



**LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001**

**PERBEDAAN TINGKAT PERKEMBANGAN EMBRIO PARUH SAPI
PERAH YANG DIBIAKKAN DALAM MEDIA M16 DAN TC199**

Peneliti :

Drh. SRI PANTJA MADYAWATI, M.Si.

Drh. PUDJI SRIANTO, M.Kes.

Drh. HUSNI ANWAR

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII/1--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 19

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Puslit Pembangunan Regional. | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | Pembangunan (5995719) |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit/Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995346
E-mail: lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. a. Judul Penelitian	: PERBEDAAN TINGKAT PERKEMBANGAN EMBRIO PARUH SAPI PERAH YANG DIBIAKKAN DALAM MEDIA M-16 DAN TCM-199
b. Macam Penelitian	: I/II/III *)
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama Lengkap dan Gelar	: Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan dan NIP.	: Penata Muda Tingkat I/III-b/131837006
d. Jabatan Fungsional	: Asisten Ahli
e. Fakultas / Puslit / Jurusan	: Kedokteran
f. Univ./Inst./Lain	
g.	
3. Jun	
4. Lok	
5. Bil	
a.	
b.	
6. Jang	
7. Biay	



Ringkasan Penelitian

PERBEDAAN TINGKAT PERKEMBANGAN EMBRIO PARUH SAPI PERAH YANG DIBIAKKAN DALAM MEDIA M16 DAN TC199 (S.P.Madyawati, P.Srianto, H.Anwar.,2001. 25 hal)

Telah dilakukan penelitian tentang perbedaan tingkat perkembangan embrio paruh sapi perah yang dibiakkan dalam media M16 dan TC199.

Permasalahan dari penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan tingkat perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel yang dibiakkan dalam M16 dan TC199 setelah diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kemampuan media M16 sebagai media sederhana dan TC199 sebagai media kompleks dalam meningkatkan viabilitas embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel.

Sebagai sampel digunakan embrio sapi perah hasil pembuahan *in vitro* yang telah mencapai fase 16 sel dan 32 sel. Selanjutnya dilakukan penyayatan menjadi dua bagian hampir sama besar bersama-sama zona pelusidanya dengan menggunakan mikromanipulator yang terdiri dari mikroblade ukuran terkecil, *holding pipette* dan inverted mikroskop. Parameter yang diamati adalah tingkat perkembangan embrio paruh dalam media biakan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase perkembangan embrio paruh fase 16 sel yang dibiakkan dalam media M16 + serum sapi ovulasi dan TC199 + serum sapi ovulasi dengan waktu pengamatan selama 24 jam masing-masing sebesar 5% dan 35%, menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$). Persentase perkembangan embrio paruh fase 32 sel yang dibiakkan dalam media M16 +SSO dan TC199+SSO dengan waktu pengamatan 24 jam masing-masing sebesar 0% dan 40%, ada perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa media terbaik untuk membiakkan embrio paruh sapi perah selama 24 jam adalah TC199 dengan penambahan serum sapi ovulasi.

(L.P. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Nomor Kontrak 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001, Tanggal 15 Maret 2001)

SUMMARY

THE DIFFERENCE OF THE DEVELOPMENT OF DAIRY CATTLE DEMI-EMBRYOS THAT ARE CULTURED IN M16 AND TC199

(S.P.Madyawati, P.Srianto, H.Anwar.,2001, 25 pages)

This research was carried out to observe the development demi-embryos after splitting in culture media M16 dan TC199 and the addition of serum.

As sample, 16 - 32 cell in vitro fertilization derived dairy cattle embryos were split into a pair of demi-embryos with each zona pelusida by using micromanipulator that contains the smallest size microblade, holding pipette and inverted microscope. The parameter observed was the developmental stage of demi-embryos in culture media.

The result showed that development percentage of demi-embryos split from 16 cell in M16 + ovulated cow serum and TC199 + ovulated cow serum, at 24 hours observation were 5% and 35% respectively, which were significantly different ($P < 0,05$). Development percentage of demi-embryos split from 32 cell embryos, cultured in M16 + ovulated cow serum and TC199 + ovulated cow serum in 24 hours observation were 0% and 40% respectively, which were very significantly different ($P < 0,01$).

The conclusion showed that the best the development percentage of demi-embryos that are cultured in TC199.

(L.P. Fakultas Kedokteran Hewan: Universitas Airlangga. Nomor Kontrak 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001,tanggal 15 maret 2001)

KATA PENGANTAR

Puji Syukur ke hadirat Allah S.W.T. bahwa atas rahmat, taufiq dan hidayahNya maka penelitian sampai dengan penyusunan laporan ini dapat dilaksanakan dengan lancar.

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Ditjen Dikti Depdiknas yang telah mengabulkan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan dengan menggunakan sumber dana DP3M dengan nomor kontrak :360/J03.2/PG/2001 tanggal 12 April 2001.
2. Prof.dr.H. Soedarto, DTM&H, Ph.D. selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian melalui sumber dana DP3M.
3. Prof.Dr.H.Sarmanu,MS.,Drh. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, atas kelancaran administrasi mulai dari proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan hasil penelitian ini .
4. Dr. Ismudiono,M.S.,Drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang mendukung kelancaran proses pengajuan proposal penelitian.

Kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan demi perbaikan penelitian ini. Semoga laporan penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang berkepentingan.

Surabaya, September 2001

Penulis

**SISTEMATIKA LAPORAN AKHIR
KEGIATAN PENELITIAN DOSEN MUDA**

	Hal
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
KATA PENGANTAR	iii
SISTEMATIKA LAPORAN AKHIR	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Perkembangan Alamiah Embrio	4
2.2. Klasifikasi Embrio	5
2.3. Daya Tahan Hidup Embrio	6
2.4. Embrio Paruh	7
2.5. Media in vitro dan Penambahan Serum dalam Media	8
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1. Tujuan Penelitian	11
3.2. Manfaat Penelitian	11
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1. Waktu dan Lokasi Penelitian	12
4.2. Alat dan Bahan Penelitian	12
4.3. Prosedur Penelitian	13
4.4. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel	13
4.5. Analisis Data	15
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Hasil Penelitian	16
5.2. Pembahasan	19
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	23
6.2. Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 5.1. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 16 sel dalam Media M16+SSO dan TC199+SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam	16
Tabel 5.2. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 32 sel dalam media M16+SSO dan TC199+SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam	16
Tabel 5.3. Uji Statistik Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 16 sel yang dibiakkan dalam Media M16+SSO dan TC199+SSO selama 24 jam	17
Tabel 5.4. Uji Statistik Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 32 sel yang dibiakkan dalam Media M16+SSO dan TC199+SSO selama 24 jam	17

