

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING II/5 PERGURUAN TINGGI
TARUN ANCGARAN 1997 / 1998**

**KAJIAN APLIKASI hCG PADA SUPEROVULASI
PMSG-MoAb ANTI PMSG DALAM USAHA PENINGKATAN
HASIL PANEN, SERTA APLIKASI METODA *DIRECT TRANSFER*
DALAM KRIOPRESERVASI EMBRIO SAPI PERAH**

**IMAN SUPRIATNA
TUTY L. YUSUF
BAMBANG PURWANTARA
GOZALI MOEKTI
LIES PARDEDE HERNOMODI**



**Dibiayai oleh Proyek : Peningkatan Penelitian dan Pengabdian
Pada Masyarakat
Kontrak No. : 03/P2 IPT/DPPM/97/PHB II/5/V/97, Tanggal 20 Mei 1997
Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan dan Kebudayaan**

**BAGIAN REPRODUKSI DAN KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

1998

KATA PENCANTAR

Dalam mencapai kemajuan bangsa dan akselerasi pembangunannya, ilmu pengetahuan dan teknologi (iptek) memegang peranan yang penting dan sangat menentukan. Keberhasilan PJP Tahap II sangat tergantung dari kualitas sumber daya manusia pembangunan termasuk kemampuan mengadopsi dan mengembangkan iptek serta kemampuan memanfaatkan teknologi dan bioteknologi yang akan menentukan keunggulan komparatif dan kompetitif dari sistem produksi

Salah satu tantangan yang terpampang di depan pembangunan peternakan adalah masalah produksi. Sampai saat ini, masih terus diimpor ternak sapi ataupun peralatan dan bahan-bahan biologik yang menunjang peningkatan produksi ternak sapi. Dalam menanggulangi kendala ini perlu penggunaan metoda-metoda teknologi tingkat tinggi baik di laboratorium maupun di lapangan. Tanpa kemampuan dan keterampilan menguasai teknologi tinggi, maka ketergantungan terhadap pasokan bahan impor tidak dapat dihindari. Untuk itu paket teknologi tinggi yang berorientasi ke produksi harus diraih dan dikuasai.

Laporan hasil penelitian ini, merupakan kegiatan yang dilakukan di tahun terakhir dari rangkaian penelitian yang direncanakan selama 5 tahun. Sehubungan dengan pelaksanaan penelitian ini patut diucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, beserta Staf, Ketua Lembaga Penelitian, IPB beserta Staf dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, IPB yang telah memberikan kesempatan dan peluang untuk melaksanakan penelitian Hibah Bersaing. Selain itu terima kasih ini disampaikan pula pada Pimpinan PT. Tsukishima Indomilk Agroindustri, Sagaranten-Sukabumi dan Konsultan Reproduksi Ternak PT Tsukishima, Drh. Muchidin Noordin dan Staf atas bantuannya dalam pelaksanaan transfer embrio.

Suatu hal yang tidak dapat dilupakan kepada Bapak Guswar Burhanuddin, Direktur PT Surya Dairy Farm, Sukabumi yang telah memberika kesempatan untuk pelaksanaan penelitian di peternakan yang dipirnpinnya, juga kepada Bapak Deden dari peternakan Parung Panjang serta Bapak Suprptoно dari peternakan Cinagara yang telah membantu

pelaksanaan transfer embrio di daerahnya, diucapkan terima kasih. Peneliti juga berhutang terima kasih kepada rekan-rekan Ir Rudi Harsono dan Drh. Ismail yang telah membantu pelaksanaan transfer embrio.

Demikian pula diucapkan terima kasih kepada Ketua Jurusan Reproduksi dan Kebidanan FKH-IPB yang telah mengizinkan dan memberi dukungan penuh untuk pengembangan iptek dan sumberdaya manusianya, serta seluruh Staf yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Sebenarnya suatu penelitian yang baru selesai dikerjakan, merupakan awal bagi penelitian lainnya. Penelitian tidak pernah akan berakhir, dan selalu menimbulkan banyak lagi pertanyaan yang memerlukan jawaban melalui penelitian lanjutannya. Begitu pula penelitian ini masih memerlukan kaji ulang agar mendapatkan hasil yang komprehensif dan komparatif yang sempurna sehingga dapat bermanfaat bagi peternak sapi khususnya dan masyarakat banyak pada umumnya.

Bogor, Februari 1998

Penulis

RINGKASAN

KAJIAN APLIKASI hCG PADA SUPEROVULASI PMSG-MoAb ANTI PMSG DALAM USAHA PENINGKATAN HASIL PANEN, SERTA APLIKASI METODA DIRECT TRANSFER DALAM KRIOPRESERVASI EMBRIO SAPI PERAH (Iman Supriatna*, Tuty L. Yusuf*, Bambang Purwantara*, Gozali Moekti, Lies Parede Hernomoadi**, 1998, ix + 74 Halaman)**

Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) merupakan hormon gonadotropin eksogen yang sangat potensial dalam menimbulkan respon superovulasi pada ternak sapi. Jumlah folikel yang terstimulasi untuk tumbuh, berkembang dan matang cukup tinggi, akan tetapi yang ovulasi dan berkembang menjadi CL masih rendah yang akan memberi dampak rendahnya jumlah embrio hasil panen. Folikel yang ovulasi akan menetap menjadi folikel persisten. Keberadaan folikel persisten (*unovulatory follicle*) yang terbentuk dari superovulasi, merupakan sumberdaya biologis berupa oosit yang masih dapat dieksploitasi untuk dijadikan embrio. Selain itu estrogen yang disekresikan oleh folikel persisten dapat mempengaruhi keseimbangan hormonal, juga residu PMSG yang masih bersirkulasi dan menimbulkan *negative rebound effect*, dapat menurunkan kualitas embrio hasil panen.

Untuk menekan terbentuknya folikel persisten dan mengatasi *negative rebound effect* dari PMSG terhadap kualitas embrio dan untuk meningkatkan hasil panen melalui eksploitasi total oosit yang tersedia dalam folikel-folikel hasil stimulasi PMSG, perlu diuji selain aplikasi MoAb, juga dikombinasi dengan aplikasi hCG, agar seluruh folikel hasil superovulasi dapat diovulasikan. Diharapkan dengan ovulasi total akan diperoleh peningkatan baik hasil panen maupun dalam peningkatan perbaikan kualitas embrio.

Peningkatan hasil panen harus diimbangi atau disertai dengan cukupnya persediaan resipien yang akan menerima embrio. Sampai saat ini untuk memperoleh persediaan resipien yang memadai masih sulit dicapai. Selain itu juga masih sulit diperoleh resipien yang sinkron dengan donor. Untuk mengatasi kesulitan tersebut, kelebihan hasil panen embrioyang tidak dapat segera ditransfer, dapat dibekukan melalui metoda dalam program

kriopreservasi (*long term storage*), dalam nitrogen cair bertemperatur -196°C . Embrio beku ini dapat dicairkan sewaktu-waktu sesuai dengan tersedianya resipien.

Pelaksanaan transfer embrio beku dilapangan, terutama dipeternakan rakyat, penerapan metoda konvensional *step by step* sulit untuk dilakukan, karena diperlukan teknisi terampil, peralatan, waktu dan biaya yang tinggi. Metoda lain yang telah terbukti dapat dipakai dalam transfer embrio beku pada kondisi lapang adalah *direct transfer*, karena praktis tidak memerlukan mikroskop, tidak memerlukan peralatan pendukung evaluasi embrio, sederhana dan ekonomis. Hanya saja sampai saat ini masih perlu ditentukan jenis krioprotektan dan larutan pembilas (*cryoprotectant removal*) yang cocok, efektif dan efisien untuk kriopreservasi menggunakan metoda *direct transfer*. Untuk mengatasi masalah tersebut perlu dirancang metoda *direct transfer* yang menggunakan *cryoprotectant* dan *cryoprotectant removal solution* tertentu yang cocok dan aplikasi lapangnya yang praktis, sederhana dan ekonomis. Hasil yang diharapkan dari metoda tersebut dapat memberikan kualitas embrio beku pascapencairan yang tinggi, *survival rate* dan viabilitas yang tinggi pula.

Penelitian ini bertujuan untuk, a) menentukan ada tidaknya sinergisme MoAb Anti PMSG-hCG dalam peningkatan hasil panen embrio dari donor yang disuperovulasi dengan PMSG, b) menentukan jenis krioprotektan terbaik 1,5 M ethylene glycol (EG) atau 1,5 M 1,2-propanediol (PROH) untuk pembekuan embrio pada aplikasi metoda *direct transfer*, c) menentukan konsentrasi larutan sukrosa (0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M) yang terbaik untuk pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) embrio beku pascapencairan.

Percobaan tahap I: Sapi perah 25 ekor sebagai donor dibagi menjadi lima kelompok. Seluruh kelompok disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG i.m. di sore hari pada D10, dan pada D12 mendapat prostaglandin dua kali, pagi dan sore. Kecuali kelompok kontrol(I) semua kelompok(II, III, IV dan V) mendapat perlakuan pada waktu inseminasi pertama masing-masing 2,5 ml MoAb i.v., 3.000 IU hCG i.v., gabungan 2,5 ml MoAb dan 3.000 IU hCG i.v., kombinasi gabungan 2,5 ml MoAb i.v. dan 3.000 IU hCG i.m. Keberhasilan aplikasi gabungan MoAb dan hCG dalam menekan efek negatif dan dalam eksploitasi total

oosit dari folikel-folikel hasil superovulasi PMSG dapat dilihat dari peubah, a) adanya peningkatan ovulasi, b) tidak adanya folikel persisten, c) meningkatnya hasil panen baik produksi embrio per donor maupun peningkatan jumlah embrio laik transfer. Teknik analisis data untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan digunakan Sidik Ragam (*Anova*) dan dilanjutkan dengan uji BNJ untuk mengetahui perlakuan yang terbaik.

Percobaan tahap II: Embrio hasil panen yang berkualitas A (*excellent*) dan B (*good*) sebanyak 40 embrio dibekukan dalam krioprotektan 1,5 M EG dan 40 embrio lagi dalam 1,5 M PROH. Program pembekuan dengan *start* dan *seeding temperature* pada -6°C , *cooling rate* $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ dan *plunging temperature* -35°C . Penyimpanan dalam nitrogen cair- 196°C selama dua minggu. Seluruh embrio beku pascapencairan dibagi dalam empat kelompok, masing-masing 20 embrio dibilas dari krioprotektan dengan larutan sukrosa sebagai *cryoprotectant removal* berkonsentrasi 0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M. Peubah yang diukur adalah proporsi kualitas embrio beku pascapencairan, *survival* dan *viable rate* 24 jam kultur in vitro. Perbedaan *survival* dan viabilitas embrio diantara kelompok dievaluasi menggunakan analisis *Chi-square*.

Hasil percobaan tahap pertama menunjukkan, bahwa 2.500 IU PMSG dapat menstimulasi struktur fungsional ovari sebanyak 20,2 folikel dan CL, akan tetapi angka ovulasinya (*ovulation rate*) masih rendah 23,8%, yang berarti setiap donor memiliki 15,4 folikel pada saat panen. Aplikasi baik MoAb atau hCG, maupun kombinasi simultan MoAB-hCG pada donor yang disuperovulasi dengan PMSG dapat meningkatkan angka ovulasi ($P < 0,01$) dan menurunkan jumlah folikel persisten yang terbentuk. Angka ovulasi diantara kelompok donor yang mendapat perlakuan MoAb dan atau hCG tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) yaitu masing-masing angka ovulasi per donor kelompok yang mendapat MoAb i.v. 82,5%, hCG i.v. 82,2%, MoAb-hCG i.v. 90,1% dan kelompok yang disuntik MoAb i.v.-hCG i.m. 89,9%.

Produksi embrio dari donor yang disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG hanya mencapai 2,4 embrio laik transfer per donor. Hasil panen dapat meningkat secara berarti ($P < 0,05$), pada perlakuan penambahan aplikasi MoAb i.v. 9,6 embrio, hCG i.v. 9,4 embrio, MoAb-hCG i.v. 11,2 embrio dan aplikasi simultan MoAb i.v. – hCG i.m. dapat mencapai

9,6 embrio laik transfer per donor. Akan tetapi produksi embrio tidak ada perbedaan yang nyata ($P>0,05$) diantara kelompok donor baik yang mendapat aplikasi MoAb atau hCG, maupun kombinasi gabungan MoAb-hCG.

Hasil percobaan kedua membuktikan bahwa 1,5 M EG dapat melindungi sel-sel embrionik terhadap pengaruh destruktif selama proses kriopreservasi dengan *survival rate* 92,8 % lebih baik ($P<0,05$) dari pada 1,5 M PROH yang mencapai *survival rate* sebesar 78,6%. Embrio beku pascapencairan yang telah dikultur 24 jam in vitro dari embrio yang dibekukan dengan 1,5 M EG menunjukkan peringkat viabilitas yang sama atau tidak berbeda nyata ($P>0,05$) baik pada kelompok embrio beku yang direhidrasi langsung kedalam medium kultur MPBS 10% FBS dengan *viable rate* 80,0%, maupun direhidrasi dengan *cryoprotectant removal* 0,2 M sukrosa 80,0%, 0,4 M sukrosa 90,9% dan 0,8 M sukrosa 81,8%. Embrio beku dalam 1,5 M PROH, akan mencapai viabilitas yang tinggi, hanya jika direhidrasi langsung dengan 0,4 M atau 0,8 M sukrosa yaitu dengan *viable rate* masing-masing mencapai 83,3% dan 90,0%. Sedangkan embrio beku dalam 1,5 M PROH akan menurun viabilitasnya ($P<0,01$) jika direhidrasi langsung, *viable rate* menjadi 22,2% atau dibilas dengan 0,2 M sukrosa, viabilitas hanya mencapai 36,3%.

Hasil analisa data yang terkompilasi, membuktikan bahwa penyuntikan baik MoAb atau hCG, maupun kombinasi dari keduanya dapat meningkatkan hasil panen embrio pada sapi perah FH yang disuperovulasi dengan PMSG. Peningkatan hasil panen dari aplikasi MoAb atau hCG saja, tidak berbeda nyab dengan aplikasi gabungan kombinasi MoAb-hCG. Untuk meningkatkan hasil panen embrio dari sapi yang disuperovulasi dengan PMSG, cukup dikombinasi dengan MoAb Anti PMSG atau hCG saja.

Survival rate pascapencairan embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG lebih tinggi dari pada embrio yang dibekukan dalam 1,5 M PROH. Morfologi embrio beku dalam 1,5 M EG pascapencairan lebih baik dari pada 1,5 M PROH. Kultur 24 jam in vitro embrio beku 1,5 M EG baik yang dibilas langsung (rehidrasi) tanpa sukrosa, maupun yang direhidrasi dengan 0,2 M, 0,4 M, atau 0,8 M sukrosa sebagai *cryoprotectant removal* menunjukkan derajat viabilitas (*viable rate*) yang sama tingginya. Sedangkan embrio beku dalam 1,5 M PROH memiliki viabilitas yang sama tingginya dengan embrio beku dalam 1,5 M EG, jika direhidrasi langsung dengan 0,4 M atau 0,8 M sukrosa. Derajat viabilitas embrio beku

dalam 1,5 M PROH akan menurun drastis jika direhidrasi langsung dengan 0,2 M sukrosa atau direhidrasi langsung kedalam medium transfer atau kultur tanpa penambahan sukrosa.

(* Staf Pengajar, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor; ** Staf Peneliti, Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Kontrak No.: 03/P2IPT/DPPM/97/PHBII/5/V/97, Tanggal 20 Mei 1997).

SUMMARY

THE EFFECT OF hCG APPLICATION ON THE ANTI PMSG MoAb-PMSG SUPEROVULATED CATTLE IN INCREASING THE EMBRYO YIELD AND THE USE OF DIRECT TRANSFER METHOD IN EMBRYO CRYOPRESERVATION (Imao Supriatna, Tuty L. Yuauf, Bambang Purwantara, Gozali Moekti, Lies Parede Hernomoadi, 1998, ix + 74 Pages)

The Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) is known as the potential exogenous gonadotropic hormone in stimulating superovulatory response in cattle. The number of stimulated follicles that are able to grow into matured follicles are high but only a small number of them were completed as a CL, and as a result only a small proportion of the embryo is produced. As the ovulating follicles will stay as unovulatory persistent follicles, superovulation can be a means to produce biological reserved oocytes to be exploited further to embryos. Factors that reduce the quality of harvested embryos are follicle secreted estrogen that create hormonal imbalance and residual PMSG that able to provoke the negative rebound effect.

By suppressing the number of persisted follicles and overcoming the negative rebound effect of PMSG, the yielded oocytes in the superovulated follicles after PMSG stimulation are intended to be increased through the use of MoAb combine with hCG. This test is favored in increasing the number and the quality of embryo yield.

In matching with the increase of expecting embryos, an arrangement of the recipient have to be prepared. The preparation is not only in number but also in donor-recipient synchronization. To solve the problem of excessive embryos, the untransferable embryos can be cryopreserved in liquid nitrogen of -196°C . So whenever the synchronized recipient are exists the embryo is then thawed and transferred.

Embryo transfer in the field using frozen embryo by conventional step by step method is difficult to achieve, particularly concerning small holder farmer due to lack of expert technicians, instruments and is also time and capital consuming. A direct transfer method is preferred in the field where microscope and embryo evaluating instrument are not available and this method was considered simple and economical as well. An investigation is needed on the choices of cryoprotectant and cryoprotectant removal

solution utilized in embryo cryopreservation using direct transfer method. From such study the quality of post thawed embryo can be increased as well as their survival rate and viability.

The aims this study were: a) to consider the occurrence of synergism between Anti PMSG-MoAb and hCG in increasing the embryo yield of donor after superovulated by PMSG, b) to evaluate the best cryoprotectant of choice between 1.5 M ethylene glycol (EG) and 1.5 M 1,2-propanediol (PROH) in cryopreserving the embryo in direct transfer method, c) to indicate the best concentration of sucrose solution (0.2 M, 0.4 M, or 0.8 M) to be used as cryoprotectant removal solution on post liquefying of the embryo.

The first step experiment: 25 cattle, grouped into 5 were used as donor. All groups were superovulated by using 2,500 IU PMSG i.m. in the evening of D10 and on the D12 received PGF₂ α twice, in the morning and evening time. Except for the control group (I), all groups (II, III, IV and V) respectively were treated each with 2.5 ml MoAb i.v., 3,000 IU hCG i.v., combination of 2.5 ml MoAb with 3,000 IU hCG i.v., combination of 2.5 ml MoAb i.v. and 3,000 IU hCG i.m. during their first insemination. The good response after combine treatment of MoAb and hCG is the occurrences of reduced negative effect and of increased total oocyte count from superovulated follicles after using PMSG. The used parameters were: a) the increasing number of ovulation, b) inoccurrence of persistent follicles, c) increasing number of embryo as well as transferable embryo per donor. To know the most influencing factors, Anova and BNJ test were used in analyzing the data.

The second step experiment: 40 harvested embryos of grade A (excellent) and grade B (good) were cryopreserved in cryoprotectant solution 1.5 M EG and another 40 embryos in solution of 1.5 M PROH. The frozen program used were start and seeding temperature of -6°C, cooling rate of -0.3°C/minute, and plunging temperature of -35°C. The storage was in liquid nitrogen of -196°C for two weeks. After thawed, the whole number of embryos were divided into 4 groups of 20 each, diluted from any cryoprotectant with sucrose solution as the cryoprotectant removal in concentration of 0.2 M, 0.4 M and 0.8 M. The parameters used were proportional quality of the thawed embryo, survival and viability rate after 24 hours in the in vitro culture. The differences among the survival and viability rate between each groups were tested using Chi-square analysis.

The result of first experiment indicate that 2,500 IU PMSG is able to stimulate ovary to produce 20.2 follicles and CL with still low ovulation rate of 23.8%. It was concluded that each of donor produced 15.4 follicles during the harvesting time. The use of MoAb, hCG or the combined MoAb-hCG on donor after superovulated by PMSG are able to increase the ovulation rate ($P < 0.01$) and to decrease the forming of persistent follicle. Ovulation rate among each groups receiving MoAb and or hCG indicate the occurrence of non-significant difference ($P > 0.05$) between the groups. The percentage of ovulation rate in each donor receiving MoAb i.v. 82.5%, hCG i.v. 82.2%, MoAb i.v.-hCG i.v. 90.1% and MoAb i.v.-hCG i.m. 89.9%.

The production of embryo from donor superovulated by 2,500 IU PMSG reveals the achievement of only 2.4 transferable embryo per donor. There were significant increase on the amount of harvested embryo after treatment ($P < 0.05$). The number of transferable embryo per donor in each consecutive treated groups were MoAb i.v. 9.6 embryo, hCG i.v. 9.4 embryo MoAb-hCG i.v. 11.2 embryo, and MoAb i.v.-hCG i.m. 9.6 embryo, but there was no significant difference ($P > 0.05$) in embryo production between each groups of the donor.

