



LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING VIII/1
TAHUN ANGGARAN 1999/2000

-1 AUG 2003

PAMERAN

SELESAI

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

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

drh. SUZANITA UTAMA , M.Phil.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 019 /XXIII/3/--/1999 Tanggal 1 Juni 1999
Kontrak Nomor : 022/ P2 IPT/DPPM/99/HB VIII/1/1999
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 2

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Januari, 2000

**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/ 131 877 883
 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.Laba Mahaputra, MSc., drh.	Endokrinologi	FKH/Kebidanan	Unair
2. Imam Mustofa, MKes., drh.	Reproduksi	FKH/Kebidanan	Unair
3. dr. David Simorangkir, PhD.	Kultur jaringan	FK/Histologi	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 2000/2001 : Rp. 40.000.000,-

Surabaya, 15 Desember 1999

Mengetahui,
Dekan Fakultas

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

Ketua Peneliti,

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



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
NIP. 130 355 372

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 Simorangkir, D.** , 50 halaman)

Dalam upaya menjaga kemurnian genetik dan pelestarian sapi Madura, sekaligus membantu upaya peningkatan peranan sapi Madura sebagai salah satu pemasok sapi pedaging, pengembangan bibit unggul jenis ternak tersebut melalui penyediaan embrio dalam jumlah besar perlu dilakukan.

Sejauh ini belum pernah dilakukan usaha pembuatan embrio sapi Madura kembar identik 4 ataupun 8. Bahkan pada *breed* sapi lain, usaha pembuatan embrio kembar identik 8 ini belum ada yang berhasil dengan baik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase pengompakan morula, persentase blastosis awal yang terbentuk dan jumlah total sel blastosis hasil pembelahan embrio stadium 16-sel dan 32-sel menjadi 4 dan 8 kembar identik yang dikultur dalam 2 jenis ko-kultur berupa sel kumulus dan sel epitel tuba falopii.

Embrio dibuat secara *in vitro* dengan fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium sapi Madura yang dipotong di rumah potong hewan dengan semen sapi Madura beku. Pada stadium 16-sel dan 32-sel embrio dibelah menjadi 4 dan 8 kembar identik. Kultur dilakukan pada 2 jenis kokultur yang berbeda.

Dari pembelahan embrio menjadi 4 didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan ($p > 0,05$) kuantitas (dengan parameter persentase morula kompak dan persentase blastosis) antara embrio yang dibelah pada stadium 16 dan 32 sel; Terdapat

* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
** Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
*** HB VIII/1 Tahun 1999/2000 No. 022/P2IPT/DPPM/99/PHB VIII/1/1999

perbedaan ($p < 0,05$) kualitas (dengan parameter jumlah sel blastosis) antara embrio yang dibelah pada stadium 16 dan 32 sel; Tidak terdapat perbedaan kuantitas maupun kualitas embrio belah 4 yang dikultur dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii ($p > 0,05$).

Dari pembelahan embrio menjadi 8 didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan ($p > 0,05$) kuantitas antara embrio yang dibelah pada stadium 16 dan 32 sel; Terdapat perbedaan kualitas antara embrio yang dibelah pada stadium 16 dan 32 sel ($p < 0,05$); Tidak terdapat perbedaan kuantitas maupun kualitas embrio belah 8 yang dikultur dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii ($p > 0,05$).

Selain itu didapatkan pula bahwa antara embrio yang dibelah 4 dan 8 terdapat perbedaan ($p < 0,05$) kuantitas maupun kualitas.

Dengan pengembangan penelitian ini lebih lanjut, diharapkan akan terwujud sebuah protokol pembuatan embrio kembar identik 4 dan 8 yang efisien untuk peningkatan populasi dan mutu genetik sapi Madura serta dalam upaya pelayanan penyelamatan genetika yang dapat dikembangkan untuk jenis sapi lain di Indonesia.

SUMMARY

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

(Utama, S.* , Mahaputra, L.* , Mustofa, I.* dan Simorangkir, D.** , 50 pages)

In attempts to maintain genome purity and the conservation of Madura cattle, as well as to promote the role of Madura cattle as one of beef sources, it is important to develop the mass production of the embryos.

So far, attempts to produce four and eight identical Madura cattle embryos had not been performed. Eventhough in other breeds of cattle, effort to produce eight identical embryos had not found considerable success.

The purpose of this research were to find the proportion of compacted morula, the proportion of blastocyst and the total cell number of blastocyst, resulted from slicing off the embryos at 16- and 32-cell stage into four and eight which were then co-cultured with cumulus cells and oviduct epithelial cells.

Embryos were produced *in vitro* by fertilizing oocytes from Madura cattle ovaries collected at abattoir with the frozen semen of Madura bull. At 16- and 32-cell stage, embryos were sliced into four and eight. Culture were carried out in the two different types of co-culture.

* Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University

** Faculty of Medicine Airlangga University

*** HB VIII/1 Tahun 1999/2000 No. 022/P2IPT/DPPM/99/PHB VIII/1/1999

From slicing the embryos into four, it was found that there was no difference ($p > 0.05$) in quality (with parameters of compacted morula and blastocyst proportion) between embryos sliced at 16- and 32-cell stage; There was a significant difference ($p < 0.05$) in quality (with parameter of blastocyst total cell number) between embryos sliced at 16- and 32-cell stage; There was no difference in quantity as well as the quality of embryos sliced into four co-cultured with cumulus cells and oviduct epithelial cells ($p > 0.05$).

From slicing the embryos into eight, it was found that there was no difference ($p > 0.05$) in quality between embryos sliced at 16- and 32-cell stage; There was a significant difference in quality between embryos sliced at 16- and 32-cell stage ($p < 0.05$); There was no difference in quantity as well as the quality of embryos sliced into eight co-cultured with cumulus cells and oviduct epithelial cells ($p > 0.05$).

In addition, a significant difference ($p < 0.05$) was found in quantity and quality of embryos sliced into four and eight.

As this research is further developed, it is hoped that protocol for four and eight identical embryo production become available for population and genetic improvement of Madura cattle, also for the development of genetic salvage service in Indonesia.

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 masal dan ditingkatkan kualitas genetiknya 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, 15 Februari 2000

Tim Peneliti

4.1.2. Analisa Statistik	18
4.2. Pembuatan Pipet	18
4.3. Pembuatan Monolayer	19
4.3.1. Pembuatan Monolayer Sel Kumulus	19
4.3.2. Pembuatan Monolayer Sel Epithel Tuba Falopii	20
4.4. Pembuatan Embrio Kembar Identik	21
4.4.1. Produksi Embrio <i>in vitro</i>	21
4.4.1.1. Pemasakan oosit	22
4.4.1.2. Fertilisasi	23
4.4.1.3. Kultur embrio	24
4.4.2. Pembelahan Embrio	25
4.5. Penghitungan Morula Kompak dan Blastosis	26
4.6. Penghitungan Jumlah Sel Total	26
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
5.1. Pembelahan Embrio pada Stadium 16 dan 32 Sel	27
5.2. Kokultur Embrio Belah dengan Monolayer Sel Kumulus dan Sel Epithel Tuba Falopii	30
5.3. Pembelahan Embrio Menjadi 4 dan 8	34
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	39
6.1. Kesimpulan	39
6.2. Saran	40
VII. RENCANA PENELITIAN TAHAP II	41
A. Tujuan Khusus	41
B. Metode Penelitian	42
C. Jadwal Kerja	43
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 4 pada stadium 16 sel dan 32 sel	28
Tabel 2. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 8 pada stadium 16 sel dan 32 sel	28
Tabel 3. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 4 dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi	31
Tabel 4. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 8 dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi	32
Tabel 5. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi utuh dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi	34
Tabel 6. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi Madura yang dibelah menjadi 4 dan 8	35

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Media Pencuci Oosit	51
Lampiran 2. Media Maturasi	51
Lampiran 3. Media Diseksi	51
Lampiran 4. Cara pembuatan Acetolacmoic	52
Lampiran 5. Media Earle's Balanced Salt Solution	52
Lampiran 6. Analisa Statistik	53

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Sapi Madura dikenal sebagai salah satu ternak asli atau ternak eksotik Indonesia, sehingga sapi Madura termasuk ternak yang diupayakan oleh pemerintah agar dalam habitat aslinya tidak tercemar oleh genetik sapi jenis lain. Usaha yang telah dilakukan untuk itu adalah tidak diijinkan adanya ternak sapi jenis lain atau semen beku jenis sapi lain yang masuk ke wilayah Pulau Madura. Di samping itu sapi Madura dikenal juga keunggulannya sebagai produsen daging. Sapi Madura mempunyai kemampuan konversi makanan yang baik, efisiensi reproduksi yang cukup tinggi, dan kualitas serta kuantitas karkas yang baik sehingga sangat diminati untuk sumber daging. Kedua hal di atas menyebabkan kekhawatiran terjadi seleksi negatif dan kepunahan pada sapi Madura. Dalam upaya menjaga kemurnian genetik dan pelestarian sapi Madura, sekaligus membantu upaya peningkatan peranan sapi Madura sebagai salah satu pemasok sapi pedaging, pengembangan bibit unggul jenis ternak tersebut melalui penyediaan embrio dalam jumlah besar perlu dilakukan.

Sejauh ini belum pernah dilakukan usaha pembuatan embrio sapi Madura kembar identik 4 ataupun 8. Bahkan pada *breed* sapi lain, usaha pembuatan embrio kembar identik 8 ini belum ada yang berhasil dengan baik. Tetapi memperhatikan sifat totipotensi yang dimiliki blastomer serta disokong oleh

pengembangan kokultur dengan sel-sel somatik, maka keberhasilan penerapan teknologi ini akan sangat membantu peningkatan populasi maupun mutu genetik secara cepat.

Embrio dapat dibuat secara *in vitro* dengan fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium sapi Madura yang dipotong di rumah potong hewan dengan semen sapi Madura beku. Pada stadium 16-sel dan 32-sel embrio dibelah menjadi 4 dan 8 kembar identik. Kokultur dilakukan dengan 2 jenis sel somatik yang berbeda. Selanjutnya dalam skala kecil kloning dapat dilakukan dengan pembelahan embrio menjadi 2 (*embryo splitting*) ataupun menjadi 4 (*embryo quartering*). Dibandingkan dengan teknik transfer nukleus untuk kloning skala besar, pembelahan embrio ini merupakan teknik mekanik yang relatif sederhana berupa pemotongan embrio menjadi 2 bagian atau lebih yang menghasilkan embrio kembar identik yang dapat ditransfer kepada resipien. Dibidang peternakan sapi teknik ini dapat digunakan secara efektif baik untuk peningkatan jumlah produksi embrio maupun peningkatan mutu genetik sekelompok ternak.

Sampai sekarang teknologi ini belum banyak diterapkan di Indonesia sehingga belum diketahui prosedur yang cocok untuk jenis ternak di Indonesia termasuk diantaranya sapi Madura. Oleh karena itu perlu dicoba menerapkan teknologi kloning untuk skala kecil yaitu dengan pembelahan embrio secara mekanis dan mencoba beberapa variasi dalam prosedur pembuatan embrio sapi Madura kembar identik 4 dan 8, sehingga

akhirnya akan didapatkan prosedur yang menghasilkan embrio sapi Madura kembar identik 4 dan 8 dengan kualitas yang paling baik.