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 5.1. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 16 sel Dengan Waktu Pengamatan 24 jam	18
Gambar 5.2. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 32 sel Dengan Waktu Pengamatan 24 jam	18

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Membuat Media TC199	27
Lampiran 2. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Membuat Media M16	28
Lampiran 3. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 16 sel Dalam Media M16+SSO dan TC199+SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam	29
Lampiran 4. Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 32 sel Dalam Media M16+SSO dan TC199+SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam	30
Lampiran 5. Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 16 sel yang diinkubasi selama 24 jam	31
Lampiran 6. Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 16 sel yang diinkubasi selama 48 jam	32
Lampiran 7. Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 32 sel yang diinkubasi selama 24 jam	33
Lampiran 8. Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 32 sel yang diinkubasi selama 48 jam	34

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Aspek biologi reproduksi dari temak yang saat ini perlu mendapat perhatian besar meliputi reproduksi pejantan, reproduksi betina, laktasi serta perkembangan pedet (Macdonald dan Kristin, 1995). Dari empat aspek tersebut kemudian dikembangkan seiring dengan pesatnya laju ilmu pengetahuan dan teknologi ,sehingga pembangunan di bidang peternakan diarahkan pada bioteknologi yaitu pemanfaatan proses biologis melalui rekayasa genetik maupun rekayasa proses untuk menghasilkan temak yang berkualitas (Soehadji,1995).

Bioteknologi reproduksi di bidang peternakan pertama kali yang dapat diterima dan dilaksanakan di masyarakat adalah inseminasi buatan. Untuk mendukung program inseminasi buatan, didirikanlah Balai Inseminasi Buatan sebagai penyedia semen beku. Selanjutnya program peningkatan inseminasi buatan adalah pengembangan bioteknologi molekuler melalui teknik pemisahan jenis kelamin sperma.

Generasi kedua bioteknologi reproduksi yang memiliki beberapa kelebihan dibandingkan inseminasi buatan adalah transfer embrio. Teknik transfer embrio memberikan beberapa keuntungan antara lain meningkatkan jumlah turunan dari induk yang mempunyai sifat genetik tinggi, dapat meningkatkan efisiensi reproduksi dengan meningkatkan anak seekelahiran, menentukan jenis kelamin embrio yang dikehendaki serta memungkinkan

pemindahan gen dalam rangka pembentukan hewan transgenik (Hardjopranjoto, 1995). Daya guna transfer embrio dapat ditingkatkan lagi bila ditunjang oleh faktor-faktor lain yaitu manipulasi embrio dan fertilisasi *in vitro* (Sukra dkk.,1991).

Usaha memanipulasi embrio dapat diawali dengan teknik fertilisasi *in vitro*, penentuan jenis kelamin embrio, *splitting* embrio serta transplantasi inti dan kloning (Sukra dkk.,1991; Hunter,1995).

Salah satu cara manipulasi embrio adalah penyayatan (*splitting*) embrio. Penelitian tentang pemisahan sel blastomer dari embrio kelinci pada stadium perkembangan dua sel dan empat sel pertama kali dilakukan oleh Moore dkk. (1968) yang dikutip Hunter (1995) dengan cara pencoblosan zona pelusida dan pemindahan sel blastomer ke zona pelusida kosong. Selanjutnya teknik penyayatan embrio dibedakan atas fase perkembangan morula atau blastosis dengan cara penyayatan membagi embrio menjadi dua bagian yang relatif sama besar.

Keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro* salah satunya bergantung pada medium yang digunakan. Medium harus mempunyai fungsi mekanis, fisik dan kimiawi dan ketiganya akan saling menunjang dalam memberikan lingkungan yang optimum untuk menjamin kualitas serta kelangsungan hidup embrio. Komposisi media *in vitro* harus dibuat sesuai dengan kondisi dalam tuba fallopii maupun dalam uterus yang merupakan tempat perkembangan embrio secara alamiah (Robinson dan McEvoy,1993).

Media *in vitro* buatan dibagi menjadi dua macam yaitu media sederhana dan media kompleks. Media *in vitro* sederhana mengandung garam fisiologis,

piruvat, laktat dan glukosa serta buffer bikarbonat, sedangkan media *in vitro* kompleks terdiri dari media sederhana yang ditambah dengan vitamin, asam amino, purin dan komponen lain (Gordon, 1994). Media sederhana dan media kompleks yang sering digunakan masing-masing adalah *Medium 16 (M-16)* dan *Tissue Culture Medium (TCM-199)*. Untuk mengetahui efektivitas kedua media *in vitro* dalam meningkatkan viabilitas embrio paruh sapi perah stadium morula, maka dilakukan penelitian ini.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian yang telah diuraikan diatas, dapat dirumuskan suatu masalah sebagai berikut

1. Apakah terdapat perbedaan tingkat perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel yang dibiakkan dalam media M-16 dan TC-199 setelah diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam ?

1.3. Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan tingkat perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel yang dibiakkan dalam media M-16 dan TC-199 setelah diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Perkembangan Alamiyah Embrio

Proses perkembangan embrio secara umum dimulai sejak sel telur dibuahi di dalam tuba fallopii sampai perkembangan organogenesis di uterus. Laju transpor embrio dalam tuba fallopii menuju uterus sangat bervariasi berdasarkan sekresi endokrin terutama berdasarkan rasio estrogen-progesteron. Pada sapi diperlukan waktu sekitar 8 hari untuk mencapai tahap blastosis, sedang pada babi, domba dan kambing memerlukan waktu lebih pendek yaitu 6 hari (Frandsen, 1992).

Perkembangan anatomi embrio selalu berjalan secara berkesinambungan dari tingkat satu sel yang sederhana menjadi bentuk multiseluler yang amat kompleks. Proses perkembangan embrio memerlukan waktu agar diperoleh perubahan yang sempurna. Waktu perkembangan untuk setiap fase tidak sama, ada yang membutuhkan waktu lama dan ada yang hanya butuh waktu singkat.

Proses perkembangan embriogenesis menurut Soenardirahardjo (1990) meliputi :

1. Tahap persiapan adalah proses perkembangan gametogenesis, fertilisasi, parthenogenesis, pembelahan, blastulasi dan gastrulasi.
2. Tahap Pembelahan cepat meliputi perkembangan sistem saraf, mata, telinga dan hidung, sistem pencernaan, jantung, pembuluh darah, derivat entodermal, sistem urogenital, gigi, kulit dan derivat-derivainya.

