkan bahwa kurang lebih 70 – 80% blastosis yang telah divitrifikasi dapat melanjutkan perkembangan secara *in vitro*. Penelitian menggunakan krioprotektan ethylene glycol dianjurkan karena memberikan keuntungan transfer embrio langsung setelah pencairan seperti dijelaskan oleh Voelkel dan Hu (1992a). Penggunaan asam hialuronik sebagai

molekulmakro pada media vitrifikasi embrio tikus cenderung menimbulkan penurunan viabilitas (Palasz *et al.*, 1991).

Walaupun beberapa peneliti menyatakan perlunya zona pelusida pengganti (Ozil, 1983; Willadsen, 1983), beberapa peneliti menyatakan tidak adanya pengaruh zona pelusida pengganti ini (Tao, 1991; Nowshari dan Holtz, 1993). Karena dalam pelaksanaannya penggunaan zona pelusida pengganti ini sangat rumit, maka perlu diteliti kebutuhan akan penggunaan zona pelusida pengganti untuk transfer embrio belah sapi Madura. Beberapa peneliti (Dinnyes *et al.*, 1995; Dinnyes *et al.*, 1996) berdasarkan penelitian menggunakan *hatched* blastosis hasil fertilisasi *in vitro* yang divitrifikasi menyimpulkan tidak diperlukannya zona pelusida sebagai pelindung mekanis selama pembekuan.

Dalam penelitian tahap II ini untuk pembelahan embrio menjadi 8 akan dipakai embrio stadium 32 sel karena hasil penelitian tahap I menujukkan bahwa untuk pembelahan embrio menjadi 8, stadium 32 sel memiliki keunggulan dibanding embrio stadium 16 sel. Sedangkan untuk pembelahan menjadi 4, akan dipakai embrio stadium 4 sel dimana stadium ini masih dalam kontrol genom materna dan hubungan interseluler masih relatif renggang.

Dari segi teknis, pembelahan dalam tahap II ini dirubah yaitu dengan menghilangkan zona pelusida terlebih dahulu dan selanjutnya pembelahan dilakukan dengan jarum mikro gelas. Demikian pula titik akhir observasi diperpanjang untuk mendapatkan gambaran yang lebih nyata.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan beberapa hal di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menjawab beberapa permasalahan berikut:

1. Bagaimana kualitas embrio belah-4 dan -8 berdasarkan kriteria morfologis, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis setelah modifikasi prosedur produksi dan pembelahan?
2. Bagaimana kualitas embrio belah-4 dan -8 berdasarkan kriteria morfologis, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis tanpa dan dengan pembekuan?
3. Apakah pada transfer embrio belah-4 diperlukan penggunaan zona pelusida pengganti?
4. Berapakan angka kebuntingan embrio belah-4 ?

1.3. Hipothesis

1. Tidak terdapat perbedaan kualitas embrio belah-4 dengan embrio utuh.
2. Tidak terdapat perbedaan kualitas embrio belah-8 dengan embrio utuh.
3. Tidak terdapat perbedaan kualitas embrio tanpa dan dengan pembekuan.
4. Tidak diperlukan zona pelusida pengganti untuk transfer embrio belah.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mencari prosedur pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 yang lebih sedikit menimbulkan gangguan perkembangan, melihat kualitas embrio belah dengan kriteria morfologi, persentase blastosis dan jumlah sel total blastosis setelah pembekuan, melihat angka kebuntingan setelah transfer embrio belah dengan dan tanpa zona pelusida pengganti.

2.2. Manfaat

Dari penelitian ini akan didapatkan suatu protokol pembuatan embrio kembar identik 4 dan 8 yang efisien untuk peningkatan populasi dan mutu genetik sapi Madura yang dapat dipakai sebagai model untuk dikembangkan bagi sapi jenis lain bahkan dapat dikembangkan untuk upaya pelayanan penyelamatan genetika untuk hewan-hewan langka yang hampir punah serta hewan-hewan superior yang tak mungkin lagi berkembang biak.

III. TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Zona Pelusida

Zona pelusida adalah lapisan amorfis glikoprotein kompleks yang mengelilingi oosit. Lapisan aseluler ini memiliki ketebalan antara 5 – 15 μm. Glikoprotein dari beberapa famili yang berbeda telah diidentifikasi pada zona berbagai spesies. Integritas struktural dari zona tampaknya dipertahankan oleh kekuatan nonkovalen walaupun juga ditemukan ikatan disulfid intermolekuler. Skaning dengan mikroskop elektron memperlihatkan permukaan luar zona dengan celah-celah/lubang diantara jalinan filamen yang bersilangan menyerupai bentuk wajik, sedangkan permukaan dalam zona tampak sebagai partikel-partikel yang tak teratur. Asam hialuronik sebagai komponen utama kumulus oophorus terselip diantara celah-celah di permukaan luar zona (Yanagimachi, 1988). Kontak antara oosit dan sel-sel granulosa dipertahankan melalui kompleks hubungan (*junction complexes*) yang terbentuk antara mikrovili oosit dan ekstensi sel granulosa yang menembus zona pelusida. Zona pelusida larut dalam berbagai kondisi pH tertentu, konsentrasi ionik, temperatur dan adanya deterjen tertentu, urea serta tercerna oleh enzim. Hasil penelitian pada tikus (Talansky dan Gordon, 1989), menunjukkan bahwa larutan asam (*acid* Tyrodes) tidak menimbulkan efek yang berbahaya bagi oosit dan perkembangan selanjutnya.

Fungsi utama zona adalah sebagai pelindung oosit dan barier terhadap penetrasi spermatozoa setelah fertilisasi. Selain itu zona pelusida berperan melindungi embrio pada stadium sebelum pengompakan dengan mencegah invasi lekosit dan hilang atau rusaknya blastomer karena kontraksi oviduk serta sebagai barier terhadap faktor-faktor yang

membahayakan dalam lingkungan uterus (Pugh *et al.*, 1994). Berhubungan dengan fungsinya dalam fertilisasi, zona pelusida mempunyai reseptor-reseptor spermatozoa yang memperantarai interaksi spermatozoa oosit pada awal fertilisasi, setelah penetrasi spermatozoa dan juga dalam reaksi zona suatu mekanisme pertahanan terhadap polispermi.

Walaupun sudah dipercaya bahwa komposisi kimia zona tak berubah selama maturasi oosit atau bahkan setelah ovulasi, juga terdapat pendapat bahwa zona kehilangan glikosaminoglikan beberapa jam setelah ovulasi demikian pula zona babi dan hamster memperoleh tambahan glikoprotein dari oviduk dalam perjalanannya.

3.2. Vitrifikasi

Menurut deskripsi fisik dari fenomenanya, vitrifikasi adalah pemadatan menyerupai gelas dari larutan pada temperatur rendah tanpa pembentukan kristal es. Hal ini dapat dicapai dengan peningkatan viskositas larutan dan dengan kecepatan tinggi dari pendinginan dan penghangatan. Dalam batas-batas tertentu, semakin tinggi kecepatan perubahan temperatur, semakin rendah viskositas yang dibutuhkan dan sebaliknya. Fenomena vitrifikasi telah lama diketahui tetapi baru pertama kali diterapkan untuk kriopreservasi embrio tikus oleh Rall dan Fahy pada 1985. Vitrifikasi yang pertama berhasil pada embrio sapi dan juga kebuntingan pertama setelah transfer dilaporkan oleh Massip *et al* (1986), dikutip oleh Vajta *et al.* (1997). Mekanisme yang diketahui terjadi selama kriopreservasi embrio adalah toksisitas krioprotektan, luka pembekuan, luka fisik oleh es ekstraseluler, toksisitas oleh elektrolit yang terkonsentrasi, pembentukan dan

pengembangan es intraseluler, kerusakan fraktur serta pembengkakan osmotik (Kasai, 1996).

Terdapat beberapa krioprotektan yang dipakai dalam berbagai konsentrasi dan kadang-kadang dalam kombinasi antara satu dengan lainnya yang menghasilkan kriosurvival lebih tinggi. Secara umum krioprotektan dibedakan dalam 2 kategori yaitu intraseluler dan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler mempunyai berat molekul yang agak rendah sehingga dapat masuk ke dalam sel embrio. Gliserol dan dimethylsulphoxide (DMSO) adalah krioprotektan intraseluler yang paling sering dipakai dalam pembekuan embrio sapi. Krioprotektan ekstraseluler mempunyai molekul yang lebih besar, misalnya pada gula dan protein seperti albumin serum sapi (*Bovine Serum Albumin*, BSA) dan asam hialuronik. Ekspos embrio terhadap krioprotektan menyebabkan dehidrasi seluler dan nuklear yang cepat serta depolimerisasi lengkap dari mikrotubulus dan mikrofilamen sitoplasma (Dobrinsky, 1996).