The result of second experiment confirmed that 1.5 M EG was protective for embryonic cells against destructive influences during cryopreservative process. The result of survival rate was 92.8% better than ($P < 0.05$) 1.5 M PROH which achieve survival rate of only 78.6%. The 24 hours in vitro culture of embryonic cells derived from thawed cryopreserved embryo freezed by 1.5 M EG indicate similar viability score or no significant difference ($P > 0.05$) between each groups of cryopreserved embryo. When rehydrated, the consecutive viability rate is by 10% MPBS culture medium 80.0%, by cryoprotectant removal of 0.2 M sucrose 80.0%, by 0.4 M sucrose 90.9% and by cryoprotectant 0.8 M sucrose 81.8 %. High viability rate of frozen embryo in 1.5 M PROH was occurred only if rehydration is by sucrose solution of 0.4 M 83.3% and by 0.8 M 90.0%. Low achievement of viability rate was occurred ($P < 0.01$) if the rehydration is using MPBS culture medium (22.2%) or diluted with 0.2 M sucrose solution (36.3%).

The analysis of compiled data indicate that injection of MoAb, hCG, or combination of both were able to increase the embryonic yield of FH dairy cattle after superovulated by PMSG. There were no significant difference in embryonic yield whether

using only MoAb or hCG alone or using the combination of MoAb-hCG. For high yield after superovulated by PMSG, the cattle needed treatment with either only Anti PMSG MoAb or hCG.

The survival rate of thawed embryo after cryopreserved in 1.5 M EG was higher than if they were done in 1.5 M PROH. Similarly the morphology of thawed embryo cryopreserved in 1.5 M EG was better than 1.5 M PROH. When the 1.5 M EG embryo were cultured in vitro, direct rehydration either without sucrose or with sucrose solution of 0.2 M, 0.4 M or 0.8 M as the cryoprotectant removal had achieved similar high viability rate. The 1.5 M PROH embryo when cultured was able to stretch into high viability rate similar to 1.5 M EG embryo only if rehydrated with 0.4 M and 0.8 M sucrose. The viability rate of 1.5 M PROH embryo will show a drastic decrease if they are rehydrated using 0.2 M sucrose or transfer medium or culture medium without addition of sucrose solution.

(*Lecturers in Reproduction Physiology and Artificial Insemination, Department of Animal Reproduction and *Obstetrics*, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University; **Research Fellow of the Central Veterinary Research Institute, Bogor. Contract No.: 03/P2IPT/DPPM/97/PHBII/5/V/97, Tanggal 20 Mei 1997).

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
2.1 Tujuan	6
2.2 Manfaat Penelitian	7
III. STUDI PUSTAKA	8
3.1 Perkembangan Folikel Preovulatoris.....	8
3.2 <i>Follicle Stimulating Hormone</i> (FSH)	9
3.3 <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i> (PMSG)	10
3.4 Superovulasi Komparatif Antara PMSG dengan FSH	11
3.5 <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (hCG)	12
3.6 Metoda-Metoda Imunologi Dalam Reproduksi	13
3.7 Antibodi (Immunoglobulin) Anti PMSG Dalam Superovulasi .	15
3.8 Indikasi Untuk Intravenous Immunoglobulin	16
3.9 Kriopreservasi	18
3.10 Krioprotektan Ethylene Glycol dan 1,2-Propanediol (Propylene Glycol).....	19
3.11 Metoda <i>Direct Transfer</i> Dalam Kriopreservasi Embrio	21
3.12 Metoda Pemupukan Embrio In Vitro	22
IV. MATERI DAN METODA PENELITIAN	25
4.1 Materi Penelitian	25
4.1.1 Hewan Percobaan	25
4.1.2 Peralatan dan Bahan	25
4.2 Metoda Penelitian	25
4.2.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap I	25

4.2.1.1 Pengaruh Pemberian MoAb Anti PMSG pada Donor Sapi Perah FH yang disuperovulasi dengan PMSG Terhadap Struktur Fungsional Ovaria (CL dan Folikel), Jumlah Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>), Hasil Panen Embrio (<i>Recovery Rate</i>) dan Kualitas Embrio (<i>Transferable</i> dan <i>Untransferable Embryo</i>)	27
4.2.1.1.1 Aplikasi MoAb Anti PMSG Dalam Program Superovulasi	27
4.2.1.1.2 Inseminasi Buatan Pada Kelompok Donor (Kontrol dan Perlakuan)	28
4.2.1.1.3 Evaluasi Pengaruh Aplikasi MoAb Anti PMSG atau hCG	30
Penentuan Jumlah Struktur Fungsional Ovaria (Banyaknya Folikel dan CL)	30
Angka Rataan Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>)	30
Angka Rataan Folikel yang Menetap (<i>Unovulatory Follicle Rate</i>)	31
4.2.1.2 Metoda Pemanenan Embrio dan <i>Recovery Rate</i> Hasil Superovulasi	31
4.2.1.3 Evaluasi dan Klasifikasi Kualitas Embrio Hasil Panen (Jumlah dan Kualitas Embrio)	35
4.2.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap II	37
4.2.2.1 Aplikasi Metoda Direct Transfer Dalam Kriopreservasi	37
Seleksi dan Penentuan Kualitas Embrio Prapembekuan	37
Media Krioprotektan dan <i>Cryoprotectant Removal</i>	38
Equilibrasi dan Pengemasan Embrio	38
Proses Pembekuan (Kriopreservasi) dan Penyimpanan	38
4.2.2.2 Evaluasi Keberhasilan Kriopreservasi	39
Evaluasi dan Klasifikasi Embrio Beku Pascapencairan	39
Penentuan Viabilitas Embrio Beku Secara In Vitro	39
Desain Penelitian dan Analisa Data	40
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
Percobaan Tahap I	
5.1 Evaluasi Hasil Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG pada Donor Sapi Perah yang Disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG	42
5.1.1 Respon Ovaria Donor Berupa Pembentukan Struktur Fungsional Folikel dan CL	43
5.1.2 Peringkat Keberhasilan Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>) dan Angka Rataan Folikel Persisten (<i>Unovulatory Follicle Rate</i>)	45
5.1.3 Hasil Pemanenan Embrio dari Program Superovulasi (<i>Recovery Rate</i> dan Peringkat Produktivitas Donor)	46
5.1.4 Evaluasi dan Klasifikasi Kualitas Embrio	48
5.1.5 Stadia Perkembangan Embrio dari Pemanenan Hasil Superovulasi	49

11. Proporsi Sebaran Stadia Embrio Hasil-Hasil Superovulasi Menggunakan Hormon PMSG, dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan	49
12. Perbandingan Jumlah Embrio yang Laik Transfer dan Tidak Laik Transfer, dari Kelima Kelompok Program Superovulasi 2.500 IU PMSG yang Berbeda dalam Perlakuan Kombinasi Aplikasi MoAb dan hCG	50
13. Komposisi Sebaran Kualitas Embrio Hasil-Hasil Superovulasi Menggunakan Hormon 2.500 IU PMSG, Tanpa Atau Dengan Kombinasi Perlakuan MoAb dan hCG.....	51
14. Peringkat Keberhasilan Secara Komparatif Dari Kelima Kelompok yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan.....	52
15. Perbandingan Kualitas Pascapencairan Embrio Beku Dalam Krioprotektan 1,5 M Ethylene Glycol (EG) dan 1,5 M 1,2-Propanediol (PROH).....	55
16. Pengaruh 1,5 M Ethylene Glycol (EG) dan 1,5 M 1,2 Propanediol (PROH) Sebagai Krioprotektan Terhadap <i>Survival Rate</i> Embrio Beku Pascapencairan.....	55
17. <i>Viable Rate</i> Embrio Beku Pascapencairan (Pascapembilasan) Setelah Dikultur In Vitro Selama 24 Jam	57

Lampiran

1. Rata-rata Struktur Fungsional Ovaria (Folikel dan CL), Embrio Trekoleksi (<i>Recovery Rate</i>) dan Tingkat Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>) Pada D7 Dari Kelompok 1 (Kontrol) Donor Yang Disuperovulasi Hanya dengan 2.500 IU PMSG	67
2. Komposisi Embrio Laik Transfer, Tidak Laik Transfer dan Stadia Perkem-bangan Embrio Hasil Pembilasan Uterus (<i>Flushing</i>) Pada D7 Dari Kelompok (Kontrol) Donor yang Disuperovulasi Hanya dengan 2,500 IU PMSG.....	67

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Rancangan Penelitian Tahap I Dalam Pelaksanaan Aplikasi MoAb Anti PMSG Dan Atau hCG Untuk Peningkatan Hasil Panen Embrio.....	28
2.	Skema Prosedur Kerja Waktu Aplikasi MoAb Anti PMSG Dan Atau hCG Dalam program Superovulasi Yang Mencakup Jadwal dan Dosis Penyuntikan, Inseminasi Buatan, Panen Embrio dan Evaluasi ..	29
3.	Komposisi Kimiawi Medium Pembilas Uterus Donor Dalam Bentuk Larutan PBS yang Dimodifikasi	32
4.	Klasifikasi Embrio Sapi Donor yang Terkoleksi Pada Pembilas D7 Berdasarkan Penampilan Umum Morfologis	36
5.	Peringkat Kualitas Embrio Beku Sapi D7 Setelah Pencairan Berdasarkan Evaluasi Mikroskopis Penampilan Umum Morfologis ...	40
6.	Rancangan Percobaan Tahap II Untuk Penentuan Jenis Krioprotektan (EG atau PROH) dan Konsentrasi Sukrosa Sebagai <i>Cryoprotectant Removal</i> Dalam Kriopreservasi Embrio Menggunakan Metoda <i>Direct Transfer</i>	41
7.	Respon Ovaria Berupa Pembentukan Struktur Fungsional (Folikel dan CL) Dari Kelima Kelompok Donor yang Disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan	44
8.	Peringkat Keberhasilan dan Kegagalan Ovulasi dari Kelima Kelompok Donor yang Disuperovulasi Dengan 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan	46
9.	Perbandingan Hasil Panen Embrio Per Donor (Recovery Rate) dari Kelompok Kontrol dan Perlakuan Yang memperoleh MoAb, hCG atau Kombinasi Gabungan MoAb dengan hCG	47
10.	Perbandingan Rataan Produksi Embrio per Donor Hasil Panen Pada D7 dari Kelima Kelompok Donor yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG, Tanpa Atau Dengan Kombinasi Perlakuan	48

5.1.6 Kualitas Embrio Hasil Panen dari Program Superovulasi	49
5.1.7 Peringkat Keberhasilan Produksi Embrio	51
Percobaan Tahap II	
5.2 Metode <i>Direct Transfer</i> Dalam Kriopreservasi Embrio Sapi Perah	53
5.2.1 Kualitas Pascapencairan Embrio Beku	54
5.2.2 <i>Survival Rate</i> Embrio Beku Pascapencairan	55
5.2.3 Viabilitas Embrio Beku	56
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	69
6.1 Kesimpulan	59
6.2 Saran	60
VII. DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	67

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING II/5 PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 1997/1998**

A. Judul : Kajian Aplikasi hCG Pada Superovulasi PMSG-MoAb Anti PMSG Dalam Usaha Peningkatan Hasil Panen, Serta Aplikasi Metoda *Direct Transfer* Dalam Kriopreservasi Embrio Sapi Perah

B. Penanggung Jawab Penelitian :

Nama : Dr. Iman Supriatna
Jenis Kelamin : Laki-laki
Pangkat/Gol. : Pembina, IV/a
NIP : 130871930
Bidang Keahlian : Biologi Reproduksi
Fakultas/Jurusan : FKH, Reproduksi dan Kebidanan
Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

C. Tim Peneliti :

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr. Iman Supriatna	Embrio Transfer Biologi Reproduksi	FKH/Reproduksi dan Kebidanan	IPB
2.	Dr. Tuty L. Yusuf, MS	Embrio Transfer Biologi Reproduksi	FKH/Reproduksi dan Kebidanan	IPB
3.	Dr. Bambang Purwantara, MSc	Embrio Transfer Biologi Reproduksi	FKH/Reproduksi dan Kebidanan	IPB
4.	Dr. Gozali Moekti	Imunologi Terapan		BALITVET
5.	Dr. Lies Parede Hermomoadi, MSc	Imunologi Terapan		BALITVET

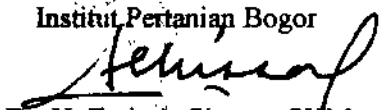
D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 5 tahun

Biaya total yang diusulkan : Rp. 290.475.000

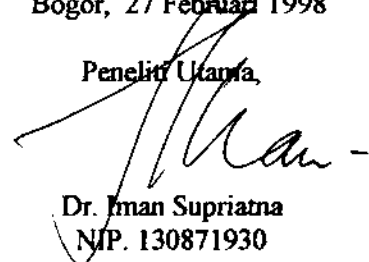
Biaya yang disetujui tahun 1996/1997 Rp. 45.080.000


Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor


Dr. H. Emir A. Siregar, SKM
NIP. 130321045

Bogor, 27 Februari 1998

Peneliti Utama,


Dr. Iman Supriatna
NIP. 130871930

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Institut Pertanian Bogor

Prof. Dr. Ir. Dudung Darusman, MA
NIP. 130516498

3. Rata-Rata Struktur Fungsional Ovaria (Folikel dan CL), Embrio Terkoleksi (<i>Recovery Rate</i>) dan Tingkat Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>) pada D7 Dari Kelompok II Donor Yang Disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG dan Kombinasi 2,5 ml MoAb.....	68
4. Komposisi Embrio Yang Laik transfer, Tidak Laik transfer dan Stadia Perkembangan Embrio Hasil Pembilasan Uterus (<i>Flushing</i>) Pada D7 Dari Kelompok II Donor Yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi 2,5 ml MoAb	68
5. Rata-Rata Struktur Fungsional Ovaria (Folikel dan CL), Embrio Terkoleksi (<i>Recovery Rate</i>) dan Tingkat Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>) Pada D7 Dari Kelompok III Donor Yang disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi 3.000 IU hCG i.v.	69
6. Komposisi Embrio Yang Laik Transfer, Tidak Laik Transfer dan Stadia Perkembangan Embrio Hasil Pembilasan Uterus (<i>Flushing</i>) Pada D7 Dari Kelompok III Donor Yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi 3.000 IU hCG i.v.	69
7. Rata-Rata Struktur Fungsional Ovaria, (Folikel dan CL), Embrio Terkoleksi (<i>Recovery Rate</i>) dan Tingkat Ovulasi (<i>Ovulation rate</i>) Pada D7 Dari Kelompok IV Donor Yang Disuperovulasi 2.500 IUPMSG dan Kombinasi Gabungan hCG-MoAb Secara i.v.	70
8. Komposisi Embrio Laik Transfer, Tidak Laik Transfer dan Stadia Perkembangan Embrio Hasil Pembilasan Uterus (<i>Flushing</i>) Pada D7 Dari Kelompok IV Donor Yang disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi Gabungan hCG-MoAb secara i.v.	70
9. Rata-Rata Struktur Fungsional Ovaria, (Folikel dan CL), Embrio Terkoleksi (<i>Recovery Rate</i>) dan Tingkat Ovulasi (<i>Ovulation Rate</i>) Pada D7 Dari Kelompok V Donor Disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi hCG i.m. serta MoAb i.v.	71
10. Komposisi Embrio Laik Transfer, Tidak Laik Transfer dan Stadia Perkembangan Embrio Hasil Pembilasan Uterus (<i>Flushing</i>) Pada D7 Dari Kelompok V Donor Disuperovulasi 2.500 IU PMSG dan Kombinasi hCG i.m. serta MoAb i.v.	71

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Peralatan Penunjang Cervical Expander (A), Mucus Remover (B) dan Kateter Karet Pembilas Uterus Beserta Logam Stiletnya (C).....	33
2.	Posisi Kateter Karet Pembilas Dengan Balon Manset yang Memfiksir Bagian dalam Kornua Uteri.....	33
3.	Histogram Perbandingan Keberhasilan Kelima Kelompok Donor yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa kombinasi Perlakuan MoAb-hCG	53

Lampiran

1.	Embrio Sapi Perah Stadium Morula Kualitas A Laik Beku Hasil Superovulasi PMSG	72
2.	Embrio Beku Pascapencairan Stadium Morula Kualitas Satu (1) Hasil Kriopreservasi Dalam 1,5 M Ethylene Glycol (EG).....	72
3.	<i>Hatching Blastocyst</i> Hasil Kultur In Vitro 24 Jam yang Berasal Dari Morula Beku 1,5 M Ethylene Glycol (EG)	73
4.	Embrio Beku Pascapencairan Stadium Morula Kualitas Tiga (3) Hasil Kriopreservasi Dalam 1,2-Propanediol (PROH)	73
5.	<i>Blastocyst</i> Hasil Kultur In Vitro 24 Jam yang Berasal Dari Morula Beku 1,5 M Propanediol (PROH)	74

I. PENDAHULUAN

Masalah utama dalam usaha memenuhi kebutuhan protein hewani di Indonesia diantaranya bagaimana meningkatkan produksi untuk memenuhi standar gizi bagi seluruh penduduk Indonesia yang akan mencapai jumlah 200 juta jiwa pada akhir Pelita VI (tahun 1998) dengan laju pertumbuhan penduduk 1,5%. Tentunya produksi protein hewani dengan cara seefisien mungkin sehingga terjangkau oleh daya beli masyarakat tanpa harus mengurangi keuntungan peternak. Problema peternakan di masa mendatang dapat diatasi melalui pemanfaatan ternak bermutu genetik unggul yang diolah dengan penerapan metode bioteknologi dalam manajemen yang baik. Salah satu metode bioteknologi yang dapat dimanfaatkan untuk penyebaran dan peningkatan populasi bibit betina unggul yaitu metode superovulasi dalam pelaksanaan transfer embrio (TE).

Melalui kawin alam atau inseminasi buatan (IB) seekor betina unggul paling cepat dalam satu tahun hanya dapat menghasilkan satu ekor pedet. Akan tetapi melalui TE, dalam setahun dapat dihasilkan kurang lebih delapan pedet yang berasal dari sekitar 15 embrio hasil tiga kali superovulasi. Sampai saat ini, melalui sekali superovulasi baru mampu dihasilkan sekitar enam embrio laik transfer. Jika jumlah hasil panen embrio dapat ditingkatkan, maka jumlah produksi pedet dapat ditingkatkan pula.

Superovulasi adalah proses biologis pertumbuhan, pematangan dan pelepasan sel telur dalam jumlah melebihi ovulasi alamiah. Fenomena ini dapat distimulasi dengan pemberian hormon gonadotropin eksogen dan metodenya disebut superovulasi. Dalam program superovulasi dapat dipakai berbagai macam hormon gonadotropin diantaranya *Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)*, *Follicle Stimulating Hormone (FSH)*, *Human Menopause Gonadotropin (hMG)* dan *Horse Anterior Pituitary (HAP)*. Dari keempat macam hormon tersebut yang sering dipakai adalah PMSG dan FSH.

Penggunaan preparat FSH untuk superovulasi pada sapi di peternakan rakyat masih sangat sulit atau mungkin belum dapat dilakukan, tentu karena berbagai alasan diantaranya:

- 1) waktu paruh yang pendek, sehingga skema aplikasinya memerlukan penyuntikan

berulang (delapan kali penyuntikan dengan selang waktu 12 jam), 2) dari segi ekonomi, memerlukan biaya yang tinggi untuk per unit program (harga satu dosis FSH untuk superovulasi setara dengan empat dosis PMSG), 3) preparat FSH sulit dijumpai di pasaran (belum beredar) dan mungkin harus diimpor. Walaupun FSH sulit diperoleh dan lebih mahal dari PMSG tetapi hasilnya lebih baik dari PMSG.

Hormon gonadotropin lainnya yaitu PMSG yang telah beredar di Indonesia, harganya lebih murah dari FSH dan dari segi aplikasinya dalam program TE perlu mendapat pertimbangan, karena diantaranya: 1) hasil superovulasi sangat bervariasi, 2) dapat menimbulkan reaksi sensitivitas, jika superovulasi dilakukan berulang, 3) hasil panennya, baik produksi embrio per donor masih rendah begitu pula embrio yang terkoleksi, kualitasnya kurang memenuhi persyaratan.

Berdasarkan data komparatif lapang, produksi rata-rata embrio hasil superovulasi menggunakan preparat FSH dan PMSG adalah sama, sedangkan jumlah embrio kelayakan transfer dan kualitasnya pada perlakuan FSH lebih tinggi dari PMSG. Jumlah embrio layak transfer dan kualitas yang rendah diduga karena waktu paruh PMSG yang panjang masih bersirkulasi dalam peredaran darah dan akan mengganggu status reproduksi donor. Stimulasi ovaria masih berlanjut setelah ovulasi dan selama tahap awal perkembangan embrio.