2.2. Klasifikasi Embrio

Embrio dibedakan berdasarkan beberapa karakteristik yang dapat digunakan untuk evaluasi pemeriksaan morfologis yaitu ikatan antar sel, keteraturan bentuk embrio, variasi dalam ukuran sel, warna dan susunan sitoplasma, ada tidaknya sel-sel yang keluar dari ikatan sel, diameter embrio, keteraturan zona pelusida, tidak mengkerut serta tidak adanya debris sel. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), embrio yang ideal adalah yang kompak, ikatan antar sel blastomer erat dan berbentuk bulat.

Klasifikasi embrio stadium morula dan blastosis menurut Schmitz (1986) yang dikutip oleh Soenardirahardjo (1990) dibagi menjadi tiga kelompok yaitu :

Kelompok A : Morula berbentuk bulat dan padat dengan sel blastomer berukuran sama besar dan morfologi sel utuh. Blastosis terlihat utuh dilengkapi dengan massa sel dalam. Keduanya dilengkapi dengan zona pelusida yang utuh dan bulat.

Kelompok B : Morula berisi 8 - 16 sel blastomer tetapi beberapa sel tampak mulai degenerasi dan berwarna pucat. Blastosis berisi massa sel dalam yang masih utuh, tetapi terdapat kelompok sel yang mengalami degenerasi. Zona pelusida pada kedua macam embrio tampak retak sehingga terlihat terputus-putus.

Kelompok C : Semua sel blastomer terlihat rusak total. Pada morula dan blastosis tampak fraksi-fraksi sel blastomer yang berisi vakuola dan zona pelusidanya tampak sudah rusak.

Evaluasi dan klasifikasi embrio sangat menentukan dalam keberhasilan manipulasi embrio yang merupakan salah satu cara untuk mengembangkan

program transfer embrio. Embrio dengan kualitas baik mempunyai daya tahan hidup dan kemampuan berkembang lebih lanjut sampai didalam alat kelamin temak resipien sehingga akan meningkatkan angka kebuntingan.

2.3. Daya Tahan Hidup Embrio

Beberapa faktor yang mempengaruhi daya tahan hidup embrio dalam media biakan antara lain : komposisi dari media, tingkat pembelahan sel dari embrio, suhu penyimpanan embrio, tekanan udara, kelembaban, penggunaan bahan anti kristal pada penyimpanan suhu beku (Hafez, 1993).

Komposisi media *in vitro* mempunyai pengaruh sangat besar dalam ketahanan hidup dan perkembangan embrio selanjutnya (Quinn, 1982, Hafez, 1993). Dasar komposisi adalah cairan alat reproduksi induk di tambah dengan protein ekstra dan sumber energi. Kondisi media biakan yang baik dapat dicapai bila memenuhi syarat-syarat antara lain kemurnian media, tekanan gas yang sesuai, suhu dan kelembaban inkubator yang optimum.

Perkembangan embrio secara *in vitro* pada tingkat pembelahan dini mempunyai daya tahan hidup yang rendah. Sebaliknya semakin tinggi tingkat perkembangan embrio, maka semakin tinggi daya tahan hidupnya (Trounson *et al.*, 1978, Hafez, 1993). Batas perkembangan embrio pada penyimpanan *in vitro* minimal sudah mencapai fase 4 sel. Penyimpanan yang paling berhasil adalah embrio pada stadium akhir morula sampai blastosis pada sapi dan stadium 4 - 8 sel pada domba (Trounson *et al.*, 1978).

Penyimpanan embrio dalam media dapat dilakukan pada temperatur 37°C atau pada temperatur 4°C. Pada temperatur 37 °C, embrio mampu bertahan selama 48 jam tanpa banyak mengalami perubahan, sedang pada

penyimpanan 4°C embrio mampu bertahan selama 5 hari (Seidel dan Sarah, 1991).

Tekanan udara yang mengandung CO₂ dan O₂ sangat penting dalam mempertahankan keseimbangan pH dan kelangsungan terjadinya proses pembentukan awal jaringan embrio. Komposisi udara bertekanan yang diberikan pada media biakan embrio harus mengandung CO₂ 5% dan O₂ 95% (Hafez,1993).

2.4. Embrio Paruh

Salah satu program manipulasi embrio adalah dengan melakukan penyayatan embrio (*splitting*). Penelitian tentang teknik penyayatan embrio telah banyak dilakukan pada hewan laboratorium seperti mencit dan tikus (Nagashima *et al.*,1984; Elsdén dan Seidel Jr.,1990 dikutip oleh Sukra dkk.,1990). Selain itu penyayatan embrio juga pernah dilakukan pada ternak kecil seperti domba, kambing serta ternak besar seperti kuda dan sapi (Polge,1991; Maurer,1988).

Beberapa peneliti melakukan penyayatan embrio menjadi dua bagian (Picard *et al.*,1986; Kippax *et al.*,1991) dan menjadi empat bagian (Willadsen dan Polge,1981). Penyayatan embrio paling baik dilakukan pada embrio stadium morula dan blastosis, karena pada stadium ini embrio masih mempunyai kemampuan untuk berkembang menjadi embrio utuh setelah dirusak atau dipisahkan sel-sel blastomernya.

Penelitian Elsdén dan Seidel (1990) mengatakan bahwa embrio paruh hasil penyayatan dapat dipindahkan ke ternak resipien secepat mungkin dan angka kebuntingan yang diperoleh mencapai 50%. Sedangkan hasil penelitian

Kippax et al.(1991) bahwa embrio yang disayat dapat dipindahkan ke resipien lengkap dengan zona pelusidanya atau tanpa zona pelusida. Angka kebuntingan yang diperoleh dari embrio paruh yang masih memiliki zona pelusida sebesar 60% lebih tinggi dibandingkan embrio paruh tanpa zona pelusida yaitu sebesar 57%.

2.5 Media *in vitro* dan Penambahan Serum dalam Media

Media yang sering digunakan untuk kultur embrio terdiri dari 3 macam yaitu *media sederhana* yang hanya terdiri dari larutan garam dan karbohidrat, *media serum darah dan cairan folikel dalam larutan garam* dan *media kompleks* yang mengandung larutan garam, asam amino serta komponen-komponen lain (Hill et al.,1978).

Beberapa media biakan telah digunakan dalam kultur embrio adalah M16 dan M2 yang termasuk media sederhana, dimana sebagian bikarbonat diganti dengan HEPES untuk mempertahankan pH. Media sederhana sering digunakan untuk mengkultur embrio mencit maupun tikus. Media yang lebih kompleks adalah TC199 sering dipakai untuk mengkultur embrio sapi (Sukra dkk.,1991).