Pembekuan kecepatan rendah adalah usaha untuk menjaga ekuilibrium antara berbagai sumber kerusakan dengan konsentrasi krioprotektan yang rendah (meminimalkan kerusakan osmotik dan toksik), pengontrolan pembentukan es, menghasilkan konsentrasi dan vitrifikasi larutan di dalam dan dekat embrio. Sebaliknya, strategi vitrifikasi lebih radikal, karena didasarkan pada eliminasi total pembentukan es. Secara ekstraseluler, fenomena ini disebabkan oleh konsentrasi krioprotektan yang tinggi, sedangkan secara intraseluler, pengaruh penetrasi sebagian dari krioprotektan dihubungkan dengan konsentrasi molekulmakro intrasitoplasmik dan ion yang disebabkan oleh pengerutan embrio. Resiko dari dibutuhkannya konsentrasi krioprotektan yang tinggi adalah meningkatnya kerusakan osmotik dan toksik. Sebaliknya kecepatan

tinggi pendinginan dan penghangatan menyebabkan pasase yang singkat melalui temperatur berbahaya sekitar 0 °C yang akibatnya meminimalkan luka pembekuan yang terutama merusak struktur yang kaya lemak. Dengan teknik vitrifikasi, tidak diperlukan mesin pembeku *programmable* yang mahal dan mempersingkat waktu yang dibutuhkan untuk kriopreservasi.

Sifat oosit dan embrio seperti ukuran, bentuk, permeabilitas, kualitas dan sensitivitas bisa tergantung pada spesies, stadium, asal serta penentuan kondisi yang memadai untuk keberhasilan kriopreservasi. Jadi kondisi harus dioptimalkan untuk setiap kelompok oosit dan embrio.

Dalam pembekuan embrio, straw mini untuk IB berkapasitas 0,25 ml paling sering digunakan karena lebih praktis dalam penyimpanan, proses pembekuan serta transfer terutama bila digunakan sistem pencairan tertutup atau *one step thawing*.

Dari penampang melintang straw dapat dibedakan 3 zona yaitu: 1). "*ice front zone*", yaitu daerah tepi luar dari straw yang berhubungan paling dekat dengan media pendingin di balik dinding straw sehingga daerah ini mengalami pembekuan dengan kecepatan paling tinggi, 2). "*solute zone*", daerah sentral yang walaupun volumenya kecil namun mempunyai ketebalan yang cukup dan terletak jauh di tengah straw sehingga kecepatan pendinginan di daerah itu cukup rendah untuk meningkatkan konsentrasi garam-garam serta 3). *optimum zone*, merupakan daerah yang terletak di antara kedua zona yang merupakan daerah aman bagi daya hidup spermatozoa.

Dalam setiap pembekuan spermatozoa terdapat 50% spermatozoa yang tak dapat bertahan terhadap pembekuan dan pencairan (thawing). Spermatozoa yang mati ini terletak di *ice front zone* dan *solute zone* karena terbentuknya kristal es dalam

spermatozoa bila kecepatan pendinginan tinggi serta berkembangnya daerah dengan konsentrasi bahan terlarut yang sangat tinggi akan menyebabkan dehidrasi sel bila kecepatan pendinginan rendah.

Kebanyakan usaha untuk mengoptimalkan vitrifikasi terfokuskan pada media, krioprotektan, ekuilibrasi serta proses pengenceran. Hanya sedikit yang memperhatikan pendinginan dan penghangatan. Pemacuan kecepatan perubahan temperatur bagaimanapun memberikan 2 keuntungan yaitu berkurangnya konsentrasi krioprotektan yang dibutuhkan untuk vitrifikasi dan berkurangnya luka beku dari struktur biologis yang sensitif ini. Cara yang paling mudah untuk meningkatkan kecepatan adalah mengurangi volume larutan dan membiarkan kontak langsung (tanpa lapisan termoinsulasi antara larutan dan materi pendingin. Vajta (1997) mengemukakan bahwa straw 0,25 ml konvensional yang dikembangkan untuk inseminasi buatan dan pembekuan kecepatan rendah adalah jauh dari sempurna untuk vitrifikasi, karena dindingnya terlalu tebal dan diameter dalamnya terlalu lebar sehingga tetes yang besar diperlukan untuk memasukkan embrio ke dalam straw serta kontak larutan dan nitrogrn cair tak dapat menghindari terjadinya dispersi. Demikian pula, *sealing* hanya memakan waktu serta membungkus embrio secara kedap ke dalam kontainer yang terisolasi dari temperatur luar (*thermoinsulated*).

Dalam penelitiannya Vajta *et al.* (1997) menemukan metode *Open Pulled Straw* (OPS) dimana straw yang digunakan telah diubah diameter dalamnya serta ketebalan dindingnya menjadi setengah dari asalnya dengan pemanasan dan penarikan sehingga pada vitrifikasi straw yang dibenamkan dalam nitrogen cair memungkinkan kontak langsung antara kedua larutan.

3.3. Kebuntingan Dini

Telah diketahui bahwa proses implantasi tidak hanya melibatkan pengaruh maternal, tetapi signal dari embrio juga penting dalam proses ini. Kebuntingan dinyatakan dan dipertahankan oleh serangkaian interaksi antara konseptus (embrio dan membran-membrannya) dengan saluran reproduksi induk. Selama stadium preimplantasi, protein kebuntingan, steroid dan hormon yang berasal dari blastosis berinteraksi dengan endometrium, ovarium dan organ maternal lainnya untuk memastikan pemeliharaan embrio oleh endometrium, juga untuk solidasi dan angiogenesis guna meningkatkan aliran darah uterus, stimulasi tranfer nutrien ke dalam lumen uterus, melindungi alograf fetus dari penolakan secara imunologis, juga pertahanan fungsi luteal (Hodgen dan Itskovitz, 1988).

Setelah konsepsi, induk berhadapan langsung dengan embrio yang bersifat semialograf dan menimbulkan aloantibodi anti-paternal (Chaouat dan Menu, 1993). Demikian pula, kemajuan dalam teknologi embrio transfer telah memungkinkan transfer embrio yang bersifat alogenik total dari induk donor ke induk resipien. Kandidat paling menonjol untuk pengenalan imun maternal adalah *antigen Major Histocompatibility Complex* (MHC) (Chaouat dan Menu, 1993). Walaupun kompatibilitas MHC antara donor dan resipien dibutuhkan untuk keberhasilan transplantasi, MHC bukanlah satu-satunya yang bertanggung jawab terhadap terjadinya penolakan. Transplan dengan MHC kompatibel dapat ditolak setelah beberapa saat karena adanya ketidakcocokan (*mismatching*) pada gen dari kelompok lain, yaitu gen-gen histokompatibiliti minor (Aguilar *et al.*, 1997) dan sebaliknya sehingga tampak bahwa pengenalan antigen MHC oleh sistem imun resipien bersifat selektif. Hal ini sesuai dengan teori imunotrofisme

yang meyatakan bahwa pengenalan fetus secara imunologis tidak menimbulkan penolakan bahkan berperan terhadap perkembangan kebuntingan yang berhasil melalui aktivasi sel materna untuk produksi sitokin yang mendukung pertumbuhan. Sebetulnya, beberapa penolakan imunologis konseptus sapi dihambat karena berkurangnya ekspresi antigen histokompatibiliti mayor pada permukaan konseptus. Juga, suatu lingkungan intrauterin tercipta selama kebuntingan dimana jaringan materna dan trophoblas mensekresikan molekul penghambat limfosit yang mengurangi reaktivitas imun dalam uterus. Molekul-molekul tersebut antara lain adalah PGE2 dan IFNτ.

Data dari spesies lain juga menunjukkan adanya perubahan spesifik dalam aktivitas fungsional populasi limfosit maternal yang menyebabkan toleransi transien terhadap antigen konseptus, imunosupresi tambahan serta pelepasan sitokin yang menstimulir pertumbuhan konseptus ataupun sekresi hormon.

Analisa genetik dari lokus yang mengontrol respon penolakan transplan menunjukkan bahwa penolakan transplan yang paling cepat terjadi bila donor dan resipien mempunyai alele yang berbeda dari suatu lokus tertentu dimana pada sapi sistem MHC homolog ini disebut BoLA dan terletak pada lengan pendek kromosom 23. Kompleks yang terdiri dari beberapa lokus yang saling berhubungan inilah yang disebut sebagai histokompatibiliti mayor (MHC). Sebaliknya, bila MHC donor dan resipien sudah cocok, perbedaan pada sejumlah lokus lain bisa menyebabkan penolakan transplan yang sifatnya sangat lambat. Lokus inilah yang disebut lokus histokompatibilitas minor (Hansen, 1997).

Kebanyakan kematian prenatal terjadi pada semua mamalia. Demikian pula, pembuangan embrio dalam jumlah besar terjadi setelah transfer embrio hasil fertilisasi *in*

vitro. Kebanyakan hal ini terjadi sebelum atau selama masa implantasi. Pada domba dan sapi hilangnya embrio relatif tinggi, dengan kejadian paling sering pada 3 minggu pertama kebuntingan (Roberts *et al.*, 1996).

Pada sapi, masa hidup korpus luteum dikontrol oleh pelepasan PGF2α (Thatcher *et al.* 1997) sedangkan signal pengenal terjadinya kebuntingan (*recognition of pregnancy*) disekresikan oleh trophectoderm konseptus berupa bovine Interferon tau (bIFNτ). Protein ini sebagai signal antiluteolitik bekerja secara parakrin pada epitel uterus mencegah pelepasan pulsatil PGF2α dari endometrium yang menjamin bertahannya korpus luteum fungsional. Bila konseptus gagal menyatakan keberadaannya pada waktu yang tepat, fungsi korpus luteum diakhiri dengan daya luteolitik PGF2α dari uterus. Sekresi bIFNτ terbatas pada kebuntingan awal saja, yaitu antara hari 14 – 17 (Bazer *et al.* , 1994). Embrio sapi hasil produksi *in vitro* mengekspresikan dan mensekresikan bIFNτ pada stadium blastosis (Thatcher *et al.*, 1997).

