

**LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING VII/4 PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2001**

**A. JUDUL**

**PRODUKSI, KRIOPRESERVASI DAN PENENTUAN JENIS KELAMIN EMBRIO  
HASIL FERTILISASI *IN VITRO* MENGGUNAKAN SUMBER SEL TELUR ANAK SAPI**

**B. PENANGGUNGJAWAB PENELITIAN**

- 1. Nama lengkap : Drh. Bambang Purwantara, MSc. PhD.
- 2. Jenis Kelamin : Pria
- 3. Jabatan/Golongan : Lektor Kepala Madya/IIIc
- 4. NIP : 131404216
- 5. Bidang Keahlian : Fisiologi dan Bioteknologi Reproduksi
- 6. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
- 7. Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

**C. TIM PENELITI**

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Institusi
Bambang Purwantara	Fisiologi dan Bioteknologi Reproduksi	Kedokteran Hewan	IPB
tman Supriatna	Fisiologi Reproduksi dan Kriopreservasi	Kedokteran Hewan	IPB
Tuty L. Yusuf	Manipulasi Embrio dan IB	Kedokteran Hewan	IPB
M. Agus Setiadi	Fertilisasi <i>in vitro</i>	Kedokteran Hewan	IPB

**B. PENDANAN DAN JANGKA WAKTU PENELITIAN :**

- 1. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 4 tahun
- 2. Biaya tahun IV yang disetujui : Rp. 40.000.000



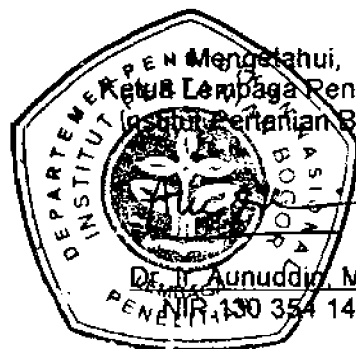
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Institut Pertanian Bogor

*[Signature]*  
Drs. Masmi Pasaribu  
NIP. 130 70 1 678

Peneliti Utama

*[Signature]*

Dr. Bambang Purwantara, MSc  
NIP. 131 404 216



Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian  
Institut Pertanian Bogor

*[Signature]*  
Dr. J. Annuddin, MSc.  
NIP. 130 354 141

## KATA PENGANTAR

Laporan penelitian dengan judul "PRODUKSI, KRIOPRESERVASI DAN PENENTUAN JENIS KELAMIN EMBRIO HASIL FERTILISASI *IN VITRO* MENGGUNAKAN SUMBER SEL TELUR ANAK SAPI" ini disampaikan kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Tujuan dari laporan ini adalah untuk memberikan gambaran tentang beberapa aspek stimulasi hormonal melalui pemberian hormon gonadotropin (FSH) dan kombinasinya dengan progesteron implant (CIDR) terhadap daya tanggap ovarium anak sapi untuk menghasilkan folikel. Teknik panen sel telur melalui pembedahan (laparotomi) pada daerah *linea alba* telah pula berhasil diidentifikasi kelebihan dan kekurangannya.

Pada tahun ke empat kegiatan penelitian ini telah berhasil dilakukan identifikasi beberapa faktor yang mempengaruhi kemampuan individu anak sapi merespons stimulasi hormonal. Data yang diperoleh akan sangat bermanfaat bagi penelitian tahun ke terakhir yang akan dititikberatkan pada penyempurnaan sistem stimulasi hormonal, pengembangan medium pematangan, fertilisasi dan kultur embrio disamping pembekuan embrio dan penentuan gender.

Bantuan dari berbagai pihak khususnya rekan-rekan staf pengajar dan pegawai di lingkungan Bagian Reproduksi dan Kebidanan FKH-IPB telah memungkinkan terselenggaranya rangkaian penelitian pada tahun pertama ini. Kepada semua pihak yang telah banyak membantu, khususnya kepada penyandang dana, penulis mengucapkan terima kasih. Penghargaan dan ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan dan Lembaga Penelitian IPB yang telah memberikan fasilitas dan mengijinkan terselenggaranya kegiatan penelitian ini.

Bogor, 18 Oktober 2001

Tim Peneliti

## I. PENDAHULUAN

Interval antar generasi merupakan salah satu unsur penentu efisiensi program perbaikan mutu genetik ternak. Dengan mempendek interval antar generasi, mutu genetik induk dan pejantan dievaluasi dengan cepat. Dibandingkan dengan inseminasi buatan (IB), program transfer embrio (TE) pada program pembibitan dianggap lebih efisien karena kemampuannya memperpendek interval antar generasi tersebut. Dengan TE, evaluasi dapat dilakukan terhadap saudara seibu (*sister sibling*) dibandingkan IB yang harus menunggu anaknya berproduksi (*daughter*). Dengan ET, bila dibandingkan dengan IB, waktu evaluasi dapat dihemat sekitar 4 tahun untuk setiap generasi (Lohuis, 1995).

Pemendekan interval generasi diharapkan dapat ditingkatkan dengan memanfaatkan anak sapi betina prapubertas, sebagai penghasil sel telur. Sel telur tersebut kemudian ditumbuhkan secara *in vitro* untuk selanjutnya dapat menghasilkan embrio (Tervit, et al., 1994, Revel et al., 1995). Dengan pemanfaatan oosit atau embrio yang berasal dari anak sapi yang belum dewasa kelamin, interval antar generasi diharapkan dapat dikurangi secara nyata. Hal ini dapat menghemat waktu dan biaya, sehingga memiliki keunggulan ekonomis bagi industri peternakan disamping sebagai pendukung bagi pengembangan ilmu dan teknologi. Dengan teknologi inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio (TE) saja misalnya, laju perbaikan mutu genetik terhadap efisiensi pertumbuhan diperkirakan meningkat dari 1.4 menjadi 2.6% per tahun. Laju perbaikan mutu ternak diperkirakan meningkat sekitar 12% apabila cadangan bibit yang dihasilkan melalui MOET dapat digantikan dengan jantan dan betina prapubertas (Lohuis, 1995).

Teknik rekayasa genetika (spermatozoa dan sel telur) dan embrio telah memberikan kontribusinya bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang reproduksi. Teknologi tersebut diantaranya meliputi produksi embrio *in vitro* (PIEV), kriopreservasi (sperma, oosit dan embrio), mikromanipulasi dan penentuan jenis kelamin embrio (*embryo sexing*).

Dalam bidang peternakan di negara-negara maju, terutama di negara-negara Amerika Utara (AS dan Kanada), Eropa dan Jepang, TE bersama inseminasi buatan (IB) telah digunakan secara luas dalam sistem pemuliaan

temak. Aplikasi pembuahan *in vitro* melalui serangkaian kegiatan meliputi pematangan sel telur (IVM), fertilisasi (IVF), dan kultur embrio (IVC) diduga akan digunakan secara luas sebagai bagian dari sistem pemuliaan ternak khususnya sapi.

Pada dasarnya manfaat utama penggunaan teknologi ini adalah untuk meningkatkan potensi reproduksi ternak (Nicholas, 1996). Dengan teknik modern tersebut, untuk menghasilkan sejumlah keturunan hanya diperlukan tetua yang jauh lebih sedikit bila dibandingkan dengan cara perkawinan konvensional. Secara genetis, sistem tersebut akan meningkatkan intensitas seleksi, yang pada akhirnya akan meningkatkan kemampuan genetis rata-rata dari keturunannya (Callesen *et. al.*, 1996). Namun demikian, perlu dicatat bahwa dalam suatu sistem produksi embrio melalui teknik TE dalam suatu "nucleus herd" angka *inbreeding* cenderung menunjukkan potensi peningkatan (Nicholas, 1996).

Program MOET yang telah dirintis di berbagai negara maju telah mulai menunjukkan hasilnya sebagai salah satu alternatif bagi sistem pemuliaan konvensional (uji progeni) yang hanya melibatkan pejantan melalui program IB. Melalui sistem *nucleus herd*, interval generasi dalam sistem pemuliaan ternak dapat diperpendek. Hal tersebut didukung dan diperkuat dengan munculnya peluang-peluang baru bagi pemanfaatan atau eksplorasi hewan muda/anak (*juvenil*) dalam sistem MOET tersebut. Sebagai teknologi yang masih tergolong mahal dan memerlukan perencanaan yang matang, maka konsep pemanfaatan teknologi embrio masih terbatas pada produksi bibit dan penyediaan induk pengganti (*replacement*), serta dalam jumlah terbatas, untuk program konservasi satwa yang terancam punah.

