

PAMERAN

1-1 SEP 2003



LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2000

SELESAI

**PERANAN KOMBINASI HEPARIN HIPOTAUIN DALAM MEDIA
KAPASITASI TERHADAP PEMBELAHAN (CLEAVAGE) DAN
TINGKAT PERKEMBANGAN EMBRIO PADA PEMBUAHAN
IN VITRO SAPI PERAH**

STUDIAT

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Peneliti :

**drh. TATIK HERNAWATI, M.Si.
drh. SUHERNI SUSILOWATI, M.Kes.
drh. TRILAS SARDJITO**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 067/XXIII/4/--/2000 tanggal 1 April 2000
Kontrak Nomor : 017/P2IPT/DM/V/2000
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 01

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Desember, 2000



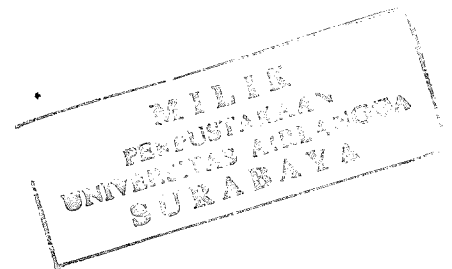
LAPORAN PENELITIAN
DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2000

KKE
KK.
636.208 24
Her
P.

PERANAN KOMBINASI HEPARIN HIPOTAUIN DALAM MEDIA KAPASITASI TERHADAP PEMBELAHAN (CLEAVAGE) DAN TINGKAT PERKEMBANGAN EMBRIO PADA PEMBUAHAN IN VITRO SAPI PERAH

Peneliti :

drh. TATIK HERNAWATI, M.Si.
drh. SUHERNI SUSILOWATI, M.Kes.
drh. TRILAS SARDJITO



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 067/XXIII/4/--/2000 tanggal 1 April 2000
Kontrak Nomor : 017/P2IPT/DM/V/2000
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut : 01

3000118013141

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Desember, 2000

**LEMBAGA PENELITIAN**

- | | | |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga | 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) 5995246

E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

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

- | | |
|---|---|
| 1. a Judul Penelitian | : Peranan Kombinasi Heparin Hipotaurin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Pembelahan (<i>cleavage</i>) dan Tingkat Perkembangan Embrio Pada Pembuahan <i>In vitro</i> Sapi Perah |
| b. Macam Penelitian | : () Dasar () Terapan
() Pengembangan |
| c. Katagori Penelitian | : I/II/III |
| 2. Kepala Proyek Penelitian | |
| a. Nama Lengkap dan Gelar | : Tatik Hernawati, MSi, Drh |
| b. Jenis Kelamin | : Perempuan |
| c. Pangkat/Gol Dan NIP | : Penata Muda TK 1/III-D/131 653 459 |
| d. Jabatan Fungsional | : Lektor Madya |
| e. Fakultas/Jurusan | : Kedokteran Hewan |
| f. Univ/Ins/Akademi/ST | : Universitas Airlangga |
| g. Bidang Ilmu Yang Diteliti | : Reproduksi |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 3 orang |
| 4. Lokasi Penelitian | : Lab. Inseminasi Buatan dan Lab. Kebidanan |
| 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. 5.000.000,- |

Mengetahui
Ketua Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dr. Ismurdiono, MS, Drh
Nip 130 687 297

Ketua Peneliti

Tatik Hernawati, MSi, Drh
Nip 131 653 459Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga

Prof. Dr. Sarmanu, MS., Drh.

Nip 130 701 125

RINGKASAN

Judul Penelitian : Peranan Kombinasi Heparin Hipotaurin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Pembelahan (*cleavage*) dan Tingkat Perkembangan Embrio Pada Pembuahan *In Vitro* Sapi Perah

Ketua Peneliti : Tatik Hernawati

Anggota Peneliti : Suherni Susilowati
Trilas Sardjito

Tahun : Nopember 2000

Pada penelitian ini akan diuji cobakan penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitasi *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS). Rumusan masalah yang diajukan adalah apakah ada pengaruh penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitasi EBSS terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio Sebagai sampel spermatozoa dari air mani sapi perah segar yang telah mengalami pencucian dan *swim up*. Parameter yang diukur adalah persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio setelah pembuahan *in vitro*.

Tujuan penelitian untuk mengetahui media yang tepat untuk kapasitasi spermatozoa dan keberhasilan pembuahan *in vitro* sapi perah dengan viabilitas yang tinggi guna menunjang program transfer embrio pada sapi perah.

Pengamatan pembelahan (*cleavage*) embrio didasarkan jumlah embrio yang membelah dari oosit yang dipakai fertilisasi setelah 48 jam pembuahan dalam media perlakuan di atas, sedangkan persentase tingkat perkembangan embrio adalah jumlah

embrio dalam tingkatan yang berbeda (2, 4, 8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio yang positif membelah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa EBSS+heparin +hipotaurin dan EBSS persentase pembelahan (*cleavage*) masing-masing 60.37% dan 48.29 % ada perbedaan yang bermakna ($P < 0.05$). Persentase rata-rata tingkat perkembangan embrio (2, 4, 8 dan 16 sel) masing-masing 25.75 %, 23.41 % , 28.68 % dan 22.15 % untuk EBSS+heparin+hipotaurin , 51.75 %, 33.69 %, 7.01% dan 8.56 % untuk EBSS ada perbedaan yang bermakna ($P < 0.05$) pada semua tingkat perkembangan (2, 4, 8 dan 16 sel)

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio dapat ditingkatkan setelah spermatozoa dari air mani segar sapi perah mengalami dua jam kapasitasasi dalam media EBSS yang ditambahkan kombinasi heparin hipotaurin.

SUMMARY

THE EFFECT OF COMBINATION HEPARIN HIPOTAUIN IN MEDIA CAPACITATION ON CLEAVAGE AND DEVELOPMENTAL STAGE EMBRYO AT DAIRY CATTLE IN VITRO FERTILIZATION.

(Tatik Hernawati, Suherni Susilowati, Trilas Sardjito; 2000, 35 Pages)

In this research, the addition of combination heparin hipotaurin in Earle's Balance Salt Solution (EBSS) media capacitation were evaluated. Fresh dairy semen were used capacitation.

Purpose of this study was to find the proper media for sperm capacitation and succes of dairy cattle in vitro fertilization with high viability to promote dairy cattle embryo transfer.

The observation of cleavage by account total embryo cleavage from oocyt after 48 hours fertilization meanwhile the percentage of embryo development was the number of embryo in different stage (2, 4, 8 and 16 cell) out of the whole number of embryo underwent cleavage.

The result experiment showed that percentage cleavage embryo were significantly different among treatment combination EBSS with heparin hipotaurin and EBSS ($P < 0,05$) and there 60,37 %, 48,29 % observation . Developmental stage embryo (2, 4, 8 and 16 cell) were significantly different among treatment combination EBSS with heparin hipotaurin and EBSS ($P < 0,05$) and there 25,75 %, 23,41%, 28,68 % , 22,15 % and 51,75 %, 33,69 %, 7,01%, 8,56 % observation.

The conclusion experiment showed that percentage of cleavage and developmental stage embryos increased after two hours capacitation in combination EBSS with heparin hipotaurin,

KATA PENGANTAR

Disertai rasa syukur tak terhingga kehadlirat Allah S.W.T., akhirnya selesailah laporan penelitian dengan judul *Peranan Kombinasi Heparin Hipotaurin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Pembelahan (Cleavage) dan Tingkat Perkembangan Embrio Pada Pembuahan In Vitro Sapi Perah*

Penelitian ini dapat terlaksana dengan baik atas pembiayaan DP3M-BBI tahun 2000/2001. Berkaitan dengan ini pula, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan dan terima kasih tak terhingga kepada :

1. Prof. Dr. Sarmanu, M.S., Drh., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
2. Dr. Ismudiono, MS., Drh., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
3. Semua pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini.

