

**TEKNIK PEMBEKUAN EMBRIO SAPI
DENGAN MENGGUNAKAN METODE VITRIFIKASI**

**Ketua Peneliti :
Dr. Ismudiono, Drh., MS.**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai oleh : Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat
Bersumber dari dana pinjaman Bank Dunia XXI (LOAN No. 2944-IND)
Kontrak Nomor : 396/P4M/DPPM/L.3311/BBI/1993 tgl. 26 Mei 1993
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud**

1994

TEKNIK PEMBEKUAN EMBRIO SAPI DENGAN MENGUNAKAN METODE VITRIFIKASI

Tim Peneliti:
Dr. Ismudiono, Drh., MS.
Sudjiharti, T., Drh., MSc., PhD.
Husni Anwar, Drh.
Abdul Samik, Drh.

005219943141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat
Bersumber dari dana Bank Dunia XXI (LOAN No.2944-IND)
Kontrak Nomor : 396/P4M/DPPM/L.3311/93/BBI/1993 tgl. 26 Mei 1993
Ditblnltabmas, Ditjan Dikti, Depdikbud

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN**

1. a. Judul Penelitian : Teknik Pembekuan Embrio Sapi dengan Menggunakan Metode Vitrifikasi
 b. Macam Penelitian : () Dasar (X) Terapan
 () Pengembangan
 c. Kategori : II/III/IV *)
-
2. Kepala Proyek Penelitian :
 a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ismudiono, Drh., MS.
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 c. Pangkat/Gol. dan NIP. : Pembina/IV 130687297
 d. Jabatan sekarang : Lektor Kepala Madya
 e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan
 f. Univ./Inst./Akademi/Instansi *) : Universitas Airlangga
 g. Bidang Ilmu yang diteliti : Bioteknologi
-
3. Jumlah Tim Peneliti : 4 orang
-
4. Lokasi Penelitian : Batu, Kabupaten Malang.
-
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan
 a. Nama Instansi :
 b. Alamat :
-
6. Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan
-
7. Biaya yang diperlukan : Rp. 5.002.000,-
 (Lima Juta Dua Ribu Rp.)

Surabaya, 26 Januari

Mengetahui :
 Dekan Fakultas : Kedekt. Hewan

Ketua Peneliti,

(Dr. H. Rochiman Sasmita, MS., Drh.)
 NIP. 130350739

(Dr. Ismudiono, MS., Drh.)
 NIP. 130687297

Mengetahui,
 Pimpinan Kelembagaan
 Penelitian Universitas Airlangga,

Prof. Dr. dr. Soedijono
 NIP. 130261504

Ringkasan

TEKNIK PEMBEKUAN EMBRIO SAPI DENGAN MENGGUNAKAN METODE VITRIFIKASI (Ismudiono, Sudjiharti, T., Husni Anwar, Abdul Samik, 1994.28 hal)

Telah banyak kemajuan yang dicapai oleh para peneliti dalam hal pembekuan suatu sel atau jaringan hidup. Selain sel spermatozoa, ternyata embrio telah pula berhasil dibekukan. Banyak keuntungan yang didapat dari hasil pembekuan tersebut, diantaranya adalah mempermudah transportasi dan pengawetan embrio. Namun demikian ada beberapa kendala yang masih menghambat keberhasilan pembekuan embrio ini, selain peralatannya yang mahal, juga harus dilakukan suatu laboratorium yang lengkap.

Di Indonesia, masalah pengadaan peralatan sudah lama menjadi kendala bagi kemajuan penelitian, oleh sebab itu diupayakan suatu terobosan guna mengatasi kendala itu. Teknik pembekuan embrio dengan menggunakan metode vitrifikasi telah diperkenalkan oleh Rall dan Fahy tahun 1985, tetapi penerapannya pada embrio sapi oleh Massip *et al* pada tahun 1987.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pembekuan embrio dengan menggunakan metode vitrifikasi ini dapat diterapkan di lapangan dengan kondisi yang ada di Indonesia.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan pedoman pelaksanaan pembekuan embrio sapi secara praktis di lapangan.

Dua ekor sapi perah terseleksi dari 10 ekor sapi perah dipergunakan sebagai donor dan dua ekor sapi perah dari lima sapi terseleksi dipergunakan sebagai resipien.

Dua ekor sapi perah yang dipergunakan sebagai donor mendapatkan perlakuan superovulasi dengan menggunakan preparat PMSG dengan dosis 2500 IU dan hCG 5000 IU.

Hasil yang diperoleh dari perlakuan superovulasi tersebut didapatkan ovulasi rata-rata 8.5 ± 2.12 buah korpus luteum dan embrio yang diperoleh. Sedangkan perolehan embrio dari hasil flushing dengan angka rata-rata 41.7 % (7/17).

Dua embrio dengan klasifikasi kualitas 2 (good) dilakukan transfer ke resipien dalam bentuk segar dan 5 embrio dalam klasifikasi kualitas 1 (excellent) dilakukan pembekuan dengan metode Vitrifikasi.

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa pembekuan embrio dengan menggunakan metode vitrifikasi dapat diterapkan pada kondisi lapangan yang ada.

(L.P. Fakultas Kedokteran Hewan, Unair. Kontrak No. 396/P4M/DPPM/L.3311/93/BBI/1993 - 26 Mei 1993)

Summary

THE USE OF VITRIFICATION METHOD FOR CRYOPRESERVATION OF BOVINE EMBRYOS (Ismudiono, Sudjiharti T., Husni Anwar, Abdul Samik, 1994. 28 pages)

Freezing of embryos allows embryo preservation and facilitates transportation, however it requires expensive and well-equipped laboratory. In Indonesia, lack of equipment has been one of the obstacles that slows down the progress of research works. Therefore an effort should be made to overcome this problem.

Cryopreservation of embryos using vitrification method has been developed (Rall & Fahy, 1985), and used for bovine embryos (Massip et al, 1987). The current study was undertaken to test whether vitrification method can be applied under field condition in Indonesia.

Two cows, selected from 10 dairy cows, were used as donor; and 2 other cows, selected from 5 dairy cows, were used as recipients. The donors were superovulated using 2500 IU PMSG and 5000 IU hCG. The superovulation rates (based on number of corpora lutea) were 8.5 ± 2.12 . Embryos recovery was 41.7 %, where 2 embryos were classified as good and 5 embryos were classified as excellent. The good embryos were transferred to recipients, whereas the excellent embryos were frozen using vitrification method. In conclusion, vitrification method can be applied in the field.