Dua teknik yang sering saling mendukung adalah teknik produksi embrio *in vitro* (PIEV) dan penggunaan alat bantu ultrasonografi untuk memanen sel telur dan hewan hidup (Purwantara, 1993). Dengan menggabungkan kedua teknik tersebut, PIEV tidak hanya mengandalkan sel telur dari hewan yang dipotong (Galli dan Lazzari, 1996), tetapi dapat melalui induk unggul yang masih hidup dengan interval pemanenan yang lebih pendek dan hasil embrio yang lebih banyak (Purwantara *et al.*, 1993)

Produksi embrio dengan sumber sel telur anak sapi ("juvenile *in vitro* embrio transfer"/JIVET) merupakan pendekatan baru dalam menunjang

bioteknologi reproduksi. Dengan teknik tersebut eksplorasi bibit unggul dapat dilakukan secara lebih dini (tanpa menunggu hewan mencapai dewasa) dan lebih berjangka panjang (Lohuis, 1995).

Dengan asumsi bahwa superovulasi dan koleksi sel telur pada anak sapi dapat diulang sekali dalam 3 minggu (Armstrong *et al.*, 1994) maka anak sapi mampu menghasilkan embrio tiga kali lipat dibandingkan dengan induk dewasa. Keuntungan ini akan berlipat ganda jika ditambahkan unsur-unsur lainnya seperti penghematan penggunaan hormon dan pemendekan interval generasi untuk sistem seleksi bibit.

## II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 2.1. Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah:

1. Penyempurnaan teknik stimulasi hormon dan koleksi sel telur anak sapi serta produksi embrio *in vitro*,
2. Identifikasi faktor-faktor penghambat perkembangan sel telur anak sapi dan pertumbuhan embrionya,
3. Perbaikan teknik kriopreservasi embrio hasil fertilisasi *in vitro* sel telur anak sapi,
4. Penentuan jenis kelamin embrio yang diproduksi dengan sumber sel telur anak sapi melalui teknik biopsi dan PCR.

Tujuan khusus dari penelitian pada Tahun IV adalah:

1. Mengoptimalkan pemanfaatan bibit unggul melalui eksploitasi anak sapi sebagai penghasil sel telur untuk program fertilisasi *in vitro*.
2. Identifikasi faktor-faktor penyebab rendahnya angka kebuntingan melalui kajian struktur ultra sel embrio.
3. Modifikasi sistem kultur menggunakan alat inkubasi sederhana.
4. Mengoptimalkan potensi genetik sapi-sapi Indonesia melalui teknik terbaru kriopreservasi embrio.
5. Penggunaan teknik biopsi dan PCR untuk penentuan jenis kelamin embrio pra pembekuan (kriopreservasi).

### 2.2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi:

1. Pengembangan sistem pemuliaan melalui pendekatan bioteknologi reproduksi modern, khususnya dalam rangka memperpendek interval generasi,
2. Upaya membangun pengertian yang lebih integratif tentang aspek-aspek biologi reproduksi, utamanya pada berbagai fungsi organ reproduksi betina pra-pubertas,

3. Dapat membuka kemungkinan referensi bagi pengembangan bioteknologi reproduksi manusia dengan anak sapi sebagai model.

### III. STUDI PUSTAKA

#### 3.1. Produksi embrio melalui program MOET dan IVEP

Program transfer embrio (TE) pada sapi, khususnya sapi perah betina dewasa (induk maupun dara), telah dimanfaatkan dalam rangka meningkatkan mutu bibit (Nicholas dan Smith, 1983). Induk sapi yang dalam Proses reproduksi konvensional hanya mampu menghasilkan seekor anak per tahun, dengan program TE mampu menghasilkan 30 embrio atau 15-20 ekor anak pertahun (Purwantara, 1991). Dengan cara ini, induk unggul dapat ditingkatkan potensinya untuk dapat memperpendek jarak generasi dan mempercepat seleksi (Nicholas, 1996). Pada sistem seleksi konvensional (uji progeni) sesuai konsep Robertson-Rendel untuk menetapkan tolok ukur produksi perlu menunggu anak (*daughters*) menghasilkan susu, sedangkan dengan TE produksi dapat diukur melalui saudara betinanya (*sisters/sibs*). Dibandingkan cara konvensional, perbaikan mutu genetik melalui program TE dapat diperpendek sampai dua kali lipat (Nicholas, 1996),

Callesen *et al.* (1996) melaporkan bahwa program yang kini dikenal sebagai *multiple ovulation and embryo transfer* (MOET) telah diterapkan secara sistematis pada kelompok sapi betina elit sekurang-kurangnya di enam negara Eropa dan Amerika, melalui konsep "*nucleus herd*". Pemerintah Indonesia telah rnengantisipasi perkembangan tekno-logi tersebut dengan introduksi TE pada tahun 1984 (Purwantara, 1990) dan diperkuat dengan pengoperasian Balai Embrio Ternak (BET) di Cipelang Bogor yang melibatkan tim JICA Jepang dan perguruan tinggi (Purwantara, 1995). Meskipun demikian, operasionalisasi BET tersebut sejauh ini masih jauh dari konsep "*nucleus herd*".

Program MOET pada induk sapi masih dihadapkan pada berbagai kendala. Kendala utama yang dihadapi adalah pembatasan panen embrio hanya 6 kali koleksi per tahun atau dengan interval koleksi 2 bulan (Purwantara *et al.*, 1995). Disamping itu, betina induk sapi perah tidak selalu berespon secara konsisten terhadap superovulasi (Purwantara *et al.*, 1990), meskipun ultrasonografi telah mulai banyak digunakan sebagai alat bantu seleksi/penapisan donor (Purwantara *et al.*, 1992; Greve dan Purwantara, 1993). Hal tersebut mendorong usaha agar sistem produksi embrio/anak



melalui MOET pada induk dewasa dicarikan alternatifnya. Dua teknik yang mendorong kecenderungan untuk mencari alternatif tersebut adalah teknik produksi embrio *in vitro* (IVEP) dan penggunaan alat bantu ultrasonografi untuk memanen sel telur dari hewan hidup (Purwantara, 1993). Dengan menggabungkan kedua teknik tersebut IVEP tidak hanya mengandalkan sel telur dari hewan yang dipotong (Galli dan Lazzari, 1996), tetapi dapat diperoleh secara berulang dari induk unggul dengan interval pemanenan yang lebih pendek dan hasil embrio yang lebih banyak (Purwantara et al., 1993).

### 3.2. Pendekatan baru pemanfaatan sel telur anak sapi

Tervit *et al.* (1995) melaporkan keberhasilan anak sapi umur 3 bulan yang disuperovulasi/disinkronisasi dengan CIDR, *equine chorionic gonadotropin* (eCG), *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). Teknik tersebut dikenal sebagai "juvenile in vitro embryo transfer" (JIVET). Dilaporkan bahwa folikel yang dihasilkan umumnya relatif banyak (10.9 folikel) tetapi ovulasi yang terjadi sangat terbatas (3.1 ovulasi). Angka ovulasi tersebut ternyata hanya menghasilkan 0.6 sel telur yang tidak dibuahi. Hasil ini menegaskan temuan sebelumnya (Onuma dan Foote, 1969; Seidel *et al.* 1971) yang menunjukkan bahwa anak sapi tidak layak menjadi donor dalam program MOET. Sampai saat ini belum terungkap mengapa kondisi tersebut terjadi. Studi yang mendasar mengenai rendahnya kompetensi perkembangan sel telur dan ovulasi serta gagalnya pembuahan perlu diketahui melalui studi morfologi struktur ultra dengan mikroskop elektron.