1.2. Rumusan Masalah

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

1. Pada stadium mana sebaiknya pembuatan embrio sapi Madura kembar identik 4 dilakukan, dan juga jenis kokultur yang cocok digunakan untuk kultur sebelum transfer.
2. Pada stadium mana sebaiknya pembuatan embrio sapi Madura kembar identik 8 dilakukan, dan juga jenis kokultur yang cocok digunakan untuk kultur sebelum transfer. Dapat dibandingkan antara kualitas embrio hasil pembelahan menjadi 4 dan 8.

1.3. Hipotesis

1. Tidak terdapat perbedaan kuantitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 4.
2. Tidak terdapat perbedaan kualitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 4.
3. Terdapat perbedaan kuantitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 8.

4. Terdapat perbedaan kualitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 8.
5. Terdapat perbedaan kuantitas dan kualitas antara embrio belah 4 yang dikultur bersama dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii.
6. Terdapat perbedaan kuantitas dan kualitas antara embrio belah 8 yang dikultur bersama dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii.
7. Terdapat perbedaan kuantitas antara embrio belah 4 dan 8.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase pengompakan morula, persentase blastosis yang terbentuk dan jumlah total sel blastosis hasil pembelahan embrio sapi Madura stadium 16-sel dan 32-sel menjadi 4 dan 8 kembar identik yang dikultur dalam 2 jenis ko-kultur.

Dalam penelitian ini oosit yang dipakai masih diperoleh dari ovarium sapi Madura yang dipotong di Rumah Potong Hewan, namun pada penerapannya nanti oosit akan diambil dari induk Madura superior.

2.2. Manfaat

Setelah penyempurnaan pada tahun ke-II, 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 (*genetic salvage service*) untuk hewan-hewan langka yang hampir punah serta hewan-hewan superior yang tak mungkin lagi berkembang biak.

III. TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Totipotensi Oosit

Sebelum mengalami proses pembelahan oosit mamalia merupakan sel terbesar diantara sel-sel lain di seluruh tubuh, dengan rasio volume sitoplasma/nukleus yang tinggi. Fertilisasi mengaktifasi oosit untuk memulai serangkaian pembelahan mitosis (*cleavage*) yang menghasilkan sel anak yang semakin lama semakin kecil ukurannya dan semakin besar jumlahnya yang disebut blastomer (*blastomere*), membentuk embrio (Anderson, 1991). Semua blastomer yang terdapat dalam satu embrio adalah identik secara genetik karena selama *cleavage* terjadi replikasi dan penurunan genom yang terbentuk dari fusi pronukleus jantan dan betina (Gordon, 1994).

Karena ovum yang fertil ini bersifat totipoten, atau mempunyai kemampuan berkembang menjadi berbagai macam sel yang dibutuhkan dalam pembentukan keseluruhan individu, maka blastomer-blastomer ini secara individuil juga bersifat totipoten. Embrio mamalia akan dapat meneruskan perkembangan yang normal meskipun sebagian blastomernya diambil (Anderson, 1991) bahkan dapat mencapai stadium pembentukan blastosis (Ozil *et al.*, 1982).

Penelitian di Inggris dengan embrio domba 2 sel untuk pertamakalinya membuktikan kemampuan sebuah blastomer untuk berkembang menjadi blastosis yang normal (Willadsen, 1979).

Secara umum blastosis mulai kehilangan totipotensi ini setelah beberapa kali pembelahan. Pada tikus totipotensi ini mulai hilang pada stadium 4 sel. Sedangkan pada domba totipotensi ini masih ada sampai stadium 8-16 sel dan pada sapi mencapai stadium 64 sel (Wales, 1995).

Pedet kembar 2 yang normal hasil pembelahan embrio menjadi 2 telah dilahirkan, dan hingga sekarang angka kebuntingan hasil transfer embrio sapi (*in vivo*) kembar 2 telah melebihi 50 % (Gray *et al.*, 1991), sedang transfer embrio sapi Madura hasil fertilisasi *in vitro* yang dibelah menjadi 2 mencapai angka kebuntingan 33 % (Mahaputra *et al.*, 1998). Demikian pula keturunan normal telah diproduksi dari embrio sapi yang hanya berisi 1/4 jumlah blastomer asalnya (Willadsen dan Polge, 1981). Sedangkan pedet yang dilahirkan dari embrio yang berisi kurang dari seperempat jumlah sel asalnya belum pernah dilaporkan.

3.2. Morula dan Blastosis

Setelah fertilisasi, sigot mengalami beberapa kali pembelahan cleavage yang menyebabkan pembagian ooplasma menjadi blastomer yang lebih kecil. Setelah oogenetik, kejadian morfogenetik yang pertama dalam perkembangan preimplantasi adalah pengompakan morula (*compaction of morula*) diikuti dengan kavitasasi atau pembentukan blastosis atau blastulasi.

Pengompakan dimanifestasi dengan peningkatan kontak antara blastomer-blastomer sehingga terjadi penipihan sel. Kejadian ini juga disertai dengan polarisasi sitoplasma maupun permukaan sel dan adanya komunikasi hubungan interse-luler.

Dalam kejadian-kejadian morfogenesis untuk terjadinya blastosis ini dibutuhkan ekspresi gen-gen spesifik untuk kontrol genetik selama periode ini. Produk-produk gen yang berperan dalam pengompakan antara lain i) uvomorulin, suatu molekul perekat sel, ii) connexin, merupakan protein *gap junction*, iii) zonula occludens, *tight junction* serta iv) komponen membran sitoskeletal korteks (Watson, 1992).

Kejadian pengompakan penting dalam perkembangan embrio sebelum implantasi karena merupakan prasyarat untuk terjadinya kavitas. Kavitas atau pembentukan blastocoel bisa terjadi karena telah terjadinya diferensiasi sel-sel menjadi trophoctoderm dan berfungsinya transpor selektif oleh hubungan erat (*tight junction*) antar sel-sel trophoctoderm.

Selain itu, untuk blastulasi diperlukan Na/K-ATPase (subunit α dan β) serta Transforming Growth Factor $-\alpha$ (TGF- α) dan Epidermal Growth Factor (EGF) untuk ekspansi blastocoel.

Pada tikus, akumulasi cairan untuk membentuk blastocoel tergantung pada perkembangan 2 fungsi kritis membran plasma yaitu komunikasi interseluler lewat saluran membran (*membrane*

channels/gap junction), dan transport sodium trans-trophectodermal yang didorong oleh Na^+ , K^+ -ATPase (pompa sodium). Embrio yang mempunyai defek pada komunikasi lewat gap junction tak dapat mempertahankan pengompakan dan selanjutnya gagal dalam kavitas. Demikian pula dengan embrio yang diperlakukan dengan ouabain, yang merupakan inhibitor dari Na^+ , K^+ -ATPase, tak dapat mengakumulasi cairan blastocoel (Kidder dan Watson, 1990).

Adapun genom yang berperan disini bukan lagi berasal dari induk melainkan dari embrio itu sendiri. Saat transisi dari kontrol materna ke embrio ini sangat peka terhadap pengaruh lingkungan, sehingga mudah sekali terjadi gangguan transkripsi ataupun sintesis protein oleh berbagai hal selama kultur *in vitro* sehingga menghambat terjadinya pengompakan maupun blastulasi (Kidder, 1993).

Implantasi terjadi pada stadium blastosis yang merupakan perkembangan lebih lanjut dari morula setelah terjadinya pengompakan, yaitu dengan peningkatan perlekatan antara sel-sel sebelah luar dari embrio yang sedang mengalami cleavage. Dapat didefinisikan blastosis dikarakterisir dengan blastocoel atau *central cavity* yang dikelilingi oleh selapis sel atau yang disebut trophectoderm. Bentuk blastocoel adalah disimetris karena adanya inner cell mass pada kutub embriolik, sedangkan trophectoderm terdiri dari lapisan perifer yang menerus, yang secara nyata terbentuk dari sel-sel yang menipih pada kutub abembrionik (Guillomot *et al.*, 1993).

Pengompakan yang menandai awal proses pembentukan blastosis yang meliputi reorganisasi intra- dan interseluler. Selain merupakan prasyarat morfogenetik yang memadai untuk terbentuknya blastosis, pengompakan juga merupakan tanda-tanda yang terlihat bahwa embrio telah dapat melewati blok pertumbuhan pada stadium 8 - 16 sel (vanSoom *et al.*, 1992).

Selain pengompakan morula, proses pembentukan blastosis dapat dipengaruhi antara lain oleh adanya serum, asam amino, glukosa dalam media.

Serum dibutuhkan untuk kultur sel *in vitro* dan sering digunakan sebagai sumber nitrogen terikat dalam media untuk kultur embrio preimplantasi khususnya bila disertai sel somatik pembantu (Gardner, 1994), karena serum mengandung hormon, nutrien, faktor penumbuh dan faktor perekat dalam komposisi yang tak tetap, yang dibutuhkan untuk kesinambungan dan proliferasi sel (Broussard *et al.*, 1995).

Namun, selain mengandung faktor penumbuh dan senyawa-senyawa lain sebagai pengikat logam berat, serum juga mengandung peptida, protein dan sejumlah molekul yang tak pernah dijumpai embrio *in vivo* (Gardner dan Lane, 1993). Penambahan serum pada produksi embrio *in vitro* menimbulkan inklusi vesikuler dalam blastomer yang terdiri dari lemak. Selain itu terdapat induksi produksi laktat yang berlebihan yang diasosiasikan dengan berkurangnya viabilitas embrio (Gardner, 1994).

Mengingat pengaruhnya pada perkembangan embrio baik preimplantasi maupun postimplantasi, penggunaan albumin serum sebagai sumber protein alternatif perlu diteliti.

Asam amino selain menstimulir perkembangan dalam kultur, juga meningkatkan perkembangan pasca implantasi. Asam amino mempertahankan viabilitas embrio dengan berperan sebagai osmolit yang melindungi embrio terhadap stres yang ditimbulkan oleh ion-ion inorganik, sebagai bufer pH intraseluler, sebagai pengikat logam berat, sebagai sumber energi dan sebagai prekursor anabolik.

Media Tissue Culture mengandung asam amino, vitamin, prekursor asam nukleat atau garam-garam logam berat seperti copper dan besi.

Asam amino, dalam media dimetabolisir embrio yang sedang berkembang dengan hasil akhir amonium yang mempunyai efek toksik bagi embrio selama inkubasi yang berkepanjangan. Amonium menghambat perkembangan blastosis pada konsentrasi 150 μM dan menghambat cleavage pada konsentrasi 75 μM . Selain itu akibat labilnya asam amino, juga terjadi degradasi spontan pada 37 °C yang menambah tingkat toksisitas amonium yang ditimbulkan dalam 48 jam. Hal ini dapat diatasi dengan penggantian media kultur yang akan mengatasi terhentinya pertumbuhan ke stadium blastosis dan meningkatkan jumlah sel embrio (Gardner, 1994).