(Resc. Inst. Faculty of Veterinary Medicine, Unair. Contract No. 396/P4M/DPPM/L.3311/93/BBI/1993 - Mei 26, 1993)

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN	1
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Permasalahan	2
Rumusan Permasalahan	3
Hipotesis Penelitian	3
Tujuan Penelitian	3
Manfaat Hasil Penelitian	3
TINJAUAN PUSTAKA	5
Penyimpanan Embrio	5
Pengawetan Beku (Cryopreservation) Embrio	7
Kecepatan Thawing	10
Metode Pengenceran Kembali (<i>Thawing</i>)	10
Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Transfer Embrio Beku	13
Kualitas Embrio	13
Faktor Intrinsik	14
Umur Embrio	14
Metoda Pembekuan dan Pencairan Kembali	14
Keterampilan Teknisi	14
METODE PENELITIAN	16
Tempat dan Waktu Penelitian	16
Materi Penelitian	16
Prosedur Penelitian	17
Variabel yang Diamati	21
Analisis Data	21
HASIL DAN PEMBAHASAN	22
Seleksi Donor dan Resipien	22
Superovulasi	22
Perolehan Embrio	23
Evaluasi Embrio	24
Transfer dan Pembekuan Embrio	25

KESIMPULAN DAN SARAN	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	29

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Persentase Kebuntingan Berdasarkan Klasifikasi Embrio yang Ditransfer	12
2.	Jumlah Korpus Luteum Yang Terdapat Pada Ovarium . . .	22
3.	Jumlah Embrio yang Diperoleh	22

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Bagan Program Perlakuan Sapi Donor	29

PENDAHULUAN

Latar belakang

Sejak Lazzaro Spallanzani yang disebut sebagai bapak Fisiologi reproduksi berhasil membekukan semen kuda 150 tahun lalu, telah banyak kemajuan yang dicapai para ahli dalam hal pembekuan suatu sel atau jaringan hidup. Selain sel spermatozoa ternyata embrio telah pula berhasil dibekukan. Banyak keuntungan yang didapat dari hasil pembekuan tersebut diantaranya adalah mempermudah transportasi. Jarak yang jauh dan biaya yang besar untuk mengangkut ternak sapi dari satu benua ke benua lain dapat diatasi dengan mengirimkan embrio beku dalam sebuah tempat yang relatif kecil saja. Selain itu transfer dapat dilakukan sewaktu-waktu setelah dipersiapkan resipiennya, demikian juga dapat mengurangi penularan penyakit yang masuk akibat impor ternak. (Ismudiono, Hardjopranjoto, Mahaputra, Hariadi dan Srianto, 1991)

Di Indonesia, transfer embrio dengan menggunakan embrio beku dilakukan pertama kali pada tahun 1984 di peternakan PT. Berdikari United Livestock, Cicurug Jawa Barat pada sapi perah, yang merupakan kerjasama antara Departemen Koperasi dan Granada International Corporation of Texas, USA. Pelaksanaan transfer embrio ini menggunakan embrio beku dengan teknik pembedahan. Hasil kebuntingan yang didapat dari dua kali pelaksanaan adalah 35.14% dan 42.76%. Pada tahun yang sama juga dilakukan transfer pada sapi potong Onggole dan Brahman dengan embrio beku dari sapi Brahman di Bila River Ranch, Sulawesi Selatan dengan hasil kebuntingan yang rendah. (Toelihere, 1991)



Pada tahun 1986, Ditjen Peternakan mengimpor embrio beku dari Premier Embryos, Inggris untuk dilaksanakan transfer di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur oleh tenaga-tenaga hasil pelatihan di Bali dengan teknik tanpa pembedahan. Hasil kebuntingan yang diperoleh di Jatim pada waktu itu adalah 21.21% (7/33), masing-masing 4 ekor di Nongkojajar, 2 ekor di Puspo dan 1 ekor di Pujon. Pada tahun 1990 pelaksanaan transfer embrio beku sapi FH (merupakan sisa embrio beku tahun 1986) dilakukan atas kerjasama Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga dengan Dinas Peternakan Daerah Propinsi Daerah Tingkat I, Jawa Timur di Surabaya dan Banyuwangi dengan hasil kebuntingan 36.36% (4/11). (Ismudiono, dkk.1991).

Permasalahan

Pelaksanaan transfer embrio dengan menggunakan embrio segar di lapangan sering kali mendapatkan kendala, diantaranya ketidaksesuaian resipien dengan embrio yang ditransfer ataupun kurangnya jumlah resipien diluar perhitungan kita dibandingkan dengan embrio yang berhasil didapat. Untuk mengatasi kendala ini penggunaan embrio beku bisa lebih luwes, dalam arti dimungkinkan untuk menunda pelaksanaan transfer sesuai kehendak kita.

Pelaksanaan transfer embrio selama ini yang menggunakan embrio beku berasal dari embrio impor. Mahalnya harga embrio impor tersebut dan untuk melepaskan ketergantungan akan embrio impor, perlu dilaksanakan pembuatan embrio beku sendiri. Kendala yang dihadapi untuk melakukan pembekuan embrio adalah mahalnya peralatan untuk pembekuan. Metoda yang berkembang akhir-akhir ini dan dapat langsung dipergunakan di lapangan adalah pembekuan

dengan metode vitrifikasi. Keandalan metode ini dan kemungkinan penerapannya pada kondisi lapangan di Indonesia, perlu dikaji lebih mendalam.

Rumusan Permasalahan

Apakah pembekuan embrio sapi dengan menggunakan metode vitrifikasi ini dapat diterapkan pada kondisi lapangan di Indonesia

Hipotesis Penelitian

1. Pembekuan embrio dengan menggunakan metoda Vitrifikasi dapat dilaksanakan pada kondisi lapangan.
2. Penggunaan metode pembekuan vitrifikasi tidak berpengaruh terhadap klasifikasi embrio sebelum dan sesudah dibekukan.
3. Penggunaan metode pembekuan vitrifikasi tidak berpengaruh terhadap persentase kebuntingan

TUJUAN PENELITIAN

Beberapa tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui keberhasilan metode ini dengan mengukur klasifikasi embrio sebelum dan sesudah pembekuan.
2. Mengetahui keberhasilan kebuntingan aplikasi embrio beku hasil aplikasi metode vitrivikasi dibandingkan dengan embrio segar.

Manfaat Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung program transfer embrio yang dilaksanakan pemerintah. Pembekuan cara

praktis di lapangan akan sangat menghemat biaya dan bermanfaat bagi kelancaran program transfer embrio.