PMSG merupakan hormon gonadotropin eksogen yang memiliki biopotensi tinggi dalam menstimulasi ovaria sapi agar dapat berespon untuk membentuk struktur fungsional ovaria berupa folikel dan CL. Aplikasi PMSG untuk superovulasi pada sapi perah, sampai saat ini masih memberikan hasil yang rendah dan bervariasi dalam peringkat ovulasi (*ovulation rate*) dan hasil panennya berupa embrio layak transfer. Hasil panen embrio yang rendah, merupakan akibat dari stimulasi lanjutan PMSG yang memiliki waktu paruh (*half life*) yang panjang (123jam), sehingga walaupun efek superovulasi PMSG telah tercapai pada hari kelima, PMSG masih menstimulasi ovaria. Seharusnya jika efek superovulasi telah tercapai, tidak lagi diperlukan stimulasi lanjutan.

Residu PMSG yang masih beredar dalam peredaran darah dan masih memiliki potensi biologis akan terus menstimulasi ovaria. Adanya residu PMSG dengan biopotensi aktif dalam sirkulasi darah akan menimbulkan *negative rebound effect* terhadap hipofisa sehingga LH tidak disekresi. Ovaria yang terus terstimulasi disertai tidak adanya sekresi LH akan menghasilkan folikel-folikel persisten (tidak terovulasi). Dampak lanjutan dari masih beredarnya PMSG dalam sirkulasi darah adalah gangguan keseimbangan hormonal, gangguan ovulasi, gangguan fertilisasi dan transportasi embrio dalam saluran telur.

Dalam mengatasi efek negatifnya, digunakan Monoklonal Antibodi (MoAb) Anti PMSG yang merupakan produk HB II untuk menetralkan residu yang masih berfungsi, sehingga *ovulation rate* dan hasil panen embrio dapat ditingkatkan. Aplikasi MoAb harus tepat waktu dalam program superovulasi dengan PMSG agar hasilnya dapat maksimal. Penentuan waktu aplikasi MoAb yang tepat dapat berpedoman pada selang waktu (interval), 1) setelah penyuntikan prostaglandin, 2) setelah LH *peak* dan, 3) sebelum, pada awal, selama, pertengahan, pada akhir atau setelah donor mengalami estrus. Pemilihan waktu aplikasi yang tepat dengan pedoman sederhana dapat dipakai pada kondisi lapang.

Dalam penelitian HB II/4 telah terbukti bahwa aplikasi MoAb Anti PMSG yang disuntikan pada donor 60 jam atau 72 jam setelah aplikasi prostaglandin atau sesaat setelah inseminasi pertama atau kedua dapat meningkatkan hasil panen embrio. Walaupun demikian efek superovulasi belum sempurna, karena masih adanya folikel persisten pada waktu panen di D7 (*unovulatory follicle rate* 17,5% - 18,6%). Tentunya keberadaan folikel persisten dengan jumlah seperlima dari jumlah struktur fungsional (folikel) yang terbentuk dari respon superovulasi, merupakan sumber daya biologis potensial berupa oosit (ova) yang masih dapat dieksploitasi untuk dijadikan embrio. Selain itu estrogen yang dihasilkan oleh folikel persisten dapat mempengaruhi keseimbangan hormonal yang dapat menurunkan kualitas embrio hasil panen.

Untuk mengatasi efek negatif dari folikel persisten terhadap kualitas embrio dan untuk meningkatkan hasil panen melalui eksploitasi total dari oosit yang ada dalam folikel-folikel hasil stimulasi PMSG, perlu diuji selain aplikasi MoAb juga dikombinasi dengan aplikasi hCG, agar seluruh folikel hasil superovulasi dengan PMSG dapat diovulasikan.

Diharapkan dengan ovulasi total akan diperoleh lagi peningkatan, baik hasil panen maupun dalam peningkatan perbaikan kualitas embrio.

Peningkatan hasil panen harus disertai dengan cukupnya persediaan resipien. Sampai saat ini masih selalu dijumpai masalah dalam penyediaan resipien di lapangan, karena kurangnya atau tidak ada resipien yang berkualitas ataupun yang sinkron dengan donor. Untuk mengatasi hal ini embrio yang tidak dapat ditransfer langsung, harus disimpan dalam jangka waktu yang tidak terbatas (*long term storage*) pada temperatur -196°C dalam nitrogen cair melalui metoda kriopreservasi yang sederhana dan praktis.

Penelitian di bidang kriopreservasi ditujukan untuk menentukan penyebab kerusakan sel yang timbul karena proses pembekuan dan menemukan metode-metode yang dapat mencegah kerusakan sel tersebut sehingga embrio yang dikriopreservasi mampu berkembang normal dengan baik (Leibo and Loskutoff, 1993). Melalui program kriopreservasi embrio dapat dibekukan dan dapat disimpan dalam kurun waktu tidak terbatas. Dalam usaha peningkatan efisiensi reproduksi, program kriopreservasi dapat mengatasi kesulitan penyediaan resipien. Adanya peningkatan produksi embrio yang tidak disertai persediaan resipien yang cukup memadai akan mengakibatkan terbuangnya plasma nutfah (*germ plasm cells*) berupa embrio bergenetik unggul dan akan menurunkan produksi pedet. Embrio-embrio hasil panen yang tidak ditransfer, karena tidak tersedianya resipien, harus segera dikriopreservasi dalam bentuk embrio beku yang sewaktu-waktu dapat dicairkan dan ditransfer ke resipien sesuai dengan jumlah yang tersedia.

Metode kriopreservasi memungkinkan pilihan termin yang bebas untuk transfer embrio beku dan pemanenan pedet, penyediaan resipien yang tidak tergantung dari status reproduksi donor, dapat mengatasi kesulitan penyediaan resipien dan penyederhanaan ekspor-impor material genetik. Menurut Niemann (1993), metode-metode kriopreservasi embrio sapi dapat digunakan metode konvensional (*step by step* dan *direct transfer*), metode *ultra rapid freezing* dan vitrifikasi. Sampai saat ini survival dan *pregnancy rate* tertinggi, dapat dicapai dari embrio yang dikriopreservasi melalui metode konvensional *step by step*, sedangkan *ultrarapid freezing* dan vitrifikasi masih memberikan hasil yang rendah. Dalam pelaksanaan metode konvensional *step by step* diperlukan peralatan yang

memadai seperti *embryo freezing machine*, *dissecting microscope* dan biaya pelaksanaan yang mahal, teknisi terampil dan membutuhkan waktu pelaksanaan yang lama (*tedious and time consuming*). Walaupun demikian hasil dari kriopresevasinya dapat diandalkan dan dapat memberikan angka kebuntingan (*pregnancy rate*) yang tinggi.

Pelaksanaan transfer embrio beku di lapangan, terutama di peternakan rakyat akan sulit melaksanakan transfer menggunakan metode konvensional *step by step*, karena diperlukan peralatan dan biaya yang tinggi. Metode lain yang telah terbukti dapat dipakai dalam transfer embrio beku pada kondisi lapangan adalah *direct transfer*, karena praktis dan tidak memerlukan mikroskop, tidak memerlukan peralatan pendukung evaluasi embrio, sederhana dan ekonomis. Hanya saja sampai saat ini masih perlu ditentukan jenis krioprotektan dan larutan pembilas (*cryoprotectant removal*) yang cocok, efektif dan efisien untuk kriopreservasi menggunakan metode *direct transfer*. Untuk mengatasi masalah tersebut perlu dirancang metode *direct transfer* yang menggunakan *cryoprotectant* dan *cryoprotectant removal solution* tertentu yang cocok dan aplikasi lapangnya yang praktis, sederhana dan ekonomis. Hasil yang diharapkan dari metode tersebut dapat memberikan kualitas embrio beku pascapencairan yang tinggi, *survival rate* dan viabilitas yang tinggi pula.

Berdasarkan latar belakang dan permasalahan yang ada, penelitian ini didesain untuk menentukan pengaruh sinergis aplikasi MoAb-hCG agar potensi PMSG yang bermanfaat dari superovulasi dalam peningkatan hasil panen embrio dapat dimanifestasikan secara maksimal. Selain itu juga merancang dan menentukan aplikasi metode *direct transfer* dalam program pembekuan embrio untuk penyimpanan embrio beku dalam jangka waktu panjang.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

Dalam penelitian HB II/4 telah terbukti bahwa aplikasi MoAb anti PMSG yang disuntikan pada donor 60 jam atau 72 jam setelah aplikasi prostaglandin atau sesaat setelah inseminasi pertama atau kedua dapat meningkatkan hasil panen embrio. Walaupun demikian efek superovulasi belum sempurna, karena masih adanya folikel persisten pada waktu panen di D7 (*unovulatory follicle rate* 17,5% - 18,6%). Tentunya keberadaan folikel persisten dengan jumlah seperlima dari jumlah struktur fungsional (folikel) yang ter-bentuk dari respon superovulasi, merupakan sumber daya biologis potensial berupa oosit (ova) yang masih dapat dieksploitasi untuk dijadikan embrio. Selain itu estrogen yang dihasilkan oleh folikel persisten dapat mempengaruhi keseimbangan hormonal yang dapat menurunkan kualitas embrio hasil panen.

Peningkatan hasil panen harus diimbangi atau disertai dengan cukupnya persediaan resipien yang akan menerima embrio. Sampai saat ini untuk memperoleh persediaan resipien yang memadai masih sulit dicapai. Selain itu juga masih sulit diperoleh resipien yang sinkron dengan donor. Untuk mengatasi kesulitan tersebut, kelebihan hasil panen yang tidak dapat segera ditransfer, dapat dibekukan melalui metoda yang praktis dalam program kriopreservasi (*long-term storage*), dalam nitrogen cair -196°C. Embrio beku ini dapat dicairkan, sewaktu-waktu sesuai dengan tersedianya resipien. Sehubungan dengan itu penelitian HB II/5 di tahun 1997/1998 ditargetkan untuk :

- 2.1.1 Menentukan ada tidaknya peningkatan hasil panen embrio dari donor yang disuperovulasi dengan PMSG dan mendapat suntikan kombinasi gabungan MoAb dengan hCG.
- 2.1.2 Menentukan jenis krioprotektan terbaik (1,5 M ethylene glycol atau 1,5 M 1,2 propanediol) untuk pembekuan embrio pada aplikasi metoda direct transfer dalam program kriopreservasi.

2.1.3 Menentukan konsentrasi larutan sukrosa (0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M) yang terbaik untuk pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) dari embrio beku pasca pencairan.

2.2 Manfaat Penelitian

Paket teknologi berupa a) metode produksi dan evaluasi MoAb Anti PMSG, b) panel MoAb Anti PMSG dan c) dosis efektif MoAb Anti PMSG, d) cara dan waktu aplikasi yang tepat agar biopotensi monoklonal antibodi bekerja efektif, e) alternatif penggunaan MoAb dan atau hCG dalam usaha peningkatan hasil panen embrio dan f) metode direct transfer dalam program kriopreservasi embrio dan penyimpanan embrio beku dalam nitrogen cair bertemperatur -196°C . Paket-paket teknologi reproduksi terapan tersebut secara khusus dapat dipakai dalam rangka peningkatan produksi embrio atau populasi bibit sapi perah unggul dalam waktu yang singkat dan penyimpanan plasma nutfah eks-situ berbentuk embrio beku dalam jangka waktu panjang (long term storage). Selain itu secara umum diharapkan dapat meningkatkan produksi ternak ruminansia besar.

III. STUDI PUSTAKA

3.1 Perkembangan Folikel Preovulatoris

Pada salah satu ovarium sapi yang telah dewasa kelamin akan terjadi pertumbuhan, perkembangan folikel serta pematangan oosit yang dilanjutkan dengan ovulasi. Ada tiga tahap perkembangan folikel yang akan mendahului proses ovulasi yaitu : 1) rekrut-men folikel sebelum onset luteolisis, 2) seleksi dan pertumbuhan oosit sampai *preovulatory surge of LH*, dan 3) pematangan akhir folikel dan oosit setelah *LH surge* sampai ovulasi. Selama tahap kedua, biasanya satu folikel terpilih yang memiliki reseptor-reseptor terhadap LH mampu mengenal serta bereaksi terhadap *preovulatory surge*. Folikel ini akan memasuki tahap yang sesuai secara kronologis dengan *sequence* hormonal yang mengatur perubahan-perubahan biosintesis morfologi dan interaksi antara sel-sel somatik dan sel-sel germinal. Pada onset tahap ketiga steroid utama yang disekresikan oleh folikel preovulatoris adalah estradiol. Bersamaan dengan *LH peak* (terdefinisi sebagai *preovulatory LH surge* yang maksimum), sintesa thecal androstenedione segera terhambat yang akan mengurangi lapisan sel-sel granulosa dengan prekursor untuk estradiol sehingga menyebabkan penurunan estradiol dalam lingkungan mikro dari oosit yang sedang matang 6 jam setelah *LH peak*.

Sesaat sebelum ovulasi, sintesa progesteron menjadi dominan, serentak dengan luteinisasi jaringan folikel, disertai pecah membran basal folikel dan invasi granulosit eosinofilik (De Loos *et al.*, 1991). Bersamaan dengan perubahan-perubahan folikel tersebut oosit mengalami pematangan inti dan sitoplasma. Meiosis *resumption* tampak nyata dari mulai 6 jam setelah *LH peak*. Sintesa mRNA diperlukan selama sekitar 3 jam setelah *LH peak*, agar oosit dapat mengalami *germinal vesicle break down* (GVBD) dan untuk perkembangan/pematangan inti lebih lanjut ke metafase II (M II) sintesa protein diperlukan sampai 12 jam setelah *LH peak* (Kastrop *et al.*, 1991). Sedangkan pematangan sitoplasma teramati sebagai penyusunan kembali organela sel oosit.

3.2 *Follicle Stimulating Hormone (FSH)*

FSH sapi merupakan glikoprotein dengan berat molekul (BM) 37.300, terdiri atas subunit α (BM 12.600) dan subunit β (BM 18.500). Menurut Docke (1981) waktu paruh atau *half life (elimination rate)* FSH sekitar 5 jam. Dalam program transfer embrio, untuk memperoleh hasil superovulasi yang optimal diperlukan penyuntikan ulang. Banyak peneliti menganggap, bahwa penyuntikan berulang, sehari dua kali dengan selang waktu 12 jam selama empat sampai lima hari dapat menimbulkan pengaruh negatif pada hasil superovulasi.

Untuk memperoleh skema teknik superovulasi yang baik, telah dilakukan beberapa penelitian. Pada dasarnya menyederhanakan teknik pemberiannya agar lebih praktis dan tidak menimbulkan stres. Looney *et al.*, (1982) membandingkan dua perlakuan. Grup pertama, seperti umumnya memperoleh 10 mg FSH dalam 0,9% NaCl fisiologis dalam dua kali suntik setiap hari selama 5 hari. Grup lainnya juga memperoleh 10 mg FSH dalam larutan gelatin 3,2%, setiap hari sekali suntik selama 5 hari. Dari hasil pemeriksaan laparotomi, angka ovulasi pada perlakuan penyuntikan tunggal harian berbeda nyata dengan perlakuan penyuntikan ganda harian. Hal ini memperkuat penelitian Vincent *et al.*, (1973) yang melakukan superovulasi menggunakan FSH yang dimasukkan kedalam kapsul gelatin dan dideposisi subkutan pada sapi potong untuk memperoleh kelahiran ganda.

Peneliti lainnya yang menyibukan diri dengan kelemahan superovulasi FSH, pada keharusan teknik aplikasi berulang karena waktu paruh FSH yang pendek adalah Dees *et al.*, (1984). Pada penelitiannya digunakan multilamelar liposome sebagai pembawa FSH, yang berfungsi memperlambat resorpsi sehingga dicapai konsentrasi yang cukup tinggi dalam waktu relatif lama. Teknik ini menurutnya sangat cocok untuk superovulasi menggunakan FSH pada sapi penggemukan. Suzuki (1991) juga melakukan penelitian mengenai penyederhanaan aplikasi FSH menggunakan PVP. Dalam penelitiannya digunakan 10 ml PVP 10% untuk melarutkan 30 mg FSH/ml yang akan berfungsi sebagai ajuvan. Aplikasi tunggal dengan dosis tunggal diawal program superovulasi.

3.3 Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)

Secara kimiawi PMSG merupakan glikoprotein dengan berat molekul 64.000 dan terdiri atas subunit α yang berat molekulnya 44.000 dan subunit β yang berat molekulnya 17.000 (Christakos and Bahl, 1979). Konsentrasi dan susunan asam-asam amino dari PMSG subunit (α dan β) mirip dengan FSH dan LH yang dibentuk. Kedua subunit tersebut secara terpisah sendiri tidak mempunyai aktivitas biologis, akan tetapi jika bersatu dengan subunit yang sesuai dari FSH dan LH endogen, dapat menimbulkan aktivitas biologis dari ovaria (Papkoff, 1978). Perbandingan aktivitas FSH dan LH dalam PMSG preparat berayun sesuai dengan baik susunan maupun waktu paruhnya (Allen and Stewart, 1978).

Schams *et al.*, (1978) meneliti kebutuhan PMSG yang digunakan untuk superovu-lasi. Dari hasil penelitiannya, disimpulkan bahwa baik fraksi serum murni maupun yang masih kasar (belum dipurifikasi) tidak ada perbedaan yang nyata ditinjau dari segi aktivitas biologis FSH dan LH. Begitu pula protein asing yang ada dalam fraksi serum tidak murni, tidak menimbulkan reaksi antibodi dalam tubuh sapi.

Begitu pula Sreenan dan Beehan (1976) menyimpulkan hasil kerja dengan berbagai susunan preparat PMSG dan tiga macam dosis yang berbeda; bahwa pengaruh konsentrasi susunan sama tingginya dengan pengaruh dari dosis. Ovulasi dan variabilitas meningkat sesuai dengan kenaikan dosis (1.500, 2.000, dan 2.500 IU), selain itu juga disertai kenaikan jumlah corpus luteum (CL) dan jumlah folikel persisten (FP) pada ovarium. Akan tetapi angka rata-rata koleksi embrio turun dari 65% sampai 51%, dengan adanya kenaikan dosis tersebut.

Menurut Church dan Shea (1976) dosis optimal adalah dosis PMSG antara 1.500 sampai 3.200 IU. Mereka menguji 10 macam susunan yang berbeda dari suatu preparat dalam satu stasiun transfer. Dari data yang diperoleh menunjukkan, bahwa terdapat angka ovulasi yang lebih kecil dari pada jumlah folikel yang unovulasi. Juga ditunjukkan adanya keragaman dan interval variasi yang besar dalam perbandingan sel telur yang terbuahi dari sel telur yang terkoleksi. Akan tetapi Gordon (1975) menemukan hasil yang justru

bertentangan, yaitu adanya perbedaan yang kecil dalam respon ovaria terhadap berbagai susunan yang berbeda dalam suatu preparat.

Waktu paruh biologis (*half life*) PMSG pada ternak sapi setelah penyuntikan intramuskular (i.m.) telah banyak diuji coba dan diteliti diantaranya oleh Schams *et al.*, (1978), Menzer dan Schams (1979). Pengukuran dan penentuannya dilakukan dengan menggunakan antibodi ganda RIA yang mereka kembangkan sendiri. Pada sapi induk yang telah disuntik PMSG 1.500-3.000 IU 10 hari yang lalu masih menunjukkan dua komponen, yang satu adalah pendek (40-50 jam) dan yang lainnya panjang (118-123 jam).

3.4 Superovulasi Komparatif Antara PMSG dengan FSH

Publikasi pertama superovulasi komparatif antara PMSG dan FSH dilansir oleh Seidel *et al.*, (1977) yang menyatakan tidak ada perbedaan dari jumlah ova yang diovulasikan tetapi kualitas embrio hasil superovulasi dengan FSH lebih baik dari pada dengan perlakuan PMSG. Elsdon *et al.*, (1978) dari penelitian banding antara PMSG dan FSH diperoleh hasil yang lebih baik pada perlakuan dengan FSH. Perbedaan ini sangat nyata dari angka ovulasi, jumlah embrio terkoleksi dan angka kebuntingan yang lebih tinggi pada grup yang disuperovulasi dengan FSH.

Penelitian lainnya dilakukan oleh Lubadeh *et al.*, (1979) pada 16 ekor sapi perah yang dibagi dalam grup A dan grup B. Seluruh donor mendapat lima kali superovulasi berturut-turut sesuai dengan siklusnya. Grup A memperoleh 3.000 IU PMSG pada D9-D12, sedangkan grup B mendapat 50 mg FSH + 20 mg LH dalam dosis yang merata selama 4 hari. Kedua grup memperoleh PGF_{2α} 48 jam setelah pemberian pertama hormon superovulasi. Untuk 4 kali program superovulasi perlakuan seperti diatas dan pada superovulasi kelima perlakuan dibalik, Grup B memperoleh perlakuan seperti grup A dan grup A memperoleh perlakuan grup B. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan angka ovulasi akan tetapi dari hasil superovulasi keempat dan kelima angka embrio terkoleksi lebih tinggi pada perlakuan FSH/LH daripada perlakuan PMSG.