Dalam media M16 mengandung berbagai bahan-bahan anorganik yang peranan secara individual tidak banyak diketahui. Beberapa diantaranya diketahui fungsinya seperti ion Ca^{+2} yang penting dalam stabilitas dan permeabilitas membran sel dan natrium klorida penting dalam keseimbangan tekanan osmotik dari medium. Selain itu juga mengandung ion bokarbonat yang berfungsi untuk mengontrol pH. Adanya piruvat dan laktat diperlukan sebagai sumber energi bagi perkembangan embrio 2 sel tetapi tidak berpengaruh

terhadap perkembangan embrio 8 sel atau lebih (Hafez,1993), sedang adanya glukosa membantu perkembangan embrio pada stadium lebih lanjut.

Dalam media TC199 selain mengandung bahan-bahan anorganik, laktat, piruvat, glukosa, HEPES serta komponen-komponen lain seperti asam amino, dan berbagai vitamin yang secara keseluruhan berfungsi untuk menstimulir perkembangan embrio. Dalam media TC199 ketahanan embrio sapi yang diambil pada hari ke-5 setelah fertilisasi viabilitasnya sebesar 71% sedang yang diambil pada hari ke-3 viabilitasnya sebesar 49% (Trounson, 1976).

Serum merupakan bagian dari darah berupa cairan bening yang sangat penting untuk meningkatkan pertumbuhan oosit secara optimum. Fungsi utama serum dalam media biakan adalah sebagai dasar nutrisi dalam larutan dan mengikat protein, mengandung hormon dan faktor penumbuh yang dapat merangsang pertumbuhan sel telur serta dapat berfungsi sebagai larutan penyangga dalam mengatur pH media (Freshney,1992).

Serum selain mengandung glukosa, protein, enzim, vitamin, zat anorganik dan imunoglobulin juga banyak mengandung hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam konsentrasi tertentu. Selain itu serum juga mengandung berbagai macam mitogen yang dapat membuat sel lebih respon terhadap faktor penumbuh dan dapat meningkatkan diferensiasi sel (Mercola dan Stiles,1988).

Pada pembiakan embrio *in vitro*, penambahan serum dalam media TC199 mempunyai pengaruh biphasik terhadap pembelahan awal sel embrio, artinya penambahan serum pada awal pembelahan atau 18 jam setelah pembuahan, serum akan menghambat pembelahan awal sel embrio tetapi bila

ditambahkan pada 48 - 72 jam setelah pembuahan yakni pada fase 8 - 16 sel dapat merangsang perkembangan embrio sampai menjadi kompak morula dan blastosis (Pinyopummintr dan Bavister, 1994).

Beberapa peneliti menyatakan bahwa embrio sapi stadium awal dapat berkembang menjadi blastosis hingga 69% pada hari ke-9 selanjutnya Holm dkk. (1994) yang dikutip Mahaputra (1996) melaporkan bahwa embrio yang dibiakkan dalam media *Rosen Creen 1* (CR-1) ditambah dengan *ovulated cow serum* (OCS) maupun dalam CR-1 saja mampu menghasilkan blastosis paling banyak pada hari ke-8 setelah fertilisasi. Selanjutnya Manaputra (1996) juga mengatakan bahwa penambahan serum sapi ovulasi dalam media biakan berpengaruh baik bagi embrio yang telah mencapai stadium 8 sel.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui perbedaan kemampuan media M-15 (media sederhana) dan TC-199 (media kompleks) dalam meningkatkan viabilitas embrio paruh sapi perah stadium 16 sel dan 32 sel.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat mendukung pelaksanaan transfer embrio pada sapi perah dalam rangka meningkatkan reproduktivitas dan penambahan populasi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di unit *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya mulai bulan Juni sampai bulan Agustus 2001.

4.2. Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat-alat Penelitian

Terdiri dari mikroskop *inverted* (Meiji) dilengkapi dengan pipet holder, pipet injeksi mikro dan pisau mikro. Mikroskop stereo *disecting* (Meiji), Inkubator CO₂ (Compact CO₂ series 5000, Thermolyne, USA), Laminar flow (Speg Air Tech, PRC), meja penghangat dan pengaduk magnet (Labinco, Holland), Refrigerator (Mitsubishi, Japan), Timbangan mikro (electronic balance CHYO JP2-160), pH meter (Hanna, Singapore), cawan petri 35mm dan 65 mm (nunclon, Denmark), Pipet mikro 100 μ l dan 50 μ l, S spuit plastik dengan berbagai ukuran, Millipore dengan diameter lubang 0,22 μ m (Sartorius Minisart), gelas beker dan erlenmeyer.

4.2.2. Bahan Penelitian

Meliputi ovarium sapi perah yang dilakukan aspirasi untuk pengambilan oosit sebagai bahan dasar untuk memperoleh embrio setelah melewati fertilisasi *in vitro*.

Serum sapi ovulasi yang diperoleh dari sampel darah sapi perah yang diambil pada hari ke-7 setelah birahi dan telah dilakukan inaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit.

Media yang digunakan meliputi media pembilas yaitu *oocyte washing solution* (OWS), media biakan sederhana yaitu M16 dan media biakan kompleks yaitu TC199. Komposisi media biakan dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

4.3. Prosedur Penelitian

Sampel ovarium sapi perah diambil dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya. Ovarium dibersihkan dari jaringan pengikatnya dan dicuci dua kali dengan larutan NaCl fisiologis 0,9%. Selanjutnya direndam dalam larutan yang sama dan disimpan dalam penangas air yang bersuhu 35 - 37 °C.

Koleksi oosit dilakukan dengan cara aspirasi dari folikel yang berdiameter 2- 5 mm menggunakan jarum suntik ukuran 18 G dan syringe 10 ml. Media untuk koleksi oosit digunakan larutan hangat OWS. Hasil aspirasi ditenipatkan dalam tabung reaksi dan ditunggu sampai oosit turun ke dasar, kemudian endapan di evaluasi di cawan petri berukuran besar dibawah mikroskop *disecting* dengan pembesaran 40X. Pematangan oosit dilakukan selama 24 jam dalam inkubator CO₂.

Teknik fertilisasi *in vitro* menggunakan semen beku dan telah dilakukan *swim up* dan *a side migration* dalam media *early balanced salt solution* (EBSS) yang berbentuk rosett (Mahaputra, 1997).

Setelah melalui pembiakan dalam media TC199 di dalam inkubator CO₂, maka embrio yang telah mencapai stadium 16 sel dan 32 sel digunakan sebagai sampel. Embrio dicuci 2 kali dalam media OWS dan diulang 1 kali dalam media TC199. Kemudian dipindahkan dalam cawan petri yang berdiameter 65 mm yang telah berisi TC199 berbentuk tetes mikro (50 µl/tetes) dan ditutup dengan minyak mineral dibagian atasnya. Embrio utuh yang siap disayat difiksasi

dengan menggunakan pipet holder disebelah kanan dan pisau mikro disebelah kiri. Penyayatan dilakukan secara langsung tanpa mengeluarkan kumpulan sel blastomer dari zona pelusida.