TINJAUAN PUSTAKA

Penyimpanan Embrio

Pada suatu ketika kadang-kadang diperlukan waktu sementara untuk penyimpanan embrio. Beberapa faktor ternyata dapat mempengaruhi kehidupan embrio ini.

Kanagawa (1979) melaporkan bahwa pengaruh lama dan kuat pencahayaan dari lampu mikroskop ternyata mempengaruhi kehidupan embrio. Embrio yang dilakukan pencahayaan dengan lampu mikroskop dengan kekuatan maksimum selama 30 menit menurunkan daya tahan embrio.

Goncangan dan variasi temperatur ternyata tidak terlalu berpengaruh terhadap kehidupan embrio. Embrio yang ditempatkan pada tabung reaksi yang berisi 1 ml BMOC-3 medium dan dilakukan transportasi sejauh lebih dari 100 km tanpa memperhatikan variasi temperatur, pada kultur selanjutnya ternyata dapat berkembang dengan baik.

Waktu Penyimpanan tanpa pengawetan beku berpengaruh buruk terhadap kehidupan embrio. Pada dasarnya embrio masih tahan apabila dilakukan transfer pada hari yang sama dengan pemanenan. Embrio yang disimpan pada suhu kamar (20 - 25°C) dan embrio yang disimpan pada suhu (4 - 5°C) selama satu hari tidak berbeda secara nyata. Tetapi bila disimpan selama dua hari maka kematian embrio akan banyak terjadi.

Bila embrio dilakukan transfer pada hari yang sama dengan pemanenan, tidak terlalu penting untuk mempertahankan temperatur pada 37 ° C. Hal ini akan sulit untuk mempertahankan temperatur

tersebut selama pemanenan, pemeriksaan, penyimpanan sementara dan transfer. Gordon dan Boland (1978) menyimpan embrio pada PBS dengan 15% FCS dan disimpan selama kurang dari 3 jam. Perbandingan perlakuan embrio yang disimpan pada suhu 30° C dan pada suhu 5 - 15 ° C tanpa dilakukan kontrol terhadap temperatur ternyata kelompok yang terakhir lebih rendah daya hidupnya.

Willadsen (1978) menggunakan kultur *in vitro* melaporkan bahwa perkembangan dan daya hidup embrio tidak berpengaruh pada stadium morula dan blastosis pada penyimpanan selama 24-28 jam dalam PBS. Kanagawa (1979) melaporkan bahwa embrio yang disimpan selama satu hari pada temperatur kamar tidak berpengaruh terhadap angka kebuntingan.

Tempat penyimpanan embrio baik pada tabung reaksi, petri dish atau tempat lain yang kedap udara dengan memakai larutan buffer bikarbonat pH bisa meningkat. Bila menggunakan PBS atau dilakukan transfer dalam waktu yang pendek, penutupan petri dish perlu dilakukan untuk penyimpanan embrio. Demikian juga penyimpanan pada temperatur yang tinggi diperlukan perlakuan dengan mencegah penguapan media dengan memberikan lapisan tipis minyak mineral atau parafin oil dipermukaan media untuk mencegah penguapan media.

Penyimpanan embrio pada suhu rendah dapat dilakukan selama beberapa hari pada suhu 4-5° C. Kanagawa (1979) melaporkan bahwa penyimpanan embrio di dalam media BMOC-3 selama satu hari demikian juga dilakukan penyimpan 5 embrio selama dua hari yang ditransferkan pada dua resipien ternyata tidak didapatkan kebuntingan. Linder *et al.* (1982) menyatakan bahwa penyimpanan embrio di dalam media PBS modified dengan penambahan 10% FCS dan dilakukan kultur

in vitro , ternyata bahwa bila disimpan selama satu hari hampir sama daya hidupnya dengan embrio yang segar, tetapi daya hidup tersebut semakin menurun bila waktu penyimpanan lebih lama. Pada percobaan selanjutnya embrio yang disimpan selama satu hari daya hidupnya 47% dan bila disimpan selama dua atau tiga hari 12-18%.

Penyimpanan dengan kultur media yang minimum dikembangkan oleh Brinster (1963) pada metode ini sekitar 4 tetes media kultur diteteskan pada petri dish plastik (60x15 mm). Media tersebut ditutupi dengan minyak parafin pada permukaannya, kemudian dilakukan penyimpanan di dalam inkubator dengan CO₂ 5%.

Pengawetan Beku (Cryopreservation) Embrio

Prinsip pengawetan beku embrio mammalia sama dengan pada jaringan hidup lainnya. Umumnya prinsip yang terpenting dari pengawetan beku adalah pengeluaran air dari dalam sel sebelum bagian intraseluler membeku. Bila tidak dilakukan dehidrasi, maka akan terbentuk kristal es intraseluler dan akan merusak sel tersebut. Jadi perhatian utama tertuju pada prinsip pemindahan air melalui membran sel, baik pada waktu dehidrasi sel selama pembekuan maupun rehidrasi selama pencairan kembali (*thawing*). Untuk mencegah terjadinya terbentuknya kristal es pada waktu pembekuan, maka diperlukan suatu zat pelindung beku atau *Cryoprotectants*.

Seperti diketahui bahwa sel dilapisi oleh membran sel yang permiable terhadap beberapa molekul tertentu (semi permeable). Zat pelindung beku (*cryoprotectants*) adalah substansi yang berperan besar dalam memperbaiki daya hidup sel setelah pengawetan beku. Mekanisme kerja *cryoprotectants* ini sebenarnya belum diketahui

secara pasti dan bervariasi untuk jenis *cryoprotectants* yang berbeda. *Cryoprotectants* dibagi dalam dua kelompok yaitu intraseluler dan ekstraseluler. Sebagai contoh *cryoprotectants* yang bekerja intraseluler adalah gliserol, dimethylsulfoxide (DMSO), Ethylene glycol dan 1,2 propanolol yang bermolekul kecil. Sedangkan yang bekerja ekstraseluler dengan molekul yang besar adalah molekul gula seperti sucrose dan rafinose, protein dan lipoprotein. Seringkali kuning telur, susu dan serum darah dipakai sebagai *cryoprotectants* tersebut.