Akhirnya untuk kesempurnaan penulisan buku laporan ini, diharapkan saran, kritik serta masukan yang berharga dari pembaca. Dengan demikian kiranya buku ini dapat bermanfaat bagi dunia kedokteran hewan, peternakan dan masyarakat.

Surabaya, Nopember 2000

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Identitas dan Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Summary	v
Kata Pengantar	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	viii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
Latar Belakang	1
Rumusan Masalah	3
Hipotesis	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 4
Kapasitasi dan Reaksi Akrosom	4
Heparin dan Hipotaurin	4
Pembuahan In Vitro	5
Tahapan dan Hambatan Perkembangan Embrio In Vitro	7
 BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	 10
Tujuan Penelitian	10
Manfaat Penelitian	10
 BAB IV METODE PENELITIAN	 11
Rancangan Penelitian	11
Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel	11
Waktu dan Lokasi Penelitian	12
Materi dan Alat Penelitian	12
Prosedure Penelitian dan Pengumpulan Data	13
Teknik Analisis Data	17
 BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	 18
Persentase Pembelahan (Cleavage) dan Tingkat Perkembangan Embrio	19
 BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	 23
Kesimpulan	23
Saran	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN	27

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Rata-rata persentase (SD) embrio yang membelah dalam media EBSS+Heparin+hipotaurin dan EBSS selama 48 jam	18
2.	Rata-rata persentase (SD) tingkat perkembangan embrio 2, 4, 8 dan 16 sel pada media EBSS + heparin + hipotaurin dan EBSS selama 48 jam.....	19

BAB I

PENDAHULUAN



Latar Belakang

Teknik pembuahan secara *in vitro* atau pembuahan secara laboratorium pada sapi telah ditemukan dan dikembangkan. Dengan demikian produksi embrio sapi diluar kandungan secara besar-besaran saat ini dimungkinkan (Margawati, 1995). Menurut Tri wulanningsih (1992) pembuahan *in vitro* adalah salah satu cara untuk memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh ternak dengan cepat dan murah sebab dengan teknik ini kita tidak perlu memelihara donor yang harganya mahal dan biaya pakan yang tinggi.

Secara rinci terdapat kegiatan utama yang menyangkut teknik pembuahan *in vitro* ini, yaitu pemasakan sel telur *in vitro*, pembuahan *in vitro* dan pengembangan embrio *in vitro*. Material utama untuk memproduksi embrio yaitu oosit (oocyte = sel telur) dari ovarium yang dapat diperoleh dari rumah potong hewan. Kebanyakan oosit ini belum masak, oleh karena itu perlu dilakukan pemasakan. Hanya oosit yang sudah masak dan sperma yang sudah terkapasitasi (sperma sudah masak) yang akan membawa keberhasilan dalam pembuahan secara *in vitro*. Oosit yang sudah terbuahi dapat dikembangkan secara *in vitro* sampai tahap perkembangan lanjut (blastosis) (Margawati, 1995).

Pada proses pembuahan *in vitro*, oosit yang diperoleh langsung dari ovarium baik dengan cara laparoscopy atau pengumpulan ovarium dari rumah potong hewan tidak dapat langsung dibuahi oleh spermatozoa sebelum oosit tersebut terlebih dahulu didewasakan secara *in vitro* (*in vitro maturation*). Pendewasaan spermatozoa (sperma

yang telah mengalami kapasitas) juga dapat dilakukan sebelum mampu dan berhasil melakukan pembuahan (Djojosoebagio, 1991).

Pada kondisi alamiah, sperma akan mengalami kapasitas pada saluran reproduksi betina sebelum proses pembuahan, tepatnya mendekati isthmus dari oviduct. Oleh karena itu di dalam laboratorium, baik sperma yang diperoleh segar maupun beku, perlu dilakukan kapasitas sebelum dilakukan pembuahan *in vitro*. Sperma tozoa mamalia hanya dapat membuahi sel telur, apabila telah berada dalam saluran alat kelamin betina selama beberapa saat. Hal tersebut diperlukan karena spermatozoa pada saat itu sedang melakukan reaksi kapasitas. Kapasitas dapat diartikan sebagai kemampuan spermatozoa membuahi sel telur (Djojosoebagio, 1991 ; Yanagimachi, 1988). Dapat juga diartikan sebagai suatu proses yang meliputi proses pembukaan reseptor, pelepasan inhibitor atau stabilisator dari permukaan spermatozoa (Suhana dan Rafiah, 1982). Jadi sebelum spermatozoa digunakan untuk melakukan pembuahan *in vitro* spermatozoa harus terlebih dahulu mengalami kapasitas *in vitro* (*in vitro capacitation*).

Menurut Hunter (1995) salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuahan *in vitro* adalah motilitas spermatozoa. Tingkat gerak maju tinggi tampaknya sangat diperlukan untuk penetrasi membrana sel telur *in vitro*.

Beberapa metode kapasitas telah banyak dikembangkan untuk menyiapkan spermatozoa menjadi terkapasitas, diantaranya menggunakan kafein, heparin, percoll gradient, hipotaurin, liposom, medium berkekuatan ion tinggi (*high ionic strength medium*) dan masih banyak yang lain (Margawati, 1995). Penambahan heparin 100 ug/ml dan konsentrasi sperma 5.01×10^6 dalam medium kapasitas, ternyata tingkat

pembelahan (*cleavage*) dari embrio lebih tinggi dan kejadian polysperma lebih rendah (Palomo *et al*, 1995). Adanya hipotaurin selama pembuahan *in vitro* meningkatkan kualitas jumlah oosit yang terbuahi ditandai dengan adanya pronukleus betina dan jantan (Ball *et al*, 1983). Pada penelitian penelitian pendahuluan penambahan heparin dalam media *Earle,s Balanced Salt Solution* (EBSS) sebagai media kapasitasi sekaligus media pembuahan ternyata tidak mempengaruhi pembelahan (*cleavage*) embrio meskipun terjadi peningkatan persentase hidup dan motilitas spermatozoa (Tatik., dkk, 1999).

Bertitik tolak dari uraian di atas perlu kiranya diteliti penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitasi EBSS terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio pada pembuahan *in vitro* sapi perah

Rumusan Masalah

Dari uraian di atas ada beberapa permasalahan yang perlu diteliti dalam pengembangan teknik kapasitasi spermatozoa dan pembuahan *in vitro* pada sapi perah.

Apakah ada pengaruh penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitasi EBSS terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio .

Hipotesis

Dari pokok permasalahan yang diajukan, maka dapat ditarik suatu hipotesis dalam penelitian ini adalah, penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitasi EBSS dapat meningkatkan persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Kapasitasi dan Reaksi Akrosom

Kapasitasi menurut Suhana dan Rafiah (1982) dapat diartikan sebagai kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Proses kapasitasi secara alamiah terjadi di dalam uterus dan tuba falopii. Menurut Hunter (1995) sebelum spermatozoa bisa menembus pembungkus sel telur (sel kumulus dan korona) dan khususnya melalui membrana pelindung sel telur (zona pelusida), spermatozoa itu harus menjalani perubahan fisiologi yang dapat meningkatkan motilitas dan kemampuan melepaskan enzim proteolisis dari bagian akrosom di kepalanya, perubahan fisiologis ini yang disebut kapasitasi ini terjadi selama spermatozoa berada dalam saluran kelamin betina, meskipun banyak perubahan itu, tidak semuanya, dewasa ini dapat diperoleh dalam sistem kultur *in vitro*.