Yadav *et al.*, (1983) melakukan pemeriksaan profil LH pada sapi donor selama berahi yang diinduksi dengan hormon superovulasi. Onset dan durasi LH-*peak* pada donor-

donor yang disuperovulasi dengan PMSG hampir selalu sama. Akan tetapi donor yang distimulasi PMSG memberikan angka ovulasi $27,7 \pm 8,2$ dan $8,5$ folikel persisten, sedangkan donor yang distimulasi dengan FSH menunjukkan ovulasi $8,3 \pm 1,5$ dan $0,7$ folikel persisten. Penelitian yang mirip dilakukan oleh Greve *et al.*, (1984 a, b). Dalam penelitiannya disimpulkan bahwa perlakuan superovulasi sering menyebabkan gangguan pelepasan normal dari LH, sedangkan persyaratan perkembangan embrio yang fisiologis normal dan terkoleksinya embrio laik transfer dalam jumlah optimal adalah profil LH yang fisiologis normal. Selain itu dari hasil penelitiannya tampak pada donor yang distimulasi dengan PMSG lebih banyak menunjukkan abnormalitas profil LH dari pada donor yang distimulasi dengan FSH. Balans sirkulasi progesteron dalam darah terganggu regularitasnya, dan dampak yang timbul pada embrio adalah kualitasnya buruk karena perkembangannya terganggu.

Dalam studi banding PMSG dan FSH, Schmitz (1986) mengungkapkan bahwa, a) CL terpalpasi pada perlakuan FSH lebih tinggi daripada PMSG. Perbedaan ini sangat berarti. Jumlah korpus luteum terpalpasi akan menurun dengan makin seringnya donor distimulasi ($P < 0,05$), dan hal ini tidak tergantung pada preparat yang digunakan, b) FP lebih banyak terbentuk pada superovulasi pertama daripada kedua atau ketiga ($P < 0,05$). Sama pada kedua perlakuan FSH ataupun PMSG, c) Jumlah embrio terkoleksi pada donor yang distimulasi FSH, rataannya 4,9 embrio, lebih tinggi daripada donor perlakuan PMSG dengan rataannya 3,6 embrio. Pada pengulangan superovulasi jumlah rataannya ini juga akan menurun. Penurunan jumlah embrio terkoleksi lebih cepat dan lebih besar pada perlakuan PMSG daripada FSH.

3.5 Human Chorionic Gonadotropin (hCG)

HCG merupakan hormon glikoprotein dengan berat molekul 30 sampai dengan 40 kD. Seperti hormon glikoprotein lainnya (FSH dan LH), hCG terdiri atas subunit-subunit α dan β . Dengan sangat sedikit modifikasi, subunit α mirip sama dengan hormon glikoprotein lainnya sedangkan subunit spesifik hCG. Glikoprotein dari hCG memiliki aktivitas biologik dan imunologik yang mirip dengan LH yang berasal dari hipofisis (Yaffe, 1978). Menurut McDonald (1980), hCG dihasilkan mulai umur kehamilan 30

sampai 60 hari. Selanjutnya telah dijelaskan oleh Jaffe (1978) bahwa hCG merupakan hormon gonadotropin yang disintesa oleh lapisan sel-sel syncytiotrophoblastic dari plasenta. Selain itu juga dapat diproduksi oleh semua tipe jaringan trophoblast, termasuk mola *hydatidiform*, *chorioadenoma* dan *choriocarci-noma*. Konsentrasi hCG naik sampai nilai puncak antara hari ke-60 sampai 90 dari umur kehamilan, setelah itu terjadi sedikit penurunan level hCG sampai tahap plasenta selama sisa kehamilan.

Struktur kimia gonadotropin adalah glikoprotein yang mengandung heksosa, manosa, galaktosa dan asam sialat (Gan *et al.*, 1980). Asam sialat memegang peranan penting dalam menentukan lamanya hCG bersirkulasi dalam peredaran darah. Hal ini disebabkan karena asam sialat dihancurkan di hati dalam waktu yang cukup lama (Grotsky, 1984). McDonald (1980) menyebutkan bahwa hCG mempunyai waktu paruh (*half life*) 8 sampai 12 jam, sedangkan menurut Jaffe (1978) memperkirakan sekitar 32 sampai 37 jam.

Secara kimiawi, hCG yang memiliki berat molekul 40 kD, terdiri atas subunit α dengan 92 asam amino dan dua rantai karbohidrat dan menyerupai subunit α dari LH. Subunit β terdiri atas 145 asam amino dan lima rantai karbohidrat. Aktivitas biologis dan imunologis menyerupai LH dan sedikit FSH (Kaltenbach dan Dunn, 1980). Selanjutnya menurut Grotsky (1984), masing-masing subunit memiliki kekuatan biologis (biopotensi) tersendiri, tetapi biopotensi ini akan semakin melemah jika kedua subunit tersebut dipisahkan. Biopotensi hCG akan maksimal jika kedua subunit α dan β digabungkan.

3.6 Metoda-Metoda Imunologis Dalam Reproduksi

Di bidang pengembangbiakan ternak, teknik-teknik imunologis untuk determinasi hormon, enzim dan protein, memainkan peranan yang penting dalam perbaikan dan peningkatan efisiensi reproduksi. Secara mendasar teknik-teknik tersebut dapat dibagi menjadi dua grup tergantung dipakai tidaknya *radioisotopic markers*. Teknik yang terpopuler diantaranya *radioimmunoassay* (RIA), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *immunofluorescent assays* (IFA) (Nakamura *et al.*, 1983; Chard, 1987). Teknik imunologis telah mampu meningkatkan pengetahuan dalam fisiologi reproduksi,

penetapan parameter normal dalam siklus estrus, seksual hormon dan diagnosa kebuntingan.

Teknologi RIA, ELISA dan IFA, kesemuanya berdasarkan prinsip mekanisme imunologis. Jauh sebelum teknologi tersebut dipakai dalam usaha peningkatan efisiensi reproduksi, telah dipakai pula metoda dasar imunologis seperti *Haemagglutination Inhibition Test* (HI) untuk identifikasi adanya PMSG dalam darah kuda bunting. Teknik diagnosa kebuntingan pada kuda ini dikenal dengan *mare immunologic pregnancy* (MIP) test (Wide and Wide, 1963; Solomon and Hoff, 1969). Antibodi anti PMSG yang diperoleh dari serum kelinci yang diimunisasi dengan preparat PMSG murni, juga dapat dipakai untuk identifikasi adanya PMSG dalam diagnosa kebuntingan pada kuda. Teknik ini dikenal dengan nama Latex atau Rapi-tex-PMSG (Bostedt *et al.*, 1983).

Akhir-akhir ini antibodi anti PMSG juga dipergunakan dalam prosedur superovu-lasi yang menggunakan stimulasi PMSG dengan tujuan peningkatan ovulation rate dan jumlah hasil panen berupa *transferable embryo*. Dosis PMSG yang umum dipakai adalah 1.500 sampai 2.000 IU untuk sapi dara dan 2.000 sampai 3.000 IU untuk sapi induk. Penelitian Saumande dan Chupin, 1981 dalam usaha memperoleh ovulasi yang lebih besar dengan peningkatan dosis PMSG, menunjukkan bahwa dosis PMSG yang sangat tinggi akan memberikan efek yang negatif. Fenomena ini dapat dijelaskan berdasarkan adanya gangguan proses di ovari dan mungkin LH tidak disekresi karena adanya *negative rebound effect* dari PMSG terhadap kelenjar hipofisa.

Negative rebound effect ini disebabkan oleh *half life* PMSG yang panjang (yang artinya konsentrasi yang tinggi masih bersirkulasi dalam darah dengan *negative effect* berupa *ovulation rate* rendah dan kualitas embrio jelek). Aplikasi antibodi anti PMSG sesaat setelah LH peak untuk menetralkan PMSG dengan harapan dapat menekan efek negatif residual PMSG dan dapat meningkatkan *ovulation rate* serta jumlah embrio hasil panen berupa peningkatan *transferable embryo*. Sebagai data komparatif, dapat dilihat dari peneliti-peneliti sebelumnya menggunakan PMSG sebagai hormon superovulasi, diantaranya Sreenan (1978) dan Situmorang *et al.*, (1993), memperoleh rata-rata empat dan lima CL dengan perlakuan PMSG saja. Penggunaan MoAb Anti PMSG yang

diaplikasikan tepat waktu dalam program superovulasi donor dengan PMSG akan meningkatkan jumlah CL. Aplikasi antibodi 5-6 jam setelah LH-*peak* menghasilkan peningkatan respon superovulasi, atau bila diaplikasikan beberapa jam setelah LH *peak* atau sekitar inseminasi. Penggunaan MoAb menjelang LH *peak* atau lebih dari 36 jam dari onset estrus akan menurunkan efek superovulasi PMSG (Dieleman *et al.*, 1993)

3.7 Antibodi (*Immunoglobulin*) Anti PMSG Dalam Superovulasi

Waktu paruh PMSG yang panjang memungkinkan untuk menginduksi pertumbuhan dan perkembangan folikel secara ekstensif tetapi juga berkontribusi efek-efek samping yang tidak diharapkan seperti telah diketahui pada PMSG untuk superovulasi (perkembangan folikel dan produksi estrogen yang berlebihan, kegagalan ovulasi dan kegagalan fertilisasi). Bindon dan Piper (1982) mencoba mentest hipotesa, bahwa antibodi eksogen terhadap PMSG dapat menetralkan PMSG dan mereduksi waktu paruhnya pada domba dan sapi sehingga dapat memberikan hasil superovulasi tanpa efek samping. Untuk tujuan itu serum *hyperimmune* diproduksi pada domba terhadap PMSG komersial. Pemberian dilakukan tiga kali injeksi subkutan 1.000 IU PMSG dalam Freund ajuvan, dengan selang waktu seminggu, diikuti injeksi *booster* intravena (i.v.) dalam cairan secara periodik. Semua domba merespon dengan titer antibodi. Jika diuji pada mencit dan domba 1 ml antiserum menetralkan efek biologis 1.000 IU PMSG. Meskipun demikian, antiserum tidak memiliki efek apapun terhadap FSH atau LH endogen baik *in vivo* maupun *in vitro*.

Pengaruh ovine antiserum PMSG terhadap efek superovulasi PMSG pada domba Merino dan sapi Hereford telah dipelajari. Jika antiserum diberikan 24 jam setelah penyutikan PMSG maka efek superovulasinya akan dinetralkan. Begitu pula jika interval waktu diperpanjang menjadi 72 jam, angka ovulasinya tidak sama dengan grup yang hanya memperoleh PMSG saja. Akan tetapi derajat overstimulasi pada ovaria berkurang pada perlakuan antiserum. Selain itu antiserum PMSG masih juga diperlukan dalam waktu lebih dari 120 jam untuk melengkapi hasil superovulasi.

Kummer *et al.*, (1980) telah menyampaikan hasil kerjanya untuk memperlihatkan bahwa pemberian antiserum PMSG dapat meningkatkan angka fertilisasi ova dan menekan pembentukan folikel yang tidak ovulasi serta mengeliminasi produksi estrogen yang berlebihan. Saumande *et al.*, (1984) juga melakukan penelitian dengan PMSG dan kombinasi PMSG + antiserum PMSG. Antiserum PMSG 5 ml diberikan 12 atau 24 jam setelah awal berahi yang distimulasi dengan PMSG tidak memberikan pengaruh, baik terhadap jumlah ovulasi maupun embrio yang terkoleksi, akan tetapi jelas pada aplikasi antiserum PMSG jumlah embrio laik transfer naik dari 3,5 menjadi 5,5 per flushing.

Dalam penelitiannya Dieleman *et al.*, (1993) membandingkan waktu aplikasi yang berbeda-beda dari antibodi monoklonal untuk netralisasi residu PMSG, setelah LH *peak*. Berdasarkan dari seluruh data yang terkompilasi, jumlah CL yang terbentuk berayun dari 1 sampai 41 dengan hasil embrio laik transfer (*transferable embryo*) masing-masing grup, saline, 6 jam dan 18 jam aplikasi post LH *peak* adalah berturut-turut 3,5, 4,1, dan 5,0. Aplikasi antibodi monoklonal terhadap PMSG 18 jam post LH *peak* menunjukkan perbaikan yang nyata pada hasil panel embrionya dibandingkan dengan grup yang mendapat saline.

3.8 Indikasi Untuk *Intravenous Immunoglobulin*

Intravenous immunoglobulin (IVIg) dibidang kedokteran adalah preparat terapi dari Ig G yang polispesifik. Pada awalnya IVIg dipakai sebagai terapi pengganti untuk pengobatan defisiensi antibodi. Beberapa tahun belakangan ini, penggunaan IVIg meningkat dalam program penanggulangan penyakit-penyakit autoimmune dan peradangan sistemik (Steinman, 1990). Efek Imunomodulasi dari IVIg, tergantung dari interaksi antara bagian Fc dari Ig G yang diinfuskan dengan Fc reseptor pada sel-sel inflamasi dan limfosit dan atau pada modulasi *repertoire antibodyes* yang diekspresikan melalui interaksi bagian variabel dari IVIg dengan Ig yang bersirkulasi dan reseptor Ag pada sel-sel imunokompeten (Ronda *et al.*, 1993).

Dibidang peternakan, salah satu cara peningkatan populasi ternak unggul melalui superovulasi, diantaranya menggunakan PMSG. Potensi stimulasi produksi ova sangat

tinggi, akan tetapi PMSG juga memiliki kelemahan karena *half life*-nya yang sangat panjang dan dapat mempengaruhi atau menekan hasil panen embrio serta memperpanjang masa restitusi donor dari keadaan superovulasi ke siklus normal yang semula. Efek negatif tersebut dapat diatasi melalui netralisasi PMSG menggunakan IVIg.

Efek pH Terhadap Stabilitas Larutan IgG

Dalam pengujian fisiko-kimia larutan IgG telah terobservasi bahwa dengan adanya penurunan pH dari globulin dalam larutan akan meningkatkan isi monomer dan stabilitasnya. Selain itu Ig stabil dalam bentuk preparat larutan dan tidak membutuhkan liofilisasi. Didalam interval pH yang pendek 4,0-4,5 isi monomer larutan IgG mendekati 100% dengan stabilitas yang panjang dan prima. Berdasarkan observasi ini dikembangkan preparat IgG dalam bentuk larutan dan tidak dimodifikasi serta cocok untuk aplikasi i.v. (Schwartz, 1987).

Dosis Aplikasi Intravena Larutan Ig

Intravena Ig dipreparasi dari pengumpulan cairan supernatan medium menumbuh klon Hibridoma PMSG-6 yang dipurifikasi parsial melalui filtrasi dengan Amicon. Preparat larutan ini mengandung IgG yang intakt. Distribusi subklas IgG seperti normal serum dengan waktu paruh (*half life*) sekitar 3 minggu (Schwartz, 1987).

Berdasarkan studi mengenai konsentrasi serum Ig, dapat dipakai sebagai petunjuk untuk memperoleh konsentrasi IgG normal baik dengan dosis yang tinggi maupun yang rendah. Konsentrasi IgG merosot dengan tajam 1 sampai 3 hari setelah pemberian IVIg karena adanya mekanisme keseimbangan dalam proses pendistribusiannya. Konsentrasi IgG menurun drastis secara eksponensial dengan *half-life* sekitar 21 hari.

Di bidang kedokteran umum, ada beberapa cara pemberian Ig secara individual dengan memakai perhitungan penurunan secara eksponensial berdasar *half life* Ig. Akan tetapi, dosis yang diperhitungkan mungkin tidak mencapai konsentrasi serum Ig yang diharapkan. Sampai saat ini belum jelas mekanismenya, apakah *half life*-nya diperpendek

oleh dosis yang lebih tinggi atau Ig itu hilang dalam sekat pembuluh darah (ekstravaskuler) pada awal fase pemerataan (ekuilibrisasi). Kasus tersebut per individu berbeda. Hilangnya IgG dari serum pada manusia berkisar antara 11 sampai 44 hari atau rata-rata 25,4 hari (Ibrahim dan Uryati, 1993).

3.9 Kriopreservasi

Kriopreservasi sel adalah suatu usaha mempertahankan viabilitas sel (diantaranya germplasm) melalui reduksi atau interupsi fungsi-fungsi metabolik bahan biologis dengan tidak merusak sel (organel sel). Penurunan ataupun interupsi aktivitas metabolik (aktivitas biokimiawi) dapat dicapai dengan menurunkan temperatur sampai temperatur nitrogen cair -196°C . Pada temperatur -196°C , sel akan membeku dan hampir semua aktivitas metabolis sel berhenti sama sekali dan sel tersebut dapat dipreservasi dibawah kondisi terkendali dan disimpan dalam periode waktu yang tidak terbatas (Sakai, 1993). Reaksi yang terjadi pada -196°C adalah ionisasi langsung yang berasal dari radiasi alam. Berdasarkan alasan tersebut Schneider (1986) menyatakan bahwa waktu penyimpanan sekitar 200 tahun tidak mengakibatkan penurunan viabilitas embrio beku ataupun perubahan genetik lainnya.

Dalam proses kriopreservasi, sel yang dibekukan akan mengalami serangkaian perubahan baik biofisik maupun biokimia karena ada perubahan atau penurunan temperatur yang sangat besar. Menurut Kasai (1996) ada beberapa faktor yang dapat menurunkan viabilitas atau bahkan dapat merusak embrio beku tersebut selama proses kriopreservasi yaitu diantaranya, 1) rusak karena proses pendinginan (*chilling injury*), 2) rusak karena adanya pembentukan kristal es ekstraselular dan intraselular (*physical injury by extracellular ice and formation/growth of intracellular ice*), 3) keracunan baik oleh *cryoprotectant* maupun oleh adanya peningkatan konsentrasi elektrolit (*toxicity of cryoprotectant and toxicity of concentrated electrolyte*), 4) kerusakan karena retak (*fracture damage*) dan 5) pembengkakan karena adanya tekanan osmose (*osmotic swelling*). Faktor-faktor tersebut merupakan faktor eksternal, dan faktor eksternal lainnya yang dapat merusak embrio beku adalah metoda pencairan (*thawing*) termasuk pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) dari embrio beku. Faktor internal yang dapat mempengaruhi viabilitas embrio dalam kriopreservasi adalah spesies, stadium dan

kualitas embrio sebelum dibekukan. Viabilitas embrio yang dikriopreservasi juga berbeda antar spesies, karena setiap spesies memiliki karakter biologis tersendiri, seperti ukuran, bentuk, sifat membran, konsentrasi lipid dan sensitivitas terhadap toksitas krioprotektan.

3.10 Krioprotektan Ethylene Glycol (EG) dan 1,2 - Propanediol atau Propylene Glycol (PROH)

Krioprotektan adalah zat kimia organik yang dapat mempertahankan viabilitas sel atau meningkatkan kelangsungan hidup (*survival rate*) setelah preservasi melalui mekanisme biofisik maupun biokimiawi yang dapat melindungi ataupun mengurangi kerusakan sel dalam proses kriopreservasi. Ada dua macam krioprotektan yaitu krioprotektan intraselular dan ekstraselular. Pada akhir-akhir ini yang paling banyak digunakan adalah krioprotektan intraselular diantaranya ethylene glycol dan 1,2 - propanediol.

Ethylene glycol (EG) dan 1,2 - propanediol (*propylene glycol*, PROH) merupakan krioprotektan intraselular yang dapat keluar masuk sel melalui membran plasma dengan cepat. Kemampuan mobilitas keluar masuk sel yang tinggi ini, didukung oleh karakteristik biofisika dari kedua krioprotektan tersebut. Rumus molekul ethylene glycol $(CH_2)_2(OH)_2$ dengan berat molekul 62,07, sedangkan 1,2-propanediol (*propylene glycol*) $C_3H_8O_2$ dengan berat molekul 76,10, merupakan alkohol dihidrat. *Specific gravity* EG dan PROH masing-masing 1,11 dan 1,03 (g/cm^3 pada $20^\circ C$).). Kedua glycol tersebut memiliki gugus OH lebih dari satu (dua gugus hidroksil). Kedua gugus OH di dalam molekul alkohol akan meningkatkan kelarutan dalam air dan titik didihnya. Karakteristik-karakteristik biofisika yang dimiliki oleh kedua glycol tersebut seperti berat molekul kecil, kelarutan yang besar dalam air dan titik didih yang tinggi, memberikan kemampuan EG dan PROH berfungsi sebagai krioprotektan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Voelkel dan Hu (1992) EG memiliki permeabilitas terhadap sel embrio yang lebih baik daripada krioprotektan lainnya. Viabilitas embrio beku setelah kultur 72 jam *in vitro* dalam kokultur sel fibroblast uterine memberikan angka 70% untuk embrio yang telah dibekukan dengan 1,5 M EG, 30% untuk 1,4 M glycerol dan 11% untuk 1,5 M PROH. Suzuki *et al.*, (1993) berhasil mencapai

viabilitas 89,8% dan angka kebuntingan 74% dengan menggunakan 1,8 M EG. Lange (1995) berhasil mencapai angka kebuntingan 58,2% pada umur kebuntingan 50-60 hari, pada penelitian kriopreservasi embrio sapi yang dibekukan dalam 1,5 M EG dan transfer dengan metoda *direct transfer*.