Dalam pengawetan beku embrio yang umum dipakai sebagai *cryoprotectants* intraseluler adalah gliserol dan DMSO. Konsentrasi gliserol dan DMSO biasanya antara 1 - 2 M yang berarti 5 kali lebih tinggi dari molekul *cryoprotectants* dalam larutan daripada semua molekul lain yang berkonsentrasi. Molekul-molekul ini dengan mudah dapat melewati membran sel sehingga konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler menjadi seimbang. Air biasanya melewatinya dengan mudah, hal ini yang menjadi problema. Pertama, bila sel ditempatkan pada larutan yang mengandung *cryoprotectants*, sel tersebut akan mengkerut sebab air secara cepat akan meninggalkan sel untuk menuju ke konsentrasi *cryoprotectants* yang lebih tinggi diluar sel. Kemudian *cryoprotectants* masuk ke dalam sel sehingga konsentrasi intraseluler akan sama dengan ekstraseluler. Dalam keadaan demikian air akan masuk kembali ke dalam sel sehingga terjadi keseimbangan kadungan air di dalam dan di luar sel seperti sebelum penambahan *cryoprotectants*. Jadi respons pertama dari penambahan *cryoprotectants* adalah pengkerutan oleh adanya air yang hilang, ini kemudian akan kembali ke ukuran yang normal bila

cryoprotectant telah masuk ke dalam sel. Seringkali penambahan *cryoprotectant* dilakukan secara bertahap untuk mengurangi derajat pengkerutan dari sel.

Problema yang penting adalah penambahan *cryoprotectant* pada sel untuk memindahkannya pada waktu thawing. Pada kejadian ini akan terjadi kebalikan dari pembekuan, bila sel penuh dengan *cryoprotectant* ditempatkan pada media tanpa mengandung *cryoprotectant*, maka air akan segera masuk ke dalam sel untuk mengencerkan *cryoprotectant* secara lebih cepat bila dibandingkan dengan *cryoprotectant* yang keluar untuk menyeimbangkan konsentrasi ekstraseluler. Pada keadaan yang demikian sel akan mengembang dan pecah dengan kerusakan yang permanen. Larutan yang umum digunakan untuk mengatasi masalah ini adalah menghilangkan *cryoprotectant* secara perlahan dan bertahap 3 - 10 tahapan masing-masing selama 5-10 menit pertahapan (misalnya 1.2 M, 1.0 M, 0.8M dst.) sehingga bila terjadi kerusakan tidak terlalu parah.

Larutan kedua untuk memindahkan *cryoprotectant* dari dalam sel adalah menempatkan embrio pada medium yang mengandung molekul-molekul dalam konsentrasi tinggi yang tidak dapat menembus sel seperti sukrose. Pada keadaan ini kecenderungan air masuk ke dalam sel untuk mengencerkan *cryoprotectant* seimbang dengan kecenderungan air untuk meninggalkan sel selama adanya konsentrasi yang tinggi dari sukrose di luar sel. Jadi sel tidak akan mengembang meskipun dilakukan pengenceran *cryoprotectant* dalam satu tahapan.

Kecepatan *Thawing*

Kecepatan optimal untuk pencairan kembali (*thawing*) tergantung pada tipe sel yang dibekukan dan yang sangat penting adalah banyaknya jumlah air yang terdapat dalam sel ketika terjadi pembekuan intraseluler. Jika terdapat sedikit air intra seluler pada waktu pembekuan intraseluler, sejumlah kecil kristal es akan terbentuk intrasel. Pada keadaan ini penting dilakukan *thawing* secara cepat untuk mendapatkan daya hidup sel yang baik. Jika *thawing* dilakukan secara lambat, maka kristal es yang kecil tersebut akan berkembang selama proses pemanasan dan akan menimbulkan kerusakan di dalam sel. Proses ini dinamakan rekristalisasi.

Bila sel dilakukan pembekuan secara lambat, maka akan terjadi dehidrasi yang hampir sempurna pada waktu terjadi pembekuan intraseluler, sehingga tidak terjadi pembentukan kristal es intraseluler, jadi rekristalisasi tidak akan terjadi bila dilakukan *thawing* secara lambat. *Thawing* secara lambat akan menghasilkan daya hidup yang baik. Pada kenyataannya, pemanasan yang cepat menyebabkan kerusakan yang luas pada beberapa tipe sel pada pengawetan beku dengan metode ini, kemungkinan disebabkan air yang masuk ke dalam sel secara cepat dan menyebabkan kerusakan. Jadi kecepatan optimal *thawing* merupakan hal yang kritis dan bergantung pada waktu perlakuan pembekuan.

Metode Pengenceran Kembali (*Thawing*)

Dikenal beberapa metode untuk pengawetan beku dan pengenceran kembali (*thawing*) embrio.

Beberapa cara pengawetan beku dengan penambahan *cryoprotect-*

ants secara bertahap yaitu lima tahapan. Menurut metode Bilton (1980) DMSO ditambahkan kedalam media penyangga (buffer) (Dulbecco's PBS + 25% FCS) dengan ditingkatkan konsentrasinya secara bertahap 0.25M, 0.5M, 0.75M, 1.0M dan 1.25M pada suhu 25° C. Embrio di masukkan kedalam media tersebut secara bertahap masing-masing selama 5 menit dan pada tahapan akhir selama 20 menit pada temperatur yang sama kemudian dilakukan pendinginan dan pembekuan. Bila dipakai gliserol maka dilakukan dalam enam tahapan konsentrasi yaitu 0.17M, 0.33M, 0.5M, 0.67M, 0.83M dan 1.0M pada 35° C. masing-masing selama 10 menit, kemudian didinginkan dan dibekukan. Inoue *et al.*, (1982) menggunakan Dulbecco's PBS dengan penambahan 20% FCS dan dilakukan penambahan gliserol dalam 5 tahapan konsentrasi 0.18M, 0.33M, 0.57M, 0.88M dan 1.0M masing-masing selama 5 menit kecuali pada tahapan yang terakhir selama 30 menit kemudian di dinginkan selanjutnya dibekukan.

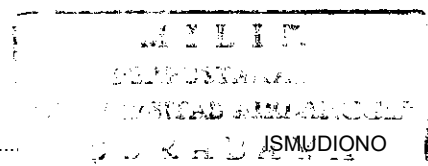
Pengenceran kembali (*thawing*) dilakukan pada temperatur 37° C kemudian dilakukan pencucian zat *cryoprotectant* secara bertahap tetapi dengan tahapan dari konsentrasi yang tinggi ke konsentrasi yang rendah sampai dengan tanpa zat *cryoprotectant*.