Heparin dan Hipotaurin

Heparin suatu campuran heterogen dari mukopolisakarida sulfat atau suatu molekul sangat asam karena banyak mengandung sulfat anion dan asam karboksilat (Katzung, 1989). Menurut Parrish (1985) dikutip Cox *et al.*, (1994) heparin dapat memindahkan faktor dekapasitasi yang melekat pada membran plasma spermatozoa seperti *calmodulin binding protein*, dengan demikian memudahkan kalsium masuk ke dalam sel, kalsium diperlukan untuk proses kapasitasi.

Hipotaurin (2 Aminoethane sulfonic Acid/C₂H₂NO₃S) adalah prekursor asam beta amino yang ada pada seminal plasma dan cairan oviduk (Gordon, 1994). Menurut

juga melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat oksidasi dari radikal-radikal hidroksil serta dapat menghambat Na^+ , K^+ - ATPase yang berpengaruh pada motilitas dan kapasitas spermatozoa (Fellman, 1987 ; Mrsny dan Meizel, 1985 yang dikutip oleh Boatman *et al.*, 1990)

Pembuahan *In Vitro*

Pembuahan *in vitro* adalah pembuahan sel telur yang terjadi di luar tubuh, yaitu suatu proses penetrasi sel telur oleh spermatozoa dalam suatu media biakan (Hunter, 1995). Keberhasilan pertama pada pembuahan *in vitro*, dilakukan pada hewan percobaan seperti mencit, tikus dan kelinci (Bavister *et al.*, 1992), kemudian menyusul pada ternak sapi yang dilaporkan pertama kali pada tahun 1981 (Brackett, *et al.*, 1989).

Menurut Austin dan Short (1982), proses pembuahan melibatkan sel kelamin jantan (spermatozoa) dan sel kelamin betina (oosit). Baik oosit maupun spermatozoa sebelum diadakan pembuahan *in vitro* harus mengalami pematangan (*maturation*) lebih dahulu. Spermatozoa harus mengalami kapasitas dan reaksi akrosom sehingga mampu membuahi oosit yang sudah matang. Hardjopranyoto (1987) menyatakan bahwa kapasitas menyebabkan perubahan selaput kepala spermatozoa khususnya pada bagian akrosomnya. Akibat proses kapasitas, metabolisme tubuh spermatozoa meningkat sehingga ekor spermatozoa akan aktif bergerak dan menyebabkan kekuatan gerak maju bertambah. Enzim hyaluronidase juga bertambah sehingga pelepasan sel kumulus yang melekat pada sel telur menjadi sempurna.

Waktu kapasitas berbeda-beda, tergantung pada spesies hewan dan berkisar antara 2 jam sampai 11 jam. Menurut Triwulanningsih, *et al.* (1994), media yang baik untuk kapasitas sperma pada ternak, khususnya sapi adalah media *Brackett Oliphant*

(BO). Demikian juga yang dilakukan oleh Lubis *et al.*, (1994) mereka menggunakan media kapasitasi sperma pada kerbau. Pengetahuan tentang media yang cocok/baik proses kapasitasi pada setiap spesies ternak sampai sekarang masih belum banyak dipublikasikan, hal inilah yang menyebabkan kendala rendahnya angka keberhasilan fertilisasi.

Oosit dapat diperoleh baik dari ovarium berasal rumah potong hewan maupun ovarium hewan hidup, di mana kondisinya masih dalam tahap belum matang (*immature*) sehingga perlu dimatangkan lebih dahulu. Dalam proses pematangan oosit dan perkembangan embrio secara *in vitro*, diperlukan media yang dapat berfungsi sebagai tempat penyediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit. Nutrisi yang terdapat dalam media merupakan zat terlarut seperti glukosa, asam amino dan ion anorganik yang diperlukan untuk metabolisme dan diferensiasi oosit maupun sel embrio. Zat nutrisi yang diperlukan harus selektif dan mempunyai konsentrasi yang sesuai, serta memiliki pH, susunan gas dan osmolaritas larutan fisiologis yang sesuai (Supriatna dan Pasaribu, 1992).

Menurut Hunter (1995) media biakan untuk pembuahan *in vitro* harus mendekati sama seperti kondisi lingkungan *in vivo* dalam saluran reproduksi hewan betina dan harus mempunyai kemampuan merangsang perkembangan embrio. Untuk mencapai kondisi optimum media yang baik untuk pembuahan *in vitro* diperlukan beberapa syarat, yaitu kemurnian media, tekanan gas yang sesuai, suhu dan kelembaban. Pada umumnya media biakan mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) atau serum darah yang telah dinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Kadar BSA dalam media biakan harus berkisar antara 0,1%-3,2%. Menurut Soenardirahardjo (1990), dalam media biasanya

ditambahkan phenol merah sebanyak 1-20mg/liter larutan itu hepes dalam media biakan. Heparin ini berfungsi sebagai *buffer* untuk menjaga agar pH media tetap berkisar antara 7,2 dan 7,4. Penambahan NaCl diperlukan untuk menjaga osmolaritas media yang tetap.

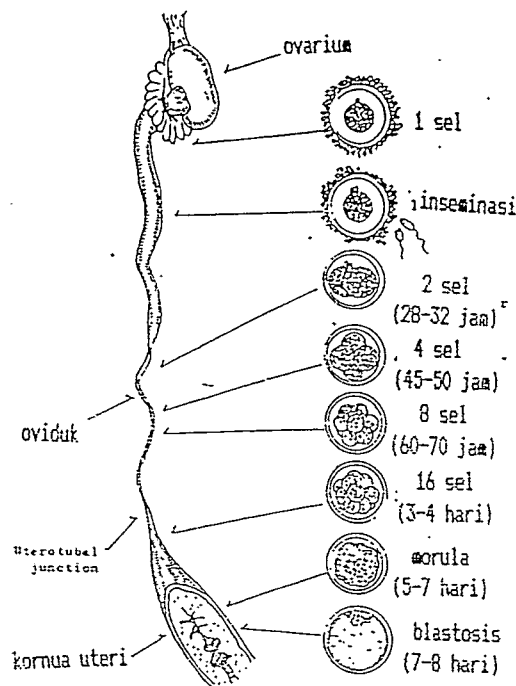
Tahapan dan Hambatan Perkembangan Embrio *In Vitro*

Perkembangan embrio dimulai sesaat setelah terjadi pembuahan. Setelah selesai proses pembuahan, terjadi serangkaian pembelahan sel, dimulai dengan pembelahan ini diikuti oleh pembelahan sitoplasma. Pada permulaan 1 sel zigot membelah 2 sel yang mirip satu sama lain dengan ukuran yang sama, diikuti dengan membelah serentak menghasilkan 4 sel. Pembelahan selanjutnya terjadi tidak serentak artinya sel yang baru tidak bersamaan. Dengan demikian terbentuk banyak sel yang ukurannya bermacam-macam (Salisbury dan Van Demark, 1985; Barnes dan Eyestone, 1990). Menurut Laing et al, (1989) tahap pembelahan awal embrio ditandai dengan adanya satu atau dua sel di dalam zona pellucida dan selanjutnya bertambah sampai tahap 16 sel. Perkiraan hanya dapat dibuat setelah tahap morula dan selanjutnya.