Pendekatan terbaru dalam pemanfaatan materi genetik unggul secara lebih cepat adalah penggunaan anak hewan (*juvenile*) sebagai penghasil sel telur untuk produksi embrio *in vitro* (Tervit, 1996). Disamping pada anak sapi (Armstrong *et al.*, 1992, 1994) panen sel telur dilaporkan juga pada anak domba (Dahlhausen *et al.*, 1980; Earl *et al.*, 1994, 1995). Menurut Lohuis (1995) uji progeni jika digabung dengan sistem MOET dari sapi dewasa yang dihasilkan dari IVEP dengan sumber sel telur anak sapi umur 1-5 bulan dapat meningkatkan mutu genetik terhadap produksi susu sebanyak 22% di atas penggunaan sistem konvensional. Dengan cara ini akan dihasilkan keturunan

yang baik dari sumber sel telur yang murah, unik dan dapat diulang (*repeatable*). Pendekatan ini dapat juga dijadikan model bagi penyelamatan satwa liar yang mendekati kepunahan (Tervit, 1995).

Anak sapi dapat menghasilkan antara 2-6 embrio dari setiap perlakuan superovulasi dan produksi embrio *in vitro*. Setiap anak sapi dengan umur antara 1-3 bulan dapat menghasilkan sekitar 40-50 folikel (Tervit *et al.*, 1995), dengan 25 oosit dan 2.3 blastosis (Lewis *et al.*, 1995), 22.8 oosit dan 5.5 embrio layak transfer (Kotaras *et al.*, 1995) atau menghasilkan sekitar 22-32% morula/blastosis. Hasil ini setara dengan produksi embrio melalui superovulasi pada induk dewasa yang berkisar antara 4-7 embrio/donor (Purwantara, 1990) atau menggunakan IVEP dengan sumber sel telur sapi yang dipotong di RPH. Dengan asumsi bahwa superovulasi dan koleksise) telur pada anak sapi dapat diulang sekali dalam 3 minggu (Armstrong *et al.*, 1994) maka anak sapi mampu menghasilkan embrio tiga kali lipat dibandingkan dengan induk dewasa. Keuntungan ini akan berlipat ganda jika ditambahkan unsur-unsur lainnya seperti penghematan penggunaan hormon dan pemendekan selang generasi untuk sistem seleksi bibit.

Namun demikian, keberhasilan tersebut di atas tidak didukung oleh Kajihara *dkk.* (1991), Palma *et al.* (1993) dan Palma (1994) yang mencatat rendahnya kemampuan berkembang oosit anak sapi mencapai blastosis dibandingkan dengan oosit asal induk (hewan dewasa). Revel *et al.* (1995) juga melaporkan penurunan kompetensi oosit berkembang menjadi blastosis setelah mampu berkembang dengan baik sampai tahap pembelahan awal ("cleavage"). Studi yang mendalam tentang kecenderungan penurunan angka blastosis ini perlu dipelajari dengan menggunakan analisis seluler pada tingkat oosit, zigot dan perkembangan embrio dini.

Dalam kaitan hasil kebuntingannya, dilaporkan bahwa kemampuan embrio anak sapi tersebut untuk menghasilkan anak hanya mencapai 13% (Armstrong *et al.*, 1992), 23% (Tervit *et al.*, 1995), 33% (Kajihara *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1995) dan 43% untuk embrio segar dan 9% untuk embrio beku (Kotaras *et al.*, 1995). Jika dijabarkan antara hasil kebuntingan embrio asal sel telur induk dan sel telur anak sapi, Revel *et al.* (1995) melaporkan angka kebuntingan yang cukup jauh berbeda yakni 38% versus 3%. Kondisi ini memerlukan kajian yang lebih jauh tentang kompetensi perkembangan

embrio setelah implantasi khususnya dalam proses perkembangan embrio dini. Penggunaan ultrasonografi untuk pemeriksaan kebuntingan dan kemungkinan penyimpangannya (Purwantara *et al.*, 1992; Greve dan Purwantara, 1992, 1993), dapat dikombinasikan dengan pemeriksaan biopsi dan morfologi struktur ultra (Assey *et al.*, 1993).

Teknik koleksi sel telur yang lazim digunakan pada anak sapi adalah laparotomi (Lewis dkk., 1995), laparotomi (Armstrong *et al.*, 1992; Tervit *et al.*, 1995) dan koleksi setelah pemotongan (Revel *et al.*, 1995). Guna menjamin pengulangan koleksi dengan selang waktu 3 minggu, maka teknik laparotomi merupakan pilihan terbaik. Meskipun aspirasi oosit pada induk sapi telah dilakukan dengan alat bantu ultrasonografi (Pieterse *et al.*, 1990; Purwantara, 1993) tetapi pemanfaatannya untuk anak sapi belum pernah dilaporkan. Sebagai alternatif teknik non-invasif, pemanfaatan ultrasonografi untuk teknik koleksi trans abdominal dan transvaginal pada anak sapi perlu diperkenalkan.

### **3.3. Sistem kultur dengan inkubator Oxoid CO<sub>2</sub> Gen™**

Banyak faktor eksternal mempengaruhi kompetensi perkembangan *in vitro* sel telur dan embrio mamalia. Stabilitas dan reliabilitas sistem inkubasi sangat penting dan membutuhkan perhatian yang khusus. Umumnya inkubator CO<sub>2</sub> mahal dan membutuhkan biaya operasional yang tinggi. Di sisi lain, pintu inkubator yang sering mengalami proses buka-tutup dapat mengacaukan keseimbangan suhu dan kandungan CO<sub>2</sub> dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan embrio. Disamping itu, terdapatnya kontaminan pada campuran gas yang digunakan dan udara di dalam laboratorium dapat pula memperburuk kualitas lingkungan kultur embrio.

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk memperbaiki dan menstabilkan sistem inkubasi seperti penyekatan ruang inkubasi, penggunaan toples yang dialiri CO<sub>2</sub> dan penggunaan inkubator mini (Avery dan Greve, 1992). Disamping itu, Vajta *et al.* (1997) melaporkan penggunaan kantung aluminium yang digembungkan dengan campuran gas dengan kandungan CO<sub>2</sub> tertentu dan dimasukkan ke dalam inkubator biasa atau penangas air. Keseluruhan pendekatan tersebut di atas dilandaskan pada

pengaliran campuran gas ke dalam ruangan (toples atau inkubator) untuk memenuhi kebutuhan kandungan gas dan suhu yang dikehendaki. Pada studi yang dilakukan oleh Suzuki et al. (1999), CO<sub>2</sub> disediakan secara *in situ* melalui penggunaan butiran *effervescent* yang berisi asam tartarat, hidrogen natrium yang terkarbonasi dan air.

Avery et al. (2000) menggunakan sistem kultur AnaeroJar™, sebagai alternatif bagi penggunaan inkubator CO<sub>2</sub> biasa. Kondisi optimum dapat dicapai dengan menempatkan sachet CO<sub>2</sub>Gen™ dengan asam askorbat di dalam AnaeroJar™. Setelah berkontak dengan udara, CO<sub>2</sub>Gen™ akan bereaksi untuk menghasilkan kandungan udara dengan komposisi 15% O<sub>2</sub> dan 6% CO<sub>2</sub> yang dianggap cukup untuk mengkultur embrio sapi. Penggunaan sachet ini diharapkan dapat mengurangi biaya produksi dengan menekan pengadaan inkubator CO<sub>2</sub>, menyediakan udara yang bebas toksik, terukur kandungannya, meskipun bertekanan O<sub>2</sub> yang lebih rendah dari tekanan udara normal yang mencapai 20%. Studi tersebut membuktikan kemampuan sistem ini untuk mempertahankan kultur embrio yang dapat berlangsung selama satu minggu.

### 3.4. Aspek selulo-molekuler dan teknik-teknik kriopreservasi

Dalam proses pembekuan atau kriopreservasi, embrio menghadapi beberapa resiko kerusakan sel-selnya oleh beberapa faktor diantaranya : 1) toksisitas krioprotektan, 2) cedera akibat "chilling", 3) cedera fisik akibat es ekstraseluler, 4) toksisitas akibat elektrolit yang mengental, 5) pembentukan dan perkembangan es intraseluler, 6) kerusakan berupa "fraktur" dan 7) pembengkakan osmotis (Kasai, 1996). Dengan menggunakan teknik pembekuan lambat yang diperkenalkan oleh Whittingham et al. (1972) embrio harus dibekukan secara lambat sehingga isi selulemya terkonsentrasi dengan dehidrasi bertahap karena pembentukan es ekstraseluler (Kasai, 1996).