Perkembangan metode akhir-akhir ini yang dilakukan adalah pembekuan dan pencairan kembali dalam satu tahapan (*one step straw method*). Renard *et al.*, (1982) dan Leibo *et al.*, 1982) melaporkan bahwa metode praktis *thawing* embrio beku dengan menggunakan gliserol, dimana gliserol diencerkan dengan menggunakan larutan yang mengandung sukrose di dalam straw dan kemudian langsung ditransferkan. Suzuki *et al.*, (1985) kemudian memperbaiki metode ini dengan mendapatkan hasil yang cukup baik. Adapun perlakuan

sebagai berikut: Mula-mula embrio yang diperoleh ditempatkan pada media PBS dengan 20% Bovine Calf Serum yang mengandung gliserol 0.25M, kemudian 0.5M dan 1.0M masing-masing selama 10 menit ekuilibrasi dilakukan selama 15 menit. Straw kosong diisi berturut-turut dengan larutan sukrose 10% kemudian udara, larutan sukrose 10%, udara, larutan gliserol dengan embrio, udara dan terakhir larutan sukrose. Pendinginan dimulai dengan temperatur kamar, kemudian sampai pada suhu -7°C dengan kecepatan $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. kemudian seeding selama 10 menit. Selanjutnya pendinginan dilakukan sampai -30°C dengan kecepatan $0.3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ biarkan selama 10 menit, kemudian di masukkan ke dalam nitrogen cair.

Thawing dilakukan dengan cara cepat pada air bersuhu 38°C , dengan menggunakan jari telunjuk dan ibu jari straw ditegakkan dan digoyangkan 1-2 kali, dengan maksud agar larutan gliserol bercampur dengan larutan sukrose. Biarkan tegak selama 10 menit dalam penangas air selama 10 menit dengan *cotton plug* dibawah. Gliserol karena beratnya yang lebih ringan akan naik ke bagian atas straw, kemudian pada batas bagian gliserol tersebut dapat dipotong. Selanjutnya transfer dapat dilakukan seperti biasa. Dengan metode ini Suzuki *et al.*, (1985) mendapatkan persentase kebuntingan yang cukup baik yaitu 58.6% (5/9) pada sapi FH dan 33.3% (5/15) pada sapi Jepang, rata-rata persentase kebuntingan adalah 41.6%.

Metode pembekuan yang cepat juga telah dilakukan oleh Bui-Xuan-Nguyen *et al.*, (1984) dimana dehidrasi dan ekuilibrasi embrio dalam PBS dengan 20% Bovine Calf Serum, 1.5M gliserol dan 1.0M sukrose selama 5 menit. Kemudian dilakukan pendinginan dari temperatur ruangan sampai -30°C dengan kecepatan $12^{\circ}\text{C}/\text{menit}$.



Segera kemudian di masukkan ke dalam nitrogen cair.

Thawing yang dilakukan secara cepat, kemudian dilakukan transfer dan menghasilkan kebuntingan 33.3% (7/21).

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Transfer Embrio Beku Kualitas Embrio

Seringkali kualitas embrio yang didapat bervariasi hal ini termasuk oleh adanya pengaruh respons terhadap perlakuan gonadotropin yang berlebihan. Kadang-kadang embrio yang didapat memperlihatkan gejala degenerasi dan gangguan perkembangan. Beberapa embrio tidak dapat bertahan dengan baik pada waktu dibekukan dan thawing. Kennedy (1983) melaporkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada embrio dengan klasifikasi *excellent* (istimewa) bila dibandingkan dengan klasifikasi *good* (*baik*) dan *fair* (cukup) pada waktu thawing. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1. berikut ini.

Tabel 1. Persentase kebuntingan berdasarkan klasifikasi embrio yang ditransfer

Klasifikasi embrio	Jumlah Embrio	Persentase kebuntingan (%)
Excellent	92	40
Good	87	33
Fair	49	22
Poor	33	12

Sumber: Kennedy (1983)

Faktor Intrinsik pada Embrio

Terdapat perbedaan faktor intrinsik yang dapat mempengaruhi angka kebuntingan pada transfer embrio. Walaupun pada klasifikasi dinyatakan embrio *excellent* tetapi ternyata angka kebuntingannya lebih rendah bila dibandingkan dengan embrio yang hanya diklasifikasikan *good* dengan metode dan penanganan yang sama.

Umur Embrio

Trounson (1978) melaporkan bahwa umur embrio berpengaruh terhadap daya hidup embrio pada waktu pengawetan beku dan *thawing*. Morula dini (*early morulae*) mempunyai daya hidup yang lebih rendah daripada morula lanjut (*late morulae*) dan blastosis.

Metoda Pembekuan dan Pencairan kembali

Metode pembekuan dan *thawing* berpengaruh terhadap keberhasilan transfer embrio. Neiman (1982) membandingkan hasil pengenceran *cryoprotectant* setelah *thawing* dengan menggunakan gliserol saja atau menggunakan gliserol dan sukrose. Ternyata dengan pengenceran terakhir ini dapat memperbaiki daya tahan embrio terhadap *osmotic swelling*. Percobaan oleh Leibo (1983) diperoleh hasil dilapangan bahwa jika dipergunakan gliserol sebagai pengencer, akan didapatkan angka kebuntingan sebesar 36.7% .

Keterampilan Teknisi

Penyiapan resipien mulai dari seleksi terhadap alat reproduksi dan sinkronisasi antara umur embrio dan siklus pada resipien sangat berpengaruh terhadap keberhasilan transfer embrio. Sering-

kali pengamatan birahi yang diserahkan pada petugas lapangan yang kurang berpengalaman akan berakibat buruk bagi keberhasilan transfer embrio.

Leibo (1983) melaporkan bahwa terdapat perbedaan yang besar hasil transfer embrio yang dilakukan oleh teknisi yang berbeda tingkat ketrampilannya. Hasilnya berkisar antara yang rendah 22% (13/58) dan yang tinggi 41% (48/118) hal ini tergantung pada penyiapan resipien sampai ketrampilan melakukan thawing.

Dari faktor-faktor yang berpengaruh terhadap angka kebuntingan, dapat diketahui hasil yang bervariasi. Di Australia dalam suatu program yang dirancang dengan baik di suatu *station* angka kebuntingan yang didapat 48.9% (45/93) sedangkan apabila dilakukan di lapangan pada kondisi yang berbeda-beda, maka diperoleh angka kebuntingan yang menurun 22.9% (30/131), 10% (3/29), 23.6% (43/182) dan 13.5% (5/57).