Hafez (1993) menyatakan proses pembelahan awal dari embrio berlangsung secara cepat, sehingga sebelum sel mempunyai kesempatan untuk tumbuh, sel sudah membelah lagi. Dengan demikian sel anak makin lama makin mengecil dan akhirnya menghasilkan sekelompok sel blastomer yang disebut morula.

Menurut Salisbury dan Van Demark (1985) kira-kira 7 hari setelah pembuahan embrio sapi mulai membentuk bulatan yang berongga. Tahap tersebut dinamakan blastula atau blastosis. Selama tahap ini masa sel berkumpul pada satu sisi dari bulatan tersebut.

Masa sel sebelah dalam akan berkembang menjadi badan embrio sedangkan lapisan sel yang tipis yang mengelilingi bagian luar blastosis bertugas memberi makan embrio yang disebut tropoblast. Dengan terbentuknya lapisan tropoblast ini, blastosis berubah bentuk dari semacam kantong bola yang bulat menjadi kantong tubuler yang cepat memperpanjang diri. Gambar 1 menunjukkan tahapan dari perkembangan embrio sapi.



Gambar1. Tahapan perkembangan embrio sapi (Itsuo, 1991).

Pada perkembangan embrio *in vitro*, beberapa gangguan ditemukan seperti hambatan embrio untuk berkembang dan membelah pada proses berikutnya. Misalnya embrio sapi yang dibiakkan *in vitro*, dari stadium satu ke empat sel, sulit untuk membelah atau bahkan tidak mampu membelah jika dibiakkan lebih lanjut (Sukra *et al.*, 1992).

Menurut Parrish dan First (1993) yang dikutip Dasrul (1997) hambatan terhadap perkembangan embrio secara *in vitro* dapat disebabkan karena kurang lengkapnya komposisi media biakan, atau lingkungan yang kurang serasi untuk perkembangan awal embrio. Kurang lengkapnya media, misalnya tidak ada faktor spesifik yang dibutuhkan selama perkembangan awal embrio (antara tahap 1 sel dan 16 sel).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Untuk mengetahui media yang tepat untuk kapasitas spermatozoa dan keberhasilan pembuahan *in vitro* sapi perah dengan viabilitas yang tinggi guna menunjang program transfer embrio pada sapi perah.

Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitas EBSS terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) embrio.
2. Untuk mengetahui pengaruh penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media kapasitas EBSS terhadap persentase perkembangan embrio

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dalam menentukan bahan media yang tepat untuk kapasitas spermatozoa, dalam rangka meningkatkan keberhasilan pembuahan *in vitro* pada sapi perah. Disamping itu diharapkan penelitian pembuahan *in vitro* ini dapat memberikan manfaat untuk menyediakan embrio yang berkualitas dalam kegiatan transfer embrio, juga untuk kegiatan di bidang rekayasa embrio.

BAB IV

METODA PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Dalam penelitian eksperimental laboratorik ini, digunakan rancangan acak lengkap dengan 2 kelompok masing-masing kelompok perlakuan dengan penambahan kombinasi heparin hipotaurin dan tanpa penambahan kombinasi heparin hipotaurin sebagai kontrol. Tiap perlakuan mempunyai 10 ulangan.

Sampel spermatozoa diambil secara acak dari air mani yang telah mengalami pencucian dan *swim up*. Air mani yang memenuhi persyaratan diperoleh dari 3 ekor sapi perah Friesian Holstein (FH) jantan menggunakan vagina buatan. Kapasitasi terhadap sampel spermatozoa dilakukan dengan menggunakan media perlakuan dan kontrol.

Identifikasi dan Definisi Operasional Variabel

Identifikasi variabel

- a. Variabel bebas (independent variable)
 1. Media EBSS + kombinasi heparin hipotaurin
 2. Media EBSS tanpa penambahan kombinasi heparin hipotaurin sebagai kontrol
- b. Variabel tidak bebas (dependent variable)
 1. Persentase pembelahan (*cleavage*) embrio
 2. Persentase tingkat perkembangan embrio
- c. Variabel kontrol
 1. Kualitas spermatozoa yang digunakan
 2. Lamanya waktu kapasitasi

3. Lamanya pematangan oosit
4. Kualitas oosit yang digunakan

Variabel moderator

1. Umur sapi FH jantan diambil air maninya
2. Jenis media pematangan oosit

Definisi Operasional Variabel

1. Persentase pembelahan embrio (*cleavage*) adalah jumlah embrio yang membelah setelah oosit dibuahi *in vitro* oleh spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi dalam media pembuahan
2. Tingkat perkembangan embrio adalah jumlah embrio dalam tingkatan yang berbeda (2, 4, 8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio yang membelah.

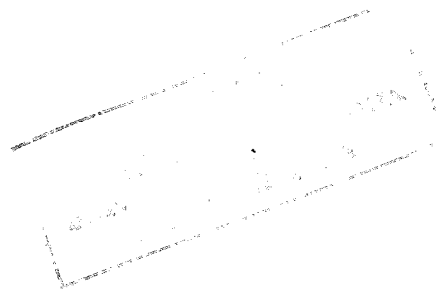
Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Inseminasi Buatan dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang berlangsung Bulan Mei sampai Agustus 2000.

Materi dan Alat Penelitian

Materi Penelitian

Spermatozoa yang dipakai dalam penelitian ini diambil dari air mani tiga ekor sapi perah FH jantan yang mempunyai libido tinggi. Oosit yang dipakai berasal dari seratus ovarium sapi betina sehat, diambil dari Rumah Potong Hewan Kotamadya Pasuruan. Media untuk *Swim up* sel spermatozoa adalah EBSS. Sedangkan 2 macam media untuk



kapasitasi asel spermatozoa terdiri dari EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS saja sebagai kontrol (Sigma). Untuk media pencuci oosit dipakai *Oocyte Washing Solution* (OWS), sedangkan untuk proses pematangan oosit dipergunakan TCM+FCS+Serum sapi berahi, bahan lain yang digunakan untuk proses pembuahan *in vitro* ini adalah minyak mineral/minyak parafin, enzim hialuronidase, NaCl fisiologis, aquadest, alkohol 70 %, NaCl 3 %, kapas, kertas tissue, vaselin dan penesillin-streptomisin.

Alat-alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari Incubator CO² (Compact CO² series 500) yang dilengkapi dengan pengatur suhu dan kelembabab (Thermolyne, USA), Refrigerator (Sharp, Japan), Mikroskop Sterio Disetting (meiji), Mikroskop Compount dan Mikroskop Invertde (Meiji), Bilik steril (Speg Air Tech, PRC), Meja penghangat-magnetic stirer (Labinco, Holland), Penangas air (Memnerf), Pengaduk magnit (Thermolyne, USA), Sentrifuse (Hettich, EBA 3 S), Timbangan mikro (Electronic Balance CHYO JPC-160), Pipet mikro (Eppendorf, Gmn). Tabung reaksi, Gelas beker, Gelas erlenmeyer, Cawan petri (Nuclon, Demark), Millipore filter (Sartorius Minisart, NML), Pipet pastur, Alat suntik 1 ml, 2,5 ml, 10 ml dan 20 ml. Jarum suntik ukuran 18 Gauge, Vagina buatan dan tabung pengumpul air mani, Haemositometer thoma, Termometer, pH meter (Hanna, Singapore).