Rall dan Fahy (1985) mengembangkan vitrifikasi, suatu pendekatan baru pembekuan pada embrio menciit. Teknik ini tidak saja menyederhanakan proses tapi juga mengurangi kemungkinan cedera sel akibat es ekstraseluler. Teknik ini diduga mengurangi cedera "chilling" dengan jalan melewati masa

kritis temperatur secara cepat (Kasai, 1996). Namun demikian embrio masih berpeluang untuk menghadapi kerusakan akibat toksisitas, pembentukan es intraseluler, fraktur dan eksese osmosis. Studi yang mendalam tentang kondisi seluler embrio dengan sumber sel telur anak sapi terhadap berbagai teknik pembekuan belum banyak dilaporkan.

### 3.5. Penentuan jenis kelamin embrio

Terdapat 2 tujuan penting dari penelitian mengenai penentuan jenis kelamin embrio yakni : 1) viabilitas sel embrio yang menjalani biopsi yang dilakukan dengan cara mikroaspirasi blastomer dan mikroseksi sel embrio, 2) efisiensi teknik PCR dalam menentukan jenis kelamin embrio (Peippo dan Bredbacka, 1997). Oleh karena itu perlu dicatat beberapa parameter penting seperti: 1) perkembangan embrio setelah menjalani proses mikromanipulasi, 2) angka kebuntingan setelah transfer dan 3) ketepatan diagnosa jenis kelamin dengan metode PCR tersebut (Carbonneau et al., 1997). Teknik mikroseksi pada tahap perkembangan embrio yang lebih lanjut ternyata memberikan angka efisiensi yang lebih tinggi, disamping angka kebuntingannya lebih tinggi.

## **IV. MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **4.1. Materi Penelitian**

#### **4.1.1. Hewan Percobaan**

Enam ekor anak sapi betina Frisian Holstein (FH) berumur sekitar 3-4 bulan dengan berat badan antara 60-70 kg dan tinggi badan antara 70-75 cm direncanakan akan digunakan dalam penelitian ini. Pada saat kedatangan (sekitar satu bulan sebelum percobaan dimulai) hewan tersebut baru berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 50-60 kg. Hewan dipelihara dalam kandang bersama dengan masing-masing kelompok terdiri atas 3 ekor.

#### **4.1.2. Ovarium sapi dewasa**

Ovarium diperoleh dari jenis sapi potong PO dan Brahman cross yang dipotong pada Rumah Potong Hewan (RPH) dilingkungan Fakultas Peternakan IPB, Kecamatan Cibinong Kabupaten Bogor dan Kabupaten Cianjur. Ovarium dilepaskan dari penggantung ovarium segera setelah pernotongan dan dimasukkan ke dalam termos dengan suhu 37°C dan sesegera mungkin dibawa ke laboratorium.

### **4.2. Bahan dan Peralatan**

#### **4.2.1. Bahan**

Hormon untuk stimulasi folikel: FSH (*Antrin*®, Japan) dan progesteron dalam bentuk Controlled Intravaginal Drug Release (CIDR®, New Zealand); bahan untuk bedah: xylazin (*Xylazil-20*®), atropin sulfat, desinfektan dan antibiotika; medium pembilasan dan pematangan oosit: PBS, TCM199, fetal calf serum (FCS), Penisilin-Streptomisin; medium fertilisasi: Medium Brackett-Oiiphan (BO), kafein, BSA; dan medium kultur perkembangan embrio: CR1aa, BSA.

#### **4.2.2. Peralatan**

Perangkat bedah: skalpel, klem arteri, gunting, *needle holder*, dll; alat evatuasi dan kultur perkembangan sel tetur: Inkubator, toples (flask) inkubasi,

tabung CO<sub>2</sub>, Inkubator CO<sub>2</sub>, inkubator biasa, AnaeroJar™, CO<sub>2</sub>Gen™, laminar cabinet, mikroskop diseksi, cawan-cawan petri, spuit dll.

### **4.3. Metode Penelitian**

#### **4.3.1. Koleksi sel telur anak sapi**

##### **4.3.1.1. Seleksi dan penyiapan anak sapi donor**

Anak sapi sebagai hewan percobaan diperoleh dari stok peternakan sapi perah rakyat yang ada disekitar Bogor atau didatangkan dari luar daerah. Hewan-hewan percobaan tersebut dipersyaratkan memiliki kondisi yang baik termasuk pemberian susu selama masa pemeliharaan di tingkat peternak. Sebelum dimulainya pelaksanaan percobaan, masing-masing hewan menjalani periode persiapan dan adaptasi selama kurang lebih satu bulan. Setelah sampai di kandang, hewan percobaan memperoleh pengobatan cacing (*Valbazen*®), pemberian multivitamin (*Hematopan*® dan *Biosalamin*®) dan pengobatan/ pencegahan massal terhadap ektoparasit (*Butox*®). Hewan percobaan yang masih berumur 2-3 bulan pada saat kedatangan memperoleh 4-5 liter susu pengganti (*milk replacer*) dan pakan konsentrat (*Indofeed*®) sebanyak 2 kg per ekor dan rumput seperlunya (sekitar 5-6 kg per ekor) selama 1 bulan. Secara bertahap, susu pengganti dikurangi dan komposisi rumput ditingkatkan.

##### **4.3.1.2. Stimulasi pertumbuhan folikel dengan pemberian gonadotropin**

Stimulasi hormonal dilakukan dengan menggunakan FSH dan kombinasi FSH-CIDR sebagaimana disimpulkan sebagai teknik terbaik dari penelitian Tahun I dan II. Hewan percobaan masing-masing memperoleh penyuntikan gonadotropin 20 atau 25 mg (AU) FSH (Kelompok A, masing-masing 3 ekor untuk Tahap I dan II), dan kombinasi CIDR dan 20 atau 25 AU FSH (Kelompok B, masing-masing 3 ekor untuk Tahap I dan II). Penyuntikan FSH dilakukan dua kali sehari (pagi-sore) selama 3 hari berturut-turut dengan dosis turun bertingkat (5, 3, 3, 2, 2 AU atau total 20 AU untuk Tahap I, dan 6, 6, 4, 4, 3, 2 IU atau total 25 AU untuk Tahap II) dimulai 4 hari sebelum koleksi sel telur. Pada Kelompok B CIDR tipe kecil (untuk domba/kambing)

dipasang secara intravaginal selama 8 hari dan penyuntikan hari ke 5, 6 dan 7.

#### **4.3.1.3. Identifikasi respons ovarium terhadap stimulasi gonadotropin**

Respons terhadap stimulasi hormonal dengan menggunakan hormon gonadotropin terhadap pertumbuhan folikel dapat muncul dalam bentuk: (1) perubahan fisik berupa pembengkakan vulva, hiperemia dan pembentukan/ sekresi lendir, (2) perubahan perilaku berupa gejala tidak tenang, *mounting* (menaiki anak betina lainnya) dan *standing heat* (diam dinaiki oleh anak betina lainnya), (3) pertumbuhan sejumlah folikel dengan diameter lebih dari 3 mm (Purwantara et al., 1999).

#### **4.3.1.4. Teknik pembedahan untuk panen sel telur**

Panen sel telur dilakukan dengan menggunakan teknik laparotomi melalui pembedahan pada daerah median abdomen (*linea alba*) sebagaimana diuraikan pada Laporan Tahun I, II dan III (Purwantara, 1998 dan 1999). Sebelum dilakukan laparotomi, hewan dikondisikan untuk tenang dan teranastesi secara umum.

Anak sapi yang akan dikoleksi sel telurnya dipuasakan selama 18 jam tanpa diberikan pakan hijauan dan konsentrat. Sekitar 10 menit sebelum penyuntikan anestetikum, larutan atropin sulfat 4% sebanyak 8-10 ml disuntikkan secara i.m. sebagai premedikasi dan pencegah respons muntah sebagai akibat anestesi umum. Xylazine 20% (*Xylazil-20®*) sebanyak 0.15-0.30 mg/kg berat badan disuntikkan untuk proses pembiusan umum. Dengan perhitungan perkiraan berat badan sekitar 70-75 kg, setiap ekor menerima sekitar 1.5 ml. Untuk mempermudah manipulasi uterus dan ovarium, anestesi epidural dilakukan dengan pemberian 2 cc lidokain adrenalin 2% pada sela-sela antara tulang sakrum dan ruas pertama tulang ekor (*coccygea*).