Elsden (1984) berkesimpulan bahwa transfer embrio yang menggunakan embrio beku dengan kontrol dan program yang baik didapatkan angka kebuntingan berkisar antara 35 sampai 40 persen.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Latihan Pegawai Pertanian (BLPP) Songgoriti, Batu, Kabupaten Malang. Dimulai pada bulan September 1993 sampai dengan bulan Januari 1994.

Materi Penelitian

Dalam penelitian ini dipergunakan 10 ekor sapi perah betina bangsa Friesian Holstein sebagai donor. Kesepuluh ekor sapi perah tersebut berada dan dipelihara di Balai Latihan Pegawai Pertanian (BLPP) Songgoriti, Batu Kabupaten Malang.

Sapi-sapi donor tersebut dipelihara seperti layaknya pemeliharaan dipeternakan yang memenuhi syarat, baik perkandangan maupun makanannya.

Sebanyak 5 ekor sapi perah betina bangsa Friesian Holstein dipergunakan sebagai resipien.

Bahan dan obat-obatan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi *PGF2 α* (Pronalgon, Up John), *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG)(Nippon Zenyaku Kogyo Co Ltd.), *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG)(Gestron, Nipon Zenyaku Kogyo Co Ltd) dan *lidocain 2%* (Lidonest, Merck) . Sedangkan bahan/kemikalia yang dipergunakan adalah *Modified Dulbeccos Phosphate Buffer Saline* (mPBS), *Foetal Calf Serum* (FCS) (Flow Lab.), *Bovine Serum Albumine* (BSA) (Flow Lab.), *1,2 Propanediol*(E Merck), gliserol, Sukrose, KY-gel, alkohol 70 % dan aquatridest. Bahan atau peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Folley catether*, *cervix expander*,

mucous remover, slang pengumpul (*collecting tube*), pompa aerator, botol steril, catether transfer, *plastic sheath*, laras inseminasi (*insemination gun*), *disposable syringe* 10 ml dan 20 ml, kapas, cawan petri, mikroskop dan *straw* transparan.

Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini untuk mendapatkan embrio dilakukan teknik transfer embrio tanpa pembedahan, embrio yang didapat sebagian langsung dilakukan transfer ke resipien dalam bentuk segar dan sebagian lainnya dilakukan pembekuan dengan metode vitrifikasi. Kronologis kegiatan penelitian adalah sebagai berikut:

Programing Pada tahap awal dilakukan penyusunan program kerja, baik perlakuan terhadap donor maupun terhadap resipien. Secara rinci program kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

Seleksi Donor dan Resipien. Seleksi donor dilakukan dengan melihat kondisi fisik, sejarah penyakit terutama reproduksinya. Palpasi rektal dilakukan guna mengetahui status reproduksi dan anatomis reproduksinya normal. Untuk donor dan resipien minimal telah beranak minimal satu kali dan maksimal dua kali.

Penyerentakan Birahi. Penyerentakan birahi dilakukan terhadap donor dan resipien dengan tujuan untuk memudahkan pengamatan birahi dan pelaksanaan transfer embrio. Preparat yang digunakan dalam penyerentakan birahi baik pada donor maupun resipien adalah Prostaglandin F2 alfa dengan dosis 25 mg secara intra muskuler. Penyuntikan PGF2 alfa dilakukan 2 kali dengan selang waktu 11 hari.

Superovulasi. Pada hari ke 9 dari siklus birahi dilakukan superovulasi dengan menyuntikkan PMSG. Sebanyak 5 ekor sapi betina donor yang terseleksi dilakukan superovulasi dengan menyuntikkan PMSG dengan dosis 2500 IU secara intra muskuler dan pada hari ke 11 dari siklus birahi dilakukan penyuntikkan PGF2 alfa dengan dosis 25 mg secara intra muskuler. Hormon Human Chorionic Gonadotropin dengan dosis 5000 IU diberikan pada waktu birahi secara intra muskuler.

Pengamatan Birahi. Pengamatan birahi dilakukan dua kali sehari pada pagi dan sore hari, dengan kriteria tingkah laku gelisah, alat kelamin luar membengkak, mukosa kemerahan dan keluar lendir jernih dari vulva.

Inseminasi. Inseminasi dilakukan dua kali dalam selang waktu 8 jam dengan memakai semen beku dari pejantan unggul, masing-masing dua straw sekali inseminasi.

Pemanenan Embrio. Pemanenan embrio atau *flushing* dilakukan pada hari ke 7 setelah inseminasi dengan memakai teknik tanpa pembedahan. Sebelum *flushing* dimulai, dilakukan palpasi rektal untuk mengetahui jumlah ovulasi yang terjadi dengan cara menghitung jumlah korpus luteum yang terbentuk. Demikian pula untuk mengetahui apakah ada folikel yang tidak terovulasikan. *Flushing* dilakukan dengan memasukkan kateter *Folley* sampai apeks kornua uteri, setelah terfiksasi, dilakukan pembilasan dengan media *Phosphate Buffer Saline* termodifikasi ditambah dengan media FCS 2 %. Hasil bilasan ditampung dalam botol steril, setelah dilakukan penyaringan dengan memakai saringan *mesh* selanjutnya ditempatkan pada cawan petri dan dilakukan identifikasi embrio. Pembilasan embrio

dilakukan pada setiap kornua uteri yang terdapat korpus luteum pada ovariumnya (*ipsilateral*).

Transfer Embrio. Embrio yang telah diseleksi di dalam media m PBS dan FCS 20 % sebagian langsung dilakukan transfer ke resipien yang telah disiapkan. Embrio yang terseleksi di masukkan ke dalam straw dengan urutan; Media, udara, media dan embrio, udara, media. Setelah dipastikan bahwa embrio berada dalam straw, kemudian disiapkan pada kateter transfer. Resipien yang telah disiapkan dilakukan *epidural anestesi* dengan menggunakan lidocain 2% pada ruas antara tulang *sacrum* dan tulang ekor guna mencegah perejanan. Embrio dideposisikan pada *apeks kornua uteri ipsilateral* dengan korpus luteum yang ada.