Jumlah makrofa dalam uterus dipengaruhi oleh hormon progesteron dan estrogen yang bervariasi selama siklus estrus. Jumlah ini meningkat secara nyata selama dan setelah implantasi. Makrofa maternal juga ada pada plasenta dan membran ekstraplasenta. Ketahanan blastosis terhadap makrofa endometrial ditentukan oleh keberadaan trophectoderm. Inner Cell Mass tanpa trophectoderm akan dimusnahkan oleh makrofa yang bersifat sitotoksik (Sionov *et al.*, 1993). Selain itu dilaporkan bahwa pada kebuntingan awal, dalam serum mamalia juga ditemukan *Early Pregnancy Factor* (EPF) (Chaouat *et al.*, 1993).

IV. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan mulai tanggal 1 September 2000 di sub Lab. Fertilisasi *in vitro* dan sub Lab. Endokrinologi, Lab. Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair serta peternakan sapi perah di Mojo, Surabaya.

4.1. Rancangan Penelitian

Percobaan I, merupakan penelitian pendahuluan. Sampel berupa embrio stadium 4 sel dan 32 sel dibuat secara *in vitro* dengan fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium sapi Madura yang dipotong di rumah potong hewan dengan semen beku sapi Madura (Komara, BIB Singosari). Embrio 4 sel dipanen pada 42 jam setelah inseminasi, dibelah menjadi 4 dan embrio 32 sel dipanen hari-5, dibelah menjadi 8. Parameter yang diamati berupa persentase blastosis pada hari-8 dan jumlah sel total blastosis hari-8. Penghitungan jumlah sel blastosis dilakukan dengan pewarnaan menggunakan Hoechst 33342 di bawah mikroskop fluoresens dengan eksitasi sinar ultra violet, perbesaran 400 kali. Ulangan dilakukan 5 kali.

Percobaan II. Pada hari-6, separuh dari embrio belah-4 dan 8 dibekukan dalam nitrogen cair selama 14 hari. Setelah dithawing kenormalan morfologi embrio diamati, persentase blastosis dan jumlah sel total blastosis dihitung, dibandingkan dengan separuh embrio belah yang tak dibekukan.

Percobaan III. Dua belas embrio belah-4 hari-8 ditransfer ke 3 ekor resipien dengan zona pelusida pengganti dan ke 3 ekor resipien lainnya tanpa zona pelusida pengganti. Angka kebuntingan awal diperoleh dari pengukuran kadar progesteron darah

pada hari-22 menggunakan teknik *Radio Immuno Assay* (RIA) fase padat. Verifikasi dilakukan dengan eksplorasi rektal 40 hari kemudian.

4.2. Analisa Statistik

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (Steel dan Torrie, 1993) dan data diolah menggunakan uji-t dan Chi-kuadrat dengan program statistik Microstat.

4.3. Produksi Embrio

4.3.1. Preparasi Spermatozoa

Semen beku sapi Madura diangin-anginkan pada temperatur sekitar sampai kristal es pada dinding straw mencair lalu dimasukkan ke dalam waterbath dengan temperatur 34 ^{0}C selama 60 detik. Setelah dibiarkan selama 3 menit semen dimasukkan ke dalam tabung sentrifus konikal yang telah berisi 2 ml media bebas calcium (Lampiran 1.), kemudian ditambahkan lagi 4 ml media bebas calcium (media pencuci sperma) dan disentrifus selama 7,5 menit dengan kecepatan 2800 rpm (875 xg). Dengan pipet, perlahan-lahan supernatan dibuang dan ditambahkan lagi 4 ml media pencuci sperma. Sentrifugasi dilakukan lagi dengan waktu dan kecepatan yang sama kemudian supernatan dibuang habis tanpa mengganggu pelet sperma dan secara perlahan-lahan melalui dinding tabung dimasukkan 1 ml media fertilisasi (Lampiran 2.). Setelah dibiarkan selama 10 menit, 0,85 ml media di bagian atas diambil perlahan-lahan dan dimasukkan dalam micro vial. *Swim up* dilakukan untuk mendapat spermatozoa yang motil saja, sebab sentrifugasi tak dapat memisahkan spermatozoa yang motil dan tak motil. Setelah diaduk perlahan, konsentrasi spermatozoa diukur dengan menggunakan *improved neubauer chamber.*

Konsentrasi dibuat menjadi 0,5 x 10^6 spermatozoa.ml^{-1} dengan menambahkan media fertilisasi. Selanjutnya dibuat tetes-tetes spermatozoa masing-masing 45 µl dan dilapisi dengan minyak mineral.

4.3.2. Preparasi Oosit

Ovarium dibersihkan dari jaringan-jaringan penggantung, dicuci dengan *phosphate buffered saline* ((PBS) yang mengandung 100 IU/ml Penisilin (Penicillin G, Potassium salt, Sigma P-4687) dan 0,1 mg/ml streptomisin (Streptomycin sulfate, Sigma S-1277), dicuci 1 kali dalam alkohol 70 % dan dibilas lagi bersih-bersih dengan PBS. Ovarium yang akan diaspirasi dikeringkan dari PBS. Oosit disedot dengan *syringe* 5 ml dan jarum 19 G dari folikel berdiameter 2 – 7 mm. Hasil aspirasi ditampung dalam tabung reaksi dan setelah diperkirakan semua kompleks oosit kumulus mengendap cairan folikel di bagian atas tabung dibuang. Endapan dicuci dengan media diseksi (Lampiran 3.) dan oosit dikumpulkan dengan mikropipet dibawah mikroskop stereo dengan perbesaran 20-40 kali. Oosit yang mempunyai lebih dari 3 lapis sel kumulus serta sitoplasma penuh dan homogen dipilih kemudian dicuci 2 kali dalam media diseksi kemudian dimasukkan dalam tetes media maturasi (Lampiran 4.) , berupa M199 Earle's masing-masing 400 µl untuk 40 oosit dibawah minyak mineral. Selanjutnya oosit diinkubasi dalam inkubator CO_2 5 % dalam udara, temperatur 38,5 ° C dan kelembaban maksimal.

Setelah 24 jam, oosit dengan sel-sel kumulus yang ekspanded dicuci 2 kali dengan media pencuci oosit (Lampiran 5.) kemudian dimasukkan masing-masing 10 oosit ke dalam tiap tetes spermatozoa. Fertilisasi dilakukan selama 24 jam saja untuk

menghilangkan pengaruh toksik dari spermatozoa yang mati karena setelah 24 jam, walaupun banyak spermatozoa yang masih hidup, lebih banyak spermatozoa yang sudah mati dan pada umumnya saat itu oosit sudah terpenetrasi.

4.4. Pembelahan Embrio

Setelah 24 jam inkubasi bersama oosit dengan spermatozoa dalam inkubator CO_2 5 % dalam udara, temperatur 38,5 °C dan kelembaban maksimal, *presumptive* embrio dicuci 2 kali dalam hepes-SOF untuk menghilangkan sisa-sisa sel kumulus dan spermatozoa kemudian dikultur dalam tetes SOFaa. Duapuluh jam kemudian 5 embrio 4 sel dipilih yang berkualitas baik dan dibelah menjadi 4 kemudian embrio belah-4 di kembalikan ke kultur. Pada hari ke-5 (fertilisasi= hari-0) 5 morula yang berkualitas baik dibelah menjadi 8 dan hasil pembelahan dikembalikan ke kultur. Kultur dalam tetes SOFaa hanya dilakukan selama 48 jam, selanjutnya kultur dilakukan dalam media maturasi dengan monolayer sel kumulus. Separuh dari media kultur diganti tiap 48 jam.

Embrio dibelah dengan terlebih dahulu menghilangkan zona pelusida dalam larutan Tyrode (Tyrode's *solution, acidic*, pH 2,1,Sigma T-1788). Embrio yang akan dibelah dicuci 2 kali dalam tetes Tyrode masing-masing selama 3 menit dan dibilas 2 kali dalam hepes-SOF kemudian dibelah dengan menggunakan jarum mikro gelas.

4.4.1. Preparasi zona pelusida pengganti

Zona pelusida didapatkan dari oosit yang diaspirasi dari folikel ovarium sapi. Aspirasi dilakukan dengan menggunakan jarum 21 G. Selanjutnya sel-sel kumulus dirontokkan dengan 0,1 % Hyaluronidase (Sigma H-3884) dan pemipetan berulang. Oosit

difiksasi dengan pipet mikro dan pada zona pelusida dibuat sayatan kecil menggunakan jarum mikro dan sitoplasma ditiup keluar dari zona pelusida. Zona pelusida yang sudah kosong dicuci dan dibekukan dalam PBS pada –20 °C.