Terdapat cukup bukti bahwa suplementasi glukosa pada media kultur embrio tidak dibutuhkan sampai kurang lebih hari ke-3 atau 4 (Thompson, 1996) dimana suplementasi memperbaiki perkembangan (Kim *et al.*, 1993). Hal ini disebabkan karena sigot mamalia belum membutuhkan glukosa sebagai sumber energi melainkan lebih membutuhkan pyruvat dari media kultur namun pada akhirnya, kebutuhan metabolisme ini berubah kembali ke glukosa sekitar saat pengompakan morula atau pembentukan blastocoel. Penggunaan glukosa pada saat fertilisasi dan awal kultur, menimbulkan efek detrimental pada saat cleavage dan blastulasi (Gardner, 1994). Sedangkan kultur embrio tanpa glukosa pada 24 jam pertama dapat meningkatkan persentase embrio yang mencapai stadium blastosis. Diperkirakan pengaruh glukosa diperantarai oleh efek crabtree dimana fosfat inorganik merangsang glikolisis anaerobik dan menimbulkan berkurangnya fosforilasi oksidatif dan akhirnya ATP seluler sangat berkurang Furnus *et al.*, 1997).

3.3. Kokultur

Sistem kultur dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu yang menggunakan sel somatik dalam sistem kokultur dan yang tak tergantung sel somatik. Dengan sistem kokultur, embrio dikultur bersama dengan sel somatik pembantu yang akan mendukung perkembangan embrio *in vitro*.

Dukungan perkembangan ini diperkirakan melalui 2 cara yaitu *conditioning* positif dan *conditioning* negatif. Pada

conditioning positif diduga adanya faktor embriotropik yang disekresikan sel somatik, seperti growth factor; sedangkan pada *conditioning* negatif diduga adanya penyerapan senyawa-senyawa yang berbahaya bagi embrio oleh sel somatik (Thompson, 1996) serta melindungi embrio terhadap pengaruh tegangan O₂ yang tinggi dalam lingkungan kultur sel (Fukui *et al.*, 1991; Holm *et al.*, 1994). Kemungkinan juga *conditioning* positif maupun negatif, keduanya terjadi bersama-sama.

Dua jenis sel somatik yang sering dipakai untuk kokultur embrio sapi sebelum implantasi adalah sel kumulus dan sel epitel oviduk sapi. Selain kedua jenis sel ini dapat juga dipakai sel fibroblast uterus, vesikel trophoblast, sel buffalo rat liver (BRL), dan sel vero (sel epitel ginjal kera hijau) (Lai *et al.*, 1992; Carnegie *et al.*, 1997; Pegoraro *et al.*, 1998).

Kebanyakan kokultur embrio dilakukan untuk melewati blok perkembangan pada saat aktivasi genom (Pegoro *et al.*, 1998), memperbaiki angka cleavage, angka blastosis maupun jumlah sel embrio (Carnegie *et al.*, 1997; Donnay *et al.*, 1997) karena hasil-hasil penelitian menunjukkan growth factor yang disekresikan oleh sel oviduk maupun sel somatik lainnya dapat menstimulir perkembangan embrio (Bavister *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 1992); demikian pula Gandolfi *et al.* (1989) berhasil mengkarakterisir protein yang disekresikan sel oviduk domba dan menguji fungsinya pada perkembangan embrio. Dikatakan pula bahwa kokultur dapat menggantikan kerjasama antar embrio

pada embrio yang tidak dikultur secara berkelompok (Donnay *et al.*, 1997).

3.4. Mukosa Oviduk dan Kumulus Oophorus

Mukosa oviduk terdiri dari selapis sel epitel silindris yang membentuk lipatan-lipatan primer, sekunder dan tertier. Epithel mukosa oviduk terdiri dari sel bersilia dan tak bersilia dimana epitel bersilia mempunyai kinosilia dengan persentase tertinggi ada di fimbriae dan infundibulum yang berkurang secara bertahap ke arah isthmus. Epithel bersilia banyak ditemukan pada bagian apeks lipatan mukosa sedangkan epithel tak bersilia merupakan sel sekretorik yang mengandung granul-granul sekretorik dengan permukaan bagian apeks tertutup oleh sejumlah microvilli (Hafez, 1993a).

Sejalan dengan pertumbuhan folikel, terjadi akumulasi cairan folikel dalam antrum sehingga sel granulosa terpisah menjadi membrana granulosa yang terletak menempel pada lamina basalis dan menjadi bentukan kumulus oophorus yang tersusun dari banyak lapisan konsentris mengelilingi oosit dengan beberapa lapisan paling dekat dengan zona pelusida tersusun secara radial yang disebut korona radiata. Beberapa sel kumulus mempunyai penonjolan menembus zona pelusida yang masuk ke dalam sitoplasma oosit di sela-sela mikrovili dari oosit untuk menyalurkan nutrien dan protein materna (Hafez, 1993b).

IV. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan mulai tanggal 1 Agustus 1999 sampai dengan tanggal 31 Desember 1999 di sub Laboratorium Fertilisasi *in vitro*, Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

4.1. Rancangan Penelitian:

Sampel berupa embrio stadium 16-sel dan 32-sel dibuat secara *in vitro* (Mahaputra dkk., 1997) dengan fertilisasi oosit yang berasal dari ovarium sapi Madura yang dipotong di rumah potong hewan dengan semen sapi Madura beku. Embrio dari kedua stadium ini dibelah menjadi embrio kembar identik 4 dan 8 serta dikembangkan dengan kokultur menggunakan 2 jenis sel somatik yang berbeda. Pengulangan dilakukan 5 kali.

Parameter yang diamati berupa:

- terbentuknya morula kompak
- terbentuknya blastosis
- jumlah sel total blastosis

Gambaran rancangan penelitian ini secara skematis tampak sebagaimana tabel berikut.

	Kumulus		Tuba Falopii	
	16 sel	32 sel	16 sel	32 sel
dibelah 4	n=20	n=20	n=20	n=20
dibelah 8	n=40	n=40	n=40	n=40
kontrol	n=10		n=10	

4.1.1. Variabel Penelitian

4.1.1.1. Variabel bebas dan variabel tergantung

Variabel bebas pada penelitian ini adalah stadium sel pada saat dilakukannya pembelahan, yaitu stadium 16 sel dan stadium 32 sel; jenis sel somatik yang digunakan untuk kokultur embrio belah yang berupa sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi serta jumlah pembelahan dimana dalam penelitian ini embrio dibelah menjadi 4 dan menjadi 8. Variabel tergantung dalam penelitian ini berupa morula kompak, blastosis dan jumlah sel blastosis.

4.1.1.2. Definisi operasional variabel penelitian

Stadium 16 sel adalah embrio hasil produksi *in vitro* yang pada hari ke-4 mempunyai 16 blastomer dan belum mengalami pengompakan.

Stadium 32 sel adalah embrio hasil produksi *in vitro* yang pada hari ke-5 mempunyai 32 blastomer dan belum mengalami pengompakan.

Morula kompak adalah morula atau embrio yang mengandung lebih dari 16 blastomer, yang telah mengalami diferensiasi hubungan antar sel dimana terjadi kontak maksimal antara blastomer di bagian superfisial yang secara morfologis tampak sebagai pemipihan blastomer menjadi bentuk kuboid dengan garis luar masing-masing sel tak dapat dibedakan lagi sehingga tampak sebagai satu kesatuan.

Blastosis adalah embrio yang telah mengalami diferensiasi sel awal yaitu menjadi sel-sel trophoctoderm dan sel-sel inner cell mass (ICM), disertai terbentuknya rongga berisi cairan. Sel-sel trophoctoderm yang selapis pipih kuboid membentuk bagian tepi rongga dengan sel-sel ICM di bagian dalam mengelompok berbentuk cakram menempel pada salah satu kutubnya.

Jumlah sel blastosis adalah jumlah keseluruhan sel blastosis tanpa membedakan antara sel trophoctoderm dan sel Inner Cell Mass yang dihitung setelah pewarnaan Hoechst.

Persentase morula belah adalah jumlah embrio belah yang mengalami pengompakan, dibagi jumlah embrio belah yang dikultur, x 100 %. Identifikasi pengompakan embrio belah lebih memerlukan kecermatan karena

jumlah selnya yang lebih sedikit sehingga pengompakan tak terlalu nyata, ditambah lagi dengan adanya bekas sisa sel-sel yang terpotong yang masih menempel.

Persentase blastosis belah adalah jumlah embrio belah yang berubah menjadi blastosis, dibagi jumlah embrio belah yang dikultur, x 100 %.

4.1.2. Analisa Statistik

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

4.2. Pembuatan Pipet

Untuk manipulasi mikro pada embrio diperlukan pipet pemegang (*holding pipette*) yang digunakan untuk menahan embrio pada posisinya dengan tekanan hidraulik negatif dengan perantaraan minyak dalam slang teflon mikro yang dihubungkan ke *microinjector* (IM-188, Narishige, Japan).

Pipet pemegang yang tersedia secara komersial juga dapat dibuat sendiri secara manual dengan bahan dari tabung kapiler gelas berdiameter luar 1 mm (*Micropipette GD-1*, Narishige). Tabung kapiler ditarik menggunakan penarik pipet mikro (Model

PC-10, Narishige) dengan temperatur dan berat beban yang telah diatur sebelumnya sehingga didapatkan pipet gelas dengan ujung yang runcing. Ujung pipet dipotong pada diameter luar yang diinginkan yaitu 100 - 120 μm menggunakan *microforge* (Microforge MF-90, Narishige). Selanjutnya ujung pipet digrinda sampai permukaan ujung pipet rata (Microgrinder EG-40, Narishige) dan dipoles panas pada ujungnya untuk mendapatkan diameter dalam yang dibutuhkan yaitu 20 - 30 μm , serta ujung pipet yang tumpul.

4.3. Pembuatan Monolayer

4.3.1. Pembuatan Monolayer Sel Kumulus

Sel-sel kumulus dikumpulkan dari hasil aspirasi folikel setelah pengumpulan kompleks oosit kumulus, sel kumulus dibersihkan dari sisa-sisa oosit yang tak dipakai dan dicuci 2 kali dengan sentrifugasi (EBA-3S, Hettich) 1000 x g selama 10 menit dengan media pencuci oosit (Lampiran 1.). Selanjutnya pelet diresuspensi (1:9, v/v) dalam media Tissue Culture 199 (TC199, M199 Hepes Modification, Sigma) dengan penambahan 10 % Estrous Cow Serum (ECS) dan suspensi dilewatkan melalui jarum 18G beberapa kali untuk menisahkan sel-sel kumulus. Setelah dihitung dengan *improved Neubauer chamber*, konsentrasi diubah menjadi 1.10^6 sel/ml, dan sel dibiakkan dalam bentuk tetes mikro (100 μl) dibawah minyak mineral dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5 %, 39 °C, dengan kelembaban maksimal (Compact CO₂ series 5000, Thermolyne, USA) (Gordon, 1994).

Media diganti 24 jam sebelum kultur embrio dan monolayer diganti setelah berumur 5 hari.