Prosedure Penelitian dan Pengumpulan Data

Kapasitasi Spermatozoa *In Vitro*

Sebelum dilakukan kapasitasi, spermatozoa dipersiapkan terlebih dahulu dengan memisahkan spermatozoa dari plasma semen. Pemisahan ini dapat dilakukan melalui

sistem pencucian dan *swim up*. Pada penelitian ini digunakan air mani segar dari 3 ekor sapi perah FH yang mempunyai libido tinggi dengan menggunakan vagina buatan. Kemudian dilakukan pemeriksaan kuantitas dan kualitas air mani yang meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pada air mani yang kualitasnya baik, diambil sebanyak 0,25 ml dimasukkan dalam tabung sentrifuse yang didalamnya berisi EBSS 3 ml dan disentrifusse selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Cairan bagian atas tabung dibuang dan pencucian diulangi 2 kali. Untuk *swim up* spermatozoa, endapan hasil pencucian ditambahkan EBSS dan disimpan dalam inkubator CO₂ 5 % suhu 38,5°C selama 30 menit.

Kapasitasi spermatozoa dilakukan dengan mengambil cairan bagian atas yang mengandung spermatozoa yang telah mengalami *swim up* dengan konsentrasi dibuat $1 \times 10^6/40$ ul dengan cara menambahkan EBSS dan meletakkan pada masing-masing media perlakuan. 2 macam media untuk kapasitasi adalah juga media untuk pembuahan *in vitro* terdiri dari EBSS+heparin +hipotaurin dan EBSS sebagai kontrol. Semua media kapasitasi ini sebelumnya disiapkan terlebih dulu dengan meneteskan sebanyak 90 ul (tetes besar) dari masing-masing media pada lantai cawan petri dan dibuat bentuk rosset berada dipusat cawan petri yang dikelilingi secara sentripetal dengan 10 tetes kecil masing-masing 10 ul dan ditutup dengan minyak parafin yang selanjutnya diekuilibrasi selama 2 jam dalam inkubator CO₂ 5 % suhu 38,5° C sebelum ditambahkan dengan spermatozoa. Pemasukan spermatozoa tepat pada senter rosset cawan petri yang berisi 90 ul masing-masing media kapasitasi lalu dimasukkan kembali ke dalam inkubator CO₂ 5% selama 2 jam untuk kapasitasi.

Koleksi Oosit dan Pematangan Oosit *In Vitro*

Ovarium yang digunakan diperoleh dari sapi perah FH betina sehat, berumur 3-5 tahun, yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan Kotamadya Pasuruan dan dibawa ke Laboratorium dalam larutan NaCl fisiologis yang telah ditambahkan penisilin-streptomisin pada suhu 37°C dengan menggunakan termos. Di laboratorium, ovarium yang diperoleh dimasukkan dalam gelas beker yang berisi NaCl fisiologis dan ditempatkan dalam penangas air dengan suhu tetap 37°C. Ovarium diambil satu persatu dengan pinset, dikeringkan permukaannya dengan kertas tissue steril untuk perlakuan selanjutnya.

Oosit diambil dengan cara aspirasi (penyedotan) cairan folikel ovarium yang ukuran diameter 3-5 mm, menggunakan alat suntik yang steril dan jarum suntik ukuran 18 Gauge. Larutan hangat *Oosit Washing Solution* (OWS) yang digunakan untuk koleksi oosit. Cairan folikel, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara hati-hati supaya sel-sel kumulus tidak rusak dan disimpan dalam penangas air dengan suhu 37° C, ditunggu 10 menit sampai oosit mengendap. Kemudian cairan bagian bawah dievaluasi dengan menempatkan pada cawan petri dibawah mikroskop sterio dengan pembesaran 100 X. Hanya oosit yang mempunyai kumulus lengkap digunakan, kemudian dicuci sebanyak 2 kali dengan larutan OWS dan 1 kali dengan media pematangan.

Pematangan digunakan media Tissue culture yang terdiri dari TCM 199 yang ditambahkan dengan 1 % *Foetal calf serum*. 100 ul piruvat, 25 ug gentamisin dan ditambahkan serum sapi berahi 10 %. Oosit dimatangkan pada media dalam bentuk tetes (50ul/tetes). Kemudian testes tersebut ditutup dengan minyak parafin dan diekuilibrasikan di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C dengan kelembaban 95% paling sedikit 2

jam sebelum digunakan untuk pematangan oosit. Setelah pencucian dengan media pematangan, 5-10 oosit yang terpilih (berkumulus lengkap) ditempatkan dalam tetes fertilisasi media pematangan, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% yang sama untuk ekuilibrisasi.

Pengamatan Pembuahan embrio in vitro

Media kapasitasi spermatozoa juga merupakan media pembuahan dan perkembangan embrio. Oosit yang telah dimatangkan selama 24 jam dalam media pematangan, dihilangkan sel kumulusnya dengan mencuci 3 kali dalam media OWS dan 1 kali pada media EBSS. Oosit kemudian dipindahkan ke dalam tetes kecil masing-masing media pembuahan terdiri EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS. Setiap tetes media berisi 5 –10 oosit, kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan CO₂ 5 %, dengan kelembaban 95 % pada suhu 38,5°C.

Pengamatan pembelahan (*cleavage*) embrio dilakukan pada hari ke 2 (48 jam) setelah pembuahan. Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah jumlah embrio yang berhasil membelah setelah dibiakkan dalam media pembuahan selama 48 jam dalam inkubator CO₂ 5%

Jumlah embrio yang membelah

Persentase pembelahan = $\frac{\text{Jumlah embrio yang membelah}}{\text{Jumlah oosit yang dipakai fertilisasi}} \times 100 \%$

Jumlah oosit yang dipakai fertilisasi

Sedangkan persentase tingkat perkembangan embrio adalah jumlah embrio dalam tingkatan yang berbeda (2,4,8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio yang positif membelah.

Teknik Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh kelompok perlakuan dan kontrol terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) embrio, data yang diperoleh diatabelasikan dan dianalisis dengan menggunakan uji t (Sarmanu, 1990). Tingkat perkembangan embrio dilakukan uji multivariate dan dilanjutkan dengan uji F univariate (Norusis, 1991).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pengamatan maka diperoleh hasil penelitian dan pembahasan yang diuraikan berikut ini :

Persentase Pembelahan (*cleavage*) dan Tingkat Perkembangan Embrio

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah semua oosit yang berhasil membelah dan mengklasifikasi tingkat perkembangan embrio (2, 4, 8 dan 16 sel) setelah dibuahi dengan spermatozoa yang mengalami kapasitasi dalam media EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS yang disimpan di dalam incubator CO₂ 5 % selama 48 jam. Persentase rata-rata embrio yang dapat membelah dan rata-rata tingkat perkembangan embrio (2,4,8 dan 16 sel) dapat dilihat pada tabel 1 dan 2 dibawah ini.

Tabel 1. Rata-rata Persentase ($\pm$ SD) embrio yang membelah dalam media EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS selama 48 jam

Media	n	Rataan ($\bar{X} \pm SD$)	Rentangan
EBSS+heparin+hipotaurin	10	$60,37 \pm 9,62^b$	53,33 - 85,00
EBSS	10	$48,29 \pm 4,80^a$	41,66 - 53,84

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Tabel 2. Rata-rata Persentase ($\pm$ SD) tingkat perkembangan embrio 2, 4, 8 dan 16 sel pada media EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS selama 48 jam

Media	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel
	(X $\pm$ SD)			
EBSS+heparin+hipotaurin	25,747 $\pm$ 17,171 ^b	23,412 $\pm$ 17,264 ^b	28,683 $\pm$ 12,173 ^b	22,146 $\pm$ 11,22 ^b
EBSS	51,746 $\pm$ 13,821 ^a	33,685 $\pm$ 17,860 ^a	7,01 $\pm$ 9,399 ^a	8,559 $\pm$ 8,236 ^a

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Menurut Hafez dan Semn (1982) ada lima kriteria yang memberi petunjuk keberhasilan pembuahan *in vitro* yaitu :

1. Adanya penetrasi spermatozoa ke dalam vetellin
2. Adanya ekor spermatozpa dalam vitellin
3. Adanya pronucleus jantan dan betina dalam sel telur
4. Adanya dua polar bodies dalam ruang perivitellin
5. Adanya pembelahan (*cleavage*) dan pembentukan dua blastomer dengan ukuran dan bentuk yang sama.