Beberapa menit kemudian, hewan akan segera tertidur atau teranastesi secara umum. Hewan kemudian ditempatkan di atas "cradle" ukuran kambing/domba dengan posisi kepala dan bagian depan tubuh terletak lebih rendah dibandingkan dengan bagian belakang tubuh. Bulu pada bagian median abdomen antara ambing dan umbilikus dicukur dengan



luas pencukuran sekitar 15-20 cm panjang dan sekitar 5 cm lebar. Daerah yang telah tercukur tersebut kemudian dibersihkan dan dicuci dengan sabun mandi anti bakteri. Setelah dikeringkan daerah median tersebut diolesi dengan *jodium tincture* dan ditutup dengan kain pelindung sekitar sayatan operasi.

Panen sel telur dengan sistem pembedahan median dilakukan melalui penyayatan dinding perut bagian bawah sejajar dengan sumbu memanjang tubuh berimpit pada garis putih (*linea alba*) dan pada posisi antara umbilikus dan kelenjar ambing. Teknik ini membutuhkan posisi hewan dalam keadaan terlentang serta tubuh bagian belakang diletakkan pada posisi yang lebih tinggi.

Dalam posisi telentang, ovarium dan saluran reproduksi berada di balik konfigurasi usus halus dan usus besar. Oleh karena itu, untuk meraih ovarium yang biasanya tersembunyi dibalik usus halus, diperlukan serangkaian manipulasi. Untuk memudahkan orientasi, pada vagina dan cervix dipasang kateter atau *gun* inseminasi sehingga dapat mengarahkan posisi ovarium. Keunggulan teknik ini adalah bahwa jaringan kulit dan jaringan ikat disekitar *linea alba* relatif tipis dan amat sedikit mengandung pembuluh darah sehingga proses pembedahannya sedikit sekali menimbulkan perdarahan. Dengan teknik ini jarak ovarium ke sayatan relatif lebih pendek sehingga dengan manipulasi sederhana ovarium dapat diraih.

Daerah operasi dicukur dan dibersihkan dengan sabun untuk selanjutnya dibilas dengan alkohol dan diolesi dengan yodium tinktur pekat. Daerah sekitar operasi ditutup dengan kain yang terbuka pada sekitar daerah sayatan. Penyayatan dilakukan sepanjang sekitar 8-10 cm di bagian ventral abdomen di antara pusar dan kelenjar ambing. Setelah menyayat kulit, penyayatan dilanjutkan pada jaringan ikat (*linea alba*). Operator kemudian mencari letak ovarium dengan dibantu lokalisasinya melalui kateter yang dimasukkan ke dalam vagina. Ovarium yang dapat teraih kemudian ditarik menuju ke permukaan sayatan.

## 4.3.2. Aspirasi folikel dan koleksi sel telur

### 4.3.2.1. Ovarium anak sapi

Folikel yang tersebar di permukaan ovarium diaspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 21 G yang dihubungkan dengan alat suntik plastik ukuran 20 cc yang berisi 2-3 cc larutan *phosphate buffer saline* (PBS). Untuk menghindari pembekuan cairan medium akibat teraspirasinya darah bersama dengan cairan folikel pada medium ditambahkan 10 IU heparin/ml larutan PBS. Teknik aspirasi dilakukan dengan pendekatan aspirasi *tunggal* yakni penyedotan cairan folikel satu persatu melalui permukaan masing-masing folikel (teknik terbaik sesuai Purwantara et al., 1999). Cairan hasil aspirasi yang berisi sel telur ditempatkan pada filter embrio dan dibilas dengan PBS guna mengurangi campuran darah di dalam medium koleksi. Cairan yang telah tersaring tersebut kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri besar.

Sel telur yang ditemukan di dalam cawan petri besar kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri kecil (ukuran 3 cm) yang berisi larutan TCM199. Sel telur yang telah terkumpul kemudian dicuci dua sampai tiga kali dengan menggunakan larutan TCM199 yang diperkaya dengan 5% *fetal calf serum* (FCS).

### 4.3.2.2. Ovarium sapi dewasa dari RPH

Kompleks oosit-kumulus (COC) dikoleksi dari folikel berdiameter 2-8 milimeter yang terdapat di ovarium dengan menggunakan jarum ukuran 18 G dengan sisi miring (*bevel*) yang pendek yang dihubungkan dengan spuit plastik steril. Dengan menggunakan *conical tube*, seluruh cairan folikel yang teraspirasi disimpan dan disatukan untuk beberapa ovarium yang tersedia. Sel telur yang dikoleksi kemudian dibilas dengan medium pembilas TCM199.

## 4.3.3. Evaluasi dan penentuan kualitas sel telur

Sel telur yang terkoleksi dievaluasi terhadap kualitasnya melalui dua indikator yang lazim digunakan yakni jumlah lapisan dan integritas sel-sel kumulus serta integritas sel-sel ooplasmnya. Rincian indikator dan klasifikasi kualitas sel telur yang dievaluasi sesuai dengan kriteria Loos et al. (1989) dan

Presicce *et al.* (1997) seperti termuat pada Laporan Tahun I dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hanya COC yang berkualitas A dan B saja yang dinyatakan layak untuk digunakan dalam proses pematangan dan tahap-tahap perkembangan serta pengujian berikutnya. Guna penghitungan total sel telur yang terkoleksi, COC dengan kualitas C dan D dicatat dan didokumentasikan.

#### 4.3.4. Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio

Medium pematangan sel telur dipersiapkan dengan membuat 4 buah tetesan medium TCM199 yang disuplementasi dengan 5% FCS sebanyak 100 ul diatas cawan petri ukuran sedang (diameter 6 cm). Untuk menghindari penguapan dilakukan penutupan permukaannya dengan menggunakan minyak mineral yang telah disterilisasi.

Pematangan sel telur dilakukan dengan menempatkan 10-20 sel telur pada setiap tetesan medium pematangan yang telah terlebih dahulu diinkubasikan selama sekitar 2 jam. Medium yang berisi oosit ditempatkan di dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 38.5°C, kelembaban maksimal (95%) dan kandungan 5% CO<sub>2</sub> atau menggunakan inkubator Oxoid CO<sub>2</sub>Gen™. Kultur pematangan sel telur berlangsung dalam kondisi tersebut di atas dalam jangka waktu sekitar 22 jam. Pematangan oosit dievaluasi dengan mengacu pada indikator utama berupa ekspansi sel-sel kumulus, kualitas ooplasmnya dan integritas selulemya secara menyeluruh.

Setelah evaluasi kematangan sel telur yang dilakukan secara morfologik, sel telur dicuci dengan medium pencuci yakni medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Fertilisasi atau inseminasi *in vitro* dilakukan dengan menggunakan semen beku yang diketahui fertilitasnya. Spermatozoa yang diperoleh dimumikan dan larutan pengencemya melalui pencucian beberapa kali. Untuk proses kapasitasi, spermatozoa diinkubasi dalam medium BO yang disuplementasi dengan sodium piruvat, penisilin-streptomisin, kafein dan heparin. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan adalah  $12.5 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Sel telur kemudian dimasukkan ke dalam medium fertilisasi (berupa tetesan 100 ul dan ditutup minyak mineral) yang

telah berisi spermatozoa dan diinkubasikan pada suhu 38.5°C, dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5% CO<sub>2</sub> selama 5 jam.

Setelah proses fertilisasi, sel telur dibersihkan dari sel-sel kumulus dan dicuci beberapa kali dengan medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Kultur zigot dilakukan dengan menempatkan pada tetesan medium CR1aa pada suhu 38.5°C, dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5% CO<sub>2</sub>. Perkembangan embrio diamati pada 48 jam setelah dimulainya kultur untuk melihat adanya pembelahan (*cleavage*) sebagai indikasi terjadinya pemuahan. Perkembangan selanjutnya diamati setiap hari sampai pada pertumbuhan maksimal pada tahap perkembangan blastosis.