4.3.2. Pembuatan Monolayer Sel Epithel Tuba Fallopii

Tuba falopii yang akan dipakai dipilih yang berada dalam fase luteal awal atau baru saja terjadi ovulasi dimana pada ovarium masih terdapat korpus rubrum dan dari fimbriae sampai dengan *utero-tubal junction* (UTJ) tampak warna kekuningan. Tuba falopii yang sudah dipisahkan dari jaringan penggantungnya diligasi di bagian ujung UTJ. Larutan trypsin 0,125 % dalam Phosphat Buffer Solution (PBS) dimasukkan ke lumen tuba sampai penuh dan ujung lainnya diikat pula. Setelah inkubasi selama 10 menit dalam inkubator, ikatan dibuka dan tuba digelontor dengan 2 ml media pencuci oosit. Hasil ditampung dalam tabung konikal dan dicuci 2 kali dengan sentrifugasi berkecepatan 1000 x g selama 10 menit dengan media pencuci oosit dan terakhir dengan media maturasi (Lampiran 2) dengan bufer NaHCO_3 dan HEPES. Selanjutnya pelet terakhir diresuspensi (1:9, v/v) dalam media TC199 dengan penambahan 10 % FBS dan suspensi dilewatkan melalui jarum 18G selama 3 kali untuk memisahkan sel-sel. Setelah konsentrasi dihitung dan diubah menjadi 1×10^6 sel. ml^{-1} , selanjutnya sel dibiakkan dalam bentuk tetes mikro dibawah minyak mineral dan diinkubasikan dalam inkubator CO_2 5 %, 39 °C, dengan kelembaban maksimal (Ouhibi *et al.*, 1988). Separuh dari media diganti (*replenished*) sebelum kokultur dan setelah berumur 5 hari, dipakai kultur primer yang baru yang telah dipersiapkan

sebelumnya.

Gambaran yang menonjol pada suspensi jaringan oviduk yaitu pergerakan fragmen lipatan mukosa yang disebabkan oleh aktivitas kinosilia. Dalam 24 jam, kebanyakan dari serpihan jaringan mukosa ini membentuk vesikel-vesikel epithelial berisi cairan dan bergerak aktif. Akhirnya sel-sel dan fragmen jaringan menempel pada dasar cawan petri pada hari ke-2 dan membentuk monolayer konfluen setelah 6 hari. Aktivitas kinosilia pada vesikel epithel dan monolayer menghilang setelah 7 hari. Demikian pula monolayer sel kumulus konfluen terbentuk dalam 6 hari, sehingga dalam penelitian ini kedua jenis monolayer diganti dengan kultur sel primer yang baru setelah berumur 5 hari.

4.4. Pembuatan Embrio Kembar Identik

4.4.1. Produksi Embrio *in vitro*

Embrio dibuat secara *in vitro* dengan fertilisasi oosit yang diaspirasi dari ovarium sapi Madura yang dipotong di rumah potong hewan Pegirian Kotamadya Surabaya. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam waktu kurang dari 2 jam dengan temperatur dipertahankan pada 35 °C dalam termos berisi NaCl 0,9 % (w/v) yang mengandung 100 IU penicillin dan 100 µg streptomycin/ml.

4.4.1.1. Pemasakan oosit

Untuk setiap ulangan diperlukan minimal 20 pasang atau 40 buah ovarium. Ovarium dibersihkan dari jaringan lain dan dicuci dengan NaCl fisiologis hangat. Kompleks oosit kumulus (KOK) diaspirasi dari folikel berukuran 2-7 mm dengan spuit 5 cc dan jarum 18G kemudian ditampung dalam tabung yang diletakkan dalam waterbath dengan temperatur 38°C. Setelah semua folikel diaspirasi, hasil aspirasi dalam tabung dibiarkan selama 5 menit untuk pengendapan. Setelah cairan folikel yang berada di bagian atas dibuang, endapan dituang ke dalam cawan petri untuk koleksi KOK. Kemudian oosit dengan minimal 3 lapis sel kumulus yang belum *expanded*, dengan sitoplasma yang homogen dikumpulkan dan dicuci 2 kali dengan media diseksi (Lampiran 3.) yang mengandung buffer HEPES (25mM). Selanjutnya 30-40 oosit dimasukkan dalam tetes media maturasi (400 µl) yang ditutup dengan minyak mineral dan telah diekuilibrasikan 2 jam sebelumnya dalam inkubator CO₂ 5 %, 39 °C, dengan kelembaban maksimal selama 24 jam.

Untuk konfirmasi hasil maturasi ditentukan dengan sampling 15-20 oosit dari setiap ulangan pada 20 jam setelah maturasi. Oosit dibersihkan dari sel-sel kumulus menggunakan hyaluronidase (Sigma) dan difiksasi dalam campuran methanol-asam asetat (3:1, v/v) selama minimal 24 jam dan diwarnai dengan aceto-lacmoic 1 % (Sigma, Lampiran 4.). Hasil diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 x terhadap keberadaan *plate* metaphase dan badan kutub I (x 100 %).

4.4.1.2. Fertilisasi

Dua jam sebelum dilakukan fertilisasi, bentukan roset dari media Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Sigma) dengan penambahan 1,5 % Bovine Serum Albumin (BSA, FAF free, Sigma) dipersiapkan. Roset berupa 8 tetes media sebanyak 45 μ l di tepi cawan petri (diameter 60 mm, NunClon, NUNC) dan 1 tetes media sebanyak 100 μ l di pusat cawan petri yang dihubungkan dengan garis tipis lurus kemasing-masing tetes tepi. Roset dilapisi dengan minyak mineral dan diekuilibrasikan dalam inkubator CO₂ 5 %, 39 °C, dengan kelembaban maksimal.

Tiga straw semen beku sapi Madura dicairkan dalam water-bath 35 °C (Memmert, W 200) selama 60 detik. Lalu semen dicuci 2 kali masing-masing dengan 6 ml dan 3 ml media EBSS dengan pemusingan 700 x g selama 10 menit. Setelah supernatan dibuang, ke dalam tabung dengan pelet di dasarnya dimasukkan 1 ml media EBSS perlahan-lahan melalui dinding tabung dan dibiarkan selama 30 menit untuk terjadinya proses *swim up*. Proses *swim up* ini lebih ditujukan untuk mendapatkan spermatozoa yang 100 % hidup daripada spermatozoa dengan motilitas tinggi.

Sementara menunggu hasil *swim up*, oosit yang telah masak dipilih dan dicuci 2 kali dengan media pencuci oosit dan dicuci sekali lagi dengan media EBSS. Selanjutnya masing-masing 10 oosit dalam maksimal 5 μ l EBSS dimasukkan dalam tetes-tetes tepi roset.

Setelah inkubasi selama 30 menit, 0,85 ml cairan di bagian atas tabung dipindahkan ketempat lain, diaduk perlahan supaya homogen dan dihitung konsentrasinya dengan *Improved Neubauer Chamber*. Selanjutnya konsentrasi diubah menjadi 3×10^6 /ml. Dari suspensi ini 100 μ l diambil dan dimasukkan kedalam pusat roset sehingga didapatkan konsentrasi akhir $0,5 \times 10^6$ /ml. Sistem roset ini digunakan untuk mengurangi tingkat polispermi yang cukup tinggi pada teknik fertilisasi *in vitro*.

Untuk konfirmasi hasil fertilisasi, ditentukan dengan sampling 15-20 oosit dari setiap ulangan pada 20 jam setelah fertilisasi. Oosit dibersihkan dari sel-sel kumulus menggunakan hyaluronidase (Sigma) dan difiksasi dalam campuran methanol-asam asetat (3:1, v/v) selama minimal 24 jam dan diwarnai dengan aceto-lacmoic 1 %. Hasil diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 x terhadap keberadaan 2 pronukleus ($\times 100$ %). Sedangkan angka *cleavage* dihitung dari jumlah embrio yang mempunyai lebih dari 1 sel/jumlah seluruh embrio dengan pemeriksaan dibawah mikroskop pada pembesaran 100 x, 48 jam setelah fertilisasi.

4.4.1.3. Kultur embrio

Embrio dibiakkan bersamaan dengan kultur primer dari sel kumulus dan dari sel epithel tuba falopii dalam media maturasi dengan penambahan 10 % ECS. Kedua jenis monolayer berumur 3 hari. Separuh dari media diganti (*replenished*) tiap 48 jam.

4.4.2. Pembelahan Embrio

Prosedur pembelahan embrio dilakukan dibawah mikroskop inverted (CK-2, Olympus, Japan) dengan *stage* pemanas untuk mempertahankan cawan petri beserta isinya pada 36 °C. Mikroskop dilengkapi dengan 3D *Hydraulic Fine Control Micromanipulator* (MO-188, Narishige) dan 3D *Motor Drive Coarse Control Manipulator* (MM-188, Narishige).

Dalam penelitian pendahuluan didapatkan kesulitan dalam melakukan pemotongan karena terlalu tebalnya pisau pemotong yang berupa scalpel blade. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan *razor blade* atau pisau silet yang relatif lebih tipis.

Embrio 16 sel dipanen pada hari ke-4 sedangkan embrio 32 sel dipanen pada hari ke-5. Embrio dalam tetes media manipulasi (media diseksi) difiksasi dengan pipet pemegang dengan tekanan hidraulik negatif kemudian pisau pembelah digerakkan maju mundur untuk membuat robekan pada zona pelusida. Selanjutnya embrio dikeluarkan dari zona pelusida dengan menyemprotkan media manipulasi ke dalam rongga perivitelin. Embrio yang telah lepas dari zona pelusida dibelah menjadi 2 bagian sama besar dan masing-masing belahan dibelah lagi menjadi 2 untuk embrio kembar 4 dan menjadi 4 untuk embrio kembar 8. Selanjutnya embrio dikembalikan ke dalam kultur dan perkembangan embrio diobservasi setiap 24 jam.

4.5. Penghitungan Morula Kompak dan Blastosis

Persentase morula kompak dihitung pada hari ke-6 setelah fertilisasi sedangkan persentase blastosis dihitung pada hari ke-8. Persentase morula kompak dan blastosis dipakai sebagai indikator kuantitatif.

4.6. Penghitungan Jumlah Sel Total

Penghitungan jumlah sel total blastosis dilakukan pada hari ke-8 dibawah mikroskop fluoresens dengan pembesaran 400x setelah pewarnaan dengan pewarna vital Hoechst 33342 (Sigma). Jumlah sel didasarkan atas hitungan nukleus dan jumlah sel dipakai sebagai indikator kualitatif. Nukleus sel yang hidup berukuran seragam dan meneruskan emisi sinar ultraviolet; sedang nukleus sel yang rusak akan terlihat berukuran jauh lebih kecil.