Pembekuan Embrio. Untuk pembekuan embrio, terlebih dahulu dipersiapkan pembuatan dua macam larutan sebelum pembekuan (V1 dan V2). Larutan V1 terdiri dari larutan *Phosphate Buffer Saline Dulbeccos* termodifikasi sebanyak 7 ml ditambahkan dengan *Foetal Calf Serum* 20 %, 2 ml 1,2 propanediol dan gliserol sebanyak 5 ml. Larutan V2 terdiri dari larutan PBS Dulbeccos termodifikasi 5 ml, 1,2 propanediol 2,5 ml dan gliserol sebanyak 2,5 ml. Larutan-larutan tersebut disaring dengan menggunakan *Millipore* 0,45 Um, larutan ini didinginkan pada suhu 0 - 4 ° Celcius (air es). Larutan V1 dan V2 dituangkan sebagian pada cawan petri kecil dan ditempatkan di atas balok es (suhu 4° C). Embrio dipindahkan ke larutan V1 selama 10 menit, kemudian dipindahkan ke larutan V2 selama 60 - 90 detik untuk selanjutnya dipindahkan kedalam straw bersama larutan V2. *Straw* yang akan digunakan dilakukan pencucian terlebih dahulu dengan PBS. *Straw* yang telah berisi embrio, dimasukkan pada suatu

holder dan ditempatkan pada uap nitrogen cair selama 30 detik, kemudian langsung dimasukkan kedalam nitrogen cair dalam kontainer.

Thawing. Untuk melakukan thawing (pencairan kembali) embrio, dilakukan persiapan larutan sukrose dalam PBS dan 20 % Foetal calf Serum. (Sukrose 1 M). Thawing dilakukan pada suhu 20 derajat Celcius selama 20 detik. Embrio kemudian di masukkan kedalam larutan PBS dan FCS + sukrose 1 M selama 5 menit untuk menghilangkan zat pelindung beku (gliserol). Pencucian ini dilakukan pengulangan 3 kali. Pada pencucian yang terakhir, embrio dilakukan evaluasi morfologinya.

Embrio kemudian dimasukkan kedalam straw dengan urutan M PBS + FCS 20 %+ sukrose 1 M, udara, embrio dalam larutan V2, udara, PBS + FCS 20 % + sukrose 1 M. Setelah embrio siap dalam straw, kemudian ditransfer pada resipien.

Dalam penelitian ini dilakukan dua kelompok pada resipien dimana pada kelompok yang pertama (10 ekor) dilakukan transfer embrio segar (langsung tanpa pembekuan) dan kelompok kedua dilakukan transfer dengan embrio hasil pembekuan.

Pemeriksaan Kebuntingan. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan melalui palpasi rektal 90 hari setelah embrio di transferkan. Kriteria kebuntingan adalah tidak simetrinya kornua uteri, terdapat fluktuasi pada kornua uteri.

Variabel yang Diamati

Dalam penelitian ini beberapa variabel yang diamati adalah:

1. Jumlah embrio yang diperoleh dibandingkan dengan jumlah korpus luteum yang ada.
2. Klasifikasi embrio sebelum dibekukan
3. Morfologi embrio setelah dibekukan
4. Persentase kebuntingan

Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan disajikan dalam bentuk persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari serangkaian percobaan yang telah dilakukan didapatkan hasil sebagai berikut.

Seleksi Donor dan Resipien

Seleksi donor dilakukan sebelum perlakuan yang meliputi kondisi fisik maupun kondisi reproduksinya demikian juga respon terhadap perlakuan treatment hormonal. Dari 10 ekor donor dan 20 ekor resipien yang diseleksi hanya didapatkan 2 ekor sapi donor dan 2 ekor sapi resipien yang memberikan respon yang baik terhadap treatment hormonal. Hal ini disebabkan kondisi pakan pada akhir musim kemarau yang menyebabkan kesulitan mendapatkan hijauan yang baik, sehingga mempengaruhi penampilan reproduksinya. Selain itu juga didapatkan beberapa ekor sapi dengan kelainan anatomis pada saluran reproduksinya, sehingga dikhawatirkan akan mengalami kesulitan dalam pemanenan embrio.

Superovulasi

Superovulasi dilakukan terhadap dua ekor sapi donor dengan menggunakan preparat PMSG. Dalam penentuan jumlah ovulasi yang terjadi, dipergunakan penghitungan jumlah korpus luteum yang ada pada ovarium, baik ovarium sebelah kanan maupun sebelah kiri melalui perabaan rektal. Secara rinci jumlah ovulasi dapat dilihat pada tabel berikut 2.

Hasil yang didapat dari perlakuan superovulasi dengan memakai preparat PMSG didapatkan jumlah korpus luteum 8.5 ± 2.12 buah.

Mahaputra dkk.(1990) melaporkan penggunaan PMSG dengan dosis 3500 IU pada sapi perah, diperoleh korpus luteum rata-rata sejumlah

4.25 buah. Ismudiono dkk (1992) melaporkan penggunaan PMSG dengan dosis 2500 IU pada sapi perah diperoleh jumlah rata-rata korpus luteum 7.80 ± 2.28 buah, sedangkan penggunaan FSH dengan dosis 36 mg pada sapi perah diperoleh jumlah rata-rata korpus luteum 7.60 ± 4.77 buah.

Tabel 2. Jumlah korpus luteum yang terdapat pada Ovarium

SAPI DONOR	KORPUS LUTEUM		
	OV. KANAN	OV. KIRI	JUMLAH
1.	5	2	7
2.	7	3	10

Pengaruh samping yang didapat dari penggunaan PMSG seperti yang dilaporkan oleh beberapa peneliti bahwa terdapat beberapa folikel yang tak terovulasikan masih terjadi dalam penelitian ini, walaupun dosis hCG ditingkatkan hingga 5000 IU. Mahaputra (1990) juga menemukan kejadian ini dalam penelitiannya dengan rata-rata 1.75 buah folikel yang tak terovulasikan.

Perolehan Embrio

Dari hasil pemanenan embrio dengan metode *flushing* tanpa pembedahan didapatkan embrio sebagai berikut:

Tabel 3. Jumlah Embrio yang Diperoleh

Donor	Jumlah Korpus Luteum	Jumlah Embrio yang Ditemukan	Persentase Temuan Embrio
1.	10	4	40
2.	7	3	57.14

Dari hasil pemanenan embrio, apabila dibandingkan dengan jumlah korpus luteum yang dapat ditemukan melalui perabaan rektal didapatkan angka rata-rata 41.17 % (7/17). Perolehan ini lebih rendah dari yang didapat Ismudiono (1992) yaitu 59.74 % (46/77). Hal ini disebabkan karena faktor-faktor yang ada di lapangan sangat bervariasi dan mempengaruhi keberhasilan mendapatkan embrio. Salah satu faktor kesulitan dalam melakukan flushing adalah bervariasinya saluran serviks sehingga menyulitkan pemasangan kateter, sehingga berakibat kelelahan pada operator dan pemasangan kateter tidak dapat mencapai apeks kornua uteri.