#### 4.3.5. Kultur menggunakan inkubator Oxoid CO<sub>2</sub> Gen™

Sebuah toples polikarbonat volume 2.5 liter AnaeroJar™ dan sachet CO<sub>2</sub> Gen™ berisi asam askorbat digunakan dalam kultur oosit/embrio. Sesuai dengan pabrik pembuatnya, sachet akan aktif setelah berkontak dengan udara. Reaksi asam askorbat dengan udara adalah bersifat eksotermik dengan temperatur sachet (sA lebih dari 65°C. Setelah cawan berisi oosit/embrio diletakkan ke dalam toples, sachet dibuka dan diletakkan ke dalam toples. Toples kemudian ditutup rapat dengan memasang tutupnya yang fiksasi dengan 4 buah klip pengunci. Klip pengunci akan memungkinkan berkembangnya tekanan positif di dalam toples, sehingga tutup agak terangkat dan bertambah rapat.

Penggunaan sistem memungkinkan kandungan CO<sub>2</sub> dan gas lainnya berlangsung sepanjang toples tidak dibuka. Oleh karena itu setidaknya ada 3 segmen waktu yakni saat melakukan IVM, IVF dan IVC yang memerlukan sachet CO<sub>2</sub> Gen™ baru. Seluruh proses kultur dilakukan dengan mengacu sistem inkubator CO<sub>2</sub> biasa.

#### 4.3.6. Preparasi untuk pemeriksaan ultrastruktur

Oosit yang terkoleksi dipersiapkan untuk pemeriksaan ultrastruktur dengan beberapa ytahap persiapan: (a) inkubasi uridine dengan persiapan pada larutan TCM199 yang disuplementasi dengan BSA dan penambahan 20 µl of

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. PEIV anak sapi

Produksi embrio *in vitro* dengan menggunakan sumber sel telur anak sapi baru akan dilaksanakan (dimulai) pada awal November 2001 oleh karena adanya kesulitan sinkronisasi waktu pindah dari fasilitas lama di Bogor ke kampus baru di Darmaga. Oleh karena itu pada tahap ini belum dapat dilaporkan produksi embrio anak sapi yang dijadwalkan berlangsung selama 2 bulan (sampai dengan akhir Desember 2001/awal Januari 2002)

### 5.2. PEIV sapi dewasa

Produksi embrio sapi dewasa dengan sumber ovarium dari RPH diperoleh dengan tujuan untuk dapat memenuhi jumlah embrio yang dapat dibekukan. Dari pengalaman penelitian tahap atau tahun sebelumnya, jumlah embrio yang dihasilkan oleh PIEV pada anak sapi sangat tidak memungkinkan untuk dapat dilakukannya percobaan pembekuan embrio dan penentuan jenis kelamin embrio. Oleh karena itu atas kesepakatan tim pembahas pada evaluasi Tahun ke III, percobaan pembekuan dan penentuan jenis kelamin embrio dapat menggunakan embrio hasil PEIV pada sapi dewasa.

#### 5.2.1. *Kondisi ovarium dari RPH*

Kondisi ovarium dari sapi betina dewasa yang dipotong di RPH, tidak semuanya menunjukkan kondisi normal. Dari 24 pasang ovarium yang telah dikoleksi hanya 16 pasang (67%) menunjukkan kondisi ovarium normal sedangkan 8 pasang sisanya (33%) menunjukkan kondisi buruk dan tidak layak untuk digunakan. Kelainan tersebut meliputi atropi, hipofungsi, hipoplasia dan kista ovarium. Kelainan tersebut dapat merefleksikan gangguan fungsional dan abnormalitas perkembangan struktur ovarium yang dapat disebabkan oleh faktor genetik dan lingkungan seperti malnutrisi, suhu dan cahaya yang erat hubungannya dengan musim (Toelihere, 1985). Dari ovarium yang dianggap normal, 10 pasang (62.5%) memiliki siklus reproduksi

yang normal, terbukti dengan adanya corpus luteum (CL) pada salah satu atau ke dua ovarium, sedangkan 6 pasang sisanya (37.5%) hanya menunjukkan perkembangan folikel tapi tanpa ditemukan CL.

### **5.2.2. Koleksi dan kualitas sel telur**

Oosit yang teraspirasi berkisar antara 1 sampai 10 buah per ovarium dengan rata-rata  $5.52 \pm 1.80$  oosit/ovarium. Dari jumlah tersebut rata-rata  $3.69 \pm 1.40$  memiliki kualitas oosit A dan B sedangkan sisanya merupakan kualitas oosit C dan D. Kondisi ini relatif rendah jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh di Inggris yakni 6.9 oosit per ovarium (Lu et al., 1987) namun setara dengan yang dihasilkan oleh Hendri (1997) dan Leibfried-Rutledge et al. (1985) yang mencatat hasil oosit kualitas A dan B masing-masing 4.17 dan antara 4-8 oosit per ovarium.

### **5.2.3. Pematangan sel telur dan angka fertilisasi**

Angka pematangan sel telur yang ditandai dengan ekspansi sel-sel kumulus mencapai rata-rata 72.30%. Angka pematangan tersebut setara dengan yang dihasilkan oleh Hendri (1997) yang mencapai rata-rata 71.08% untuk berbagai sistem kultur yang melibatkan serum dari berbagai stadium estrus sapi.

Angka fertilisasi yang ditunjukkan dengan *cleavage rate* (angka pembelahan sel dari satu ke dua sel) dalam penelitian ini adalah 52.54%. Hasil ini sedikit lebih baik dari Hendri (1997) yang melaporkan angka *cleavage* rata-rata 46.86% dan dibawah hasil yang dicatat dari studi yang dilakukan oleh Avery et al. (2000) yang mencatat *cleavage rate* mencapai 75% atau bahkan diatas 85%.

### **5.2.4. Perkembangan embrio**

Perkembangan embrio yang diamati dari penelitian ini adalah pembentukan embrio dari 8, sampai 16 sel, morula dan blastosis. Angka keberhasilan mencapai tahap perkembangan embrio tersebut dapat diamati pada Tabel 1.

Tabel 1. Perkembangan sel telur (oosit) dan embrio sampai tahap blastosis

Stadium perkembangan	Jumlah total, rata-rata dan persentase
Oosit kualitas A dan B	118 (3.69 oosit/ovarium)
Cleavage	62 embrio (52.54%)
8-16 sel	39 embrio (33.05%)
Morula	20 embrio (16.95%)
Blastosis	11 embrio (9.32%)

Dari Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa kemampuan produksi oosit sampai pada tahap blastosis relatif masih sangat rendah apabila dibandingkan dengan hasil yang dicapai oleh Avery et al. (2000) yang mencatat angka blastosis di atas 30%. Namun demikian angka tersebut masih lebih baik dari Hendri (1997) yang mencatat angka morula sebesar 12.92% dan tanpa blastosis dapat dihasilkan. Kelemahan yang dihadapi dengan sistem yang ada saat ini diduga berkaitan dengan kualitas oosit yang relatif rendah diakibatkan oleh rendahnya kualitas hewan yang digunakan.

Perbedaan tersebut secara langsung atau tidak langsung dapat pula berkaitan dengan adanya variasi latar belakang reproduksi yang berbeda. Faktor yang mempengaruhi tersebut antara lain adalah umur sapi (Zhang et al., 1991), bangsa sapi (Gordon, 1994), nutrisi (garcia-Bojalil et al., 1991) dan variasi individu sapi (Mermillod et al., 1992). Sapi-sapi yang dipotong di Indonesia, berbeda dengan sapi-sapi Eropa dan Amerika umumnya dipotong pada umur tua sehingga diduga kemampuannya secara rata-rata lebih rendah. Di sisi lain status nutrisi yang dimiliki oleh sapi-sapi Indonesia umumnya lebih buruk dibandingkan sapi-sapi dari luar negeri.

Faktor lainnya yang diduga dapat dianggap sebagai penyebab rendahnya angka pembentukan blastosis adalah sistem kultur yang relatif kurang memadai. Salah satu faktor yang sangat penting untuk diperhatikan adalah kualitas air terutama yang bebas dari cemaran endotoksin. Demikian pula kontaminasi udara lingkungan (inkubator dan laboratorium) dari bakteri dapat pula menurunkan angka keberhasilan pembentukan blastosis. Angka

cleavage yang relatif masih rendah dapat pula diduga berkaitan dengan mutu semen yang digunakan dalam penelitian ini. Rendahnya motilitas dan kerusakan membran akrosom dapat pula menyebabkan rendahnya fertilisasi yang dicerminkan oleh rendahnya angka pembelahan (*cleavage*).