4.4.2. Pembuatan jarum mikro gelas

Jarum mikro dibuat dari tabung kapiler gelas berdiameter luar 1mm (Micropipette GD-1, Narishige). Tabung kapiler ditarik menggunakan penarik pipet mikro (Model PC-10, Narishige) dengan temperatur maksimal tanpa penambahan beban. Selanjutnya ujung jarum digrinda miring (Microgrinder EG-40, Narishige).

4.5. Pembekuan Embrio

Pembekuan dilakukan pada hari-6 dengan teknik vitrifikasi dan *metode open pulled straw* (OPS) (Vajta *et al.*, 1997). Straw plastik transparan 0,25 ml dipanaskan dan ditarik hingga diperoleh diameter dalam setengah dari diameter asal. Morula berkualitas baik dipilih untuk pembekuan. Holding media berupa TCM199 dengan bufer Hepes dan penambahan 20 % foeltal calf serum (FCS). Krioprotektan berupa ethylene glycol (EG) dan dimethyl sulphoxide (DMSO) diberikan dalam 2 tahap yaitu masing-masing dengan konsentrasi 10 % selama 1,5 menit kemudian dengan konsentrasi 20 % selama 25 detik keduanya pada suhu 39 °C (Lewis *et al.*, 1998). Selanjutnya embrio dimasukkan dalam straw, dibiarkan terkena uap nitrogen cair selama 2 menit sebelum dicelupkan (Vajta *et al*, 1997b). Setelah thawing embrio dimasukkan ke dalam 0,2 M sukrose sebagai bufer osmotik untuk mempertahankan keseimbangan osmotik antara embrio dengan lingkungan

sekitarnya. selama 5 menit dan dicuci 2 kali dalam *holding media* dan dikultur. Observasi blastulasi dilakukan 2 hari kemudian.

4.6. Sinkronisasi resipien

Calon resipien adalah sapi Friesian holstein (FH) yang sudah pernah beranak minimal satu kali serta berdasarkan pemeriksaan tidak sedang bunting. Selain itu sapi tidak sedang sakit atau pun memiliki gangguan reproduksi serta memiliki pinggul yang lebar untuk menghindari terjadinya disproporsi fetomaternal. Selanjutnya seleksi dilakukan dengan memilih sapi yang berada dalam fase luteal berdasarkan pemeriksaan keberadaan korpus luteum perektal.

Delapan ekor sapi resipien disinkronkan birahinya dengan metode satu kali penyuntikan PGF2α (Glandin N) dosis 25 mg. Selanjutnya pengamatan dilakukan dengan seksama terhadap terjadinya atau munculnya tanda-tanda birahi.

4.7. Transfer ke Resipien

Transfer non bedah dilakukan pada hari-7 (estrus= hari-0) pada sapi yang mempunyai korpus luteum (CL) di ovariumnya. Dua belas embrio belah-4 hari-8 ditransfer ke 6 ekor sapi resipien sehingga masing-masing resipien menerima 2 embrio belah-4. Kedua embrio belah didisposisikan di kornua uteri ipsilateral.

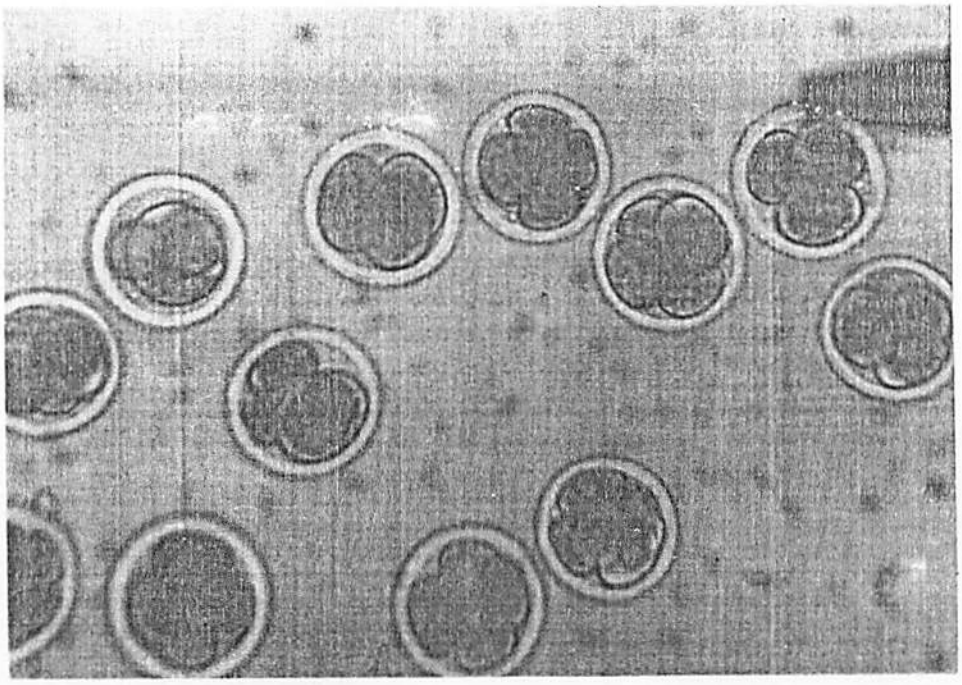
Transfer dilakukan dengan bantuan gun inseminasi. Media berisi embrio belah difiksasi dalam kolom di antara dua gelembung udara, terletak di pertengahan panjang straw. Kolom ini dibuat tidak terlalu panjang agar embrio tidak tergelinding kesana kemari, namun tidak terlalu tipis sehingga fiksasi mudah rusak.

Sebelum dilakukan transfer, pada resipien diberikan anestesi epidural untuk merelaksasi saluran genital serta mengatasi perejanan oleh sapi. Anestesi dilakukan dengan penyuntikan 5 – 10 ml Procain HCl 2 % pada spatium intercoccygea I atau spatium di antara os sacrum dan os coccygea I.

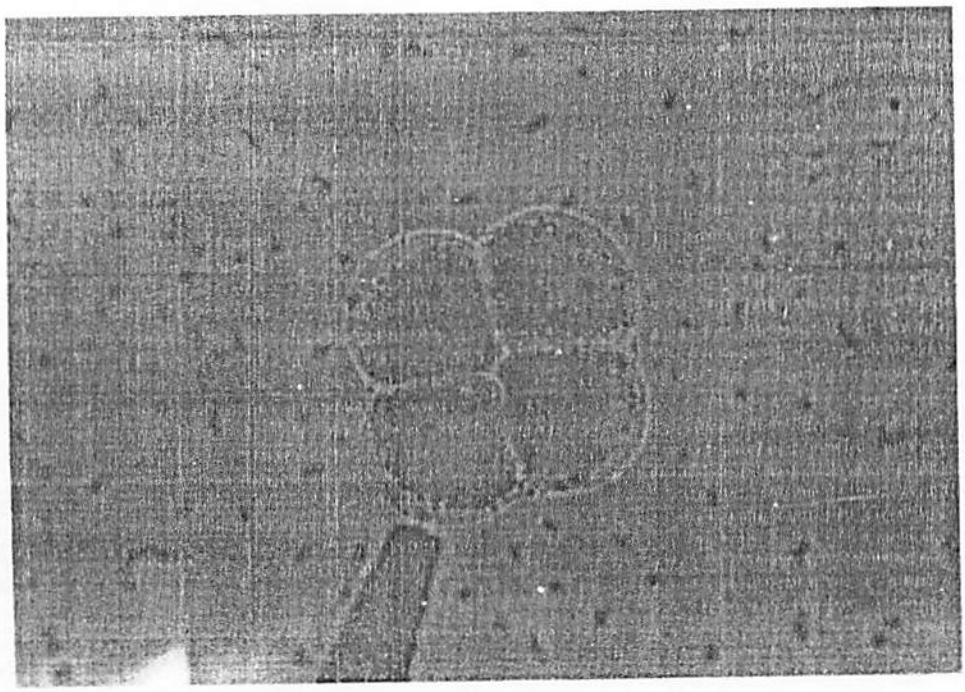
Seluruh pekerjaan dilakukan seaseptik mungkin dan dengan peralatan steril untuk mencegah introduksi infeksi ke dalam uterus.