Setelah embrio disayat , embrio paruh dipindahkan ke cawan petri lain yang telah diisi dengan media perlakuan yaitu M16+SSO dan TC199+SSO berbentuk tetes mikro.

Pembiakan embrio paruh dilakukan dalam inkubator CO₂ 5%, kelembaban 90-100% dan bersuhu 39 °C. Pengamatan terhadap perkembangan embrio paruh dilakukan setelah 24 jam dan 48 jam.

4.4. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

4.4.1. Identifikasi variabel

Sebagai variabel bebas adalah Media M16+SSO dan TC199+SSO, variabel terikatnya adalah Tingkat perkembangan embrio paruh dan variabel kendali adalah cara penyayatan embrio, embrio hasil fertilisasi *in vitro*.

4.4.2. Definisi Operasional Variabel

- 1. Media M16 adalah media sederhana yang mengandung mineral, piruvat, laktat dan glukosa serta penambahan BSA. Media ini sering digunakan untuk membiakkan embrio mencit maupun tikus.**
- 2. Media TC199 adalah media kompleks yang berisi yang berisi komponen-komponen media sederhana ditambah dengan asam amino, vitamin serta komponen lainnya. Media ini sering digunakan untuk membiakkan embrio sapi terutama setelah mencapai stadium perkembangan lanjut.**

3. Embrio paruh adalah embrio stadium 16 sel dan 32 sel yang disayat dengan menggunakan peralatan mikromanipulator menjadi dua bagian bersama-sama dengan zona pelusidanya.
4. Serum sapi ovulasi adalah serum yang diperoleh dari darah sapi perah yang diambil pada hari ke-7 setelah birahi, dimasukkan dalam tabung reaksi dan didiamkan pada suhu kamar sampai terjadi koagulasi. Selanjutnya diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit dan dilakukan pemeriksaan kadar progesteron dan estradiol melalui teknik Radio Immunoassay (RIA) fase padat.
5. Tingkat perkembangan embrio paruh adalah perkembangan embrio paruh setelah dibiakkan dalam media perlakuan yang ditandai dengan penambahan sel blastomernya.

4.5. Analisis Data

Rancangan Penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak lengkap. Untuk membuktikan adanya perbedaan perkembangan embrio paruh dalam media perlakuan dilakukan dengan uji Eksak Fisher (Pumomo, 1992).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

Penelitian tentang perbedaan perkembangan *in vitro* embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel dalam media M16 dan TC 199 dengan penambahan serum sapi ovulasi yang diamati selama 24 jam dan 48 jam hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.1 dan 5.2 (lampiran 5 dan 6).

Tabel 5.1. Perkembangan Embrio paruh Sapi Perah Fase 16 sel dalam Media M16 + SSO dan TC199 + SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Fase Embrio	Media Kultur	Jumlah Embrio Paruh	Waktu Pengamatan	
			24 jam	48 jam
16 sel	M16 + SSO	20	1 (5)	0 (0)
	TC199 + SSO	20	7 (35)	2 (10)

Keterangan : Angka di dalam kurung menunjukkan persentase perkembangan embrio paruh sapi perah.

Tabel 5.2. Perkembangan Embrio paruh Sapi Perah Fase 32 sel dalam Media M16 + SSO dan TC199 + SSO yang diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Fase Embrio	Media Kultur	Jumlah Embrio Paruh	Waktu Pengamatan	
			24 jam	48 jam
32 sel	M16 + SSO	20	0 (0)	0 (0)
	TC199 + SSO	20	8 (40)	3 (15)

Keterangan : Angka di dalam kurung menunjukkan persentase perkembangan embrio paruh sapi perah.

Perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel dalam dua media perlakuan: setelah dilakukan analisis statistik menggunakan uji Eksak Fisher, maka hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 5.3. dan 5.4 (lampiran 7 dan 8).

Tabel 5.3. Uji Statistik Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 16 sel yang dibiakkan dalam media M16 + SSO dan TC199 + SSO selama 24 jam.

	M16 + SSO	TC199 + SSO
Berkembang	1 (5) ^a	7 (35) ^b
Tidak Berkembang	19 (95)	13 (65)

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

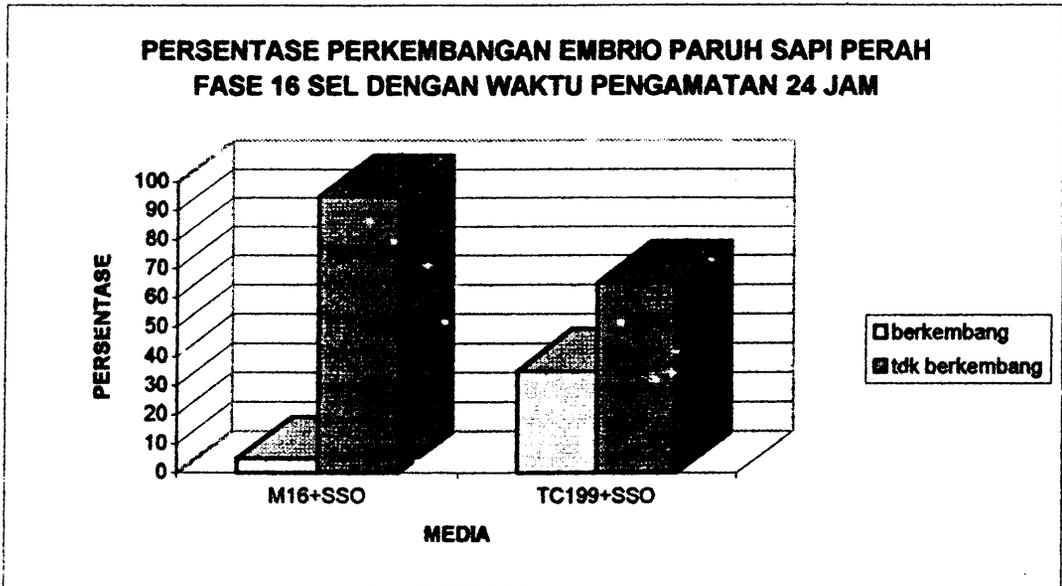
Angka dalam kurung menunjukkan persentase perkembangan embrio paruh sapi perah.

Tabel 5.4. Uji Statistik Perkembangan Embrio Paruh Sapi Perah Fase 32 sel yang dibiakkan dalam media M16 + SSO dan TC199 + SSO selama 24 jam.