Pewarnaan Hoechst

Blastosis dicuci dalam media diseksi hangat berisi 10 µg/ml bisBenzimide (Hoechst 33342, Sigma) selama 5 menit dalam inkubator. Selanjutnya blastosis diletakkan dalam tetes 2 µl 1,4,-diazabicyclo-2,2,2-octane (DABCO, Sigma) 5 % dalam gliserol diatas gelas obyek yang telah dilapisi dengan campuran lilin parafin dan vaselin (1:9, b/b). Blastosis ditekan dengan gelas penutup dan jumlah sel dihitung dibawah mikroskop (Labophot, Nikon) dengan perlengkapan epifluoresens dan filter eksitasi ultra violet.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 5 kali ulangan produksi embrio *in vitro* didapatkan rata-rata 75,6 % oosit mencapai stadium metafase II setelah pemasakan; 64,3 % dari oosit menunjukkan adanya pembentukan pronukleus jantan pada 20 jam setelah fertilisasi dan 60,3 % dari oosit mengalami *cleavage*.

5.1. Pembelahan Embrio pada Stadium 16 dan 32 Sel

Embrio yang dapat lolos dari masa kritis pada peralihan kontrol genom materna ke embrio segera memasuki stadium morula, dengan jumlah blastomer lebih dari 16 dan pada saatnya akan mengalami pengompakan dimana terjadinya pengompakan ini tidak tergantung dari jumlah sel (Loskutoff *et al.*, 1991; Parish and First, 1993). Seiring dengan terjadinya pengompakan, sel-sel mulai mengalami polarisasi dan deferensiasi, oleh karena itu, untuk menghindari bidang pembelahan (*plane*) yang tak sesuai dengan polarisasi (Anderson, 1991) dalam penelitian ini hanya dipakai embrio 16 sel dan 32 sel yang belum mengalami pengompakan.

Hasil pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 dapat dilihat masing-masing pada Tabel 1. dan Tabel 2.

Tabel 1. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 4 pada stadium 16 sel dan 32 sel.

	embrio belah 4		
	morula kompak	blastosis	jumlah sel
16 sel	11,96±2,7	12,96±2,7	41,78±1,0 ^a
32 sel	11,63±3,2	12,19±3,7	43,90±1,5 ^b

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

Tabel 2. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 8 pada stadium 16 sel dan 32 sel.

	embrio belah 8		
	morula kompak	blastosis	jumlah sel
16 sel	9,55±3,2	10,06±4,5	20,16±1,1 ^a
32 sel	8,03±4,9	9,00±3,9	22,30±0,7 ^b

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

Ternyata, baik pada embrio yang dibelah menjadi 4 maupun 8, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada jumlah sel blastosis hari ke-8 antara embrio yang dibelah pada stadium 16 sel dan 32 sel. Walaupun terdapat perbedaan jumlah sel pada blastosis hari ke-8, namun tidak dijumpai adanya perbedaan yang berarti pada persentase morula kompak dan persentase blastosis.

Perbedaan antara embrio stadium 16 sel dan 32 sel hanyalah terletak pada ukuran masing-masing blastomernya, dimana blastomer embrio stadium 32 sel mempunyai volume setengah

dari volume blastomer embrio stadium 16 sel. Mengingat hal tersebut, perbedaan jumlah sel blastosis yang bermakna ini bisa disebabkan oleh adanya persentase kerusakan sel yang lebih banyak pada bidang pembelahan embrio stadium 16 sel. Menurut Anderson (1981), pembelahan embrio menyebabkan terpotongnya blastomer sebanyak kurang lebih 15 %. Blastomer yang terpotong selanjutnya akan mengalami lisis dan mati. Sisa potongan biasanya mengkerut dan tetap menempel pada blastomer disekitarnya. Bila sisa potongan ini masih mengandung inti, pada pewarnaan dengan Hoechst akan tetap terwarnai namun mudah sekali dibedakan dari sel yang hidup. Karena embrio stadium ini masih totipoten, maka pemisahan blastomer menjadi beberapa populasi baru akibat pembelahan tak akan menyebabkan suatu kelainan atau cacat yang timbul saat gastrulasi. Demikian pula terpotongnya blastomer tak akan menimbulkan gangguan pada diferensiasi menjadi ketiga lapisan germinal primer embrio (ectoderm, mesoderm dan endoderm). Kecacatan yang bisa timbul akibat pembelahan embrio biasanya terjadi secara *in vivo* akibat tidak tuntasnya pembelahan pada populasi sel-sel ICM (masih ada yang gandeng) yang dalam perkembangan selanjutnya mengakibatkan kembar identik dengan perlekatan di bagian tubuh tertentu ataupun organ tunggal pada kembar siam.

Kemungkinan yang lain adalah, kalau diasumsikan bahwa segera setelah pembelahan jumlah sel yang tidak rusak sana, namun jumlah sel yang terus berkembang sampai hari ke-8 berbeda, maka hal ini bisa disebabkan karena stadium 16 sel

terlalu dekat atau masih merupakan masa transisi pengambilalihan kontrol genom oleh embrio sehingga pembelahan pada saat ini memberikan stres yang cukup untuk terjadinya gangguan perkembangan. Bila pengaruh mekanik, fisik maupun yang lainnya dari pembelahan diabaikan, seharusnya, pada stadium berapa sekalipun dilakukan pemotongan, pada titik akhir (*end point*) observasi yang sama akan didapat jumlah sel yang sama.

Jadi, walaupun hanya berbeda dalam jumlah sel blastosis dan tak ada perbedaan pada persentase morula kompak dan persentase blastosis, maka dapat dikatakan pembelahan embrio sapi Madura menjadi 4 dan 8 lebih baik dilakukan pada stadium 32 sel. Perlu pula dicoba, pada stadium lain yang relatif aman, seperti stadium 4 sel dan stadium blastosis. Namun tentu saja pada kedua stadium ini hanya dapat dilakukan pembelahan menjadi 4.

5.2. Kokultur Embrio Belah dengan Monolayer Sel Kumulus dan Sel Epithel Tuba Falopii Sapi

Pada embrio utuh, sistem kokultur sering dipakai untuk memperbaiki angka blastosis dan jumlah sel blastosis (Bongso *et al.*, 1993; Broussard *et al.*, 1995; Pegoraro *et al.*, 1998). Untuk embrio belah, masalah pengompakan dan blastulasi tampaknya lebih ditentukan oleh kualitas oosit dan kondisi pada saat fertilisasi. Penelitian vanSoom (1992) menunjukkan bahwa embrio yang mengalami *cleavage* (dalam artian pembelahan pertamanya) terlambat, lebih sedikit kemungkinannya akan

mengalami pengompakan dan blastulasi. Sedangkan fertilisasi dengan keberadaan glukosa dalam media, juga menghambat *cleavage* dan pembentukan blastosis (Matsuyama *et al.*, 1993). Berhubungan dengan jumlah sel pada embrio belah, ternyata embrio yang kompeten untuk mengalami pengompakan dan blastulasi, tidak tergantung dari jumlah sel embrio saat itu. Lebih jelasnya, pada saat pengompakan, embrio akan mengalami pengompakan, dan pada saat blastulasi embrio akan mengalami blastulasi, berapapun jumlah sel yang dimiliki embrio sehingga tergantung dari kecepatan pembelahannya, secara individu embrio mengalami pengompakan dengan jumlah sel yang berbeda-beda, demikian pula dengan blastulasi. Jadi yang dibutuhkan untuk kompensasi pembelahan ini sebenarnya adalah memacu kecepatan pembelahan blastomer sehingga pada saat blastulasi jumlah sel lebih banyak.

Sistem kokultur dengan sel somatik telah dilakukan untuk kultur embrio pada berbagai spesies (Eyestone, 1989) dengan penggunaan berbagai jenis sel somatik yang tidak harus berasal dari spesies yang homolog (Bongso *et al.*, 1993).

Tabel 3. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 4 dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi.

	embrio belah 4		
	morula kompak	blastosis	jumlah sel
kumulus	12,07±2,7	12,58±3,8	42,90±2,0
tuba	11,52±3,3	12,57±2,7	42,78±1,4

Tabel 4. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi yang dibelah 8 dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi.

	embrio belah 8		
	morula kompak	blastosis	jumlah sel
kumulus	7,97±4,5	8,47±3,8	21,18±1,7
tuba	9,61±3,7	10,59±4,4	21,28±1,2

Hasil kokultur dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii yang dapat dilihat pada Tabel 3. dan Tabel 4. menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna untuk terjadinya pengompakan, blastulasi dan jumlah sel blastosis. Perbedaan mungkin akan tampak bila dipakai titik akhir observasi yang lebih jauh ke belakang seperti misalnya viabilitas setelah pembekuan dan setelah transfer. Alasannya, kalau diasumsikan ada perbedaan yang sangat kecil antara kokultur dengan kedua jenis sel somatik ini, kemungkinan perbedaan ini dapat diamplifikasi dengan tenggang waktu observasi yang lebih jauh dan dengan kondisi kultur yang lebih optimal. Dengan kata lain, pengaruh perlakuan lebih terlihat. Kurang optimalnya kondisi ini bisa diatasi dengan penggunaan media fertilisasi yang bebas glukosa, dan penggunaan media bebas glukosa dan serum pada 24 jam pertama kultur embrio. Kejadian *in vivo* juga menunjukkan adanya kebutuhan embrio akan dukungan lingkungan yang spesifik menurut stadiumnya. Sebagai contoh, blastosis yang menetap dalam oviduk akan mengalami

gangguan perkembangan lebih lanjut (Goff dan Smith, 1989). Selain itu, kemungkinan sebenarnya terdapat masalah kompetisi nutrien antara embrio yang dibiakkan dengan sel-sel *feeder*-nya, karena dalam kultur sel ini sel-sel somatis terus membelah secara rutin sehingga cepat memenuhi dasar cawan petri (terjadi *overgrowth*), dimana hal ini tidak terjadi secara *in vivo*. Dikhawatirkan, selain adanya kompetisi nutrien, juga terdapat deferensiasi sel-sel somatik yang mengganggu fungsi normalnya, serta terjadinya pengasaman media secara cepat. Dalam penelitian ini, hal ini diusahakan menjadi minimal dengan penggantian monolayer setelah berumur 5 hari. Pada penelitian yang menggunakan sel-sel vero (Carnegie *et al.*, 1997), dilakukan penghambatan proliferasinya sebagai sel *feeder* dengan pemberian mitomycin.

Jadi perlu dicoba penggunaan faktor penumbuh (*growth factor*), sebagai substansi penacu pembelahan blastomer, seperti misalnya Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) (Voelkel dan Hu, 1992) karena telah terbukti bahwa IGF-II dapat meningkatkan jumlah sel total blastosis dimana peningkatan ini bukan hanya disebabkan oleh peningkatan jumlah sel-sel trophoctoderm saja melainkan juga oleh peningkatan jumlah sel-sel ICM dimana sel ICM ini jauh lebih peka terhadap stres dan kondisi lingkungan ataupun kultur yang kurang optimal dibandingkan dengan sel-sel trophoctoderm (Utana, 1997); juga pengaturan komposisi media yang spesifik dengan stadium perkembangan atau bahkan penggunaan agens pencegah prolifera-

si yang berlebihan dari sel *feeder* perlu dicoba untuk perkembangan embrio belah.

Tabel 5. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi utuh dengan kokultur sel kumulus dan sel epitel tuba falopii sapi.

	embrio utuh		
	morula kompak	blastosis	jumlah sel
kumulus	14,00±5,6	16,00±5,5	189,28±2,8
tuba	16,00±5,5	18,00±8,4	190,16±4,4

Pada Tabel 5. tampak pula bahwa embrio utuh sebagai kontrol yang dikokultur bersama monolayer sel kumulus dan monolayer sel epitel tuba falopii juga tak menunjukkan adanya perbedaan dalam persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis.