4.8. Pemeriksaan Kadar Progesteron Darah

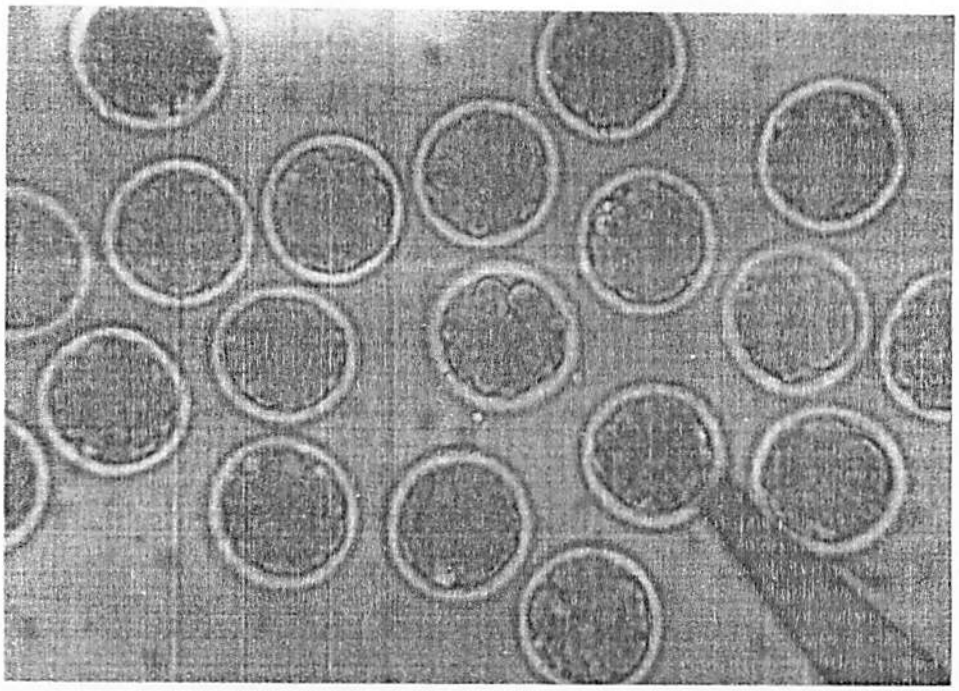
Darah diambil pada saat transfer, hari-7, hari-14 dan hari-22 sebanyak 5 ml dari setiap resipien. Sampel berupa serum yang didapatkan setelah sentrifugasi diperiksa kadar progesteronnya dengan teknik RIA fase padat.



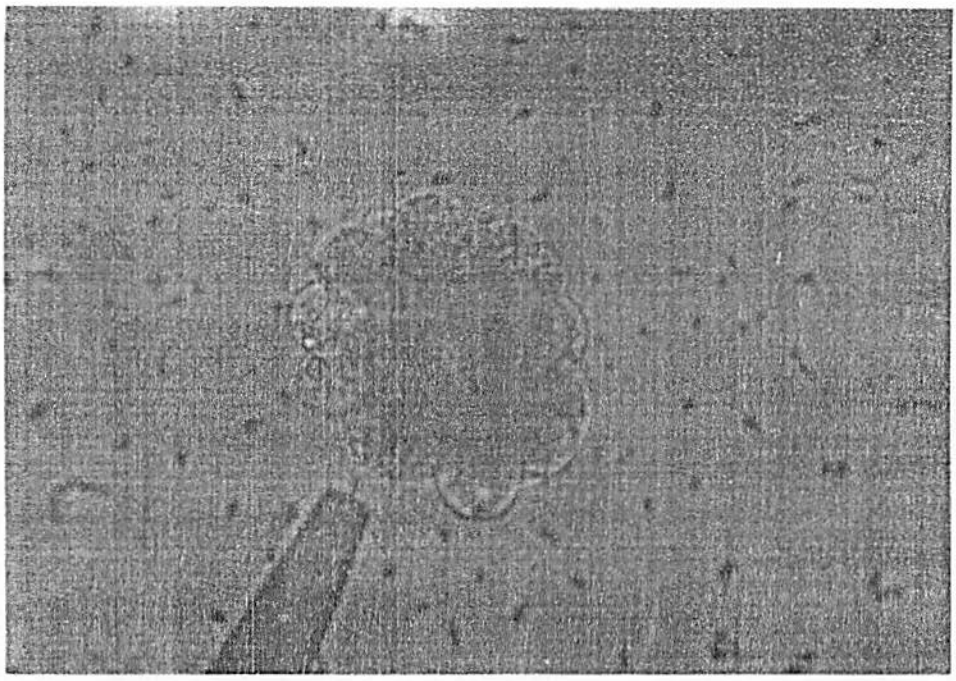
Gambar 1. Embrio sapi Madura 4 sel siap dipanen



Gambar 2. Embrio sapi Madura 4 sel setelah penghilangan zona pelusida



Gambar 3. Embrio sapi Madura 32 sel dalam zona pelusida



Gambar 4. Embrio sapi Madura 32 sel tanpa zona pelusida, siap untuk dibelah

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam produksi embrio *in vitro* yang diulang sebanyak 5 kali, didapatkan rata-rata angka cleavage 73,8 %.

5.1. Percobaan I. Pembelahan Embrio Menjadi 4 dan 8

Embrio yang dibelah saat ini dibandingkan dengan pada tahap I banyak perbedaannya dalam prosedur pembuatannya. Kalau dalam tahap I untuk pencucian sperma dan fertilisasi digunakan media yang sama yaitu EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*), suatu media sederhana yang mengandung 0,20 g/l $CaCl_2$ dan 1 g/l D-glukosa., dalam penelitian ini untuk mencuci sperma digunakan media bebas Calcium dan untuk fertilisasi digunakan media khusus fertilisasi dimana di dalam kedua media ini tidak terkandung glukosa, karena glukosa menghambat kapasitasi spermatozoa oleh metabolisme glukosa yang mengasamkan pH (Fukui *et al.*, 1990). Pada embrio sapi glukosa menimbulkan efek detrimental pada perkembangan awal dimana glukosa belum dibutuhkan. Sampai saat aktivasi genom embrionik, enerji diperoleh dari glutamin, namun glukosa masih tetap dibutuhkan untuk proses blastulasi. Glukosa menimbulkan efek melalui *crab tree* yang merangsang glikolisis anaerob fosfat inorganik dan mengarah pada berkurangnya fosforilasi oksidatif dan berkurangnya ATP seluler (Furnus *et al.*, 1997).

Perbedaan lainnya adalah dilakukannya *swim up* selama 10 menit dan juga setelah 24 jam fertilisasi *presumptive* embrio dibersihkan dari sisa-sisa spermatozoa dan sel kumulus. Kemudian embrio dikultur dalam SOF (aa, BSA) yang tidak mengandung serum karena serum meningkatkan kejadian polispermi, juga menimbulkan efek bifasik

dalam perkembangan embrio (Saeki *et al.*, 1994). Bila kebanyakan inkubator CO_2 seperti juga inkubator yang dipakai dalam penelitian ini menghasilkan atmosfir 5 % karbondioksida dalam udara (mengandung 20 % oksigen), maka untuk kultur embrio dalam SOF memerlukan tekanan oksigen yang lebih rendah yaitu 5 %, dimana hal ini berkaitan dengan tidak digunakannya sel kultur jaringan untuk ko-kultur (Thompson *et al.*, 1990; Voelkel dan Hu, 1992b; Yang *et al.*, 1994) oleh karena itu kultur tanpa sel somatis pembantu dalam SOF hanya dilakukan selama 24 jam. Dengan adanya modifikasi ini, selain didapatkan embrio yang berkualitas lebih baik, angka cleavage juga meningkat. Dengan adanya peningkatan kualitas embrio ini tentu saja dapat diharapkan hasil pembelahan yang lebih baik ataupun lebih nyata diantara perlakuan. Hasil pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 dapat dilihat pada Tabel 1. dan Tabel 2.

Secara rata-rata angka blastulasi dalam penelitian ini tidak tinggi. Faktor yang menentukan proses blastulasi adalah proses pengompakan, dimana bila tidak terjadi pengompakan morula yang ditandai dengan meningkatnya kontak antar blastomer, berkurangnya rongga interseluler dan terjadinya pembauran bentuk tepi luar morula. Dengan tidak adanya pengompakan berarti tidak ada proses *sealing* akibat tidak terjadinya *tight junction* pada blastomer yang terletak di luar/basolateral sehingga tak ada transudasi selektif ke rongga blastocoel. Walaupun pada sapi pengompakan ini cukup nyata dan di bawah mikroskop terlihat perluasan rongga perivitelin namun pada embrio produksi *in vitro* proses pengompakan kurang nyata. Proses pengompakan ini tergantung kalsium dan membutuhkan peranan sitoskeleton dan molekul adhesi uvomorulin (cadherin).

Tabel 1. Pengaruh pembelahan terhadap persentase blastosis

Ulangan	Persentase blastosis		
	Kontrol	Belah-4	Belah-8
1	20 (2/10)	14,3 (2/14)	10,5 (4/38)
2	10 (1/10)	16,7 (3/18)	12,8 (5/39)
3	20 (2/10)	13,3 (2/15)	11,4 (4/35)
4	20 (2/10)	16,7 (3/18)	11,8 (4/34)
5	20 (2/10)	17,6 (3/17)	11,1 (4/36)

Tabel 2. Pengaruh pembelahan terhadap rata-rata persentase blastosis dan jumlah sel total blastosis.

	Persentase blastosis	Jumlah sel total
Kontrol	18,00 ± 4,47 [a]	192,28 ± 6,19
Belah-4	15,72 ± 1,83 [a]	44,08 ± 3,90
Belah-8	11,52 ± 0,86 [b]	21,68 ± 1,91

Superskrip yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Dihitung pada hari ke 8, persentase blastosis embrio belah-4 adalah 15,72 ± 1,83 yang ternyata tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dengan persentase blastosis pada embrio utuh (kontrol, 18,00 ± 4,47) sedangkan angka blastulasi embrio belah-8 berbeda secara nyata ($p < 0,05$) baik dengan kontrol maupun embrio belah-4. Hal ini menunjukan bahwa prosedur pembelahan embrio stadium 4 sel menjadi 4 hanya sedikit menimbulkan stress atau kerusakan fisik pada embrio.