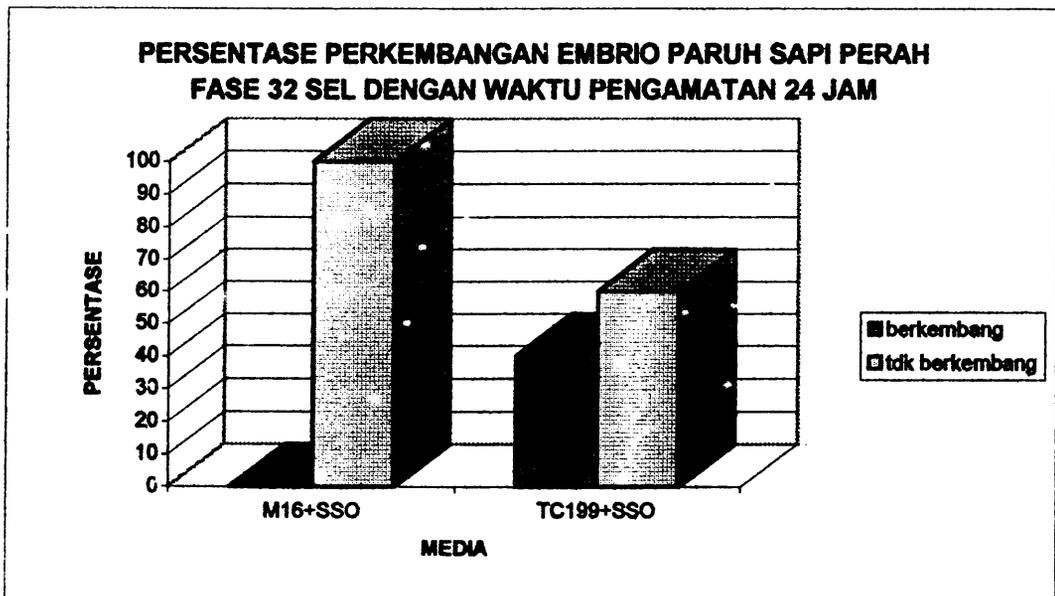
	M16 + SSO	TC199 + SSO
Berkembang	0 (0) ^a	8(40) ^b
Tidak Berkembang	20 (100)	12 (60)

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$).

Angka dalam kurung menunjukkan persentase perkembangan embrio paruh sapi perah.



Gambar 5.1. Perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dengan waktu pengamatan 24 jam



Gambar 5.2. Perkembangan embrio paruh sapi perah fase 32 sel dengan waktu pengamatan 24 jam

5.2. Pembahasan

Pembiakan embrio secara *in vitro* dalam media kultur harus selektif dalam memilih zat-zat nutrisi yang digunakan. Zat-zat nutrisi tersebut harus dapat di sintesa oleh sel, harus mempunyai konsentrasi tertentu serta memiliki derajat keasaman dan susunan kimiawi yang bersifat fisiologis.

Didalam teknik biakan embrio sering timbul kendala untuk membiakkan embrio tahap dua sel sampai tahap 16 sel yang bervariasi untuk setiap spesies hewan. Selain itu juga jenis media kultur yang digunakan tidak selalu sesuai untuk membiakkan embrio dari berbagai spesies hewan, Karena setiap jenis media kultur mengandung komposisi yang berbeda-beda.

Untuk mencapai kondisi media yang optimal bagi perkembangan embrio, maka pada media perlu ditambahkan protein atau bahan lain sebagai sumber energi (Quinn,1982). Penambahan serum pada media biakan yang merupakan sumber protein dan unsur-unsur lain dapat memberikan pengaruh yang sangat besar terhadap keberhasilan pembuahan *in vitro* serta kelanjutan perkembangan embrio sampai mencapai tahap blastosis.

Pada tabel 5.1. terlihat persentase tertinggi perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel yang dibiakkan dalam media TC199 ditambah serum sapi ovulasi dan diinkubasi selama 24 jam adalah sebesar 35%. Selanjutnya berdasarkan analisis statistik menggunakan uji Eksak Fisher didapatkan perbedaan yang nyata ($F < 0,05$) antara embrio paruh fase 16 sel yang dibiakkan media M16 + SSO dengan TC199 + SSO.

Menurut Gordon (1994) TC199 merupakan media kompleks yang sesuai untuk membiakkan embrio sapi. Media ini mengandung garam-garam

anorganik, bahan organik (glukosa) serta komponen lain. Adanya glukosa dalam media biakan dapat meningkatkan proses glikolisis dimana produk samping dari proses glikolisis ini dapat mengganggu respon tumbuh dari embrio pada stadium awal perkembangan (Nakao dan Nakatsuji, 1990).

Pada embrio yang telah mencapai stadium morula, kebutuhan glukosa tetap tinggi. Hal ini karena pada stadium ini kebutuhan energi dan bahan-bahan lain hasil metabolisme glukosa lebih banyak digunakan untuk proses kompaksi (Leese dkk., 1993). TC199 sedikit mengandung asam amino dimana asam amino berperan pada tahap awal perkembangan dan TC199 juga sedikit mengandung piruvat yang berfungsi sebagai sumber energi bagi perkembangan awal embrio preimplantasi sehingga TC199 tidak sesuai untuk membiakkan embrio stadium awal (Hafez, 1993).

Hasil persentase perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel yang dibiakkan dalam media M16 + SSO dan diinkubasikan selama 24 jam hanya sebesar 5%. Hal ini disebabkan karena M16 termasuk media sederhana yang mengandung komposisi garam-garam anorganik, laktat, piruvat serta Hepes sebagai buffer. Menurut Sukra dkk. (1991) media M16 sesuai untuk membiakkan embrio tikus/mencit.

Dalam media M16 antara lain mengandung piruvat yang dibutuhkan bagi sigot mencit untuk merangsang pembelahan pertama dan bersama-sama laktat merangsang pembelahan kedua, sedangkan glukosa juga dibutuhkan tetapi konsentrasinya rendah (Gardner dan Leese, 1988). Sedangkan untuk embrio sapi membutuhkan media yang lebih kompleks untuk proses metabolisme sel. Adanya glukosa dan piruvat dalam media diperlukan untuk proses *hatching*

serta untuk mempercepat perkembangan embrio ke tahap morula (Matsuyama dkk.,1993).

Perkembangan embrio paruh sapi perah fase 32 sel yang dibiakkan dalam media TC199 + serum sapi ovulasi selama 24 jam menunjukkan persentase yang cukup tinggi (40%), sedangkan embrio paruh fase 32 sel yang dibiakkan dalam media M16 + serum sapi ovulasi menunjukkan tidak adanya perkembangan. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Eksak Fisher menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antara embrio paruh sapi perah fase 32 sel yang dibiakkan dalam media sederhana dengan yang dibiakkan dalam media kompleks.