Dari kriteria di atas pengambilan data keberhasilan pembuahan *in vitro* dalam penelitian ini dilakukan secara tepat yakni dengan melihat persentase pembelahan yaitu jumlah embrio yang berhasil membelah dari keseluruhan oosit yang dipilih untuk fertilisasi, sedangkan persentase perkembangan embrio yaitu jumlah embrio yang berkembang menjadi 2,4,8 dan 16 sel dari keseluruhan embrio yang membelah.

Oosit yang dipakai dalam penelitian dilakukan maturasi dengan menggunakan media TCM yang ditambahkan serum sapi berahi. Hal ini sesuai dengan penelitian Dasrul

(1997) mengenai media pematangan oosit kambing dengan penambahan serum sapi berahi ternyata dapat meningkatkan persentase pematangan, oosit yang dibuahi dan perkembangan embrio mencapai tahap blastosit. Bavister *et al* (1992)

Menyatakan perkembangan embrio secara *in vitro* selama pembuahan sangat ditentukan oleh media yang digunakan selama pematangan *in vitro*.

Oosit matang yang dipilih untuk dipakai pembuahan *in vitro* dalam penelitian ini adalah yang berkulus lengkap. Menurut penelitian yang dilakukan Chian dan Niwa (1994) keberhasilan pembuahan *in vitro* pada sapi yang ditandai dengan adanya pronucleus jantan dengan menggunakan oosit berkumulus lengkap mencapai 88 % sedang bila yang dipakai oosit tanpa kumulus (oosit telanjang) hanya 20 %.

Dari tabel 1 rata-rata persentase embrio yang berhasil membelah (cleavage) dari keseluruhan oosit yang dipakai pembuahan *in vitro* dalam masing-masing kelompok yaitu kelompok perlakuan media EBSS+heparin+hipotaurin adalah 60,37% sedangkan kelompok kontrol media EBSS saja yaitu 48.29%. Dari hasil ini memperlihatkan penambahan kombinasi heparin dan hipotaurin sangat efektif untuk meningkatkan angka fertilisasi pada sapi perah. Pada penelitian pendahuluan penambahan heparin saja pada media EBSS tidak meningkatkan persentase pembelahan.

Pada tingkat perkembangan embrio, hasil pengamatan terhadap embrio yang positif membelah di dalam masing-masing media pembuahan memperlihatkan tingkat pembelahan yang berbeda-beda, yaitu 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel. Rata-rata persentase embrio dua sel dalam masing-masing media yakni EBSS+heparin+hipotaurin dan EBSS adalah 25.75 dan 51.75 % , 4 sel 23.41 % dan 33.69 % untuk 8 sel : 28.68 % dan 7.01%, sedangkan 16 sel adalah 22.15 % dan 8.56%. setelah dilakukan analisa statistik ternyata

kedua perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) hal ini membuktikan penggunaan kombinasi heparin hipotaurin meningkat perkembangan embrio dengan melihat angka 2 sel dan 4 sel lebih rendah dan selanjutnya 8 dan 16 sel lebih tinggi.

Penggunaan heparin menurut Kurosaka *et al*, 1990 dikutip Gordon, 1994, selain mempengaruhi proses fertilisasi yaitu membantu kapasitas juga mempengaruhi perkembangan embrio. Parrish *et al* (1985) dan Niwa *et al* (1988) melaporkan pada hewan mamalia, media yang paling cocok untuk kapasitas dan pembuahan adalah media yang selain mengandung mineral juga dilengkapi dengan heparin dan kafein. Penambahan heparin dan kafein pada media BO dapat meningkatkan daya penetrasi spermatozoa pada sel telur.

Hipotaurin dengan dosis 10 ug yang dikombinasikan dengan penisillamin, epinephrin disingkat PHE menurut Vergos (1990) dikutip Gordon (1994) mempunyai pengaruh sebagai faktor motilitas spermatozoa pada fertilisasi *in vitro* pada sapi, angka fertilisasi mencapai 87.5 %. Menurut Barnett dan Bavister (1992) hipotaurin melindungi kondisi lingkungan *in vitro*, seperti peroksidasi lemak-lemak membran dengan dua pengaruh stimulasinya yaitu sebagai antioksidan yang putative, dan pengaruh positif terhadap rendahnya tekanan oksigen selama kultur embrio yang kemungkinan berhubungan dan sensitivitas dari embrio awal (embrio yang baru membelah) terhadap radikal bebas yang merusak, yang mungkin menghambat atau bahkan mencegah pembelahan embrio.

Bila dilihat rata-rata persentase perkembangan embrio kedua perlakuan tersebut memperlihatkan angka tidak merata dimana angka tertinggi pada perkembangan dua sel kemudian menurun dan terendah pada 16 sel. Hal ini menurut Dasrul (1997) timbulnya

ketidak seragaman tingkat perkembangan embrio ini diduga disebabkan oleh kurang sempurnanya pematangan inti oosit atau berbeda tingkat pematangan inti oosit atau berbeda tingkat pematangan oosit sewaktu dilakukan pembuahan. Menurut Thibault (1976) hambatan (block) perkembangan embrio *in vitro* pada sapi adalah pada saat embrio tahap 8 sel sampai 16 sel, sedangkan pada babi tahap 4 sel (Davis dan Day, 1978), pada hamster tahap 2 sampai 4 sel (Bavister, 1974). Juga beberapa peneliti menyatakan bahwa *chemically semidefined* atau *defined* media dapat mendukung perkembangan embrio *in vitro* sampai tahap blastosit dengan tingkat yang bervariasi (Meinezo dan Wright, 1982; Chatot *et al*, 1989 ; Kishi *et al* , 1991 ; Browam dan Whithingham , 1992 dikutip oleh Miyoshi *et al*, 1995) Dengan demikian kemungkinan ketidak seragaman perkembangan embrio hasil penelitian ini selain adanya hambatan (block) juga dapat disebabkan media EBSS tidak sesuai untuk perkembangan embrio lanjut. Menurut Mahaputra *et al* (1997) media EBSS mengandung glukosa yang mencapai 1 % sehingga sebagai media fertilisasi selama 48 jam, dapat menghambat perkembangan embrio. Adanya glukosa dalam media pada awal perkembangan embrio akan memacu proses glikolisis dalam sel, sehingga mengakibatkan penghambatan respirasi mitokondria pada embrio dan selanjutnya respon untuk membelah menjadi terganggu, akhirnya perkembangan embriopun jadi terhambat (Nakao dan Nakatsuji, 1990 ; Kim *et al*, 1993).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh penambahan kombinasi heparin hipotaurin pada media kapasitas EBSS terhadap persentase pembelahan (*cleavage*) dan tingkat perkembangan embrio, maka dapat diambil beberapa kesimpulan

1. Penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media EBSS dapat meningkatkan persentase pembelahan (*cleavage*) embrio.
2. Pembahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media EBSS mempengaruhi perkembangan embrio dengan rata-rata persentase 2, 4 sel lebih rendah dan 8, 16 sel lebih tinggi dibandingkan media EBSS .