Dalam prakteknya, setelah zona pelusida dilarutkan dalam larutan asam Tyrode (pH 2,1), pembelahan embrio 4 sel menggunakan jarum gelas sangat mudah dilakukan diantara sela-sela blastomer, sehingga kecil sekali persentase blastomer yang rusak dan

kebanyakan rusaknya blastomer disebabkan oleh perlengketan dengan dasar petri. Yang menarik dalam pembelahan embrio dengan menghilangkan zona pelusida terlebih dahulu ini, embrio yang kualitasnya kurang baik akan mengalami kerusakan blastomer sebelum zona pelusida hilang sama sekali.

Pada embrio belah-8, walaupun persentase blastosisnya berbeda secara nyata dibandingkan dengan embrio utuh ataupun embrio belah-4, namun angka blastulasi dan jumlah sel totalnya sudah cukup tinggi mengingat yang dibelah adalah embrio stadium 32 sel sehingga dalam pembelahannya menjadi 8, terpotongnya sejumlah blastomer tak dapat dihindari seperti pada embrio 4 sel.

5.2. Percobaan II. Pembekuan Embrio Belah-4 dan 8

Dalam percobaan II ini pembekuan dilakukan bukan untuk mengaplikasikan atau mencari teknik yang baik atau cocok untuk embrio belah melainkan sebagai salah satu kriteria yang dipakai untuk menentukan kualitas embrio belah-4 dan –8.

Setelah vitrifikasi selama 14 hari, embrio dithawing. Setelah pulih dari vitrifikasi embrio terlihat mengkerut dan observasi 24 jam kemudian menunjukkan dalam persentase tertentu (Tabel 3.) embrio kembali ke morfologi normalnya dan berkembang lebih lanjut ke stadium blastosis (Tabel 4, 5 dan 6.).

Tabel 3. Embrio dengan morfologi normal 24 jam setelah dicairkan setelah vitrifikasi selama 14 hari

Kontrol	Belah-4	Belah-8
94 %	91 %	96 %

Dengan gabungan teknik vitrifikasi dan metode *open pulled straw*, zona sentral dari ministraw yang merupakan daerah berbahaya karena peningkatan konsentrasi garam-garam atau pengentalan freezing medium dapat merusak embrio di dalamnya ditiadakan. Untuk itu ministraw ditarik setelah dipanaskan. Dari penarikan ini yang didapatkan adalah diameter straw yang lebih kecil serta dinding straw yang lebih tipis. Dinding straw yang tipis menyebabkan pembekuan yang cepat dan merata kemudian ditambah dengan tidak adanya *solute zone*, yang ada hanya *ice front zone* dan *optimum zone* sedangkan *ice front zone* sangat tipis dan embrio cenderung berada di tengah straw sehingga daya tahan embrio adalah maksimal. Dalam pembekuan ini tidak dilakukan *sealing* karena *sealing* sendiri akan membahayakan bila media mengembang dan tak ada ruang gerak lagi, maka pengembangan itu akan mendesak embrio sehingga embrio mendapat trauma mekanis.

Kemudian pada hari-8, pada kontrol dalam hal ini embrio utuh, ditemukan perbedaan yang nyata pada angka blastulasi tanpa dan setelah pembekuan. Hal ini berarti bahwa beberapa embrio tidak *survive* setelah pembekuan yang mungkin berhubungan dengan adanya *droplet* lemak yang berukuran lebih besar dan jumlahnya lebih banyak pada embrio produksi *in vitro*. Diperkirakan kandungan lemak ini menentukan *cryosurvival* karena kandungan lemak yang tinggi dan distribusi variabel dari lemak intraseluler menginduksi nukleasi es intraseluler yang heterogen (Toner *et al.*, 1986). Penelitian pada babi dimana kandungan lemak embrio *in vivo* sangat tinggi diberi diet dengan kandungan asam lemak tak jenuh tinggi sedangkan kalau secara *in vitro* bisa dilakukan dengan kultur tanpa serum, dimana hal ini mungkin dengan penggunaan defined media seperti SOFaa ataupun CR1aa.

Tabel 4. Pengaruh pembekuan terhadap persentase blastosis dan jumlah sel total embrio utuh (kontrol)

	% blastosis (mean ± SD)	Σ sel total (mean ± SD)
tanpa pembekuan	18,00 ± 4,47 [a]	190,13 ± 12,74
setelah pembekuan	12,00 ± 4,47 [b]	190,83 ± 12,12

Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5. Pengaruh pembekuan terhadap persentase blastosis dan jumlah sel total embrio belah-4

	% blastosis (mean ± SD)	Σ sel total (mean ± SD)
tanpa pembekuan	16,00 ± 4,18 [a]	43,81 ± 3,31
setelah pembekuan	10,00 ± 3,54 [b]	44,10 ± 3,54

Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Tabel 6. Pengaruh pembekuan terhadap persentase blastosis dan jumlah sel total embrio belah-8

	% blastosis (mean ± SD)	Σ sel total (mean ± SD)
tanpa pembekuan	11,00 ± 4,18	21,27 ± 1,85
setelah pembekuan	8,00 ± 2,74	20,88 ± 2,03

Dalam Tabel 5. juga didapatkan angka blastulasi yang berbeda tanpa dan setelah pembekuan dimana hal ini sangat normal mengingat terdapatnya pengaruh pembekuan pada kontrol atau embrio utuh sedangkan untuk jumlah sel tak ada perbedaan yang nyata.

Pada embrio belah-8, tampaknya tidak ada perbedaan tanpa dan setelah pembekuan disebabkan karena pada embrio belah-8 yang tak dibekukan angka blastulasi tidak terlalu baik.

Perbedaan angka blastulasi akibat pembekuan pada kontrol dan embrio belah-4 ini bisa disebabkan oleh gangguan perkembangan ke stadium lebih lanjut karena adanya kerusakan akibat pembekuan namun bisa juga disebabkan oleh adanya penundaan (*delay*) dalam perkembangan karena dibutuhkannya suatu masa pemulihan (recovery) dari keadaan beku yang mencapai 24 jam.

Dalam pencairan (*thawing*), digunakan 0,2 M sukrosa untuk mengurangi efek toksik dari DMSO dengan membantu dehidrasi embrio melalui osmosis, sedangkan sukrosa sendiri sebagai agen krioprotektan makromolekul toksisitasnya sangat rendah (Tachikawa *et al.*, 1993).

Embrio sapi produksi *in vitro*, bagaimanapun lebih sensitif terhadap prosedur pembekuan dibanding embrio *in vivo* (Leibo dan Loskutoff, 1993). Sistem kultur juga mempengaruhi kualitas embrio, demikian pula dengan potensi kriosurvival. Selain itu embrio produksi *in vitro* cenderung mengandung lebih banyak vakuoli dan *droplet* lemak, mempunyai kompleks junctional lebih sedikit dan lebih pendek, pengompakan yang kurang nyata serta embrionik disk yang biasanya lebih kecil. Kultur *in vivo* dengan sel epithel oviduk sapi (BOEC) dapat memperbaiki morfologi maupun daya tahan terhadap pembekuan, demikian pula secara tak langsung penggunaan serum selama kultur mempengaruhi ketahanan terhadap pembekuan. Terdapat parbedaan pada komposisi lemak dari embrio yang diproduksi dengan menggunakan serum yang diperkirakan menimbulkan efek utama pada komposisi membran dan selanjutnya mempengaruhi daya

ahan embrio terhadap pembekuan (Quinn, 1992; Young *et al.*, 1994; Dobrinski, 1996; Dinnyes *et al.*, 1996).

5.3. Percobaan III. Transfer Embrio Belah-4

Hasil transfer embrio belah-4 dengan dan tanpa zona pelusida pengganti menunjukkan angka kebuntingan awal masing-masing 33,3 % (Tabel 7.) yang keduanya merupakan kebuntingan tunggal, namun dalam pemeriksaan lebih lanjut 40 hari kemudian, resipien yang menerima transfer dengan zona pelusida pengganti menunjukkan angka kebuntingan 0 % sedangkan pada resipien yang menerima transfer tanpa zona pelusida pengganti angka kebuntingan tetap 33,3 %. Ini menunjukkan adanya kematian embrio dini (sebelum 2 bulan). Berdasarkan uji Chi-square dengan Fisher exact probability tidak ditemukan adanya perbedaan angka kebuntingan antara transfer dengan menggunakan zona pelusida pengganti dan tanpa menggunakan zona pelusida pengganti baik berdasarkan pemeriksaan kadar Progesteron hari-22 maupun hasil palpasi rektal hari-62. Dalam penelitiannya dengan demiembrio Kippax *et al.* (1991) juga mendapatkan hasil yang sama dengan dan tanpa zona pelusida pengganti.

Rendahnya angka kebuntingan awal pada kedua kelompok ini mungkin disebabkan oleh rendahnya keberhasilan embrio produksi *in vitro* dalam *signalling maternal recognition of pregnancy* (Farin dan Farin, 1995). Dalam penelitian ini dinyatakan bahwa survival embrio setelah transfer adalah sama antara embrio *in vivo* dan *in vitro grade* 1 serta embrio *in vivo grade* 2, bisa diasumsikan bahwa embrio produksi *in vitro* setelah pembelahan, bagaimanapun tak akan mendapatkan *grade* 1.