Perkembangan embrio stadium 8 sel atau lebih dibutuhkan kondisi biakan yang dilengkapi dengan serum sapi ovulasi. Semakin tinggi stadium embrio semakin tinggi pula kebutuhan akan protein dan komponen lainnya seperti hormon dan faktor penumbuh yang penting untuk proses proliferasi dan diferensiasi sel embrio (Supriatna,1993). Komponen tersebut banyak terkandung di dalam serum. Hal ini bisa dijelaskan yaitu pada awal pembelahan terjadi penambahan kecepatan metabolisme yang relatif kecil, tetapi pada stadium morula terdapat peningkatan yang cukup tajam.

Tingginya persentase perkembangan embrio paruh sapi perah fase 32 sel yang dibiakkan dalam media TC199 yang dilengkapi dengan serum sapi ovulasi, kemungkinan karena penambahan serum sapi ovulasi turut berperan dalam perkembangan embrio paruh. Berdasarkan hasil penelitian Pinyopummintr dan Bavister (1994), bahwa penambahan serum pada 48 sampai 72 jam atau pada embrio tahap 4 dan 8 sel akan merangsang

perkembangan menjadi morula dan blastosis. Hal ini menunjukkan bahwa sejumlah faktor seperti media biakan dasar dan penambahan serum dalam sistem biakan memainkan peran penting dalam perkembangan embrio paruh sapi perah.

Perkembangan embrio paruh sapi perah fase 16 sel dan 32 sel yang dibiakkan dalam media TC199 selama 48 jam menunjukkan persentase perkembangan yang rendah yaitu masing-masing sebesar 10% dan 15%. Hal ini dikarenakan sel-sel blastomer tidak mampu berkembang dalam zona pelusida yang tidak utuh lagi dalam waktu yang lama. Seperti yang dilaporkan Picard dkk. (1986) bahwa embrio paruh yang dikultur terlalu lama dalam media biakan menyebabkan kegagalan untuk bertahan hidup.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, perbedaan tingkat perkembangan embrio paruh sapi perah yang dibiakkan dalam media M16 dan TC199, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Media TC199 lebih baik dibandingkan dengan media M16 untuk membiakkan embrio paruh sapi perah dengan waktu inkubasi 24 jam.
2. Embrio paruh fase 32 sel yang dibiakkan dalam TC199 mempunyai kemampuan untuk berkembang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Elsden, R.D. and G.E. Seidel, Jr. 1990. Procedures for Recovery, Bisection, Freezing and Transfer of Bovine Embryos. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University Colorado.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi IV. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Terjem. B. Srigandono dan Koen Praseno.
- Freshney, R.I. 1992. Animal Cell Culture. A Practical Approach. Second Edition. IRL Press at New York.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. The UK. University Press. Cambridge.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animal. 5th. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Transfer Embrio pada Ternak. Disampaikan dalam Kursus Penyegaran Pengelolaan Reproduksi, Penyakit dan Makanan pada Sapi. Kerjasama FKH Unair dengan Royal (Dick) Veterinary School, Edinburgh University UK.
- Hill, J.R., L.J. Luszcz, J.R. Dantzler and W.R. Boone. 1978. Culture of Ovine and Bovine Embryos. J.An.Sci. 47. Hal 908 - 913.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit ITB Bandung dan Universitas Udayana.
- Kippax, I.S., W.B. Christie and T.G. Rowan. 1991. Effects of Method of Splitting, Stage Development and Presence or Absence of Zona Pelusida on Foetal Survival in Commercial Bovine Embryo Transfer of Bisected Embryos. Theriogenology vol. 1. p. 26-34.
- Leese, H.J. 1993. Metabolic Control During Preimplantation Mammalian Development. J. Human reprod. 1 : 63 - 72.
- Macdonald and Kristin. 1995. Refreshing Course on Animal Reproduction, Disease and Nutrition of Cattle. Kerjasama FKH Unair dengan Royal (Dick) Veterinary School, Edinburgh University UK.
- Mahaputra, L., A. Hirting, H.A. Hermadi, I. Mustofa, S. Utama dan P. Srianto. 1996. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi. SubFertilisasi In Vitro pada Sapi Madura. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga, Surabaya.

- Mahaputra,L.1997. The Effect of Brackett-Oliphant (BO) Media and Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) Media on Bovine *in vitro* Fertilization. Seminar XIII Kongres VIII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia, Surabaya.
- Maurer,R.R.1988. Embryo Splitting and Transfer in Sheep. *Theriogenology*. No.29.Vol.1 p.276.
- Matsuyama,K; H.Miyakoshi dan Y.Fukui,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.
- Mercola,M. and C.D. Stile 1988. Growth Factor Superfamilies and Mammalian Embryogenesis Development 102 : 451
- Nakao,H. dan N.Nakatsuji,1990. Effect of Co-culture, Medium Component and Gas Phase on *in vitro* Culture of *in vitro* Maturation and *in vitro* Fertilized Bovine Embryos. *J.Theriogenology* 33 : 591 - 300.
- Picard.I.,T.Greve.W.,A.King.K.,J.Betteridge and P.H.Jorgensen.1986. Bisectio of Post Compaction Bovine Embryos: Difference in Viability Between The Monozygotic Halves.*Acta Vet.Scand.*27 : 33 - 48.
- Pinyopummintr,T. and B.D.Bavister.1994. Development of Bovine Embryo in cell Free Culture Medium Effects of Serum, Timing of Its.Inclution and Heat in Activation. *J.Theriogenology*.41:1241 - 1249.
- Polge,C.1991. Novelties in Reproductive Biotechnology in 7th.ed. Scientific Meeting. European Embryo Transfer Association. Cambridge P.108-111.
- Purnomo, W.1992. Analisis Data Katagorial. Penataran Metodologi Penelitian dan Komputer. Lembaga Penelitian Unair Surabaya.
- Quinn,P.1082. Fertilization and Culture of Embryos : Factors Which Have a major Influence on Embryo Survival *in vitro* in Sympisium Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats. Canberra.
- Robinson,J.J. and T.G.McEvoy.1993. Biotechnology The Possibilities Animal Production. Vol. 57 Bag.3 p.346.
- Seidel,GE. And MR.Sarah.,1991. Training Manual for Transfer in Cattle. FAO Animal Production and Health Paper. Rome P.52 - 66