Embrio sapi yang dipapar langsung kedalam 1,5 M EG prapembekuan, dan dibekukan dengan metoda konvensional (*slow freezing*), memberikan angka kebuntingan 59% pada palpasi per rektal umur enam minggu kebuntingan (McIntosh dan Hazeleger, 1994). Sedangkan Looney *et al.*, (1996) menggunakan konsentrasi EG yang sama 1,5 M memperoleh angka kebuntingan 50%

Perbandingan efektivitas konsentrasi 1,6 M dari tiga macam krioprotektan yaitu PROH, gliserol dan DMSO untuk preservasi oosit sapi yang dimatangkan secara *in vitro* telah dilakukan oleh Otot *et al.* (1993). Jumlah oosit yang memiliki morfologi normal setelah kriopreservasi dan pencairan kembali dalam PROH (49,8%), gliserol (28,6%) dan DMSO (32,6%). Angka fertilisasi dari oosit bermorfologi normal, PROH (57,9%) dan DMSO (38,3%). Menurut Palasz *et al.*, (1992) blastosis rate dari embrio *in vitro* yang dikriopreservasi dengan PROH 73,4%.

Krioprotektan intraselular mempunyai peran yang besar terhadap terjadinya keracunan dalam sel, karena krioprotektan tersebut dapat masuk kedalam sel dan mempengaruhi aktivitas organel sel. Untuk mengetahui tingkat toksisitas beberapa krioprotektan intraselular (EG, PROH, gliserol, DMSO dan acetamide) telah dilakukan uji viabilitas embrio mencit yang dipapar dengan 20% krioprotektan intraselular selama 20 menit pada suhu 20°C. *Survival rate* diukur dengan potensi perkembangan lebih lanjut dalam kultur *in vitro*. Dari hasil penelitian tersebut Kasai (1996) menyimpulkan bahwa yang paling tidak beracun adalah EG (98%) diikuti berturut-turut ke peringkat bawah yaitu glycerol (88%), DMSO (68%), PROH (16%) dan yang paling beracun adalah acetamide (0%) karena tidak satu embriopun yang mampu berkembang ke stadium lebih lanjut.

3.11 Metoda *Direct Transfer* Dalam Kriopreservasi Embrio

Dalam pelaksanaan transfer embrio komersial, diperlukan teknik yang praktis, sederhana, ekonomis dan memberikan hasil yang tinggi. Prosedur kriopreservasi konvensional menggunakan krioprotektan intraselular seperti gliserol dan DMSO, mengharuskan pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) dari sel-sel embrio yang telah dicairkan tahap demi tahap sebelum ditransfer ke resipien (Leibo dan Mazur, 1978). Prosedur ini mengharuskan pengeluaran embrio dari jerami plastic (*plastic straw*), masuk kedalam cawan petri dan diperiksa dibawah mikroskop dan dibilas krioprotektan secara bertahap (3 sampai 10) tahap dengan waktu equilibrasi per tahap 5-10 menit. Evaluasi dan pembilasan ini sebelum transfer merupakan hal yang tidak praktis, dan tidak ekonomis (Voelkel and Hu, 1992).

Pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) secara bertahap dilakukan untuk menghindari pecahnya sel-sel embrionik, apabila embrio yang penuh dengan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi dimasukan langsung kedalam medium transfer yang bebas krioprotektan. Pecahnya sel-sel embrionik ini karena air dari medium hipotonik ekstra selular langsung masuk kedalam sel hipertonik sehingga sel membengkak dan akhirnya pecah (Seidel, 1984).

Selanjutnya untuk mencegah pecahnya sel-sel embrionik, selain dilakukan pembilasan krioprotektan secara bertahap, dapat pula dilakukan pembilasan satu tahap menggunakan medium yang mengandung molekul larutan nonpenetratif berkonsentrasi tinggi seperti sukrosa. Embrio beku pascapencairan dalam medium ekstraselular sukrosa berkonsentrasi tinggi, pertama-tama akan segera mengkerut karena krioprotektan ekstraselular akan segera keluar dari sel, sedangkan kecenderungan air ekstraselular masuk ke dalam sel akan tertahan oleh air intraselular yang akan keluar untuk mengencerkan sukrosa yang berkonsentrasi tinggi. Adanya proses fisika larutan tersebut, memungkinkan penyederhanaan sistim pembilasan krioprotektan tersebut dari embrio beku (pascapencairan) sebelum ditransfer ke resipien.

Beberapa prosedur pembilasan dapat pula dilakukan di dalam straw, dimana embrio dibekukan (Leibo, 1984). Pendekatan ini memungkinkan embrio ditransfer langsung ke

resipien, tanpa pemeriksaan dan pembilasan di luar straw, sebelum transfer. Metode transfer langsung (*direct transfer*), pada umumnya menggunakan prosedur pengepakan embrio dalam krioprotektan disertai larutan sukrosa yang terpisah dari medium krioprotektan dalam straw. Pendekatan lainnya adalah mencampur sukrosa dalam medium krioprotektan yang dipakai dalam kriopreservasi embrio. Kedua metoda ini dilaporkan efektif jika ditransfer langsung ke resipien setelah proses pencairan (Massip *et al.*, 1987). Prosedur ini belum secara utuh diterima oleh industri embrio transfer karena prosedur rumit dan kegagalan dalam memberikan hasil yang konsisten. Penelitian tambahan diperlukan untuk menentukan metoda *direct transfer* yang dapat diterima dalam kondisi lapang dan komersial.

Pendekatan lain dalam pengembangan metode *direct transfer*, adalah pemilihan dan penentuan campuran krioprotektan yang memiliki daya permeabilitas tinggi terhadap sel-sel embrionik, sehingga dapat mereduksi jumlah tahapan pembilasan menggunakan medium sukrosa sebelum transfer. Embrio sapi dan domba memiliki permeabilitas yang tinggi terhadap EG daripada PROH dan gliserol (Szell *et al.*, 1989). Voelkel dan Hu (1992), menarik kesimpulan dari penelitiannya, bahwa 1,5 M EG sebagai medium krioprotektan dapat memberikan angka viabilitas tertinggi embrio beku pascapencairan 24/25 (96%) setelah dikultur 24 jam. Sedangkan 2,0 M EG memberikan nilai 8/25 (32%) dan 1,4 M gliserol 11/15 (73%). Selain itu menurut Suzuki *et al.*, (1990), menyatakan bahwa media krioprotektan 1,6 M PROH menghasilkan *survival rate embryo*, yang lebih tinggi dari pada 1,4 M gliserol yaitu masing-masing 100% berbanding 80%.

3.12 Metoda Pemupukan Embrio *In Vitro*

Perkembangan iptek reproduksi dalam satu dekade terakhir ini, telah banyak menyempurnakan hampir semua proses yang berkaitan dengan metoda fertilisasi. Peningkatan perbaikan inovasi suatu metoda yang dapat menyediakan kondisi lingkungan yang lebih tepat seperti alamiah dalam proses pematangan oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio sampai stadium blastosis bahkan sampai terjadi perkembangan sel-sel trophoblast maupun *inner cell mass* pada dasar tempat kultur *in vitro* (Bavister *et al.*,

1992). Embrio dapat berkembang *in vitro* dalam suatu medium kultur yang cocok. Viabilitas embrio dapat ditentukan melalui aplikasi teknik kultur embrio *in vitro*. Overstrom (1992) menggunakan teknik kultur embrio *in vitro* untuk mempelajari tentang mekanisme selular dan molekuler yang meregulasi perkembangan embrio selama periode preimplantasi, dan dapat dijadikan suatu petunjuk penentu (indikator) viabilitas embrio. Perkembangan embrio dari suatu stadium ke stadium berikutnya dalam periode tertentu (3 sampai 24 jam) dapat membedakan embrio yang viabel dari embrio yang berdegenerasi.

Pemupukan embrio *in vitro* secara teknis berdasarkan tempat penyimpanan ada tiga sistem, yaitu 1) metode droplet, 2) metode test tube, 3) metode penyimpanan jangka pendek dalam cawan petri. Metode droplet biasanya digunakan untuk pupukan dengan medium bufer bikarbonat dan dibawah kondisi lingkungan yang cukup CO₂ (5%). Embrio dipupuk dalam beberapa drop medium. Dalam satu plastik cawan petri (berdiameter 35 mm) terdiri atas 4-5 drop. Setiap drop sekitar 100 μ l medium pupukan. Seluruh drop medium pupukan dilapisi mineral/parafin oil yang mengisi 70% cawan petri. Metode kedua dan ketiga lebih simpel karena tidak mutlak memerlukan CO₂. Dalam metode ini embrio dipupuk dalam medium MPBS yang disuplementasi dengan 10-20% serum yang telah diinaktivasi secara panas 56^oC selama 30 menit (*heat inactivated fetal calf serum*) atau *fetal bovine serum (FBS)*.

Berdasarkan komposisi susunan medium dan tempat kultur, sistem pemupukan dibagi dalam dua kelompok, yaitu 1) sistem kokultur (mengandung sel-sel somatik) dan, 2) sistem terbatas (*defined culture systems*) karena tidak bergantung pada sel-sel somatik. *Defined culture system* merupakan suatu tempat pupukan dengan medium dan lingkungan fisik yang tertentu, dimana komponen mediumnya diketahui dengan pasti (Thompson, 1996). Untuk mengembangkan suatu *defined culture system*, diperlukan dua pendekatan yaitu menentukan kebutuhan biokimia embrio selama perkembangan dan mengetahui lingkungan *in vivo* embrio secara alami seperti suhu, osmolaritas, viskositas, tegangan permukaan dan pH.

Embrio sapi yang dikultur in vitro dapat berkembang pada temperatur antara 36°C sampai 40°C. Temperatur optimal terbaik adalah 39°C, karena pada temperatur tersebut banyak embrio yang berkembang sampai *hatched blastocyst* (Wang *et al.*, 1991). Perlu juga diperhatikan pada embrio sapi hasil panen sebaiknya disimpan pada medium kultur 37°C atau dapat pula pada temperatur kamar 20 - 30°C. Perubahan temperatur yang mendadak sebaiknya dihindari. Temperatur tinggi sekitar 40°C akan memudahkan embrio berdegenerasi. Menurut Thompson (1996) embrio sapi dapat berkembang lebih baik dalam medium dengan osmolalitas 270 mOsm daripada 300 mOsm. Osmolalitas optimal menurut Mastroiani dan Biggers (1983), adalah 276 mOsm untuk perkembangan embrio mencit stadium dua sel dalam kultur in vitro. Selain temperatur dan osmolalitas medium, juga harus diperhatikan pH. Untuk memperoleh viabilitas embrio yang baik diperlukan pH medium kultur 7,2 - 7,4 (Hogan *et al.*, 1986).

IV. MATERI DAN METODA PENELITIAN

4.1 Materi Penelitian

4.1.1 Hewan Percobaan

Sebagai donor dipergunakan sapi perah Fries Holland (FH) disekitar Kabupaten Bogor dan Sukabumi. Donor berjumlah 25 ekor sapi yang terpilih dari peternakan sapi perah yang tergolong peternakan dengan manajemen baik dan memiliki sapi-sapi unggul fertil dan sehat. Selain itu juga donor dipilih dari sapi-sapi yang dternakan atau dipelihara di Jurusan Reproduksi dan Kebidanan, FKH IPB.

Donor yang terpilih sebagai hewan percobaan dalam penelitian ini telah memenuhi persyaratan sebagai berikut: a) umur 2 1/2 tahun sampai dengan 5 tahun, laktasi ke-1 atau ke-2, b) memiliki traktus reproduksi normal, c) sehat, fertil, menunjukkan siklus kelamin reguler dengan penampilan reproduksi yang baik (S/C tidak lebih dari 2), d) tidak pernah mengalami abortus ataupun kesulitan melahirkan dan e) pada saat penelitian telah selesai proses involusi uterusnya (3 bulan postpartus).

4.1.2 Peralatan dan Bahan

Perangkat inseminasi buatan, panen embrio, transfer embrio dan kriopreservasi embrio

Dalam pelaksanaan produksi dan penyimpanan embrio, dilakukan serangkaian kegiatan yaitu seleksi donor, superovulasi, sinkronisasi donor, inseminasi donor, pembilasan uterus, evaluasi, klasifikasi dan penyimpanan melalui metode kriopreservasi embrio. Kegiatan inseminasi buatan memerlukan peralatan/perlengkapan pemeriksaan ginekologi ternak sapi, insemination gun, kontainer penyimpan semen beku. Untuk panen embrio diperlukan seperangkat alat pembilas uterus (*flushing catheter, straight connectors, metal stylet, embryo collecting filters, disposable plastic syringes*) dan peralatan penunjang seperti *cervical expander, catheter for removing mucus* (Gambar 1). Peralatan koleksi dan evaluasi embrio (*dissecting microscope dan stereophase contrast microscope, plastic dishes*).

Peralatan pembuatan media, tersedia aquadestilator gelas (*water still*), *water deionisator*, *vacuum filtering flask*, *teflon filtering holder*, *teflon facep pyrex*, *durapore filter HVLP 0,45 μ* , *vacuum pump*, *heating table*, *analytical balance*, *filter 0,22 μ* , *magnetic stirrer*, *sentrifuge*, *incubator*, gas cylinder for special gas (N_2 , CO_2 , O_2) gas regulator dan pH meter. Peralatan penunjang pembuatan media yaitu freezer penyimpanan media, obat-obatan, hormon, ajuvan dan antiserum. Alat sterilisator untuk sterilisasi peralatan yang dipakai untuk pelaksanaan program TE.

Peralatan pelaksanaan kriopreservasi embrio, yaitu *embryo freezing machine* terdiri atas Freeze Control Model CI 5000, *Cryochamber* dan *liquid nitrogen bath*. Untuk penyimpanan embrio beku berupa *storage container* 35l yang berisi nitrogen cair, sedangkan untuk pencairan embrio beku digunakan *automatic thawer*.

Media, obat-obatan (hormon, antibiotik, anastesi) serum dan antiserum, krioprotektan dan larutan pembilas (*cryoprotectan removal solution*)

Bahan untuk media baik untuk flushing maupun *maintenance/culture/transfer* media dipakai *phosphate buffered saline* atau PBS^a (-) yang dimodifikasi dan diperlengkapi dengan *metal salt solution* (Ca, Mg), antibiotik khusus untuk in vitro culture (penisilin dan streptomisin), *glukose*, *natrium pyruvate*, *bovine serum albumin (BSA)*^b dan *fetal bovine serum* yang telah diinaktivasi secara panas 56°C selama 30 menit yang disebut *heat in activated fetal bovine serum* (h.i. FBS).

Hormon yang dipakai dalam penelitian yaitu hormon gonadotropin eksogen yaitu *pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)*^c untuk superovulasi sedangkan untuk melisis fungsi corpus luteum dipergunakan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)^d, dan untuk netralisasi residu PMSG dipakai antiserum monoklonal antibodi PMSG (MoAb Anti PMSG)^e. Untuk anastesi epidural dipergunakan lidocaine HCL^f 2%.

^a PBS (-), Nissui, Jepang; ^b BSA, Irvine Scientific, USA; ^c Folligon dan ^d Prosolvin, Intervet, Holland;

^e MoAb Anti PMSG, Produk Hasil Penelitian HB II, Balitvet-FKH IPB, Indonesia;

^f IPHA Laboratory, Indonesia

Krioprotektan yang dipakai untuk pembekuan embrio ada dua jenis yaitu 1,5 M ethylene glycol (EG)⁸ dan 1,5 M 1,2-propanediol (PROH)⁸. Sedangkan larutan yang akan dipakai dalam pembilasan krioprotektan embrio beku pascapencairan (*cryoprotectant removal*) yaitu larutan sukrosa dengan konsentrasi 0,2 M, 0,4 M dan 0,8 M. Basal medium sebagai pelarut baik untuk krioprotektan maupun larutan pembilas adalah *phosphate buffered saline* yang dimodifikasi (*modified PBS* atau MPBS)

4.2 Metode Penelitian

4.2.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap I

4.2.1.1 Pengaruh Pemberian MoAb Anti PMSG dan atau hCG pada Donor Sapi Perah FH yang Disuperovulasi dengan PMSG Terhadap Struktur Fungsional Ovaria (CL dan Folikel), Jumlah Ovulasi (*Ovulation rate*), Hasil Panen Embrio (*Recovery Rate*) dan Kualitas Embrio (*Transferable* dan *Untransferable Embryo*)

4.2.1.1.1 Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG Dalam Program Superovulasi

Setelah dilakukan seleksi donor melalui pemeriksaan ginekologis, dipilih 25 ekor sapi donor yang akan dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol (I) dan kelompok perlakuan (II, III, IV dan V) yang masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor donor sapi perah FH. Setiap donor dari seluruh kelompok akan disuntik dengan 2.500 IU PMSG secara i.m. disore hari pada D10 (D0 = fase estrus) dan pada D12 seluruh donor disuntik dengan PGF_{2α} dua kali, pagi dan sore masing-masing satu dosis, 2 ml per ekor.

Kelompok I (kontrol) tidak mendapat MoAb Anti PMSG dan hCG sedangkan kelompok perlakuan (II, III, IV dan V) mendapat perlakuan pada waktu inseminasi pertama masing-masing 2,5 ml MoAb i.v., 3.000 IU hCG i.v., gabungan 2,5 ml MoAb - 3.000 IU hCG i.v., gabungan 2,5 ml MoAb i.v. dan 3.000 IU hCG i.m. Keberhasilan

⁸ EG dan PROH, Merck, Jerman

aplikasi gabungan MoAb dan hCG dalam menekan efek negatif dan dalam eksploitasi total oosit dari folikel-folikel hasil superovulasi PMSG dapat dilihat dari parameter, a) tidak adanya folikel persisten dan meningkatnya jumlah CL, b) adanya peningkatan ovulasi, dan c) meningkatnya jumlah embrio per donor dan jumlah embrio laik transfer (meningkatnya hasil panen embrio).

4.2.1.1.2 Inseminasi Buatan Pada Kelompok Donor (Kontrol dan Perlakuan)

Seluruh program superovulasi pada kelima kelompok donor dimulai pada hari ke-10 setelah estrus (D10) dan 48 jam kemudian (D12) mendapat penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ pagi dan sore. Pada D14 seluruh donor akan memasuki fase estrus (D0 kembali) karena proses superovulasi yang ditimbulkan oleh PMSG.

Tabel 1. Rancangan Penelitian Tahap I Dalam Pelaksanaan Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG Untuk Peningkatan hasil Panen Embrio

Kelompok	Jumlah Donor (n)	Superovulasi PMSG (IU)	MoAb Anti PMSG (ml)	hCG (IU)	Rute Aplikasi	
					MoAb	hCG
I (Kontrol)	5	2.500	-	-	-	-
II	5	2.500	2,5	-	i.v.	-
III	5	2.500	-	3.000	-	i.v.
IV	5	2.500	2,5	3.000	i.v.	i.v.
V	5	2.500	2,5	3.000	i.v.	i.m.

Inseminasi Buatan (IB) dilakukan dua kali yaitu dipertengahan dan menjelang akhir fase estrus. IB yang pertama dilakukan pada D14 (=D0) disore hari dan yang kedua, 12 jam kemudian setelah inseminasi yang pertama yaitu dipagi hari pada D15 (=D1). Semen yang dipakai dalam IB yaitu semen beku. Setiap IB diberi satu dosis. Kemasan semen beku berbentuk jerami plastik (*plastic ministraw*) dengan dosis 25 juta sperma/0,25 cc. Semen beku sebelum dipakai dicairkan (thawing) pada temperatur 34°C selama 30 detik.

Mengenai prosedur kerja dan jadwal skematis penyuntikan hormon gonadotropin (PMSG), MoAb Anti PMSG, hCG, $PGF_{2\alpha}$ dan IB dapat dilihat pada Tabel 2. Seminggu

kemudian setelah donor diinseminasi yaitu pada D21 (=D7), dilakukan pembilasan menyeluruh setiap program.

Tabel 2. Skema Prosedur Kerja Waktu Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG Dalam Program Superovulasi Yang Mencakup Jadwal dan Dosis Penyuntikan, Inseminasi Buatan, Panen Embrio dan Evaluasi

Siklus Kelamin (Hari ke-)	Waktu Penyuntikan	Kelompok				
		Kontrol	Perlakuan			
		I	II	III	IV	V
0 (E)	Pagi					
	Sore					
10	Pagi					
	Sore	PMSG	PMSG	PMSG	PMSG	PMSG
11	Pagi					
	Sore					
12	Pagi	PG	PG	PG	PG	PG
	Sore	PG	PG	PG	PG	PG
13	Pagi					
	Sore					
14	Pagi					
	Sore	IB ₁	IB ₁ MoAb i.v.	IB ₁ hCG i.v.	IB ₁ MoAb i.v. hCG i.v.	IB ₁ MoAb i.v. hCG i.m.
15	Pagi	IB ₂	IB ₂	IB ₂	IB ₂	IB ₂
	Sore					
21		-Panen Embrio (Flushing) -Evaluasi/Klasifikasi Embrio				

Keterangan :

1. IB₁, IB₂ : Inseminasi buatan yang pertama atau kedua
2. E : Estrus
3. Penyuntikan hormon gonadotropin dan PGF₂α dilakukan setelah pemerahan susu dengan rute aplikasi i.m.
4. Penyuntikan MoAb PMSG dan hCG dilakukan setelah IB₁
5. IB dilakukan sebelum pemerahan susu.