5.3. Pembelahan Embrio Menjadi 4 dan 8

Secara umum, perbedaan antara embrio hasil pembelahan 4 dan 8 adalah terletak pada jumlah sel embrio belah tersebut. Pada pembelahan embrio menjadi 4, masing-masing embrio belah akan memiliki sekitar 1/4 jumlah sel embrio utuh, demikian pula embrio hasil pembelahan menjadi 8 akan memiliki sekitar 1/8 jumlah sel embrio utuh. Tentu saja, perbedaan jumlah sel akibat pembelahan menjadi 4 dan 8 ini sudah tergambar

jelas dan tak perlu diperbandingkan. Namun sebenarnya secara langsung pemotongan embrio menjadi 4 dan 8 bisa menimbulkan proporsi penurunan jumlah sel yang tidak sama akibat terpotong sehingga blastomer lisis. Secara tak langsung, dampak yang timbul berupa trauma mekanis bagi embrio belah juga tak sama karena jumlah kali pemotongan yang berbeda. Faktor ini kemungkinan bisa membedakan dampak yang timbul berupa stres fisik bagi embrio belah dalam perkembangannya termasuk dalam hal pengompakan dan blastulasi. Persentase pengompakan morula, persentase blastulasi dan jumlah sel akibat pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 dapat dilihat pada Tabel 6., dimana terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara embrio belah 4 dan 8 baik dalam persentase morula kompak maupun persentase blastosis.

Tabel 6. Persentase morula kompak, persentase blastosis dan jumlah sel blastosis hari ke-8 hasil kultur embrio sapi Madura yang dibelah menjadi 4 dan 8.

	morula kompak	blastosis	jumlah sel
kontrol	15,0±5,3 ^a	17,0±6,7 ^a	189,7±3,5 ^a
belah 4	11,8±3,0 ^a	12,6±3,2 ^b	42,8±2,3 ^b
belah 8	8,8±4,0 ^b	9,5±4,2 ^c	21,2±1,9 ^c

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

Kelompok embrio belah 4, bila dibandingkan dengan kontrol, ternyata persentase morula kompak tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) sedangkan persentase blastosis berbeda nyata (p

<0,05). Walaupun persentase blastosis embrio belah 4 berbeda secara nyata dibanding kontrol, namun persentase morula kompak embrio belah 4 yang sebanding dengan kontrol lebih memberikan harapan.

Karena pengompakan dan blastulasi dapat terjadi pada saatnya tanpa tergantung dari jumlah sel yang dimiliki, maka baik embrio yang mempunyai 1/4 maupun 1/8 jumlah sel embrio utuh akan memiliki kompetensi yang sama untuk pengompakan morula dan blastulasi. Kalaupun akhirnya ada perbedaan, hal ini tentunya disebabkan akibat stres yang relatif lebih besar pada pembelahan embrio menjadi 8. Tentu saja, blastosis embrio belah berukuran lebih kecil dari blastosis embrio utuh, karena mempunyai jumlah sel yang lebih sedikit. Bila dilakukan transfer, blastosis hasil pembelahan ini akan tetap lebih kecil pada masa awal kebuntingan, tetapi pada saat dilahirkan sudah akan berukuran normal (McLaren, 1990).

Walaupun embrio utuh, embrio belah 4 dan embrio belah 8 memiliki kompetensi yang sama untuk blastulasi, perlu diteliti lebih lanjut, apakah pada blastosis embrio belah ini, terutama belah 8, mempunyai *inner cell mass* (ICM) didalamnya. Untuk itu, sebelum melakukan usaha transfer embrio belah, perlu dilakukan terlebih dahulu evaluasi keberadaan ataupun menghitung jumlah sel-sel ICM yang dapat dilakukan dengan pewarnaan deferensial. Kekhawatiran ini timbul mengingat proses diferensiasi yang terjadi pada peralihan dari morula ke blastosis, selapis blastomer yang pada saat morula terle-

tak di bagian superfisial akan membentuk lapisan perifer yang kuboid yang disebut trophoctoderm yang berfungsi dalam pengambilan nutrien secara selektif dan dalam perkembangan lebih lanjut akan menjadi chorion. Hubungan antar sel kuboid ini yang mula-mula berupa *gap junction* segera berubah menjadi *tight junction* dan membentuk suatu *seal* yang menisahkan sel-sel ICM dari lingkungan luar. Demikian pula sel kuboid ini tampak semakin pipih seiring dengan ekspansi blastosis akibat peningkatan volume cairan dalam blastocoel. Kelompok blastomer profunder yang mempunyai proporsi jauh lebih kecil, akan membentuk embrioblast atau ICM yang dalam perkembangannya akan menjadi 3 lapisan germinal primer embrio saat gastrulasi.

Kalau dihitung secara total, embrio yang dibelah 2 misalnya, akan menjadi 2 demiembrio dengan jumlah sel $1/2$ dari jumlah sel embrio utuh. Proporsi ICM dari jumlah total sel blastosis berkisar antara 20 - 40 % (Iwasaki *et al.*, 1990; Bredbacka *et al.*, 1991). Secara kasar, kalau dihitung dari jumlah sel total, embrio yang dibelah akan mempunyai jumlah sel total satu per jumlah pembelahan dari jumlah sel embrio utuh. Namun hal ini tak terjadi dengan jumlah hitungan sel ICM karena jumlah alokasi sel untuk ICM tergantung dari jumlah sel yang terkandung dalam morula saat pengompakan (*inside-outside hypothesis*) (vanSoom *et al.*, 1996). Setelah pembelahan, sel yang berada di bagian dalam yang merupakan calon fetus, proporsinya menurun drastis (Bredbacka *et al.*, 1991) sampai diperkirakan kemungkinan terjadinya pseudoblas-

tosis atau blastosis yang tidak mengandung ICM yang bila berkembang akan menjadi kantung yang berisi cairan saja tanpa fetus di dalamnya. Kalaupun masih terdapat ICM dalam jumlah yang sangat sedikit, diperkirakan tidak akan cukup untuk mendukung perkembangan embrio lebih lanjut setelah transfer (vanSoom *et al.*, 1996).

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Tidak terdapat perbedaan kuantitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 4.
2. Terdapat perbedaan kualitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 4.
3. Tidak terdapat perbedaan kuantitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 8.
4. Terdapat perbedaan kualitas antara hasil pembelahan embrio stadium 16 sel dan 32 sel menjadi 8.
5. Tidak terdapat perbedaan kuantitas dan kualitas antara embrio belah 4 yang dikultur bersama dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii.
6. Tidak terdapat perbedaan kuantitas dan kualitas antara embrio belah 8 yang dikultur bersama dengan sel kumulus dan sel epitel tuba falopii.
7. Terdapat perbedaan kuantitas antara embrio belah 4 dan 8.

6.2. Saran

1. Pembelahan embrio menjadi 4 dicoba pada stadium 4 sel atau blastosis. Pada stadium 4 sel, hubungan interseluler masih renggang, dengan rongga interseluler yang lebar sehingga pembelahan pada stadium ini, apalagi menggunakan jarum sebagai pengganti pisau, kemungkinan akan lebih sedikit menimbulkan kerusakan dan stres. Pada stadium blastosis, diferensiasi sudah jelas sehingga pembelahan menjadi 4 dapat dengan mudah dilakukan untuk mendapatkan embrio belah yang masing-masing mendapat alokasi ICM yang sama.
2. Untuk optimalisasi kondisi fertilisasi *in vitro*, perlu dicoba penggunaan media kapasitasasi dan fertilisasi bebas glukosa serta media bebas glukosa dan serum untuk kultur embrio pada 24 jam pertama.
3. Penyediaan kultur primer yang baru setiap saat sangat merepotkan maka perlu dicoba penggunaan agen pencegah proliferasi sel somatik atau tanpa kokultur yaitu dengan *chemically defined* media seperti Synthetic Oviduct Fluid (SOF), dengan penambahan faktor penumbuh IGF-II karena penambahan IGF-II pada blastosis utuh selain dapat meningkatkan produksi blastosis juga dapat meningkatkan jumlah sel embrio, termasuk jumlah sel ICM.

VII. RENCANA PENELITIAN TAHAP II

Walaupun beberapa peneliti menyatakan perlunya zona pelusida pengganti dalam transfer embrio belah ke induk resipien, beberapa peneliti menyatakan tidak adanya pengaruh zona pelusida pengganti ini. 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.

Dalam penelitian Tahap II ini untuk pembelahan embrio menjadi 8 akan dipakai embrio stadium 32 sel karena hasil penelitian Tahap I menunjukkan 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 *glass microneedle*; Demikian pula titik akhir observasi diperpanjang untuk mendapatkan gambaran yang lebih nyata.

A. Tujuan Khusus

1. Mencari prosedur pembelahan embrio menjadi 4 dan 8 yang lebih sedikit menimbulkan gangguan perkembangan.
2. Melihat kualitas embrio belah, dengan kriteria morfologi blastosis setelah pembekuan; jumlah sel total dengan pewarnaan Hoechst; serta jumlah sel ICM dan trophoctoderm setelah pewarnaan deferensial.
3. Melihat angka kebuntingan setelah transfer embrio belah dengan dan tanpa zona pelusida pengganti.

B. Metode Penelitian

Produksi embrio *in vitro*

Embrio dibuat menurut prosedur yang sama dengan sedikit modifikasi, berupa penggunaan media kapasitasi dan fertilisasi bebas glukosa. Demikian pula kultur embrio dilakukan dalam media Synthetic Oviductal Fluid (SOF) dengan penambahan faktor penumbuh IGF-II. Untuk embrio yang dibelah 4, embrio stadium 4 sel dipanen pada 36 jam setelah fertilisasi dan untuk embrio yang dibelah 8, embrio stadium 32 sel dipanen pada hari ke-5. Zona pelusida dihilangkan dengan pemberian larutan Tyrode dengan pH 2,1.

Preparasi Zona Pelusida Pengganti

Zona pelusida pengganti didapatkan dari oosit yang diambil dari ovarium sapi dari rumah potong. Oosit dipegang dengan pipet pemegang mikro, zona pelusida dibuka sekecil mungkin menggunakan microneedle dan oosit dihisap keluar. Zona pelusida kosong dibekukan pada -20°C dalam PBS dengan penambahan serum dan dicairkan kembali pada saat akan digunakan. Untuk transfer, setelah embrio belah dimasukkan ke zona pelusida pengganti, zona pelusida diisolasi dalam silinder agar.