- Soehadji,1995. **Pengembangan Bioteknologi Peternakan. Keterkaitan Penelitian Pengkajian dan Aplikasi dalam Lokakarya Nasional Bioteknologi Peternakan. Ciawi Bogor.**
- Soenardirahardjo,B.P.,1990. **Kajian Manipulasi Mudigah pada Tikus. Disertasi, Institut Pertanian Bogor.**
- Sukra Y.,I.Djuwita, A.Boediono dan S.Golfiani.1991. **Studi Tentang Pengembangan Teknik Fertilisasi In Vitro, Kultur Pewarnaan Kromosom dan Penyayatan Embrio dalam Proses Perekayasaan Embrio. Institut Pertanian Bogor.**
- Sukra Y.,B.Purwantara.,I.Djuwita dan M.Fahrudin.1996. **Penerapan Teknologi Fertilisasi In Vitro dalam Upaya Meningkatkan Populasi serta Produksi Sel-sel Oviduk dan Serum Domba. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Fakultas kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.**
- .Supriatna,I.,1993. **Pengaruh Penambahan fetal Serum,Calf Serum dan Bovine serum dalam Pupukan *in vitro* Terhadap Viabilitas Embrio mencit. Laporan Penelitian Pusat Antar Universitas Ilmu hayati. IPB,Bogor.**

Lampiran1. Komposisi Bahan Kimia dan Cara membuat Media TC199

TCM stock	1000 ml
Medium 199 (powder)	9,9 g
NaHCO ₃	2,2 g

Masukkan powder dalam 900 ml air yang telah di deionisasi, kemudian tambahkan sodium bikarbonat, larutkan dan buat pH menjadi 7,4 dengan meneteskan NaOH atau HCL.

TCM 199 (media biakan)

TCM 199	9 ml
FCS	1 ml
Piruvat	100 μ l
Gentamisin	5 μ l (250 μ g)

Lampiran 2. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Medium M16

STOCK A	(dalam gram/ml)
NaCl	5,533
KCl	0,345
KH ₂ PO ₄	0,162
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,293
Sodium lactat 50%	5,2188 (timbang dalam beker)
Diaduk dalam magnetic stirer	

STOCK B	(dalam gram/100 ml)
NaHCO ₃	2,101
Fenol red	0,010

STOCK C	(dalam gram/10 ml)
Sodium piruvat	0,036

STOCK D	(dalam gram/10 ml)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,252

Buat medium dari STOCK dalam 100 ml	
STOCK A	10 ml
STOCK B	10 ml
STOCK C	1 ml
STOCK D	1 ml
Glukosa	0,1 g
BSA	400 mg
Gentamisin	25 µg/ml

Stock A dan Stock C dicampur kemudian tambahkan gentamisin. Stock B dan Stock D dicampur sedikit demi sedikit lalu diaduk dengan magnetic stirer. Selanjutnya semua campuran dimasukkan dalam tabung erlenmeyer dan diberi gas CO₂ selama 15 menit sampai pH mencapai 7,4. Terakhir dimasukkan BSA dan tidak perlu diaduk karena dapat larut sendiri, saring dengan millipore 0,22 µm.

Setelah dibuat media M16 selanjutnya ditambahkan serum sapi ovulasi 20% dan buat drop 50 µl pada cawan petri 60 mm dan tutup mikro drop dengan minyak mineral. Tempatkan dalam inkubator selama 2 jam sebelum digunakan.

Lampiran 3. Perkembangan Embrio paruh Sapi Perah Stadium 16 sel dalam Media M16 + SSO dan TC199 + SSO yang diinkubasi Selama 24 jam dan 48 jam.

Embrio 16 sel	M16 + SSO		TC199 + SSO	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1	+	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	-
4	-	-	+	-
5	-	-	+	-
6	-	-	+	-
7	-	-	+	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
Jumlah	1	0	7	2

Lampiran 4. Perkembangan Embrio paruh Sapi Perah Stadium 32 sel dalam Media M16 + SSO dan TC199 + SSO yang diinkubasi Selama 24 jam dan 48 jam.

Embrio 32 sel	M16 + SSO		TC199 + SSO	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	-
5	-	-	+	-
6	-	-	+	-
7	-	-	+	-
8	-	-	+	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
Jumlah	0	0	8	3

Lampiran 5 :Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 16 sel selama 24 jam

Case Processing Summary

	Cases	
	Valid	
	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	40	97.6%

Case Processing Summary

	Cases			
	Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	1	2.4%	41	100.0%

1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang Crosstabulation

Count

		1: Berkembang; 2: tidak berkembang		Total
		1	2	
		1: M16;2:TC199	1	
	2	13	20	
Total		8	32	40

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.625 ^b	1	.018		
Continuity Correction ^a	3.906	1	.048		
Likelihood Ratio	6.194	1	.013		
Fisher's Exact Test				.044	.022
Linear-by-Linear Association	5.484	1	.019		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.00.

Lampiran 6 : Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 16 sel dalam selama 48 jam

Case Processing Summary

	Cases	
	Valid	
	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	40	97.6%

Case Processing Summary

	Cases			
	Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	1	2.4%	41	100.0%

1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang Crosstabulation

Count

		1: Berkembang; 2: tidak berkembang		Total
		1	2	
1: M16;2:TC199	1		20	20
	2	2	18	20
Total		2	38	40

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.105 ^b	1	.147		
Continuity Correction ^a	.526	1	.468		
Likelihood Ratio	2.878	1	.090		
Fisher's Exact Test				.487	.244
Linear-by-Linear Association	2.053	1	.152		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.00.

Lampiran 7: Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 32 sel selama 24 jam

Case Processing Summary

	Cases	
	Valid	
	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	40	97.6%

Case Processing Summary

	Cases			
	Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	1	2.4%	41	100.0%

1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang Crosstabulation

Count

		1: Berkembang; 2: tidak berkembang		Total
		1	2	
1: M16;2:TC199	1		20	20
	2	8	12	20
Total		8	32	40

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	10.000 ^b	1	.002		
Continuity Correction ^a	7.656	1	.006		
Likelihood Ratio	13.112	1	.000		
Fisher's Exact Test				.003	.002
Linear-by-Linear Association	9.750	1	.002		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.00.

Lampiran 8 : Uji Eksak Fisher Perkembangan Embrio Paruh 32 sel selama 48 jam

Case Processing Summary

	Cases	
	Valid	
	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	40	97.6%

Case Processing Summary

	Cases			
	Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent
1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang	1	2.4%	41	100.0%

1: M16;2:TC199 * 1: Berkembang; 2: tidak berkembang Crosstabulation

Count

		1: Berkembang; 2: tidak berkembang		Total
		1	2	
1: M16;2:TC199	1		20	20
	2	3	17	20
Total		3	37	40

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.243 ^b	1	.072		
Continuity Correction ^a	1.441	1	.230		
Likelihood Ratio	4.402	1	.036		
Fisher's Exact Test				.231	.115
Linear-by-Linear Association	3.162	1	.075		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.50.