Penelitian Xu *et al.* (1991) menunjukkan bahwa sigot tanpa zona dapat mencapai stadium blastosis walaupun dengan angka lebih rendah. Selanjutnya, untuk transfer embrio belah tanpa zona pelusida pengganti, berdasarkan pendapat Pugh *et al.* (1994), tampaknya diperlukan kultur terlebih dahulu sampai stadium blastosis dimana hal ini juga merupakan persyaratan bagi angka kebuntingan yang tinggi pada embrio utuh dengan zona pelusida aslinya.

Implantasi hanya dapat terjadi bila embrio dan endometrium telah mencapai stadium yang sinkron (± 1 hari), selain itu blastosis harus ditetaskan (*hatched*) dari zona pelusida. Dalam hal embrio belah yang ditransfer menggunakan zona pelusida pengganti, kemungkinan yang terakhir ini ikut berperan terhadap rendahnya angka kebuntingan karena embrio belah tak dapat ditetaskan (*to be shed out of surrogate zona pellucida*) Selain itu tanpa memperhatikan asal embrio apakah hasil produksi *in vitro* ataupun *in vivo*, pada transfer embrio dialog maternal-embrional tidak terjadi karena tak adanya protein yang disekresikan oleh embrio (Hodgen dan Itskovitz, 1988).

Tabel 7. Angka kebuntingan induk resipien setelah menerima transfer embrio belah-4 dengan dan tanpa zona pelusida pengganti.

transfer	Σ resipien	Σ embrio /resipien	angka kebuntingan (%)	
			P4 hari-22	eks. rektal
dengan zpp	3	2	33,3	0
tanpa zpp	3	2	33,3	33,3

Pedet pertama yang berasal dari embrio belah-4 dilaporkan oleh Willadsen dan Polge (1981) di Kanada dengan angka kebuntingan 35 % dimana 67 % merupakan

kebuntingan kembar. Bila embrio yang dibelah dalam penelitian Willadsen dan Polge adalah embrio yang diproduksi secara *in vivo*, maka Loskutoff *et al.* (1993) melakukan pembelahan embrio produksi *in vitro* menjadi 4 dan mendapatkan angka kebuntingan 20 %. Pedet yang diproduksi dari embrio yang mengandung kurang dari 1/4 jumlah sel asalnya belum pernah dilaporkan, namun 5 cempe telah berhasil diproduksi dari embrio belah-8. Belum berhasilnya produksi pedet yang berasal dari embrio belah-8 kemungkinan disebabkan karena belum teratasinya kegagalan perkembangan *inner cell mass* (ICM) karena alokasi ICM yang rendah dari jumlah sel total yang juga tak terlalu banyak; tetapi pada babi ditemukan bahwa jumlah sel blastosis yang diperoleh dari 1/8 blastomer kurang lebih sama dengan yang ditemukan pada blastosis utuh.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Tidak terdapat perbedaan persentase blastosis embrio belah-4 dengan kontrol.
2. Terdapat perbedaan persentase blastosis embrio belah-8 dengan kontrol.
3. Terdapat perbedaan persentase blastosis embrio belah-4 tanpa dan setelah pembekuan.
4. Tidak terdapat perbedaan persentase blastosis embrio belah-8 tanpa dan setelah pembekuan.
5. Tidak terdapat perbedaan jumlah sel embrio belah-4 maupun –8 tanpa dan setelah pembekuan.
6. Tidak ada perbedaan angka kebuntingan hasil transfer embrio belah-4 dengan menggunakan dan tanpa menggunakan zona pelusida pengganti.
7. Angka kebuntingan awal hasil transfer embrio belah-4 adalah 33,3 %.

6.2. Saran

Dengan diperolehnya protokol pembuatan embrio sapi Madura belah-4 dan –8 ini perlu diteliti teknik seksing embrio yang tepat sehingga teknik ini bisa diterapkan untuk produksi masal embrio sapi Madura berkualitas dengan jenis kelamin yang diinginkan. Demikian pula penelitian untuk meningkatkan angka kebuntingan pasca transfer akan menunjang keberhasilannya.

DAFTAR PUSTAKA

Aguilar, B., Vos, P.L.A.M., Beckens, J.F., Hensen, E.J. dan Dieleman, S.J. 1997. The role of the major histocompatibility complex in bovime embryo transfer. Theriogenology 47: 111-120.

Bazer, F.W., Ott, T.L. dan Spencer, T.E. 1994. Pregnancy Recognition in Ruminants, Pigs and Horses: Signals from the trophoblast. Theriogenology 41: 79-94.

Chaouat, G. dan Menu, E. 1993. Immunology of Pregnancy. In: Reproduction in Mammals ans Man. Edited by C. Thibault, M.C. Levasseur and R.H.F. Hunter. Ellipses. Paris.

Dinnyes, A., Carolan, C., Lonergan, P., Solti, L., Massip, A. and Mermillod, P. 1995. *In vitro* survival of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. Theriogenology 43: 197 abstr.

Dinnyes, A., Bodo, Sz. and Senan Solti, L. 1996. *In vitro* survival of cryopreserved hatching or hatched *in vitro* produced (IVP) bovine embryos. Theriogenology 45: 173 abstr.

Dinnyes, A., Carolan, C., Lonergan, P., Massip, A. dan Mermillod, P. 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocyst produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. Theriogenology 46: 1425-1439.

Dobrinski, J.R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology 45: 17-26.

Farin, P.W. dan Farin, C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: Survival and fetal development. Biology of Reproduction 52: 676-680.

Fukui, Y., Sonoyama, T., Modrizuki, H. dan Ono, H. 1990. Effect of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 34: 579-591.

Furnus, C.C., deMatos, P.G., Martinez, A.G. dan Matkovic, M. 1997. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of *in-vitro* produced bovine embryos. Theriogenology 47: 481-410.

Han, Y.M. Yamashina, H., Koyama, N., Lee, K.K. and Fukui, Y. 1994. Effects of quality and development stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. Theriogenology 42: 645-654.

Hansen, P.J. 1997. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. Theriogenology 47: 121-130.

Hasler, J.F., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q. and Stokes, J.E. 1997. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. Theriogenology 48: 563-579.

Hodgen, D. dan Itskovitz, J. 1988. Recognition and Maintenance of Pregnancy. In: The Physiology of Reproduction. Edited by E. Knobil and J. Neill *et al.* Raven Press, Ltd., New York.

Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. Animal Reproduction Science 42: 67-75.

Kippax, I.S., Christie, W.B. dan Rowan, T.G. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on fetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. Theriogenology 35: 25-35.

Kuwayama, M. 1995. Vitrification of IVMFC bovine embryos at various developmental stages and of different quality. Theriogenology 43: 257 abstr.

Leibo, S.P. and Loskutoff, N.M. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. Theriogenology 39: 81-94.

Lewis, I.M., Lane, M.W. and Vajta, G. 1998. Pregnancy rates following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. Theriogenology 50: 168 abstr.

Loskutoff, N.M., Johnson, W.H. dan Betteridge, K.J. 1993. The Developmental Competence of Bovine Embryos with Reduced Cell Numbers. Theriogenology 39: 95-107.

Mahmoudzadeh, A.R., vanSoom, A., Bols, P., Ysebaert, M.T. and deKruif, A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. Journal of Reproduction and Fertility 103: 33-39.

Nowshari, M.A. and Holtz, W. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. Journal of Animal Science 71: 3403-3408.

Ozil, J.P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. Journal of Reproduction and Fertility 69: 463 abstr.

Palasz, A., Alkemade, S. and Mapletoft, R.J. 1991. The use of hyaluronic acid as a macromolecule in mouse embryo vitrification media. Theriogenology 35: 251 abstr.

Pugh, P.A., Thompson, J.G., Logan, K. and Tervit, H.R. 1994. *In vivo* survival of transferred sheep embryos following puncture of zona pellucida and *in vitro* culture. Animal Reproduction Science 35: 81-89.

Quinn, P.J. 1992. Modulation of membrane lipid phase behavior by chemical modification in situ. In: Quinn, P.J., Cherry, R.J. (Eds.). Structural and dynamic properties of lipids and membranes. Portland Press. London, UK. 29-50.

Rieger, D., Loskutoff, N.M. dan Betteridge, K.J. 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamin and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. Reproduction, Fertility and Development 4: 547-557.

Roberts, R.M., Xie, S. dan Mathialagan, N. 1996. Maternal Recognition of Pregnancy. Biology of Reproduction 54: 294-302.

Saeki, K., Nagao, Y., Hoshi, M. dan Kainuma, H. 1994. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. Theriogenology 42: 1115-1123.

Saito, N., Imai, K. and Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocyst produced *in vitro*. Theriogenology 41: 1053-1066.

Sionov, R.V., Yagel, S., Har-tier, R. dan Gallily, R. 1993. Trophoblast Protect the Inner Cell |Mass from Macrophage Destruction. Biology of Reproduction.

Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Machida, T dan Kasai, M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts derived by *in vitro* maturation and fertilization. Molecular Reproduction and Development 34: 266-271.

Talansky, B.E. and Gordon, J.W. 1989. Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona drilling. Gamete Research 21: 277-278.