Saran saran

Untuk meningkat hasil yang lebih baik terhadap angka ferilisasi dalam pembuahan *in vitro* pada sapi perah, disarankan sebaiknya digunakan penambahan kombinasi heparin hipotaurin dalam media EBSS.



DAFTAR PUSTAKA

- Austin ,C.H dan R.V. Short, 1982. Germ Cell And Fertilization Reproduction in Mamalian 1. Cambridge University Press. Cambridge. England.p 46-164
- Ball, G.D., M.I. Leibfried, R.W. Lenz, R.L Ax, B.D. Bavister, dan N.L. First, 1983. Factors Affecting Successful In Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocytes. Biol-Reprod. 28(3) p 717-25
- Barnet, D.K dan B.D. Bavister, 1992. Hypotaurine Requirement for In Vitro Development of Golden Hamster One Cell Embryos into Morulae and Blastocysts, and Production of Term Offspring from In Vitro Fertilized Ova.J. Biol-Reprod.47 : 297-304
- Bavister, B.B., T.A. Rose-Hellekant dan T.Pinyopummintr, 1992. Development of in Vitro Maturation/In Vitro Fertilized Bovine Embryos Into Morula and Blastocysts In Defined Culture Media.J. Theriogenology. 37 127 –146.
- Brackett,B.G., A.I. Younis dan R.A. Fayrer-Hosken, 1989 Enhanced Viability After In Vitro Fertilization of Bovine Oocytes Matured In Vitro With High Concentration of Luteinizing Hormone. J.Fert. and Steril.52 : 319-324
- Chian, R.C dan K.Niwa, 1994. Effect of Cumulus Cells Present During Different Periods of Culture on Maturion In Vitro of Bovine Oocytes. J, Theriogenology, 41 :176.
- Dasrul, 1997. Pengaruh Penambahan Serum Hewan Berahi Pada Media Biakan Terhadap Pematangan Oosit dan Pembuahan In Vitro Pada Kambing Lokal. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya
- Djojosoebagio, S, 1991. DNA Rekombinan, Hewan Transgenik dan Keamanan Biologik. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor.
- Gordon, I, 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. University Press. Cambridge p 148-161
- Hafez,E.S.E dan K.Semm, 1982. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Published by MTP Press Limited Falcon House. Lancaster. England. P 22-23
- Hafez, E.S.E, 1993. Reproduction In Farm Animals. Ed 6. Lea & Febiger. Philadelphia. P 114-188.
- Hardjopranojoto,S, 1987. Pembuahan In Vitro dan Transfer Embrio. Pidati Pengukuhan Guru Besar, Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

- Hunter, R.H.F, 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Edisi pertama. Penerbit ITB Bandung. P257-275.
- Itsuo, S, 1991. Manual of Embryo Transfer and In Vitro Fertilization Superovulated Cattle, J. Reprod and Fert. 81 : 1-13.
- Katzung, B.G, 1989. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi 3. Terjemahan Binawati, Dkk. Penerbit Buku Kedokteran EGC. P 448-449
- Laing, J.A., W.J.B. Morgan dan W.C. Wagner, 1989. Fertility and Infertility In Veterinary Practice. Ed 4. Balliere Tindall. London. P 52-63.
- Mahaputra, L., A. Hinting, H.A. Hermadi, I. Mustofa, S. Utama dan P. Srianto, 1997. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya Dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio. Sub : Fertilisasi In Vitro Pada Sapi Madura. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/4.
- Margawati. E.T, 1995. Produksi Embrio Sapi Secara In Vitro. Journal Ilmu Ternak dan Veteriner. Vol 1. Bogor.
- Miyoshi, K., L.R. Abeydeera, K. Okuda dan K. Niwa, 1995. Effect of Osmolarity Amino Acids in A. Chemically Defined Medium on Development of Rat One Cell Embryos. J. Theriogenology, 33 : 591-300
- 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.
- Niwa, K., O. Ohgata dan M. Yuhara, 1988. Effect of Caffeine In Medium for Pretreatment of Frozen Thawed Sperm On In Vitro Penetration of Cattle Oocyte. Proceeding of 11th International Congress On Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin Vol. V; 346.
- Norusis, M.J, 1991. SPSS/PC + Advanced Statistics V2o for The IBM PC/XT/AT and PS/2
- Palomo, M.J., T. Mogas, M.D. Izquierdo dan T. Paramio, 1995. Effect of Heparin and Sperm Concentrasi On IVF of Prepubertal Goat Oocytes. J. Theriogenology. Vol 43. No 1 : 292.
- Parrish, J.J., J.J. Susko-Parrish dan N.L. Fitts, 1985. In vitro Fertilization of Bovine Oocytes Using Heparin Treated and Swim up Separated Frozen-Thawed Bovine Semen is Repeatable and Result In High Frequencies of Fertilization. J. Theriogenology. 23 : 216.

- Salisbury, G.W dan N.L. VanDermark, 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi Terjemahan R. Djanuar. Gajah Mada University Press. Yokyakarta. P 102-237.
- Sarmanu. 1190. Statistik Parametrik : Uji T dan Anova Satu Arah. Penataran Metodologi Penelitian, Statistik dan Komputer. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga.
- Soenardirahardjo, B.P. Kajian Manipulasi Mudigah Pada Tikus, Disertasi Doktor IPB. Bogor.
- Suhana, N. dan R.T. Rafiah, 1982. Diferensiasi-Embriolog Dalam Tingkat Selluler, Subselluler, Molekuler. Penerbit Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. p 13-21
- Sukra, Y., L. Rahardja dan I. Djuwita, 1992. Pembentukan Sel Kelamin dalam Embriologi I PAU IPB. Bogor. P 22-27.
- Supriatna, I dan F.H. Pasaribu, 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Dirjen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Tatik.H, S. Susilowati dan T. Sardjito, 1999. Pengaruh Heparin Dalam Media Kapasitasi Terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa dan Pembelahan (Cleavage) Embrio Pada Pembuahan In Vitro Sapi Perah. Universitas Airlangga.
- Triwulanningsih, 1992. Fertilisasi In Vitro Pada Sapi . Kumpulan Materi Kursus. Balai Penelitian Ternak. Ciawi-Bogor.
- Yanagimachi, R, 1988. Mammalian Fertilization. In : E. Knobil and J. Neil (eds), The Physiology of Reproduction. Raven Press. Ltd. New York. P 135-185.

Lampiran 1 : Personalia Tenaga Peneliti

1. Kepala Proyek

Nama Lengkap : Tatik Hernawati, Msi, Drh
 Pangkat dan Jabatan : Penata Tk I/Lektor Madya
 Tempat Penelitian : Lab. Kebidanan & IB FKH Unair
 Tugas /Hubungan Kerja : Koordinator kegiatan penelitian
 Waktu yang disediakan : 12 jam per minggu penelitian

2. Tenaga Peneliti I

Nama Lengkap : Suhermi Susilowati, MKes, Drh
 Pangkat dan Jabatan : Penata Tk I/Lektor Madya
 Tempat Penelitian : Lab. Kebidanan & IB FKH Unair
 Tugas/Hubungan Kerja : Tenaga peneliti
 Waktu yang disediakan : 10 jam per minggu penelitian

3. Tenaga Peneliti II

Nama Lengkap : Trilas Sardjito, Drh
 Pangkat dan Jabatan : Penata Muda Tk I/ Assisten Ahli
 Tempat Penelitian : Lab. Kebidanan & IB FKH Unair
 Waktu yang disediakan : 10 jam per minggu penelitian

Lampiran 2. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Media Pencuci Oosit (OWS)

TL Hepes Stock dalam 500 ml

NaCl	3.330 g
KCl	0,120 g
NaHCO ₃	0,084 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,028 g
Atau Anhydrous	0,024 g
Na Lactat	930 ul
Hepes	1,2 g
Penisilin	0,0325 g
Phenol red	0,005 g
CaCL ₂ 2H ₂ O	0,150 g
MgCL ₁₂ 6H ₂ O	0,050 g

Buat pH menjadi 7,4 osmoralitas 255-270 mOsm. Saring, kemudian masukan dalam botol steril. Simpan dalam suhu 4 derajat celcius selama 1-2 minggu. Tambahkan piruvat, gentamisin dan BSA pada saat akan digunakan.