Evaluasi Embrio

Embrio yang didapat dilakukan evaluasi dibawah mikroskop disekting. Dari tujuh embrio yang diperoleh setelah dilakukan evaluasi diklasifikasikan 5 embrio dalam klasifikasi baik sekali (*excellent*) dan dalam stadia *morulla*, sedangkan dua embrio dalam klasifikasi baik (*good*) dan dalam stadia blastosis dini (*early blastocyst*). Menurut Kuzan (1984), berdasarkan morfologinya embrio segar diklasifikasikan sebagai *excellent* (kualitas 1) yaitu embrio tanpa adanya cacat; *good* (kualitas 2) yaitu embrio dengan satu cacat kecil misalnya bentuk yang kurang simetris atau sedikit mengalami hambatan perkembangan bila dibandingkan embrio lainnya dalam satu flushing yang sama; *fair* (kualitas 3) yaitu apabila terdapat lebih dari satu kecacatan biasanya mengalami hambatan perkembangan 1-2 hari; *poor* (kualitas 4) yaitu apabila terdapat sel-sel embrio yang tak terorganisasi dengan baik dan terdapat

hambatan perkembangan lebih dari dua hari; *dead* (kualitas 5) yaitu sel telur yang tak terbuahi atau embrio yang sel-selnya mengalami degenerasi total.

Transfer dan Pembekuan Embrio

Dari semua embrio yang didapat dua embrio dengan kualitas 2 (*good*) dilakukan transfer langsung dalam bentuk segar ke resipien sapi perah yang sudah disiapkan, sedangkan lima embrio dilakukan pembekuan dengan metode Vitrifikasi. Metode pembekuan vitrifikasi merupakan metode pembekuan secara cepat, dimana embrio setelah dilakukan adaptasi pada media PBS dan krioprotektan 1,2 propnediol dan gliserol pada larutan pertama (V1) pada suhu 4° C diatas balok es selama 10 menit kemudian di masukkan pada larutan V2 dengan konsentrasi krioprotektan yang lebih tinggi dalam waktu cepat, untuk kemudian dipindahkan ke uap nitrogen dan kemudian di masukkan ke dalam nitrogen cair untuk pembekuan. Metoda ini dinilai dapat dilakukan secara cepat dan dapat langsung di lakukan di lapangan, kendala yang ada adalah mempertahankan suhu agar tetap dingin, terutama pada waktu pemindahan embrio ke dalam straw, karena harus di bawah mikroskop.

Klasifikasi embrio setelah pembekuan (*post thawing*) dan transfer embrio beku tersebut sedang dilakukan dan hasilnya akan dilaporkan kemudian.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. Pembekuan embrio pada sapi perah dengan menggunakan metode vitrifikasi dapat dilaksanakan di lapangan dengan mudah.
2. Keberhasilan transfer embrio dengan menggunakan embrio beku dipengaruhi oleh faktor-faktor teknis yang harus diperhitungkan terutama dalam pelaksanaannya di Indonesia
3. Transfer embrio beku di Indonesia memberikan prospek yang cukup bagus untuk dikembangkan.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencoba melakukan modifikasi teknik pembekuan ini.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai faktor-faktor dominan yang berpengaruh terhadap keberhasilan transfer embrio beku pada kondisi lapangan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Bilton, R.J. 1980 Preservation of Embryos of the large domestic species. IXth Int. Congr. Anim.Reprod.& AI. Madrid RT-R-3, 245-253.
- Brinster, R.L. 1963 A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp.Cell.Res. 32,205-208.
- Elsden, RP., 1984. Success Rates with Cryopreserved Bovine Embryos. In: Bovine Embryo Transfer Workshop. The University of Sydney, Australia.
- Gordon, I., Boland, M.P. 1978. Cattle twining by non surgical egg transfer. In: Sreenan (ed) Control of Reproduction in The Cow. 336-355. Martin Nijhoff. The Hague.
- Ismudiono, Hardjopranjoto, S., Mahaputra, L., Hariadi, M., dan Srianto, P. 1991. Transfer Embrio dengan Menggunakan Embrio Beku pada Sapi Perah. Univ. Airlangga.
- Ismudiono, Hardjopranjoto, S., Hariadi, M., Srianto P. 1992. Transfer Embrio Sapi Perah Dengan Menggunakan Sapi Potong Sebagai Resipien. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Kanagawa, H. 1979 One to two day preservation of bovine embryos. Jpn.J.Vet.Res. 28,1-6.
- Kanagawa, H. 1988. Bovine Embryo Transfer. Japan Int.Cooperation Agency. Hokkaido.
- Kennedy, L.G., Boland, M.P., and Gordon, I. 1983. Effect of Bovine Embryo Quality on Survival after Rapid Freezing and Thawing. Theriogenology. 19:135 (Abstr.)
- Kuzan, F., 1984. Classification of Embryos Prior to Freezing. In Bovine Embryo Transfer Workshop. Sydney, N.S.W., Australia.
- Leibo, S.P. 1982. A. One-Step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Cryobiol., 19,673-674 (Abstr.).
- Leibo, SP. 1983. Field Trial of One-Step Frozen Bovine Embryo Transferred Non Surgically. Theriogenology 19:139 (Abstr.).
- Mahaputra, L. Hariadi, M., Ismudiono dan Hardjopranjoto, S. 1991. Penerapan Teknik Transfer Embrio pada Sapi Perah dengan Menggunakan Embrio Segar. Univ. Airlangga.
- Neiman, H., B, Sacher., E. Schilling and D, Smidt. 1982. Improvement of Survival Rates of Bovine Blastocyst with Sucrose for Glycerol Dilution After a Fast Freezing and Thawing Method. Theriogenology 17:102. (Abstr.).

- Trounson, A.O., Shea, B.F., Ollis, G.W. and Jacobson, M.E. 1978. Frozen Storage and Transfer of Bovine Embryos. *J. Anim. Sci.* 47:677-681.
- Toelihere, M.,R., 1991. Transfer Embrio di Indonesia. Simposium Transfer Embrio. Pusat Antar Universitas, Bogor.
- Willadsen, S.M. 1978. In Vitro Storage of Cattle Embryos. In: Sreenan (ed) Control of Reproduction in the cow. Comm. of the European Comm. Luxembourg.

Lampiran 1. : Bagan Program Perlakuan Donor