4.2.1.1.3 Evaluasi Pengaruh Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG

Penentuan Jumlah Struktur Fungsional Ovaria (Folikel dan CL)

Hormon Gonadotropin eksogen PMSG dapat menstimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel yang telah ada pada kedua ovaria sapi donor. Pada program superovulasi, hormon gonadotropin hanya diperlukan untuk stimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel. Selanjutnya proses ovulasi folikel-folikel tersebut diambil alih oleh hormon gonadotropin endogen yaitu dalam hal ini luteinizing hormone (LH). Stimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel hanya diperlukan sekitar empat hari dan selanjutnya harus dihentikan, ovulasi terjadi dengan proses fisiologis internal dan merubah seluruh folikel yang ovulasi menjadi CL.

PMSG memiliki waktu paruh (*half life*) yang panjang sekitar lima hari (123 jam). Efek superovulasi yang diperlukan sekitar empat hari. Kelebihan PMSG atau residu PMSG yang masih beredar dalam darah akan terus melanjutkan stimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel, akibatnya ovulasi terganggu, jumlah CL yang terbentuk akan tertekan sedangkan folikel akan ada menetap sampai D21 (=D7) yang disebut *unovulatory follicle* (folikel persisten).

Tingkat kemampuan atau biopotensi PMSG yang dipergunakan dalam menstimulasi banyaknya folikel-folikel yang tersedia dikedua ovaria untuk tumbuh, berkembang matang, ovulasi dan berkembang menjadi CL dapat dihitung melalui pemeriksaan per rektal pada hari ke-7 (D7) setelah estrus dalam program superovulasi. Kedua jenis struktur fungsional (folikel dan CL) dapat teraba terutama jika memiliki ukuran lebih besar dari 10 mm.

Angka Rataan Ovulasi (*Ovulation Rate*)

Secara fisiologis setiap folikel matang (folikel de Graaf) yang ovulasi akan segera berubah menjadi CL. Berarti jumlah CL yang ada dapat dipakai sebagai tolok ukur penentuan jumlah atau banyaknya folikel yang ovulasi. CL yang ada dalam penelitian, dihitung melalui pemeriksaan palpasi rektal. Untuk menghitung *ovulation rate* dipakai rumus sederhana sbb. :

$$\text{Rataan CL} = \frac{\text{Jumlah CL yang terbentuk di kedua ovaria dari seluruh donor D7}}{\text{Jumlah donor yang disuperovulasi}}$$

Angka Rataan Folikel Menetap (*Unovulatory Follicle Rate*)

Residu PMSG yang masih tetap ada setelah efek superovulasi tercapai, akan terus menstimulasi pertumbuhan perkembangan dan pematangan folikel. Akibat stimulasi berlanjut jumlah folikel-folikel meningkat, dan hormon yang dihasilkannya akan mengganggu proses ovulasi, sehingga dapat meningkatkan jumlah folikel yang tidak ovulasi. Jumlah folikel yang menetap (*unovulatory follicles*) dapat menggambarkan adanya stimulasi lanjutan dari PMSG yang sebenarnya tidak lagi diperlukan. Untuk menghitung jumlah folikel pada D7 dilakukan palpasi rektal dan rataannya dipakai rumus sbb :

$$\text{Rataan Folikel Menetap (Unovulatory Follicle)} = \frac{\text{Jumlah folikel D7 dari seluruh donor yang disuperovulasi}}{\text{Jumlah donor yang disuperovulasi}}$$

(Folikel menetap atau folikel persisten, folikel yang tidak ovulasi dan berdiameter lebih besar dari 10 mm).

4.2.1.2 Metode Pemanenan Embrio dan *Recovery Rate* Hasil Superovulasi

Pada hari ketujuh (D7) setelah donor estrus dalam program superovulasi atau setelah IB pertama, dilakukan pemanenan embrio dengan metode tanpa bedah (*non surgical method*) yaitu dengan cara pembilasan uterus memakai medium modifikasi PBS yang ditambah h.i. FBS 1%. Sebagai pelarut bahan-bahan PBS dipergunakan air bebas ion (*deionized water*) yang telah didestilasi. Medium pembilas yang telah terbuat, disterilisasi dengan penyaringan menggunakan filter HVLP 0,45 μ . Penambahan h.i. FBS kedalam medium pembilas dilakukan sesaat menjelang proses pemanenan embrio.

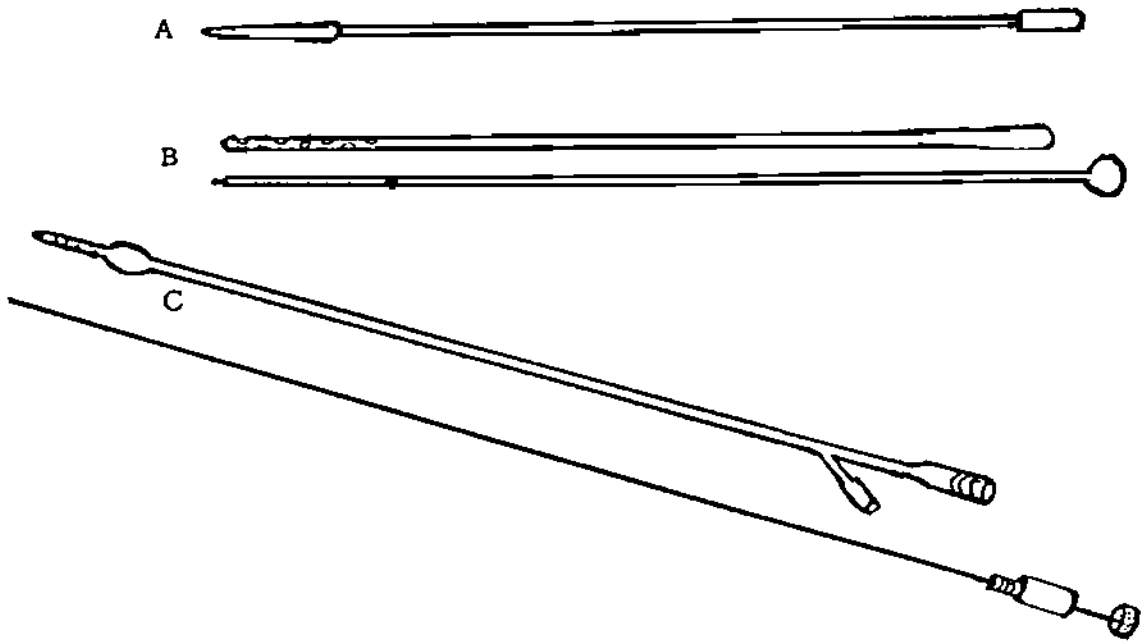
Tabel 3. Komposisi Kimiawi Medium Pembilas Uterus Donor Dalam Bentuk Larutan PBS yang Dimodifikasi (MPBS)

Komponen	g/l	Keterangan	
NaCl	8,00	PBS (-)	PBS (+)
KCL	0,20		
KH ₂ PO ₄	0,20	Metal Salt	
Na ₂ HPO ₄	1,15		
MgCL ₂ .6H ₂ O	0,10		
CaCL ₂	0,10		
Na pyruvate	0,036	Modifikasi	MPBS
Glucose	1,000		
Penisilin	100.000 IU		
Streptomisin	100 mg		
h.i. FBS	1%		

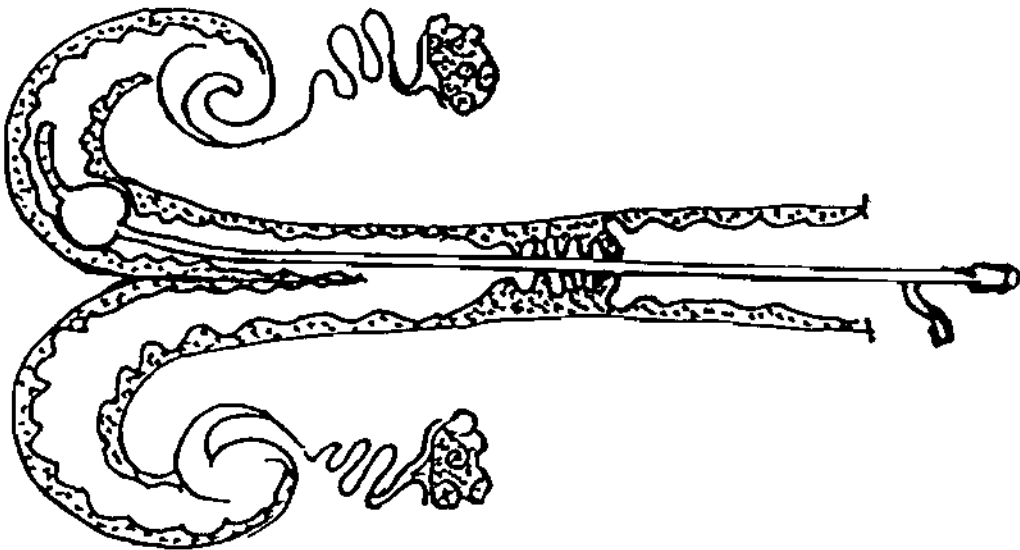
Peralatan, obat-obatan, medium dan bahan-bahan penunjang diletakkan dan disusun pada meja sedemikian rupa sehingga memudahkan cara kerja. Letak dan tempat meja peralatan dekat donor yang akan dipanen dan cukup aman. Medium PBS dalam botol direndam dalam air hangat supaya tetap bersuhu 37°C.

Pelaksanaan pembilasan uterus dapat dilakukan dikandang donor. Jika donor liar, diikat didalam kandang jepit. Periksa jumlah CL, folikel dan ukuran kedua ovariumnya. Bagian belakang bersihkan dengan sabun dan didesinfeksi dengan alkohol 70% dan keringkan. Lakukan anastesi epidural, menggunakan lidocaine HCL^a 2%, 2-4 ml pada daerah penyuntikan antara os sacrum dan vertebrae coccygeal I.

^a. IPHA Laboratory, Indonesia



Gambar 1.: Peralatan Penunjang Cervical Expander (A), Mucus Remover (B) dan Kateter Karet Pembilas Uterus Beserta Logan Stiletnya (C).



Gambar 2. : Posisi Kateter Karet Pembilas Dengan Balonnya yang memfiksir Bagian Dalam Cornua Uteri

Dalam keadaan tertentu, yaitu serviks sulit dilalui oleh kateter pembilas maka diperlukan *cervical expander* (dilatator). Alat dilatator ini hanya dimasukkan kedalam saluran serviks. Sebelum penggunaan *cervical expander* lendir yang ada dalam saluran servik dikeluarkan dengan alat *mucus remover*.

Untuk membilas uterus dipergunakan kateter karet modifikasi Foley catheter^b, steril berukuran 16-20G (tergantung dari ukuran traktus reproduksi donor). Kateter pembilas yang telah dibasahi dengan medium baik bagian luar dan dalamnya diperkuat dengan piston logam (*metal stylet*). Masukkan kateter melalui serviks, pertama arahkan pada cornua uteri yang berhadapan dengan ovarium yang sangat berespon terhadap superovulasi, setelah ujung kateter terasa berada pada bifurkasio, tarik metal stylet 5-10 cm keluar, dan majukan kembali kateter sehingga posisi balon kateter berada sekitar 5 cm kedepan bifurkasio bagian luar (*external bifurcation*). Balon yang terletak disebelum ujung kateter ditiup dengan spuit 20 ml. Isi udara sekitar 10 ml, baru ditambah lagi secara hati-hati sekitar 2-8 ml sampai terasa balon yang menggelembung dalam cornua uteri cukup memfiksir, tidak tergelincir/tertarik kebelakang sehingga cairan medium pembilas tidak dapat lolos keluar kateter (Gambar 2). Umumnya udara yang terpakai pada donor yang kecil traktur reproduksinya sekitar 12-16 ml dan yang besar sekitar 16-20 ml.

Setelah terfiksasi dengan baik maka pembilasan uterus donor mulai dilakukan dengan cara memasukkan dan mengeluarkan kembali medium MPBS+1% FBS. Medium dimasukkan dan dikeluarkan kembali dari cornua uteri berulang kali menggunakan spuit plastik 60 ml. Medium pembilas dimasukkan secara bertahap meningkat yaitu 30, 30-40, 40-50, 50-50, 50 ml. Jumlah keseluruhan tiap cornua uteri sekitar 300 ml. Medium pembilas seluruhnya ditampung pada *embryo collecting filter*^c. Pada akhir pembilasan uterus sisa medium yang mungkin masih tertinggal di cornua uteri dihisap dengan spuit. Bila pembilasan telah selesai dari salah satu cornua uteri, udara dari balon dikeluarkan dengan menghisapnya dengan spuit 20 ml dan kateter ditarik keluar. Kateter dibilas kembali dengan medium PBS dan siap dipakai lagi untuk pembilasan cornua uteri sisi lainnya. Prosedur pemasukan dan pengeluaran medium sama seperti pada cornua sebelumnya.

^{b,c} Fujihira Co, Jepang

Setelah donor selesai dibilas uterusnya, disuntik 2 ml PGF_{2α} (15 mg luprostiol) i.m., untuk membantu hewan donor kembali ke siklus kelamin semula. Untuk mencegah terjadi infeksi atau peradangan pada uterus, dilakukan infusi uterus dengan antibiotik sebanyak 0,5 - 1,0 juta IU penisilin dan 0,2 - 0,5 g streptomisin yang dilarutkan kedalam 40 ml aquabidest. Alokasi penyebaran antibiotik 2/3 di dalam uterus dan 1/3 disebar dari serviks ke vagina.

Medium pembilas yang tersisa dalam *embryo collecting filter* langsung diperiksa dibawah stereo mikroskop (*dissecting microscope*). Pembesaran berkisar antara okular 10 dengan objektif 8-40 kali. Ova dan embrio yang ditemukan segera dikoleksi dan dievaluasi untuk klasifikasi embrio.

Ova dan embrio yang terkoleksi dapat menunjukkan *recovery rate* yaitu :

$$\text{Recovery rate} = \frac{\text{Jumlah ova dan embrio terkoleksi}}{\text{Jumlah CL yang ada pada kedua ovaria}} \times 100$$

(%)

4.2.1.3 Evaluasi dan Klasifikasi Kualitas Embrio Hasil Panen (Jumlah dan Kualitas Embrio)

Identifikasi kualitas embrio, ditentukan melalui pemeriksaan morfologis embrio. Beberapa kriteria yang karakteristik, yang dapat dipergunakan untuk evaluasi dan klasifikasi kualitas embrio melalui pemeriksaan morfologis yaitu; a) kekompakan sel-selnya (ikatan antar sel), b) keteraturan/kesimetrisan bentuk embrio, c) variasi dalam ukuran sel, d) warna dan susunan sitoplasma, e) ada tidaknya vesikel, f) adanya sel-sel yang keluar dari ikatan sel (*extruded*), g) diameter, h) keteraturan zona pellucida, i) adanya debris sel seperti reruntuhan sel dan granulasi, j) umur atau stadia perkembangan embrio.

Dalam penelitian ini embrio terkoleksi diklasifikasi dalam dua kelompok yaitu, kelompok embrio yang laik transfer (*transferable embryos*) dan kelompok embrio yang

tidak laik transfer (*untransferable embryos*). Embrio dengan kualitas A, B dan C digolongkan ke kelompok embrio laik transfer, sedangkan embrio kualitas D yaitu embrio yang degenerasi, retarded dan atau tidak terfertilisasi (tidak terbuahi) tergolong kedalam kelompok embrio tidak laik transfer (Tabel 4).

Tabel 4. Klasifikasi Embrio Sapi Donor yang Terkoleksi Pada Pembilasan D7 Berdasarkan Penampilan Umum Morfologis

Kelompok Embrio	Kualitas Embrio	Penampilan Umum Morfologis
Laik Transfer	A (sangat baik)	Stadia embrio sesuai dengan yang diantisipasi (morula, blastosis dini, blastosis), tidak cacat, zona intak, bentuk bundar <i>spherical</i> , ikatan blastomer erat dan kompak, ukuran sama besar dan simetri, warna agak gelap (<i>dark amber</i>)
	B (baik)	Stadia perkembangan 16-32 sel, tampak sedikit cacat seperti keluarnya salah satu blastomer dari ikatan kumpulan blastomer (<i>extruded blastomere</i>) bentuk asimetri.
	C (cukup)	Stadia perkembangan agak <i>retarded</i> satu sampai dua hari dari stadia yang diantisipasi (stadia 8-16 sel), cacat beberapa blastomer keluar, ukuran blastomer tidak sama besar atau asimetri
Tidak Laik Transfer	D (jelek)	<ul style="list-style-type: none"> - Morula retarded : embrio mengalami hambatan perkembangan parah (stadia 2-8 sel) - Morula degenerasi : embrio mengalami degenerasi seluler, ikatan-ikatan blastomer longgar sampai lepas, granulasi, debris, sedikit atau tidak ada sama kali organisasi sel. - Ovum tidak terbuahi : sel telur tidak terfertilisasi (<i>unfertilized ova</i>)

4.2.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap II

4.2.2.1 Aplikasi Metoda *Direct Transfer* Dalam Kriopreservasi

Prosedur pelaksanaan kriopreservasi konvensional, sebelum pembekuan, embrio harus diequilibrasi secara bertahap (3-10 tahap) dalam medium krioprotektan (*addition of cryoprotectant*). Setelah embrio mendapat konsentrasi akhir krioprotektan, embrio dibekukan dengan program pembekuan tertentu. Jika suatu saat akan ditransfer, embrio beku yang telah cair, dibilas dari krioprotektan (*cryoprotectant removal*) secara bertahap pula, kembali sampai kedalam medium bebas krioprotektan (*holding* atau *transfer medium*). Setiap tahap pemaparan atau pembilasan krioprotektan dibutuhkan waktu 5-10 menit.

Metoda *direct transfer* yang akan dilakukan merupakan penyederhanaan dari kriopreservasi konvensional. Penyederhanaan dilakukan dengan mempersingkat prosedur kerja dan waktu yaitu equilibrasi prapembekuan hanya dilakukan satu tahap pemaparan krioprotektan. Begitu pula pembilasan krioprotektan pascapencairan embrio beku satu tahap.

Seleksi dan Penentuan Kualitas Embrio Prapembekuan

Dalam proses kriopreservasi, embrio akan mendapatkan pemaparan dan perubahan fisika-kimia yang merupakan stres fisiologis dan stres mekanik yang berat dan dapat menimbulkan kerusakan sel-sel embrionik serta menurunkan viabilitasnya. Hanya embrio dengan kualitas tertentu dapat mengatasi efek negative tersebut.

Sekitar 15% embrio laik transfer tidak dapat dibekukan dan sekitar sepersepuluh dari embrio beku hasil kriopreservasi akan mengalami kerusakan yang hebat. Untuk penelitian ini hanya akan dipakai embrio laik transfer dengan kualitas A dan B sebagai embrio laik beku (lihat Tabel 4).

Media Krioprotektan dan *Cryoprotectant Removal*

Untuk membekukan embrio dan menyimpannya dalam nitrogen cair -196°C dalam waktu yang tidak terbatas, diperlukan medium krioprotektan. Merujuk literatur yang ada,

Untuk membekukan embrio dan menyimpannya dalam nitrogen cair -196°C dalam waktu yang tidak terbatas, diperlukan medium krioprotektan. Merujuk literatur yang ada, sampai saat ini medium krioprotektan merupakan medium yang terdiri atas basal medium MPBS yang dicampur dengan krioprotektan. Adapun krioprotektan yang sering dipakai karena hasilnya baik adalah *ethylene glycol* (EG) dan 1,2-propanediol (PROH). Dalam penelitian akan dibandingkan efektivitas 1,5 M EG dan 1,5 M PROH.

Setelah embrio beku dicairkan, perlu segera dibilas atau dibersihkan dari krioprotektan (*cryoprotectant removal*), agar embrio dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Untuk pembilasan pascapencairan satu tahap diperlukan larutan sukrosa. Dalam penelitian akan dibandingkan efektivitas larutan sukrosa berkonsentrasi 0,2 M, 0,4 M dan 0,8 M.

Equilibrasi dan Pengemasan Embrio

Prinsip kriopreservasi embrio mammalia, diantaranya yaitu mengeluarkan sebagian air dari dalam sel dan menggantikannya dengan krioprotektan intraselular yang dapat mencegah terjadinya efek negatif kriopreservasi. Atas dasar ini embrio harus dipapar dengan krioprotektan (*addition of cryoprotectant*) dalam konsentrasi optimal, sehingga air keluar (dehidrasi) dan krioprotektan masuk ke dalam sel. Proses perubahan ini memerlukan waktu sampai konsentrasi medium krioprotektan intra- dan ekstraselular seimbang, disebut equilibrasi. Waktu equilibrasi paparan krioprotektan baik 1,5 M EG ataupun 1,5 M PROH masing-masing 10 menit.