Media OWS atau TL Hepes (medium pencuci) dalam 100 ml

TL hepes Stock	99 ml
Piruvat	1,0 ml
Gentamisin	50 ul (2,5 mg)
BSA Fraction V	0,3 g

Saring dengan milipore dan letakkan dalam water bath 39 derajat celcius

Lampiran 3. Komposisi bahan kimia dan cara pembuatan media TCM 199

TCM 199 STOCK dalam 1000 ml

Medium 199 (powder)	9,9 g
NaHCO ₃	2,2 g

Tambahkan powder dalam 900 ml D.W (Deionized Water). Kemudian tambahkan Sodium bicarbonat. Larutkan dan buat pH menjadi 7,4 dengan menambahkan NaOH 1N atau HCL 1N

Tc (medium pematangan atau maturasi)

TCM 199	9 ml
FCS	1 ml
Piruvat	100 ul
Gentamisin	5 ul (250 ug)

Lampiran 4. Komposisi dan cara pembuatan Medium EBSS Stock

Komponen	g/liter
Calcium Chloride. 2H ₂ O	0,265
Magnesium Sulfat	0,09767
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	6,8
Sodium Phosphate Monobasic	0,122
D-Glukosa	1,0
Phenol Red.Na	0,011
Hepes	1,2

Komposisi media pencucian dan kapasitas spermatozoa serta fertilisasi

Komponen	100 ml/mg
EBSS Stock	0,87
BSA	1,25
Piruvat	0,10
Gentamisin	25 ug/ml
TJ Beker	100 ml

Kemudian tambahkan kombinasi heparin 100 ug/ml EBSS dan 10 ul hipotaurine stock/ml EBSS

Pembuatan hipotaurin Stock

Hipotaurin	1,09 mg
NaCl	10 ml

Lampiran 5. Hasil pemeriksaan makroskopis rata-rata 10 sampel air mani dari 3 ekor sapi perah jantan

Sampel	Volume (ml)	Warna	bau	pH	konsistensi
1	5	krem keputihan	khas	6,7	kental
2	5,5	krem keputihan	khas	6,7	kental
3	4,5	krem keputihan	khas	6,6	kental
4	6	krem keputihan	khas	6,6	kental
5	4,5	krem keputihan	khas	6,5	kental
6	5,5	krem keputihan	khas	6,7	kental
7	6	krem keputihan	khas	6,8	kental
8	6	krem keputihan	khas	6,5	kental
9	5,5	krem keputihan	khas	6,6	kental
10	6	krem keputihan	khas	6,7	kental



Lampiran 6. Hasil pemeriksaan mikroskopis rata-rata 10 sampel air mani dari 3 ekor sapi perah jantan

Sampel	Konsentrasi (Juta/ml)	Gerakan massa	Gerakan individu	% hidup
1	2400	+++	progresif	70
2	2500	+++	progresif	72
3	2500	+++	progresif	70
4	2300	+++	progresif	75
5	2400	+++	progresif	69
6	2200	+++	progresif	68
7	2550	+++	progresif	71
8	2500	+++	progresif	71,3
9	2400	+++	progresif	70
10	2450	+++	progresif	73

Lampiran 7. Daftar uji t persentase pembelahan (*cleavage*) embrio

	EBSS+Heparin+hipotaurin	EBSS
1.	60.00	41.66
2.	66.67	45.45
3.	54.17	45.00
4.	85.00	53.84
5.	58.33	53.33
6.	53.33	41.66
7.	59.09	52.00
8.	53.85	50.00
9	53.35	46.66
10	60.00	53.33

----- DESCRIPTIVE STATISTICS -----

HEADER DATA FOR : A : Embrio LABEL : Persent Cleavage

NUMBER OF CASES : 10 NUMBER OF VARIABLES : 2

NO.	NAME	N	MEAN	STD.DEV	MINIMUM	MAXIMUM
1	EBSS+hep+hip	10	60.3790	9.6159	53.33	85.00
2	EBSS	10	48.2930	4.8046	41.66	53.84

----- HYPOTHESIS TEST FOR MEANS -----

	GROUP 1	GROUP 2
MEAN =	60.3790	48.2930
STD.DEV =	9.6159	4.8046
N =	10	10

DIFFERENCE = 12.5860

STD.ERROR OF DIFFERENCE = 3.3993

T = 3.5555 (D.F=18)

GROUP 1: EBSS+Hep+Hip

GROUP2 :EBSS

PROB = 1.130E-03

Lampiran 8. Rekapitulasi tingkat perkembangan embrio pada media EBSS+heparin, + hipotaurin dan EBSS

Kelompok	r	oosit yang diferitilisasikan	total	Embrio yang membelah (%)			
				2 sel	4 sel	8 sel	16 sel
EBSS+hep+hip	1	15	9 (60)	2(22,22)	2(22,22)	2(22,22)	3(33,33)
	2	12	8 (66,67)	2(25)	3(37,5)	1(12,5)	2(25)
	3	24	13(54,17)	3(23,08)	6(46,15)	2(13,33)	2(13,33)
	4	20	17 (85)	2(11,76)	4(23,53)	5(29,41)	6(35,29)
	5	12	7(58,33)	-	3(42,86)	2(28,57)	2(28,57)
	6	15	8(53,33)	2(25)	-	4(50)	2(25)
	7	22	13(59,09)	4(30,77)	1(7,69)	4(30,77)	4(30,77)
	8	13	7(53,85)	4 (57,14)	-	3(42,86)	-
	9	15	8(53,35)	1(12,5)	3(37,5)	3(37,5)	1(12,5)
	10	20	12(60)	6(50)	2(16,67)	2(16,67)	2(16,67)
EBSS	1	12	5(41,66)	3(60)	1(20)	-	1(20)
	2	11	5(45,45)	3(60)	-	1(60)	1(20)
	3	20	9(45)	4(44,44)	2(22,22)	2(22,22)	1(11,11)
	4	13	7(53,84)	3(42,86)	3(42,86)	-	1(14,29)
	5	15	8(53,33)	2(25)	4(50)	1(12,5)	1 (12,5)
	6	12	5(41,66)	3(60)	2(40)	-	-
	7	25	13(52)	7(53,85)	3(23,08)	2(15,38)	1(7,69)
	8	12	6(50)	4(66,67)	2(33,33)	-	-
	9	15	7(46,66)	4(57,14)	3(42,86)	-	-
	10	15	8(53,33)	3(37,5)	5(62,5)	-	-

Daftar Uji multivariate dilanjutkan uji F univariate persentase perkembangan embrio (2, 4, 8 dan 16 sel)

Multivariate Test of Significance (S=1, M=1, N = 6 ½)

Test Name	Value	Exact F Hypoth	D.F	Error DF	Sig. Of F
Pillais	.65302	7.05768	4.00	15.00	.002
Hotellinos	1.88205	7.05768	4.00	15.00	.002
Wilks	.34598	7.05768	4.00	15.00	.002
Rovs	.65302				

Note.. F statistics are exact