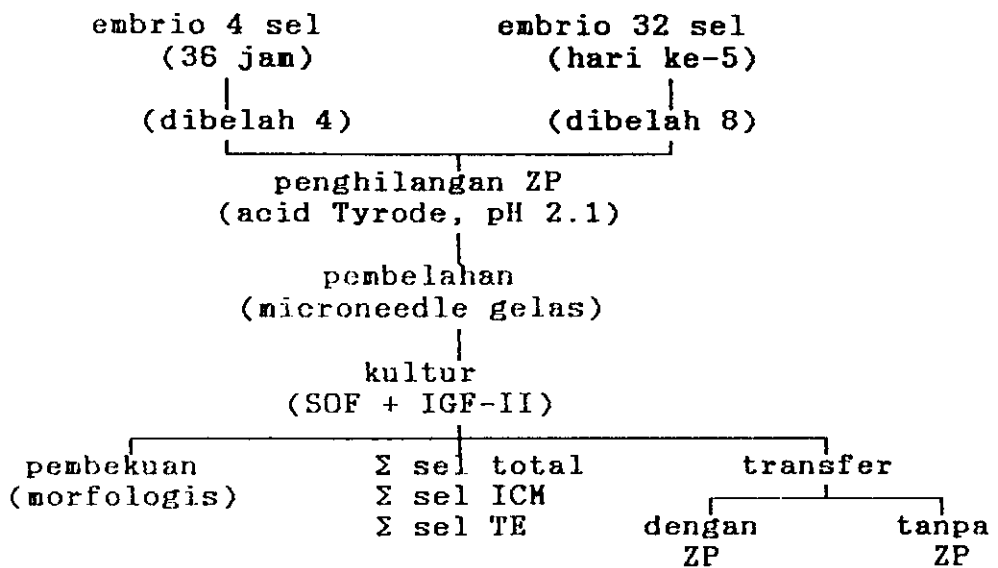
Pembuatan microneedle

Microneedle gelas dibuat dari tabung kapiler mikro dengan penarikan. Ujungnya dibuat miring dengan bentukan lancip dipuncaknya.

Parameter Penelitian

Parameter penelitian berupa morfologi blastosis setelah pembekuan, jumlah sel total setelah pewarnaan Hoechst, jumlah sel ICM dan trophoctoderm setelah pewarnaan deferensial serta angka kebuntingan setelah transfer dengan dan tanpa zona pelusida. Angka kebuntingan berdasarkan pemeriksaan kadar Progesteron darah pada hari ke-21 yang dikonfirmasi dengan pemeriksaan per rektal pada hari ke-60.

Skema penelitian:



C. Jadwal Kerja

Bulan I s/d bulan IX, dilakukan beberapa ulangan dengan urutan sebagai berikut:

- hari -1: Produksi embrio, pembelahan dan kultur sampai stadium blastosis
- hari +8: pembekuan, pewarnaan (Hoechst dan deferensial), transfer
- hari +21: pemeriksaan kadar Progesteron darah
- hari +60: eksplorasi rektal
- bulan 3: thawing embrio beku dan evaluasi

Analisa data dan penulisan laporan dilakukan mulai bulan X.

**RENCANA BIAYA PENELITIAN
HIBAH BERSAING VIII/2 TAHUN 2000/2001**

NAMA PENELITI : Suzanita Utama, MPhil., drh.
 PERGURUAN TINGGI : Universitas Airlangga

1. Upah/Honor (maka 30% total biaya, lama max 10 bln, konsultan dijadikan anggota peneliti, pembantu termasuk teknisi, administrasi, laboran, pencacah).

Tim Peneliti	Jumlah Orang	Minggu/ Bulan	Bulan Kerja	Jam/ Minggu	Tarif Jam/ Minggu	Total
a. Ketua	1	X 4	X 10	X 10	Rp. 7.500,-	= Rp. 3.000.000,-
b. Anggota	3	X 4	X 10	X 5	Rp. 6.000,-	= Rp. 3.600.000,-
Sub - Total						= Rp. 6.600.000,-

2. Bahan Habis Pakai (sesuai kebutuhan, kalau ada mohon dirinci)

a. ATK	= Rp.	800.000,-
b. Kimia	= Rp.	13.334.000,-
c. Lainnya		
- 4 pak Syringe filter (@ 100)	= Rp.	1.980.000,-
- 4 pak sterilization filter (@ 12)	= Rp.	2.060.000,-
- 1 boks Progesterone RIA Kit (100 tubes)	= Rp.	1.630.000,-
- 1 pak plastic sheet	= Rp.	150.000,-
- 1 pak foley catheter	= Rp.	850.000,-
- 20 pak cawan petri disposibel	= Rp.	4.500.000,-

Sub - Total = Rp. 25.304.000,-

3. Komponen peralatan (sesuai kebutuhan, maksimum Rp. 7,5 juta/komponen, tidak boleh beli peralatan utuh seperti komputer printer, alat analisis kimia, fisika dan lain-lain, sarankan untuk disewa).

.....	= Rp.	-	,-
.....	= Rp.	-	,-

Sub - Total = Rp. - ,-

4. Perjalanan Dinas (maks 30%)

a. Transportasi antar kota :

- Tiket pesawat 3x Surabaya-Jakarta pp	= Rp.	3.000.000,-
- Angkutan darat	= Rp.	800.000,-

b. Perdiem Gol IV - Tk. I 4 X HOK X Rp. 120.000,-	= Rp.	480.000,-
Gol III - Tk. I 8 X HOK X Rp. 102.000,-	= Rp.	816.000,-

Sub - Total = Rp. 5.096.000,-

5. Lain-lain (penyusunan/perbanyak laporan, analisis lab., analisis data, seminar, pertemuan/rapat, bahan pustaka, fotocopy).

Sub - Total = Rp. 3.000.000,-

Total Biaya Penelitian = Rp. 40.000.000,-

LAMPIRAN :

1. JUSTIFIKASI ANGGARAN DISESUAIKAN DENGAN RINCIAN TERLAMPIR

1.1. Anggaran untuk pelaksanaan (Honor dan Upah) :	6.600.000
1.2. Anggaran untuk komponen peralatan :	-
1.3. Anggaran untuk bahan aus (material penelitian) :	25.304.000
1.4. Anggaran untuk perjalanan :	5.096.000
1.5. Pengeluaran lain :	3.000.000

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, G.B. 1991. Fertilization, early development and embryo transfer. In: *Reproduction in Domestic Animals*. 4th ed. Perry T. Cupps (Editor). Academic Press, Inc. California.
- Bavister, B.D., Rose-Hellekant and Pinyopumintr, T. 1992. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. *Theriogenology* 37: 127-146.
- Bongso, A., Fong, C.Y., Ng, S.C. and Ratnam, S. 1993. The search for improved in vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Human Reproduction* 8: 1155-1162.
- Bredbacka, P., K. Bredbacka, J. Aalto, H. Kukkola. 1991. Development of inner cell mass in intact and bisected cattle morulae. *Theriogenology* 35: 188 (Abs).
- Broussard, J.R., Thibodeaux, J.K., Myers, M.W., Roussel, J.D., Hansel, W. and Goodke, R.A. 1995. Effect of media substitutes on bovine granulosa cell function and proliferation during in vitro culture. *Journal of Animal Science* 73: 3287-3293.
- Carnegie, J.A., Durnford, R., Algire, J. and Morgan, J. 1997. Evaluation of mitomycin-treated vero cells as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos. *Theriogenology* 48: 377-389.
- Donnay, I., vanLangendonck, A., Auquier, P., Grisart, B., vansteenbrugge, A., Massip, A. and Dessy, F. 1997. Effect of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 47: 1549-1561.
- Eyestone, W.H. and First, N.L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 85: 715-720.
- Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A. and Tervit, H.R. 1991. Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 125-131.
- Furnus, C.C., deMatos, D.G., Martinez, A.G. and Matkovic, M. 1997. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 47: 481-490.

- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Richardson, L., Brown, C.R. and Moor, R.M. 1989. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106: 303-312.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L. and Moor, R.M. 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.* 38: 107-115.
- Gardner, D.K. dan Lane, M. 1993. Embryo culture systems. In: Trounson, A. and Gardner, D.K. (eds). *Handbook of In Vitro Fertilization*. Boca Raton: CRC Press. 85-114.
- Gardner, D.K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biology International* 18: 1163-1179.
- Goff, A.K. and Smith, L.C. 1998. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. *Theriogenology* 1021-1030.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture*, 11. J. Gordon (Editor). CAB International, Wallingford.
- Gray, K.R., K.R. Bondioli and C.L. Betts. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35: 37-44.
- Guillomot, M., Flechon, J. dan Leroy, F. 1993. Blastocyst development and implantation. In: *Reproduction in Mammals and Man*. Edited by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Elipses, Paris.
- Hafez, E.S.E. 1993a. Anatomy of Female Reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*. 6 th Ed. E.S.E. Hafez. Lea and Febiger. 20-55.
- Hafez, E.S.E. 1993b. Transport and survival of gametes. In: *Reproduction in Farm Animals*. 6 th Ed. E.S.E. Hafez. Lea and Febiger. 144-164.
- Holm, P., Irvine, B.J., Armstrong, D.T. and Seanark, R.F. 1994. Effect of oviduct epithelial cells on the fertilization and development of sheep oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science* 36: 227-241.
- Iwasaki, S., Yoshiba, N., Ushijima, H., Watanabe, S. and Nakahara, T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility* 90: 279-284.

- Kidder, G.M. and Watson, A.J. 1990. Gene expression required for blastocoel formation in the mouse. In: Early Embryo Development and Paracrine Relationships. Alan R. Liss, Inc. 97-107.
- Kidder, G.M. 1993. Genes involved in cleavage, compaction and blastocyst formation. In: Genes in Mammalian Reproduction. Wiley-Liss, Inc. 45-71.
- Kim, J.H., Niwa, K., Lim, J.M. and Okuda, K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biology of Reproduction* 48: 1320-1325.
- Kippax, I.S., Christie, W.B. and Rowan, T.G. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* 35: 25-35.
- Lai, Y.M., Stein, D.E., Soong, Y.K., Tang, Y.K., Grifo, J., Malter, H.E., Talansky, B.E., Coehn, J., Liu, H.C. and Rosenwaks, Z. 1992. Evaluation of vero cells co-culture system for mouse embryos in various media. *Human Reproduction* 7: 276-280.
- Loskutoff, N.M., Pollard, J.W., Scodras, J.M., DelaFuente, R., King, W.A. and Betteridge, K.J. 1991. Production of blastocyst from single blastomeres cultured after isolation from 4-cell bovine embryos generated *in vitro*. *Theriogenology* 35: 233 (Abs).
- Loskutoff, N.N., W.H. Johnson, K.J. Betteridge. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology* 39: 95-107.
- Mahaputra, L., Hinting, A., Utama, S., Hermadi., H.A., Mustofa, I. dan Wirjaatmadja, R. 1995. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi Madura. Hibah Bersaing II/2, Dirjen Dikti Depdikbud.
- Mahaputra, L., Hinting, A., Utama, S., Hermadi., H.A., Mustofa, I. dan Pudjisrianto. 1997. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi. Sub. Fertilisasi *in-vitro* pada sapi Madura. Hibah Bersaing II/4, Dirjen Dikti Depdikbud.