#### 5.2.5. Viabilitas embrio pasca pembekuan

Embrio yang dihasilkan melalui program IVF harus dapat dan mampu menghadapi cekaman akibat pembekuan. Tabel 2 menunjukkan kemampuan tumbuh dan berkembangnya morula dan blastosis yang dihasilkan pada eksperimen ini setelah mengalami pembekuan dan "thawing". Lebih dan 70% morula yang dibekukan mampu berkembang menjadi blastosis dan *expanded blastocyst*. Dan hanya 20% yang mengalami degenerasi, sedangkan sekitar 10% menunjukkan stagnasi perkembangan pada stadium yang sama. Perlu kajian lebih mendalam apakah morula yang ada telah pula mengalami kematian sel atau menuju degenerasi.

Tabel 2. Perkembangan embrio pada kultur pasca pembekuan

Stadium perkembangan saat pembekuan	Stadium perkembangan setelah kultur pasca pembekuan			
	M	BL	XBL	DEG
Morula (M)	2 (10%)	11 (55%)	3 (15%)	4 (20%)
Blastosis (BL)	-	2 (18%)	8 (73%)	1 (9%)

Sementara itu pembekuan embrio pada stadium blastosis menunjukkan angka perkembangan embrio yang dikultur pasca pembekuan dan "thawing" relatif tinggi (73%) dengan hanya 9% yang mengalami degenerasi. Sementara itu sekitar 18% blastosis yang terbentuk tetap pada stadium yang sama setelah mengalami kultur 1-2 hari. Hasil ini mengindikasikan bahwa embrio pada tahap blastosis relatif lebih tahan terhadap berbagai kemungkinan cekaman dingin dan suhu rendah.



## **Analisis struktur ultra sel telur dan embrio**

Analisis struktur ultra guna melinat perkembangan dan hambatan yang dihadapi oleh sel telur dan embrio dalam upayanya tumbuh dan berkembang merupakan unsur penting yang dikerjakan dalam penelitian ini. Pengerjaan preparat dan analisis menggunakan mikroskop elektron transmisi, akan dikerjakan di Jurusan Anatomi dan Fisiologi, Royal Veterinary and Agricultural University (RVAU), Kopenhagen Denmark. Para peneliti akan mengoleksi sel telur dan embrio sebagaimana protokol yang dijelaskan secara garis besar di depan dan sebagaimana secara rinci dijelaskan pada Lampiran. Kesepakatan dengan pihak RVAU Denmark memungkinkan sampel baik berasal dari set telur anak sapi dan sapi dewasa dapat dikerjakan pada bulan Februari 2002. Gambaran dari analisis struktur ultra diharapkan dapat menjelaskan kondisi sel telur anak sapi secara ultra mikro pada taraf seluler dan molekuler, guna menjawab rendahnya angka pembentukan embrio dari sel telur yang berasal dari anak sapi.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil sementara yang dapat diperoleh dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Produksi embrio dengan sumber sel telur sapi dewasa dapat berjalan pada kondisi laboratorium yang terbatas, meskipun masih relatif rendah dibandingkan dengan yang dicapai di negara maju.
2. Dengan berbagai upaya perbaikan sistem kultur angka keberhasilan berupa produksi embrio yang layak transfer dapat dicapai.
3. Embrio hasil PEIV dapat dibekukan dengan kemampuan berkembang pasca pemebejukan yang relatif tinggi.

### Saran

1. Perlu improvisasi penggunaan alat kultur yang lebih murah dan sederhana agar hasil yang dicapai relatif memadai meskipun dikerjakan pada laboratorium yang serba terbatas.
2. Guna mengetahui kondisi seluler dan molekuler pada tingkat oosit dan embrio tahap perkembangan dini perlu analisis struktur ultra.

## DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, D.T., Holm P., Irvine B., Petersen, B.A., Stubbing, R.B., McLean, B., Stevens, G., and Seamark, R.F., 1992. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, 38: 667-678.
- Armstrong, D.T., Irvine B., Earl, C.R., McLead, D. and Seamark, R.F., 1994. Gonadotropin stimulation regimen for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 42: 1227-1236.
- Armstrong, D. T., Kotaras, P. J., and Earl, C. R. 1997. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reproduction, Fertility and Development*. 9 : 333-339.
- Assey, R.J., Hyttel, P., Greve, T., Purwantara, B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development* 37, 335-344.
- Avery, B., Melsted, J.K., Greve, T. 2000. A novel approach for in vitro production of bovine embryos; use of the oxid atmosphere generating system. *Theriogenology* 54: 1259-1268.
- Bedirian, K.N., and Baker, R.D. 1975. Follicular development, oocyte maturation and ovulation in gonadotropin treated prepubertal calves. *Canadian Journal of Animal Science* 55, 193-199.
- Betteridge, K.J. 1977. Embryo transfer in farm animals : A review of techniques and application. *Monograph No 16*. Agriculture Canada. pp 34-41.
- Brackett, R. B., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., and Dressel, M. A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27 : 147 - 158.
- Brogliatti G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology* 45, 1163-1176
- Callesen, H., Libonussen, T., Greve, T., 1996. Practical aspects of multiple ovulation - transef in cattle. *Animal Reproduction Science* 42: 215-226.
- Dahlhausen, R. D., Dresser, B. L., and Ludwick, T. M. 1980. In vitro maturation of prepubertal lamb oocytes and preliminary report on fertilisation and cleavage. *Theriogenology* (vol.13): 93

- Earl, C. R., Armstrong, D. T., and Irvine, B. J. 1994b. Juvenile *in vitro* fertilization-embryo transfer (3WET): the *in vitro* production of viable embryos from oocytes obtain from gonadotropin-stimulated juvenile calves and Lambs. *Proc. Aust. Assoc. Anim. Artif. Breeders.* 7:25-27.
- Earl, C. R., Irvine, B. J., Kelly, J. M., Rowe, J. P., and Amstronng, D. T. 1995. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and *in vitro* embryo production from 8 to 9 week old lambs. *Theriogenology.* 43:203.
- Galli, C., and G. Lazzari. 1996. Practical Aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science.* 42;371-379.
- Garcia, M. 1988. An abattoir survey of reproductive organ abnormalities from female zebu cattle. *ACTA Vet. Scandinavian (Suppl. 83).* 3445.
- Garcia-Bojalil, C. M., C. R. Staples., J. D. Savio., M. Drost., and W. W. Tatcher. 1991. Effect of dietary protein on follicle growth and embryo development of superovulated non-lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 74 (suppl. 1) : 95.
- Gardner, D.K., Lane, M, and Batt, P.A. 1994. 1994. Nutrient uptake and enzyme activity of the preattachment goat embryo developed *in vivo*. *Theriogenology*41: 204.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. Wallingford. 640 p.
- Greve, T. and B. Purwantara. 1992. Ultrasonography in embryo transfer practice. A Review. *Proceeding 8<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France.*
- Greve, T. and B. Purwantara. 1993. Ultrasonography in embryo transfer practice.. A Review. *Proceeding 9<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France.* 137-147.
- Hendri. 1997. Efektifitas penambahan berbagai jenis dan konsentrasi serum serta kokultur sel-sel epitel tuba fallopii dan kumulus pada TCM-199 dalam produksi embrio sapi *in vitro*. Disertasi. Program Pascasaqana Institut pertanian Bogor. Bogor. 140 p.
- Kajihara, Y., Blakewood, E. G., Myers, M. W., Kometani, N., Goto, K., and Godke, R. A. 1991. *In vitro* maturation and vertilization of follicular oocytes obtained from calves. *Theriogenology.* 35: 220.
- Kotaras. P. J., Earl, C. R., Kelly, J. M., Rowe, J. P., de Barro, T. M., and Armstrong. 1995. Pregnancies from *in vitro* matured and fertilised prepubertal calf oocytes. *Serono Int. Symp. on Superovulation and Oocyte Maturation.* p. 30.

- Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser., and N. L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*. 23 : 753-759.
- Lewis, I., Owens, J., and Prime, P. 1995. The commercial production of offspring from two to five months old heifers and the effects on later fertility. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 27:29.
- Lohuis, M. M. 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programmes. *Theriogenology*. 43: 51-60.
- Looney, C. R., Damiani, P., Lindsey, B. R., Long, C. R., Gonseth, C. L., Johnson, D. L., and Doby R, T. 1995. Use of prepubertal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotropin treatment. *Theriogenology*. 43 : 269 (abstract).
- Loos de, F.A.M., van Vliet , C, van Maurick, P and Kruij, T.A.M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Garnet Research* 24: 797-204.
- Mermillod, P., C. Boccart., C. Wils., A massip., and F. Dessy. 1992. Effect of oviduct-condition medium and of cumulus cells on bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology*. 37 : 256.
- Moreno, J. F., C. J. Turczynski., G. Flores-Foxworth., and D. C. Craemer. 1992. Influence of parity of donor and presence of a CL on quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Biol. Reprod.* 46 (suppl. 1). 65 (Abs. 60).
- Nicholas, F. W., and Smith, C. 1983, Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36: 341-353.
- Nicholas, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. 1996. *Animal Reproduction Science*. 42: 205-214.
- Onuma, H., and Foote, R. H. 1969. In vitro development of ova from pubertal cattle. *J. Dairy Sci.* 52: 1085-1087.
- Palma, G. A., Clement-Sengevald ., and Krefft, H. 1993. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology*. 39: 278.
- Palma, G. A. 1994. Effects of FSH and Estradiol-17 $\beta$  for maturation of calf oocytes on the in vitro development to blastocyst. *Theriogenology*. 41: 267.
- Pieterse, M.C. 1990. Clinical use of ultrasound in bovine reproduction. Thesis. Rijksuniversiteit Utrecht. The Netherlands. 171 pp.

- Presicce, G. A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C.R., Godke, R. A., and Yang, X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biology of Reproduction*. 56 : 386 - 392.
- Purwantara, B. and T. Greve. 1991. Dynamics of ovarian follicular population prior to and during superovulation in heifers. *ARTA Vol II*, 130.
- Purwantara, B. and T. Greve. 1991. Effect of intra ovarian status on the superovulatory response in heifers, *ARTA Vo. II*, 162.
- Purwantara, B., M. Schmidt, T. Greve. 1991. Intra ovarian changes and embryo recovery rate in two different superovulation regiment in cattle. *Proceeding 7<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Cambridge, UK*.
- Purwantara, B., R.J. Assey, M. Schmidt, P. Hyttel, T. Greve. 1992. Dynamics of the first follicular wave in cattle following cloprestenol induced luteolysis. *Proceeding 12<sup>th</sup>. International Congress on Animal Reproduction (ICAR), The Hague, The Netherlands*.
- Purwantara, B. M. Schmidt, T. Greve and H. Callesen. 1993. *Follicular Dynamics Prior to and During Superovulation in Heifers Theriogenology 40:913-921*.
- Purwantara B. M. Schmidt, H. Callesen, T. Greve. 1994. Follicular development and embryo Recovery following 3 versus 8 FSH injections in Heifers *ACTA Vet Scand*, 33, 89-92.
- Purwantara, B. . 1995. *Ultrasonography of Donor and Recipient in Bovine Embryo Transfer program. Proc. Symp on Biotech of Animal Reprod, Bogor, Indonesia*.
- Purwantara B, H. Callesen, T. Greve. 1995. Characterization of Ovulation on Superovulated Cattle. *Anim Reprod. Sci*.
- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf dan M. Agil. 1999. *Produksi, Kriopreservasi, dan Penentuan Jenis kelamin Embrio Hasil Fertilisasi in vitro menggunakan sumber se) telur anak sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/1*.
- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf dan Amrozi. 2000. *Produksi, Kriopreservasi, dan Penentuan Jenis kelamin Embrio Hasil Fertilisasi in vitro menggunakan sumber sel telur anak sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/2*.
- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf , M. Agil and Amrozi. 2000. Effect of age and hormone administration on ovarian stimulatory response in bovine juvenile. *14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden 2-6 July, 2000*.

- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Benard, J. P. and Heyman. 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilised oocytes from calves compared to that of cows. *J. Reprod. Fertil.* 103 : 115-120.
- Seidel, G. E., Larson, C. H., Spilman, C. H. Hahn, J., and Foote, R. H. 1971. Culture and transfer of calf ova. *J. Dairy Sci.* 54: 923-926.
- Supriatna, I., T.L. Yusuf, B. Purwantara, D. G. Moekti, L.P. Hemomoadi. A study on the purification of anti-PMSG and its neutralization dose against PMSG on superovulation in dairy cattle. *Proceeding 13th International Congress on Animal Reproduction. Vol 3. P19-27 (1996).*
- Tervit, R. , Mc Millan, W., Mc Gowan, L., Smith, J., Voges, H. ,Lynch, P., Larsen, J., and Hall, D. 1995. Follicle development, superovulation and in vitro embryo production from calves. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 27:1
- Tervit. H. R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science.* 42: 227-238.
- Thompson, J. G. 1997. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 341-354
- Vajta G, P. Holm, T. Greve, H. Callesen. 1997. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture. A technique report. *Theriogenology.* 48 : 1379-1385.

## Lampiran 1.

Tabel 1. Kualitas sel telur sesuai dengan parameter morfologis

Kategori Kualitas	Kondisi <i>cumulus oocyte complex</i> (COC)
A	Sel-sel kumulus tersusun kompak terdiri atas beberapa lapis, ooplasma nampak homogen dan kompleks kumulus-ooosit (COC) nampak cerah dan transparan.
B	Sel-sel kumulus tersusun kompak terdiri atas 2-4 lapis, ooplasma nampak homogen tetapi terdapat daerah gelap pada permukaan ooosit, COC nampak lebih gelap dan kurang transparan.
C	Sel-sel kumulus hanya 1 lapis dan/atau tidak terlalu kompak, ooplasma kurang beraturan dengan "cluster" yang gelap, COC nampak tidak beraturan dan gelap.
D	Sel-sel kumulus mengalami ekspansi (pemekaran) atau terserak dalam matriks bertendir yang beraspek gelap atau sama sekali tidak ditemukan adanya sel-sel kumulus (gundul), COC nampak gelap dan tak beraturan.



**Lampiran 2.****Preparation of in vivo developed bovine cleavage stage embryos  
for ultrastructural autoradiography**

- experimental protocol

1. Surgical flushing of zygotes/embryos after removal of oviduct and tip of uterine horn, alternatively flushing in situ.
2. Preparation of droplets for uridine incubation in 25 mM bicarbonate buffered TCM199 supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, cat. A4919). Prepare a 5 µl droplet in each well of a 4 well multidish, cover with paraffin oil (Uvasol Merck, cat. 107161), add 65 µl TCM199 supplemented with 1% BSA to the droplet and finally add 20 µl of <sup>3</sup>H-uridine (5(<sup>3</sup>H) Uridine, Amersham, art. 550160/L, 1mCi/ml). This results in a final concentration of <sup>3</sup>H-uridine of 200 µCi/ml. The droplets should be equilibrated at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> in humidified air for at least 30 min. The zygotes/embryos are then transferred into the droplets in 10 µl medium resulting in a final volume of the droplet of 100 µl.
3. Incubate the zygotes/embryos (one 100 µl droplet per animal) for 20 min under the above mentioned conditions.
4. Wash the zygotes/embryos twice in PBS supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 4°C.
5. Hold the zygotes/embryos in PBS supplemented with 10% FCS and 5mg/ml of unlabelled uridine (Sigma, cat. U3003) for 30 min at 4°C.
6. Wash the zygotes/embryos twice in PBS supplemented with 10% FCS at 4°C.
7. Fix the zygotes in 3% glutaraldehyde in 0.1 M Na-phosphate buffer for 1 h at 4°C.
8. Store the zygotes/embryos in 0.1 M Na-phosphate buffer.
9. Load the zygotes/embryos into straws **completely filled** with 0.1 M Na-phosphate buffer and mail them to:

Professor Poul Hyttel, DVM, PhD, DVSc  
Department of Anatomy and Physiology  
Royal Veterinary and Agricultural University  
Groennegaardsvej 7, DK-1870 Frederiksberg C  
Denmark  
Telephone: +45 3528 2541  
Fax: +45 3528 2547  
E-mail: poh@kvl.dk