Tao, T., Jiang, S., Han, Y., Gao, C., Meng, WZ., An, T.Z. and Zhu, Y. 1991. The survival of zona-free bovine demi and quarter embryos. Theriogenology 35: 281 abstr.

Thatcher, W.W., Binelli, M., Burke, M., Staples, J.C.R. Ambrose, J.D. dan Coelho, S. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. Theriogenology 47: 131-140.

Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donelly, P.E., dan Tervit, H.R. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. Journal of Reproduction and Fertility 89: 573-578.

Toner, M., Cravalho, E.G., Ebert, K.M. dan Overstrom, E.W. 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. Biology of Reproduction 34 (suppl.): 98 abstr.

Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 1997. Successful vitrification of early-stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-Letters 18: 191-195.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 1997b. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. Theriogenology 47: 501-509.

Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. 1992a. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 37: 23-37.

Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. 1992b. Effect of gas atmospheres on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Theriogenology 37: 1117-1131.

Willadsen, S.M. and Polge, C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. The Veterinary Record 108: 211-213.

Willadsen, S.M. 1983. Micromanipulation of embryos of the large domestic species. *In* Mammalian Egg Transfer. C.E. Adams (Ed.). Boca Raton, FL, CRC Press.

Willadsen, S.M. 1989. Cloning of sheep and cow embryos. Genome 31: 956-962.

Wilmut, I. And Rowson, L.E.A. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. The Veterinary Record 92: 686-690.

Xu, K.P., Loskutoff, N.M. dan Betteridge. 1991. Pregnancies resulting from bovine embryos derived from *in vitro* culture of zona-free zygotes produced by *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes. Theriogenology 35: 296 abstr.

Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization. *In* The Physiology of Reproduction. E. Knobil and J. Neill et al. (Eds). Raven Press, Ltd., New York. 135-173.

Yang, B.K., Yang, X. dan Foote, R.H. 1994. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a single serum-free medium with different concentrations of CO_2 and O_2. Journal of Reproduction and Development 40: 197-202.

Young, C.R., Knight, T.J., Batt, S.M. dan Butz, D.C. 1994. Phospholipid, cholesterol, triacyl glycerol, and fatty acid composition of porcine blastocysts. Theriogenology 41: 343 abstr.

Lampiran 1. Media Bebas Calcium

Komposisi dalam 500 ml:

2.65	g	Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
0.11	g	Potassium chloride (KCl) (Sigma)
20	mg	Sodium orthophosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (BDH)
0.15	mg	Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)
1.05	g	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma)
1.85	ml	Lactic acid (Sodium lactate, 70% syrup, Sigma)
0.5	g	Pyruvic acid (Sodium pyruvate, Sigma)
37	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
3	g	Bovine Serum Albumin (A6003, Sigma)
50	mg	Caffeine (Sigma)
1	mg	Phenol red (Sigma)

pH : 7,7

Osmolalitas : 280 – 290 mOsm/kg H_2O

Lampiran 2. Media Fertilisasi

Komposisi dalam 100 ml:

544	mg	Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
23	mg	Potassium chloride (KCl) (Sigma)
4.7	mg	Sodium orthophosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (BDH)
10	mg	Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)
220	mg	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma)
186	µl	Lactic acid (Sodium lactate, 70% syrup, Sigma)
100	mg	Pyruvic acid (Sodium pyruvate, Sigma)
7.5	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
600	mg	Bovine Serum Albumin (A6003, Sigma)
27	mg	Caffeine (Sigma)
1	mg	Heparin (Sigma)
0.05	mg	Hypotaurine (Sigma)
0.05	mg	Epinephrine Hydrochloride (Sigma)
78	mg	Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) (Sigma)

pH : 7,7

Osmolalitas : 278 mOsm/kg H_2O

Lampiran 3. Media Diseksi

Komposisi dalam 1000 ml:

100	ml	M199 Earle's (10X, cat. No. 21180-013, Gibco, Life Technology, Paisley, UK)
75	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
7.08	g	HEPES (Sigma, Poole, Dorset, UK)

pH : 7,4

Osmolalitas : 279 mOsm/kg H_2O

Lampiran 4. Media Maturasi

Komposisi dalam 500 ml:

50	ml	M199 Earle's (10X, cat. No. 21180-013, Gibco, Life Technology, Paisley, UK)
37.5	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
2.375	g	HEPES (Sigma, Poole, Dorset, UK)
1.1	g	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma)

pH : 7,8

Osmolalitas : 280 mOsm/kg H_2O

Lampiran 5. Media Pencuci Oosit

Komposisi dalam 500 ml:

3.4	g	Sodium chloride (NaCl) (Sigma)
0.11	g	Potassium chloride (KCl) (Sigma)
23	mg	Sodium orthophosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (BDH)
50	mg	Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)
84	mg	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma)
2.4	g	HEPES (Sigma)
0.93	ml	Lactic acid (Sodium lactate, 70% syrup, Sigma)
5.5	mg	Pyruvic acid (Sodium pyruvate, Sigma)
37	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
3	g	Bovine Serum Albumin (A6003, Sigma)
0.24	g	Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) (Sigma)

pH : 7,4

Osmolalitas : 282 mOsm/kg H_2O

Lampiran 6. Statistik

ANALYSIS OF VARIANCE

HEADER DATA FOR: A:%BLAST LABEL: Persentase Blastosis Kontrol, Belah 4& 8
NUMBER OF CASES: 5 NUMBER OF VARIABLES: 3

ONE-WAY ANOVA

Anova Persentase Blastosis Klp. Kontrol, Belah 4 dan Belah 8

GROUP	MEAN	N
1	18.000	5
2	15.720	5
3	11.520	5
GRAND MEAN	15.080	15

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB.
BETWEEN	108.048	2	54.024	6.734	.0109
WITHIN	96.276	12	8.023		
TOTAL	204.324	14			

HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS:POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis Kontrol dan Belah 4

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	18.0000	15.7200
ST D. DEV. =	4.4721	1.8254
N =	5	5

DIFFERENCE = 2.2800
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 2.1602

T = 1.0555 (D.F. = 8) GROUP 1: Kontrol
GROUP 2: Belah 4

PROB. = .1610

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS:POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis Kontrol dan Belah 8

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	18.0000	11.520
STD. DEV. =	4.4721	.8585
N =	5	5

DIFFERENCE = 6.4800
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 2.0365

T = 3.1819 (D.F. = 8) GROUP 1: Kontrol
GROUP 2: Belah 8

PROB. = 6.480E-03

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis Belah 4 dan Belah 8

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	15.7200	11.5200
STD. DEV. =	1.8254	.8585
N =	5	5

DIFFERENCE = 4.2000
STD. ERROR OF DIFFERENCE = .9021

T = 4.6558 (D.F. = 8) GROUP 1: Belah 4
GROUP 2: Belah 8

PROB. = 8.162E-04

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis KONTROL tanpa dan setelah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	18.0000	12.0000
STD. DEV. =	4.4721	4.4721
N =	5	5

DIFFERENCE = 6.0000
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 2.8284

T = 2.1213 (D.F. = 8) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .0333

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis BELAH 4 tanpa dan setelah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	16.0000	10.0000
STD. DEV. =	4.1833	3.5355
N =	5	5

DIFFERENCE = 6.0000
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 2.4495
T = 2.4495 (D.F. = 8) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .0200

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Persentase blastosis BELAH 8 tanpa dan sesudah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	11.0000	8.0000
STD. DEV. =	4.1833	2.7386
N =	5	5

DIFFERENCE = 3.0000
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 2.2361

T = 1.3416 (D.F. = 8) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .1083

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Jumlah sel KONTROL tanpa dan sesudah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	190.1250	190.8333
STD. DEV. =	12.7440	12.1230
N =	8	6

DIFFERENCE = -.7083
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 6.7448

T = -.1050 (D.F. = 12) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .4590

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Jumlah sel BELAH 4 tanpa dan sesudah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	43.8125	44.1000
STD. DEV. =	3.3110	3.5418
N =	16	10

DIFFERENCE = -.2875
STD. ERROR OF DIFFERENCE = 1.3703
T = -.2098 (D.F. = 24) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .4178

---------- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS ----------

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

Jumlah sel BELAH 8 tanpa dan sesudah pembekuan

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	21.2727	20.8750
STD. DEV. =	1.8488	2.0310
N =	11	8

DIFFERENCE = .3977
STD. ERROR OF DIFFERENCE = .8949
T = .4444 (D.F. = 17) GROUP 1: tanpa
GROUP 2: setelah

PROB. = .3312□

CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS
P4-22Hari

OBSERVED FREQUENCIES

	1	2	TOTAL
1	2	1	3
2	2	1	3
TOTAL	4	2	6

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .750, PROB.= .3865

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .000, PROB.=1.0000

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail = .8000, Upper Tail = .8000

CROSSTAB / CHI-SQUARE TESTS
Rektal

OBSERVED FREQUENCIES

	1	2	TOTAL
1	3	0	3
2	2	1	3
TOTAL	5	1	6

CHI-SQUARE WITH CONTINUITY CORRECTION FACTOR = .000, PROB.=1.0000

CHI-SQUARE WITHOUT CONTINUITY CORRECTION FACTOR = 1.200, PROB.= .2733

D.F. = 1

FISHER EXACT PROBABILITY: Lower Tail =1.0000, Upper Tail = .5000