- Mahaputra, L., Hinting, A., Utama, S., Hermadi., H.A., Mustofa, I. dan Pudjisrianto. 1998. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi. Sub. Fertilisasi *in-vitro* dalam upaya pembuatan kembar identik & fraternal. Hibah Bersaing II/5, Dirjen Dikti Depdikbud.
- Matsuyama, K., Miyakoshi, H. and Fukui, Y. 1993. Effect of glucose level during the *in vitro* culture in Synthetic Oviduct Fluid medium on *in vitro* development of bovine oocyte matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 40: 595-605.
- McLaren, A., 1990. Fertilization, cleavage and implantation, In: *Reproduction in Farm Animals*. Ed. E.S.E. Hafez. 3rd Edition. Lea and Febiger. Philadelphia. 143-163.
- Nibart, M. 1992. Practical application of two advanced biotechnologies to bovine embryo transfer: splitting and sexing. In: Lauria, A. and Gandolfi, F. (eds) *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Portland Press, London, pp 215-224.
- Ouhibi, N., Menezo, Y., Benet, G. and Nicollet B. 1988. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon)*, 37.
- Ozil, J.P., Y. Heyman and J.P. Renard. 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Veterinary Record* 110: 126-127.
- Parish, J.J. and First, N.L. 1993. Fertilization. In: *Reproduction in Domesticated Animals*. Edited by G.J. King. Elsevier Science Publishers B.V. London.
- Pegoraro, L.M.C., Thuard, J.M., Delalleau, N., Guerin, B., Deschamps, J.C., Marquant-LeGuienne, B. and Humblot, P. 1998. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. *Theriogenology* 49: 1579-1590.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1993. *Principles and Procedures of Statistics*. 4 th ed. McGraw Hill International Book Book Co. Tokyo.
- Thompson, J.G. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45: 27-40.
- Utama, S. 1997. Influence of Insulin-like Growth Factor-II on Bovine Embryo Development. Thesis. MPhil. University of Edinburgh.

- vanSoom, A., vanVlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyker, H. dan deKruif, A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
- vanSoom, A., Boerjan, M., Ysebaert, M. and deKruif, A. 1996. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Molecular Reproduction and Development* 45: 171-182
- Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture system. *Theriogenology* 37: 1117-1131.
- Wales, R.G. 1995. From Uncommitted to Committed Embryonic Cells: Opportunities for their Study and Manipulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 983-96.
- Watson, A.J. 1992. The Cell Biology of Blastocyst Development. *Molecular Reproduction and Development* 33: 492-504.
- Willadsen, S.M. and Polge, C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Veterinary Record* 108, 211-213.
- Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298-300.

Lampiran 1. Media Pencuci Oosit

Komposisi TL HEPES dalam 100 ml

99	ml	TL HEPES stock
1	ml	Pyruvate
50	μ l	Gentamycin (Sigma)
0,3	g	BSA (Fraction V, Sigma)

Komposisi TL HEPES stock dalam 500 ml

3,33	g	NaCl (Sigma)
0,12	g	KCl
0,084	g	NaHCO ₃ (Sigma)
0,028	g	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
930	μ l	Na lactat (Sigma)
1,2	g	HEPES (Sigma)
32,5	g	Penicillin (Sigma)
5	mg	Phenol Red (Sigma)
0,15	g	CaCl ₂ .2H ₂ O
0,05	g	MgCl ₂ .6H ₂ O

Lampiran 2. Media Maturasi

Komposisi dalam 100 ml

0,99	g	TC199 (M199, HEPES Modification, Sigma)
0,22	g	NaHCO ₃ (Sigma)
6.3	mg	Penicillin (Sigma)
5	mg	Streptomycin (Sigma)

Lampiran 3. Media Diseksi

Komposisi dalam 100 ml

0,99	g	TC199 (M199, Hepes Modification, Sigma)
2,33	mg	HEPES (Sigma)
0,22	g	NaHCO ₃ (Sigma)
6.3	mg	Penicillin (Sigma)
5	mg	Streptomycin (Sigma)

Lampiran 4. Cara pembuatan Acetolacmoic

1	g	Lacmoic (Sigma)
45	ml	acetic acid glacial
55	ml	aquadest

Tambahkan Lacmoic kedalam acetic acid, didihkan. Dinginkan kemudian tambahkan aquadest. Saring sebelum dipakai.

Lampiran 5. Media Earle's Balanced Salt Solution (Sigma)Komposisi dalam 1 liter

0,29	g	CaCl ₂
0,4	g	KCl
97,7	mg	MgSO ₄
6,8	g	NaCl
0,14	g	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
1	g	D-glucosa
0,01	g	Phenol Red

LAMPIRAN 6. Analisa Statistik

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	11.9600	11.6300	
STD. DEV. =	2.7249	3.2411	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	.3300	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.3390	
T =	.2465	(D.F. = 18)	GROUP 1: 16 Sel GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	.4041		

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

LABEL: Blastosis pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	12.9600	12.1900	
STD. DEV. =	2.7411	3.6747	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	.7700	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.4497	
T =	.5311	(D.F. = 18)	GROUP 1: 16 Sel GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	.3009		

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	41.7800	43.9000	
STD. DEV. =	.9864	1.5297	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-2.1200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		.5756	
T =	-3.6833	(D.F. = 18)	GROUP 1: 16 Sel GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	8.504E-04		

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		9.5500	8.0300	
STD. DEV. =		3.1736	4.8858	
N =		10	10	
		DIFFERENCE =	1.5200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			1.8424	
T =	.8250	(D.F. =	18)	GROUP 1: 16 Sel
				GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	.2101			

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

LABEL: Persentase Blastosis pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		10.0600	9.0000	
STD. DEV. =		4.5236	3.9435	
N =		10	10	
		DIFFERENCE =	1.0600	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			1.8977	
T =	.5586	(D.F. =	18)	GROUP 1: 16 Sel
				GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	.2917			

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		20.1600	22.3000	
STD. DEV. =		1.1227	.7439	
N =		10	10	
		DIFFERENCE =	-2.1400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			.4259	
T =	-5.0248	(D.F. =	18)	GROUP 1: 16 Sel
				GROUP 2: 32 Sel
PROB. =	4.399E-05			

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	12.0700	11.5200	
STD. DEV. =	2.6583	3.2795	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	.5500	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.3350	
T =	.4120	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.3426		

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

LABEL: Blastosis pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	12.5800	12.5700	
STD. DEV. =	3.7523	2.6957	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	.0100	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.4610	
T =	.0068	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.4973		

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Belah 4

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	42.9000	42.7800	
STD. DEV. =	1.9782	1.3742	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	.1200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		.7617	
T =	.1575	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.4383		

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	7.9700	9.6100	
STD. DEV. =	4.4590	3.7215	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-1.6400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.8366	
T =	-.8929	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.1918		

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

LABEL: Blastosis pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	8.4700	10.5900	
STD. DEV. =	3.8448	4.3999	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-2.1200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.8477	
T =	-1.1474	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.1331		

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	21.1800	21.2800	
STD. DEV. =	1.7396	1.1516	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-.1000	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		.6597	
T =	-.1516	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.4406		

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	7.9700	9.6100	
STD. DEV. =	4.4590	3.7215	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-1.6400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.8366	
T =	-.8929	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.1918		

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

LABEL: Blastosis pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	8.4700	10.5900	
STD. DEV. =	3.8448	4.3999	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-2.1200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.8477	
T =	-1.1474	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.1331		

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Belah 8

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	21.1800	21.2800	
STD. DEV. =	1.7396	1.1516	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	-.1000	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		.6597	
T =	-.1516	(D.F. = 18)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.4406		

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

LABEL: Morula kompak pada kelompok Kontrol

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		14.0000	16.0000	
STD. DEV. =		5.4772	5.4772	
N =		5	5	
		DIFFERENCE =	-2.0000	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			3.4641	
T =	-.5774	(D.F. =	8)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.2898			

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

LABEL: Blastosis pada kelompok Kontrol

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		16.0000	18.0000	
STD. DEV. =		5.4772	8.3666	
N =		5	5	
		DIFFERENCE =	-2.0000	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			4.4721	
T =	-.4472	(D.F. =	8)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.3333			

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

LABEL: Jumlah sel pada kelompok Kontrol

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

		GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =		189.2800	190.1600	
STD. DEV. =		2.7842	4.3552	
N =		5	5	
		DIFFERENCE =	-.8800	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =			2.3117	
T =	-.3807	(D.F. =	8)	GROUP 1: Kumulus GROUP 2: Tuba
PROB. =	.3567			

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

LABEL: Morula kompak

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	15.0000	11.7600	
STD. DEV. =	5.2705	3.0249	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	3.0400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.8762	
T = 1.6203	(D.F. = 18)		GROUP 1: Kontrol GROUP 2: Belah 4
PROB. = .0613			

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

LABEL: Morula kompak

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	15.0000	8.7500	
STD. DEV. =	5.2705	4.0036	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	5.4500	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.9455	
T = 2.8013	(D.F. = 18)		GROUP 1: Kontrol GROUP 2: Belah 8
PROB. = 5.901E-03			

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

LABEL: Morula kompak

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	11.7600	8.7500	
STD. DEV. =	3.0249	4.0036	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	2.4100	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.3227	
T = 1.8220	(D.F. = 18)		GROUP 1: Belah 4 GROUP 2: Belah 8
PROB. = .0426			

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

LABEL: Blastosis

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	17.0000	12.5600	
STD. DEV. =	6.7495	3.2411	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	4.0400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		2.3037	
T = 1.7537	(D.F. = 18)		GROUP 1: Kontrol GROUP 2: Belah 4
PROB. = .0482			

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

LABEL: Blastosis

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	17.0000	9.5300	
STD. DEV. =	6.7495	4.1659	
N =	20	20	
	DIFFERENCE =	7.4700	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.7394	
T = 4.2945	(D.F. = 38)		GROUP 1: Kontrol GROUP 2: Belah 8
PROB. = 5.838E-05			

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

LABEL: Blastosis

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	12.5600	9.5300	
STD. DEV. =	3.2411	4.1659	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	2.9000	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.6726	
T = 1.7338	(D.F. = 18)		GROUP 1: Belah 4 GROUP 2: Belah 8
PROB. = .0500			

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

LABEL: Jml.Sel Kontrol, Belah4&8 vs16 & 32 Sel

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	189.7200	42.7800	
STD. DEV. =	3.4772	2.2864	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	147.9400	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.1430	
T = 129.4360	(D.F. = 18)		GROUP 1: Kontrol
			GROUP 2: Belah 4
PROB. =	5.000E-14		

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

LABEL: Jumlah sel

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	189.7200	21.1600	
STD. DEV. =	3.4772	1.9227	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	169.5600	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		1.1555	
T = 146.7455	(D.F. = 18)		GROUP 1: Kontrol
			GROUP 2: Belah 8
PROB. =	.000E+00		

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

LABEL: Jumlah sel

DIFFERENCE BETWEEN TWO GROUP MEANS: POOLED ESTIMATE OF VARIANCE

	GROUP 1	GROUP 2	
MEAN =	42.7800	21.1600	
STD. DEV. =	2.2864	1.9227	
N =	10	10	
	DIFFERENCE =	21.6200	
STD. ERROR OF DIFFERENCE =		.4726	
T = 45.7487	(D.F. = 18)		GROUP 1: Belah 4
			GROUP 2: Belah 8
PROB. =	5.000E-14		