Setelah krioprotektan mencapai equilibrasi dalam embrio, segera dikemas dengan jerami plastik (*plastic straw*) yang berkapasitas 0,25 ml. Embrio dikemas dalam medium krioprotektan 1,5 M EG atau 1,5 M PROH ditengah-tengah straw, dipisah dengan dua gelembung udara dari dua medium krioprotektan sejenis yang berada pada kedua sisi straw.

Proses Pembekuan (Kriopreservasi) dan Penyimpanan

Embrio yang telah dikemas dalam straw segera dibekukan. Kemasan embrio (sampel) langsung diletakkan dalam kontainer pembeku bertemperatur -6°C selama 10

menit. Setelah lima menit berada pada -6°C , dilakukan seeding yaitu inisiasi pembentukan kristal es ekstraselular, sehingga konsentrasi ekstraselular akan meningkat (hipertonik) secara graduil diikuti dengan dehidrasi sel-sel embrionik. Setelah 10 menit berlalu temperatur sampel diturunkan secara bertahap dengan kecepatan *cooling rate* $-0,3^{\circ}\text{C}$ per menit sampai -35°C dan tahan sekitar lima menit. Pada temperatur -35°C , telah terjadi pembekuan intraselular. Selanjutnya sampel dibenamkan kedalam nitrogen cair -196°C dan disimpan dalam *storage container* selama dua minggu sampai waktu evaluasi.

4.2.2.2 Evaluasi Keberhasilan Kriopreservasi

Evaluasi dan Klasifikasi Embrio Beku Pascapencairan

Sebelum embrio beku dievaluasi harus dicairkan terlebih dulu. Pencairan dilakukan menggunakan suatu alat *automatic thawer*, yang akan menghangatkan dan menstabilkan temperatur air pada 34°C . Sampel dicairkan dengan kecepatan 350-400 $^{\circ}\text{C}$ /menit, yaitu dengan memasukkan sampel kedalam *automatic thawer* 34°C selama 15 detik. Setelah cair sampel dikeringkan dengan kertas tissue, dan embrio dikeluarkan dari sampel *plastic straw*, untuk selanjutnya dievaluasi.

Peringkat keberhasilan metoda *direct transfer* dalam kriopreservasi dapat ditentukan melalui evaluasi mikroskopis dari penampilan embrio. Kriteria yang paling objektif dan sering dipakai untuk evaluasi embrio adalah stadium perkembangan pada saat pemeriksaan. Kriteria yang relevan ini perlu didukung oleh kriteria lainnya yang dapat dilihat pada Tabel 5.

Penentuan Viabilitas Embrio Beku Secara In Vitro

Salah satu cara evaluasi penentuan viabilitas embrio adalah melihat kemampuan berkembang ke stadium lebih lanjut. Untuk itu diperlukan pemupukan in vitro. Dalam pelaksanaan penelitian ini dipakai medium MPBS 10% h.i. fetal bovine serum (FBS) sebagai medium kultur. Pemupukan dilakukan dalam inkubator bertemperatur $38,50^{\circ}\text{C}$

dengan atmosfer 5% CO₂ dan kelembaban udara jenuh. Kultur dilakukan selama 24 jam. Embrio dinilai viable jika dalam jangka 24 jam dapat berkembang ke stadium berikutnya. Dari parameter ini akan diperoleh *viable rate*.

Tabel 5. Peringkat Kualitas Embrio Beku Sapi D7 Setelah Pencairan Berdasarkan Evaluasi Mikroskopis Penampilan Umum Morfologis

Kualitas (peringkat)	Penampilan Umum Morfologis
1, sangat baik (<i>excellent</i>)	Seperti embrio segar, tidak dapat dibedakan dari embrio yang belum dibekukan.
2, baik (<i>good</i>)	Lebih gelap dari normal, masih memiliki ukuran dan bentuk seperti embrio segar.
3, cukup (<i>fair</i>)	Tampak jelas lebih gelap dan lebih kecil dari normal, material yang gelap keluar dari masa sel, <i>vesicular inclusion</i> tampak jelas, zona kemungkinan retak dengan batas jelas atau kabur.
4, buruk (<i>poor</i>)	Warna gelap, bentuk irregular, 1 atau beberapa masa hitam kecil, granular, <i>vesicular inclusion</i> besar, zona retak dan bentuk irregular, blastomer membran kabur, kadangkala blastomer bulat tetapi tidak saling melekat dengan blastomer.
5, mati (mati)	Biasanya bentuk irregular, zona rusak berat, blastomer- blastomer terlalu terang atau gelap, untuk embrio <i>irregular</i> karena sering kehilangan bagian luas membran, masa sitoplasma sangat sedikit dan tidak ada organisasi sel dengan jarak yang jauh dalam sitoplasma.

Desain Penelitian dan Analisis Data

Dalam program kriopreservasi embrio yang akan dibekukan harus berkualitas laik beku. Embrio laik transfer hasil panen berkualitas A dan B dikategorikan sebagai embrio laik beku. Embrio laik beku hasil panen sebanyak 40 buah dibekukan dalam krioprotektan 1,5 M ethylene glycol (EG) dan 40 buah lagi dalam 1,5 M 1,2 propanediol (PROH). Program pembekuan: *start*, *seeding* dan *holding temperature* pada -6°C, *cooling rate* - 0,3°C/ menit dan temperatur *plunging* -35°C. Penyimpanan dalam nitrogen cair -196°C

selama dua minggu dan setelah itu dievaluasi. Seluruh embrio beku pascapencairan dibagi empat kelompok, masing-masing terdiri atas 20 embrio beku dibilas dari krioprotektan (*cryoprotectant removal*). Embrio beku pascapencairan kelompok I (kontrol) sebagai pembanding dibilas langsung dengan medium pemupukan MPBS 10%FBS tanpa sukrosa (0 M sukrosa). Kelompok II, III IV sebagai kelompok perlakuan dibilas dengan larutan sukrosa masing-masing dengan konsentrasi 0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M. Parameter yang diamati dan diukur adalah proporsi kualitas embrio beku pascapencairan, *survival rate* dan *viable rate* 24 jam dalam kultur *in vitro*. Teknik analisis data untuk menentukan perbedaan jenis krioprotektan dan konsentrasi sukrosa dipakai analisis Chi-square.

Tabel 6. Rancangan Percobaan Tahap II Untuk Penentuan Jenis Krioprotektan (1,5 M EG atau 1,5 M PROH) dan Konsentrasi Sukrosa Sebagai *Cryoprotectant Removal* dalam Kriopreservasi Embrio Menggunakan Metoda *Direct Transfer*.

Kelompok	Larutan Pembilas Sukrosa (M)	Kriopreservasi Embrio (<i>Direct Transfer</i>)	
		Ethylene Glycol (EG) (M)	1,2-Propanediol (PROH) (M)
I	0,0	1,5	1,5
II	0,2	1,5	1,5
III	0,4	1,5	1,5
IV	0,8	1,5	1,5

Dalam penelitian ini akan dievaluasi dan klasifikasi embrio beku pascapencairan pada saat:

1. setelah pembilasan krioprotektan untuk menentukan :

a) Peringkat kualitas embrio (lihat tabel 6)

Jumlah embrio
berkualitas 1,2 dan 3

b) Survival rate : ----- x 100%
Jumlah embrio beku
yang dicairkan

2. setelah pemupukan 24 jam *in vitro* untuk menentukan :

Jumlah embrio
yang berkembang

Viable rate : ----- x 100%
Jumlah embrio
yang dipupuk

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Percobaan Tahap I

5. 1. Evaluasi Hasil Aplikasi MoAb Anti PMSG dan atau hCG pada Donor Sapi Perah yang Disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG

PMSG merupakan hormon gonadotropin eksogen yang umum dipakai dalam program superovulasi baik pada ternak sapi, domba maupun kambing, akan tetapi respon ovaria donor yang distimulasi tidak dapat diprediksi dan sangat bervariasi. Ovarium sapi mengandung sekitar 70.000-100.000 folikel primordial dan sekitar 100-400 folikel yang aktif tumbuh. Dalam ovaria yang aktif dan fungsional terdapat berbagai macam stadia dan ukuran folikel, yang responnya terhadap hormon gonadotropin bervariasi sesuai dengan tingkat perkembangannya. Secara alamiah, dalam selang waktu satu siklus estrus setiap ovarium sapi memiliki sekitar 10 folikel (berdiameter lebih besar dari 2mm), dan dua pertiganya akan mengalami atresia. Pada akhir siklus estrus, hanya satu folikel yang akan menjadi matang dan ovulasi. Akan tetapi jika hormon gonadotropin eksogen disuntikan pada fase luteal, diperkirakan 10 folikel tersebut akan menjadi matang dan ovulasi

Mekanisme kerja PMSG sebagai agen superovulasi dalam menstimulasi perkembangan folikel-folikel tambahan lainnya melalui beberapa cara yaitu diantaranya, 1) folikel-folikel kecil (*primordial follicles*) direkrut dan dipercepat pertumbuhannya menjadi folikel-folikel yang berkembang (*growing follicles*), 2) meningkatkan folikel preantral, 3) meningkatkan pertumbuhan folikel-folikel antral baik yang kecil maupun yang besar sehingga proporsi folikel antral yang akan mengalami atresia akan menurun, dan 4) menyelamatkan folikel atresia (stadium ringan) kembali dapat tumbuh berkembang dan ovulasi (Cahill, 1982)

Waktu paruh (*half-life*) yang panjang memungkinkan PMSG menginduksi perkembangan folikel secara ekstensif tetapi juga berkontribusi efek samping yang tidak diharapkan seperti perkembangan folikel dan produksi estrogen yang berlebihan, kegagalan ovulasi, kegagalan fertilisasi dan gangguan transportasi ova atau embrio pada saluran telur. Efek samping ini timbul karena residunya masih bersirkulasi dalam peredaran darah, walaupun efek superovulasi telah tercapai, sehingga hasil panen embrio rendah.

Dalam mengatasi efek samping yang negatif, digunakan MoAb Anti PMSG untuk menetralkan residu yang masih bekerja. Aplikasi MoAb harus tepat waktu, yaitu jika efek superovulasi telah tercapai sehingga hasil panen dapat maksimal. Penyuntikan MoAb yang terlalu awal akan meniadakan efek superovulasi sedangkan jika terlambat, maka akan timbul efek samping yang negatif. Waktu optimal dan tepat penyuntikan MoAb dilakukan sesaat setelah inseminasi buatan pertama atau kedua pada tenak donor yang estrus dalam program superovulasi. Penyuntikan yang tepat waktu akan memperbaiki respon stimulasi ovaria berupa peningkatan jumlah CL dan penekanan pembentukan jumlah folikel, selain itu produksi embrio hasil panen meningkat

5.1.1 Respon Ovaria Donor Berupa Pembentukan Struktur Fungsional Folikel dan CL

Pada ternak sapi, dalam selang waktu satu siklus akan terjadi proses pertumbuhan, perkembangan dan pematangan folikel dari salah satu ovarium yang distimulasi oleh FSH. Folikel yang telah matang akan distimulasi oleh LH dan terjadi ovulasi, selanjutnya folikel berkembang menjadi CL. Ukuran ovaria akan berubah-ubah, membesar atau mengecil dalam satu selang periode siklus estrus, seiring dengan fluktuasi tumbuh kembang struktur fungsional ovaria baik berupa adanya *follicle waves* maupun CL. Dalam satu siklus estrus, sapi hanya mengovulasikan satu sel telur (ovum) yang kemudian akan difertilisasi oleh spermatozoa dan berkembang menjadi embrio, dan secara alamiah selama satu siklus estrus, ovaria hanya mengandung satu CL.

PMSG merupakan preparat hormon gonadotropin yang dapat menginduksi respon superovulasi, yaitu dapat menstimulasi pertumbuhan dan pematangan beberapa folikel sekaligus pada ovaria sehingga terjadi ovulasi dalam jumlah besar. Tingkat keberhasilan dari program superovulasi, salah satunya dapat ditinjau dari aspek struktur fungsional CL dan folikel yang terbentuk pada kedua ovaria. Banyaknya CL pada D7 yang ada pada ovaria setelah pemberian preparat hormon gonadotropin dapat menunjukkan gambaran tentang keberhasilan superovulasi. Semakin banyak CL yang terbentuk pada ovaria, makin tinggi tingkat keberhasilan superovulasi. Sedangkan banyaknya folikel matang berdiameter lebih besar dari 10 mm (10-20 mm) yang masih ada pada D7 setelah pemberian hormon gonadotropin memberikan gambaran berhasilnya stimulasi hormon

tersebut dalam proses pertumbuhan, perkembangan atau pematangan folikel, akan tetapi terjadi kegagalan dalam proses ovulasi

Respon ovaria terhadap hormon gonadotropin (untuk superovulasi) dapat terlihat dengan membesarnya ukuran dan banyaknya struktur fungsional ovaria (folikel dan CL) yang terbentuk. Ovaria dikatakan berespon terhadap stimulasi PMSG, jika ukuran membesar dan banyak struktur fungsional ovaria terbentuk. Kriteria utama yang menunjukkan keberhasilan superovulasi adalah banyaknya CL yang terbentuk. Menurut Schilling (1981), bahwa jika CL yang terbentuk lebih dari tujuh termasuk kategori tinggi, tiga sampai enam termasuk sedang, dan nol sampai dua termasuk rendah atau tidak ada reaksi superovulasi.

Jumlah struktur fungsional ovaria yang dihasilkan dari kelima kelompok donor (I,II,III,IV dan V) baik yang disuperovulasi dengan hanya 2.500 IU PMSG maupun yang mendapat kombinasi MoAb dan atau hCG adalah sama ($P>0,05$). Banyaknya folikel dan Cl setiap donor dari kelompok I adalah 20,2 , kelompok II sebesar 19,4, kelompok III 18,0, kelompok IV 18,2 dan kelompok V 15,8 (lihat tabel 6). Pada kelompok kontrol (I), yang tidak mendapat MoAb dan atau hCG, walaupun menghasilkan struktur fungsional yang tidak berbeda dengan kelompok perlakuan akan tetapi berbeda nyata ($P<0,05$) dalam pembentukan CL yaitu 4,8 CL per donor (terendah), sedangkan folikel yang terbentuk tertinggi 15,4 folikel per donor. Penyuntikan superovulasi 2.500 IU PMSG hanya mampu menstimulir banyak pembentukan folikel tetapi gagal (sedikit) menghasilkan CL. Pemberian MoAb dan atau hCG pada kelompok perlakuan (II, III, IV, dan V) dapat menghasilkan pembentukan CL yaitu masing-masing berurutan 16,0 , 14,8 , 16,4 dan 14,2.

Tabel 7. Respon Ovaria Berupa Pembentukan Struktur fungsional (Folikel dan CL) dari Kelima Kelompok Donor Yang Disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG dengan atau Tanpa Kombinasi Perlakuan

Kelompok	Jumlah Donor (n)	Jumlah Fol. (n)	Fol./Donor (n)	Jumlah CL (n)	CL/Donor (n)	Jumlah Fol. dan Donor (n)	Fol dan CL. per Donor (n)
I	5	77	15,4	24	4,8	101	20,2
II	5	17	3,4	80	16,0	97	19,4
III	5	16	3,2	74	14,8	90	18,0
IV	5	9	1,8	82	16,4	91	18,2
V	5	8	1,6	71	14,2	79	15,8

5.1.2 Peringkat Keberhasilan Ovulasi (*Ovulation Rate*) dan Angka Rataan Folikel Persisten (*Unovulatory Follicle Rate*)

Banyaknya folikel matang yang persisten tetap ada pada D7 (waktu pemanenan), berdiameter lebih besar dari 10mm, merupakan reaksi superovulasi yang gagal mengalami proses ovulasi, sehingga tidak ada produksi ova yang tertampung dalam kornua uteri. Menurut Boryczko *et al.*, (1992), pemberian PMSG saja dapat menimbulkan $19,4 \pm 9,5$ folikel yang tidak ovulasi (folikel persisten) akan tetapi jika pemberian PMSG dikombinasi dengan penyuntikan MoAb Anti PMSG (Neutra PMSG) 108 jam setelah penyuntikan PMSG dapat mereduksi kegagalan ovulasi, menjadi $1,7 \pm 0,8$ folikel persisten yang tidak ovulasi.

Salah satu kriteria keberhasilan program superovulasi, apabila bayak terbentuk CL pada kedua ovaria donor yang distimulasi dengan hormon gonadotropin. Penggunaan MoAb pada donor yang disuperovulasi dengan PMSG memberikan 15 ± 2 CL (Callesen *et al.*, 1992). Berdasarkan pengamatan Zeitoun *et al.*, (1991), penggunaan PMSG saja hanya memberikan 6,6 CL per donor akan tetapi jika dikombinasi dengan MoAb dapat meningkat menjadi 14,3 CL per donor.

Dalam penelitian ini keberhasilan superovulasi bukan hanya ditinjau dari jumlah CL per donor yang terbentuk saja, akan tetapi juga dilihat dari respon ovaria untuk menghasilkan struktur fungsional berupa folikel dan CL. Apabila dari suatu program superovulasi, ovaria tidak berespon, tidak ada pembentukan folikel dan CL, maka program superovulasi dikategorikan gagal. Walaupun ovaria berespon baik dengan terbentuknya banyak folikel dan tidak ovulasi (*unovulatory follicle rate* tinggi), maka tetap program superovulasi masih dikatakan gagal. Program superovulasi dinilai berhasil, bila selain ovaria berespon, juga disertai dengan jumlah CL per donor yang tinggi, karena jumlah CL menunjukkan jumlah folikel yang ovulasi (*ovulation rate*). Banyaknya CL yang terbentuk dapat menggambarkan banyaknya ova atau embrio yang akan dipanen. Semakin tinggi jumlah CL dan *ovulation rate* per donor, semakin baik program superovulasi itu.

Pada kelompok kontrol (I), yang tidak mendapat MoAb dan hCG diperoleh 4,8 CL per donor dengan *ovulation rate* 23,8% dan *unovulatory follicle rate* 76,2% (Tabel 7). Hal ini menunjukkan bahwa PMSG masih menunjukkan biopotensinya yang tinggi, terlihat dari struktur fungsional ovaria yang terbentuk, jumlah folikel dan CL sebesar 20,2 per

donor. Akan tetapi tingkat ovulasinya hanya 4,8 CL per donor atau hanya 23,8%. PMSG yang masih beredar dalam peredaran darah (karena *half life*-nya yang panjang) menimbulkan efek negatif berupa kegagalan ovulasi sebesar 15,4 folikel per donor (76,2%). Sedangkan pada kelompok perlakuan (II, III, IV dan V) baik yang mendapat MoAb atau hCG maupun kombinasinya, masing-masing menghasilkan CL per donor berturut-turut 16,0, 14,8, 16,4, 14,2 dengan *ovulation rate* 82,5%, 82,2%, 90,1% dan 89,9%. Pemberian MoAb atau hCG atau kombinasi MoAb dan hCG pada kelompok perlakuan dapat meningkatkan jumlah CL dan *ovulation rate*-nya ($P < 0,01$). MoAb yang disuntikkan sesaat setelah inseminasi buatan yang pertama dapat menetralkan residu PMSG yang masih bersirkulasi, sehingga *negative rebound effect* yang akan ditimbulkan dapat diatasi. Begitu pula halnya dengan hCG yang diberikan pada waktu inseminasi buatan yang pertama dapat membantu LH endogen untuk menimbulkan reaksi ovulasi pada folikel yang telah terbentuk hasil induksi hormon PMSG. HCG yang cukup, dapat menimbulkan respon ovulasi folikel sehingga terbentuk CL dan keluarnya ova yang siap difertilisasi menjadi embrio.

Tabel 8. Peringkat Keberhasilan dan Kegagalan Ovulasi dari Kelima Kelompok Donor yang Disuperoovulasi dengan 2.500 IU PMSG dengan atau tanpa Kombinasi Perlakuan

Kelompok	Jumlah Donor (ekor)	Jumlah Fol. per Donor (n)	Jumlah CL per Donor (n)	Jumlah Struktur Fungsional (Fol.+CL) per Donor (n)	Ovulation Rate (%)	Unovulatory Follicle Rate (%)
I	5	15,4	4,8	20,2	23,8 ^b	76,2
II	5	3,4	16,0	19,4	82,5 ^a	17,5
III	5	3,2	14,8	18,0	82,2 ^a	17,8
IV	5	1,8	16,4	18,2	90,1 ^a	9,9
V	5	1,6	14,2	15,8	89,9 ^a	10,1

Angka dengan superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($P < 0,01$)

5.1.3 Hasil Pemanenan Embrio dari Program Superovulasi (*Recovery Rate* dan Peringkat Produktivitas Donor)

Di dalam proses superovulasi menggunakan hormon gonadotropin yang disuntikan dari luar tubuh (eksogen), diharapkan akan menimbulkan penyerentakan perkembangan

dan pematangan beberapa folikel beserta ovanya agar siap untuk diovulasikan. Sel-sel telur (ova) yang telah diovulasikan masuk kedalam saluran telur dan segera difertilisasi oleh spermatozoa yang diinseminasikan pada saat donor estrus. Baik ova yang tidak terbuahi (*unfertilized ova*) maupun yang terfertilisasi (*fertilized ova*) akan ditransportasi dalam saluran telur ke dalam kornua uteri. Ova yang terfertilisasi, selama transportasi mengalami proses cleavage, berkembang menjadi embrio. Pembilasan kedua kornua uteri pada D7 setelah inseminasi, akan mengeluarkan baik ova maupun embrio yang belum implantasi, ditampung dan dikoleksi (dipanen).

Tabel 9. Perbandingan Hasil Panen Embrio per Donor (*Recovery Rate*) dari Kelompok Kontrol dan Perlakuan yang Memperoleh MoAb, hCG atau Kombinasi Gabungan MoAb dengan hCG

Kelompok	Jumlah Donor (ekor)	Jumlah CL per Donor (n)	Jumlah Ova Dan Embrio per Donor (n)	<i>Recovery Rate</i> (%)
I	5	4,8	4,4	91,7
II	5	16,0	13,0	81,3
III	5	14,8	12,4	83,8
IV	5	16,4	13,2	80,5
V	5	14,2	11,2	78,9

Data dalam Tabel 8, memperlihatkan bahwa kelima kelompok donor, baik kontrol maupun kelompok-kelompok yang disuntik dengan MoAb dan atau hCG memberikan hasil *recovery rate* yang sama. *Recovery rate* kelompok I, II, III, IV dan V masing-masing 91,7%, 81,3%, 83,8%, 80,5% dan 78,9%. Perolehan ova dan atau embrio dari pembilasan kornua uteri atau *embryo flushing* yang dinyatakan dalam *recovery rate* dari kelima kelompok ini tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$).

Hasil panen dengan tingkat produktivitas tinggi diperoleh kelompok-kelompok perlakuan baik yang mendapat MoAb atau hCG atau kombinasi MoAb dan hCG. Peringkat produktivitas tertinggi adalah kelompok IV sebesar 12,6 embrio per donor diikuti berturut-turut keperingkat yang lebih rendah oleh kelompok II, III dan V masing-masing 12,0, 11,6, dan 10,6 embrio per donor. Keempat kelompok perlakuan tersebut secara statistik memiliki tingkat produktivitas yang sama atau tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penyuntikan MoAb atau hCG dan atau kombinasi

keduanya memberikan pengaruh yang sama pada donor yang disuperovulasi dengan PMSG.

Pada kelompok kontrol (I) yang disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG, tanpa disuntik dengan MoAb ataupun hCG, hanya memperoleh 3,8 embrio per donor. Hasil panen pada kelompok kontrol merupakan peringkat terendah dan jauh lebih rendah dibanding dengan kelompok perlakuan II, III, IV dan V ($P < 0,01$). Data ini menunjukkan bahwa baik MoAb atau hCG, maupun kombinasi MoAb-hCG dapat meningkatkan produktivitas donor yang disuperovulasi dengan PMSG (Tabel 9).

Tabel 10. Perbandingan Ratan Produksi Embrio per Donor Hasil Panen Pada D7 dari Kelima Kelompok Donor yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG, Tanpa Atau dengan Kombinasi Perlakuan

Kelompok	Jumlah Donor	<i>Unfertilized Ova</i> (n)	Fertilized Ova atau Embrio (n)	Rataan Embrio per Donor (n)
I	5	3	19	3,8 ^b
II	5	5	60	12,0 ^a
III	5	4	58	11,6 ^a
IV	5	3	63	12,6 ^a
V	5	3	53	10,6 ^a

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

5.1.4 Evaluasi dan Klasifikasi Kualitas Embrio

Sel telur yang tidak terbuahi (*unfertilized ova*) dan embrio praimplantasi yang telah memasuki kornua uteri memiliki beberapa kemungkinan baik dari aspek stadia perkembangan maupun kualitas yang berkorelasi dengan viabilitasnya. Stadia dan kualitas embrio intraselular dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kematangan ova prafertilisasi, baik inti maupun sitoplasmanya, faktor makanan, keseimbangan hormonal dan lingkungan internal uterus (*fetal maternal relationship*). Menurut Armstrong (1987) kualitas embrio ditentukan oleh beberapa faktor yaitu macam hormon gonadotropin serta cara aplikasinya, faktor genetik, manajemen serta keadaan reproduksi donor.

Dijelaskan bahwa FSH dan LH dibutuhkan untuk perkembangan folikel akan tetapi kelebihan LH sedikit saja akan menurunkan nilai ambang FSH yang dibutuhkan untuk induksi superovulasi dan dapat mempengaruhi baik stadia maupun kualitas embrio. PMSG merupakan hormon gonadotropin yang mirip dengan FSH dan LH. Secara bioassay,

PMSG menunjukkan aktifitas biologis berupa biopotensi FSH dan LH. Dari penelitian Saumande dan Chupin, (1990) disimpulkan bahwa walaupun PMSG memiliki biopotensi yang tinggi dalam stimulasi ovaria akan tetapi hasil panen dan kualitas embrionya masih rendah. Fenomena ini terjadi karena adanya *negative rebound effect* dari PMSG terhadap hipofisa sehingga LH tidak disekresi. Masalah ini dapat diatasi dengan pemberian antisera terhadap PMSG atau hCG untuk mencukupi LH endogen sehingga baik kualitas maupun kuantitas embrio hasil panen dapat diperbaiki.

5.1.5 Stadia Perkembangan Embrio dari Pemanenan Hasil Superovulasi

Dalam penelitian ini pengaruh pemberian MoAb dan atau hCG pada donor yang disuperovulasi dengan PMSG, terhadap stadia perkembangan embrio dapat dilihat pada tabel 10. Yang sangat menyolok adalah proporsi ova yang tidak terbuahi (*unfertilized ova*) pada kelompok kontrol (I) 13,6%, sekitar dua kali lebih besar dari pada kelompok perlakuan baik yang mendapat MoAb dan atau hCG yaitu kelompok II 7,7%, III 6,4%, IV 4,5% dan V 5,3%. Proporsi sebaran stadia embrio pada seluruh kelompok baik kontrol maupun perlakuan adalah berimbang terdiri atas morula, blastosis dini dan blastosis.

Tabel 11. Proporsi Sebaran Stadia Embrio Hasil-Hasil Superovulasi Menggunakan Hormon PMSG, dengan atau Tanpa Kombinasi Perlakuan

Kelompok	Jumlah Donor	Ova Tidak Terbuahi	Morula Deg.	Morula Ret.	Morula	Blastosis Dini	Blastosis	Jumlah n
		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
I	5	3(13,6)	3(13,6)	4(18,2)	6(27,3)	5(22,7)	1(4,5)	22
II	5	5(7,7)	8(12,3)	4(6,1)	29(44,6)	14(21,5)	5(7,7)	65
III	5	4(6,4)	6(9,7)	5(8,1)	31(50,0)	10(16,1)	6(9,7)	62
IV	5	3(4,5)	3(4,5)	4(6,1)	36(54,5)	12(18,2)	8(12,1)	66
V	5	3(5,3)	2(3,6)	3(5,3)	30(53,6)	12(21,4)	6(10,7)	56

5.1.6 Kualitas Embrio Hasil Panen dari Program Superovulasi

Kelaikan transfer sebuah embrio tergantung pada stadia dan kualitasnya. Embrio yang retarded, degenerasi berat atau ova yang tidak terbuahi tidak akan menghasilkan kebuntingan. Kriteria keberhasilan transfer embrio dinyatakan dalam angka kebuntingan (*pregnancy rate*). Semakin tinggi angka kebuntingan, semakin berhasil. Tentunya keberhasilan kebuntingan ditentukan oleh faktor stadia dan kualitas embrio dan bukan oleh

kuantitas. Embrio yang memiliki stadia D7 dengan kualitas baik, tentunya memiliki viabilitas yang tinggi dan sesuai dengan lingkungan internal uterus resipien D7 dan akan mampu berkembang lebih lanjut dengan baik pula sehingga resipien dapat menjadi bunting (Betteridge *et al.*, 1980).

Proporsi embrio laik transfer dapat dilihat pada Tabel 11. Proporsi embrio laik transfer kelompok perlakuan II, III, IV dan V masing-masing 73,8%, 75,8%, 84,8% dan 85,7%. Produksi embrio laik transfer keempat kelompok perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (I) yang menghasilkan embrio dengan proporsi embrio laik transfer 54,5%, jelas lebih rendah dari pada kelompok-kelompok perlakuan ($P < 0,05$). Kelompok kontrol yang disuperovulasi dengan PMSG saja masih menghasilkan embrio yang tidak laik transfer cukup tinggi 45,5%. Proporsi tidak laik transfer yang tinggi ini disebabkan karena masih adanya residu PMSG yang masih bersirkulasi dalam peredaran darah dan menyebabkan efek negatif pada hasil panen embrio, sedangkan pada kelompok perlakuan MoAb dan atau hCG *negative rebound effect* dari PMSG telah teratasi dengan aplikasi MoAb dan atau hCG.

Tabel 12. Perbandingan Jumlah Embrio yang Laik Transfer dan Tidak Laik Transfer, dari Kelima Kelompok Program Superovulasi 2.500 IU PMSG yang Berbeda dalam Perlakuan Kombinasi Aplikasi MoAb dan hCG

Kelompok	Jumlah Donor (ekor)	Embrio Tidak Laik Transfer		Embrio Laik Transfer		Jumlah (n)
		(n)	(%)	(n)	(%)	
I	5	10	45,5	12	54,5 ^b	22
II	5	17	26,1	48	73,8 ^a	65
III	5	15	24,2	47	75,8 ^a	62
IV	5	10	15,2	56	84,8 ^a	66
V	5	8	14,3	48	85,7 ^a	56

Angka dengan huruf superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama, berbeda nyata ($P < 0,05$)

Menurut Elsdon dan Seidel (1985) sampai saat ini angka kebuntingan (*pregnancy rate*) hasil transfer embrio tanpa bedah embrio beku masih di bawah 50%. Hanya embrio dengan kualitas tinggi (A atau B) yang cocok untuk dibekukan (kriopreservasi); berarti sekitar 15% embrio laik transfer (kualitas C) harus sesegera mungkin ditransfer keresipien tanpa dibekukan terlebih dulu atau kalau tidak sebaiknya dibuang. Selain itu sekitar sepersepuluh dari jumlah embrio yang dibekukan akan mengalami rusak berat, dan tidak

dapat dipakai ataupun ditransfer ke resipien. Data yang terangkum dalam tabel 12, menunjukkan bahwa kelompok perlakuan IV dan V yang mendapat aplikasi gabungan MoAb dan hCG dapat menghasilkan embrio kualitas A masing-masing 34,8% dan 35,7%, lebih banyak dari pada kelompok kontrol (I) yang hanya mencapai 13,6% ($P < 0,05$). Sedangkan pada kelompok perlakuan II yang mendapat MoAb dan III yang disuntik hCG, masing-masing menghasilkan proporsi embrio kualitas A 23,1% dan 20,9%, walaupun secara empiris lebih tinggi dari pada kelompok kontrol tetapi secara statistik tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Data tersebut menunjukkan bahwa aplikasi gabungan MoAb dan hCG dapat meningkatkan proporsi kualitas A, embrio hasil panen dari donor yang disuperovulasi dengan PMSG.

Tabel 13. Komposisi Sebaran Kualitas Embrio Hasil-Hasil Superovulasi Menggunakan Hormon 2.500 IU PMSG, Tanpa Atau dengan Kombinasi Perlakuan MoAb dan hCG

Kelompok	Jumlah Donor (ekor)	Kualitas Embrio				Jumlah (n)
		Embrio Tidak Laik Transfer n(%)	Embrio Laik Transfer			
			A n(%)	B n(%)	C n(%)	
I	5	10(45,5)	3(13,6) ^b	4(18,2)	5(22,7)	22
II	5	17(26,1)	15(23,1) ^{ab}	17(26,1)	16(24,6)	65
III	5	15(24,2)	13(20,9) ^{ab}	18(29,1)	16(25,8)	62
IV	5	10(15,2)	23(34,8) ^a	19(28,8)	14(21,2)	66
V	5	8(14,3)	20(35,7) ^a	18(32,1)	10(17,8)	56

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

5.1.7 Peringkat Keberhasilan Produksi Embrio

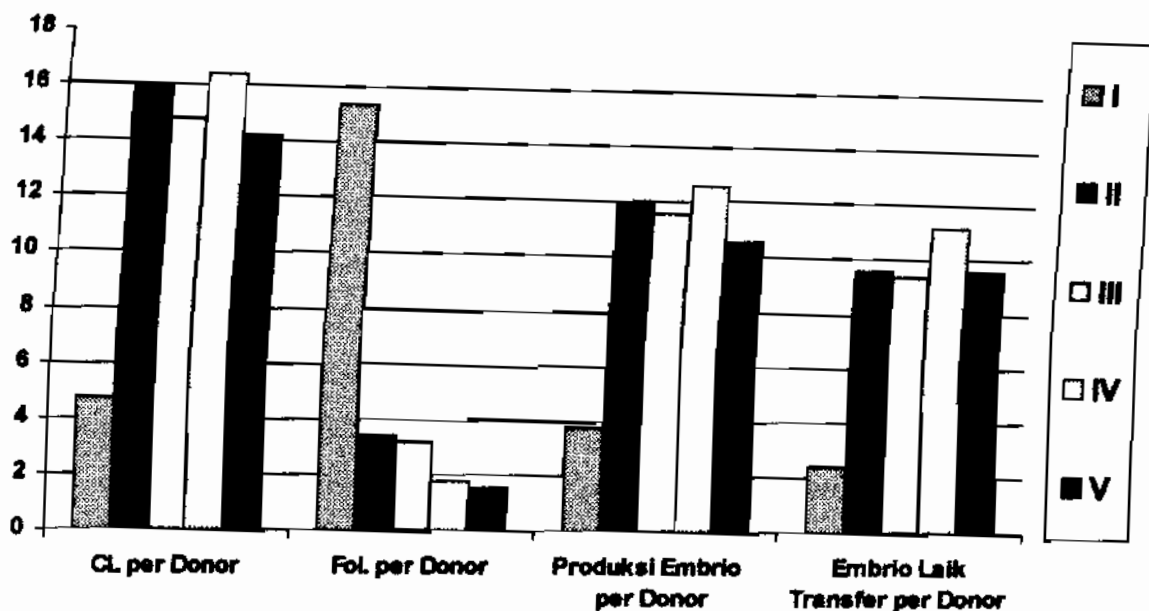
Keberhasilan upaya produksi embrio dalam program transfer embrio dengan metoda superovulasi dapat dibuktikan dari hasil panennya dan kesehatan reproduksi donor setelah disuperovulasi. Peringkat keberhasilan produksi embrio ditentukan dari angka ovulasi (*ovulation rate*) dan hasil panen berupa jumlah embrio laik transfer yang tinggi. Sedangkan kesehatan reproduksi dan fertilitas donor ditentukan oleh rendahnya angka folikel persisten pada waktu paenen (*unovulatory follicle rate*). Donor yang yang tidak memiliki folikel persisten tetapi CL, walaupun dengan CL yang banyak, setelah penyuntikan dengan prostaglandin pada waktu panen embrio, akan segera kembali ke proses fisiologis siklus kelamin semula yang teratur dan siap untuk produksi embrio

kembali. Keberhasilan kelompok-kelompok perlakuan yang selain disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG juga dikombinasi dengan penambahan MoAb dan atau hCG dapat dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya disuperovulasi dengan 2.500 IU PMSG saja. Selain itu juga dapat diperbandingkan dan ditentukan keberhasilan produksi embrio dari setiap kelompok perlakuan kombinasi dengan MoAb secara i.v. (kelompok II), kombinasi dengan hCG yang diaplikasi i.v. (kelompok III), kombinasi MoAb dan hCG i.v. (kelompok IV), dan kelompok V yang dikombinasi dengan MoAb i.v. dan hCG i.m. Perbandingan secara komparatif dari kelima kelompok tersebut diatas dapat dilihat pada Tabel 13 dan Gambar 4.

Tabel 14. Peringkat Keberhasilan Secara Komparatif dari Kelima Kelompok yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan

Kelompok	Corpus Luteum Per Donor (n)	Folikel Per Donor (n)	Produksi Embrio Per Donor (n)	Embrio Laik Transfer Per Donor (n)
Tanpa MoAb-hCG (I)	4,8	15,4	3,8	2,4 ^b
MoAb i.v. (II)	16,0	3,4	12,0	9,6 ^a
HCG i.v. (III)	14,8	3,2	11,6	9,4 ^a
MoAb-hCG i.v. (IV)	16,4	1,8	12,6	11,2 ^a
MoAb i.v.-hCG i.v. (V)	14,2	1,6	10,6	9,6 ^a

Angka dengan superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ($P < 0,01$)



Gambar 3 : Histogram Perbandingan Keberhasilan Kelima Kelompok Donor Yang Disuperovulasi 2.500 IU PMSG Dengan Atau Tanpa Kombinasi Perlakuan MoAb-hCG

Percobaan Tahap II

3.2 Metode *Direct Transfer* Dalam Kriopreservasi Embrio Sapi

Prosedur pembekuan embrio konvensional menggunakan krioprotektan seperti gliserol dan DMSO, memerlukan metoda bertahap (*step-wise*) dalam pengenceran/pembilasan krioprotektan intraselular atau menggunakan solute yang nonpenetratif sebagai bufer osmotik selama krioprotektan diencerkan dari sel-sel embrionik. Dalam prosedur ini embrio harus dikeluarkan dari straw plastik dan dibilas dari krioprotektan secara bertahap sebelum ditransfer ke resipien. Hal ini merupakan kerja yang banyak memerlukan peralatan dan menghabiskan waktu yang tidak sedikit.

Penyederhanaan prosedur yang kompleks, dari metoda bertahap ke metoda yang lebih simpel dan singkat yang memungkinkan transfer langsung ke resipien setelah embrio beku di cairkan merupakan nilai tambah tersendiri dalam prosedur transfer *embrio* komersial. Campuran krioprotektan dapat diencerkan/dibilas dari sel-sel embrio sementara embrio berada dalam straw plastik yang merupakan tempat *ke* dibekukan. Pendekatan ini memungkinkan transfer langsung (*direct trans*) ke resipien setelah pencairan tanpa melakukan pemeriksaan at

krioprotektan dari embrio di luar straw plastik. Prosedur umum dalam metoda ini adalah pengemasan kolom atau kolom-kolom medium sukrosa yang terpisah oleh rongga udara dengan kolom embrio-krioprotektan dalam straw plastik. Metoda ini telah dilaporkan efektif jika ditransfer langsung ke resipien setelah pencairan.

Eksperimen yang dilakukan dalam penelitian ini berskala laboratoris dan merupakan simulasi metoda *direct transfer* lapangan. Setelah sampel mencair, embrio dikeluarkan dari straw, langsung dievaluasi dan diklasifikasi peringkat kualitasnya. Setelah penentuan peringkat kualitas embrio beku pascapencairan dilakukan rehidrasi langsung baik tanpa sukrosa maupun dengan sukrosa dan terakhir embrio ditransfer ke dalam medium kultur. Pemupukan atau kultur *in vitro* dilakukan selama 24 jam untuk menentukan viabilitasnya.

5.2.1 Kualitas Pascapencairan Embrio Beku

Kualitas embrio beku pascapencairan terlihat pada Tabel 14. Perbandingan kualitas embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG dan 1,5 M PROH menunjukkan tingkat efektifitas diantara kedua krioprotektan dalam melindungi atau menekan kerusakan sel embrionik selama proses pembekuan. Tampak peringkat embrio beku pasca pencairan yang dibekukan dalam 1,5 M EG, proporsi kualitas satu sebesar 42,9%, lebih tinggi dari pada embrio yang dibekukan dengan 1,5 M PROH sebanyak 28,6% ($P < 0,05$). Sedangkan proporsi embrio kualitas dua dan tiga dari hasil pembekuan dengan 1,5 M EG masing-masing 33,3% dan 16,6% tidak berbeda nyata dengan hasil pembekuan embrio dalam 1,5 M PROH yaitu masing-masing 31,0% dan 19,0%. Pembekuan menggunakan 1,5 M PROH selain menghasilkan embrio kualitas satu lebih rendah dari 1,5 M EG, juga masih menimbulkan degenerasi sel embrionik lebih banyak ($P < 0,01$) pada peringkat kualitas empat yaitu PROH sebesar 16,6% sedangkan EG hanya 4,8%.

Tabel 15. Perbandingan Kualitas Pascapencairan Embrio Beku Dalam Krioprotektan 1,5M Ethylene Glycol (EG) dan 1,5 M 1,2-Propanediol (PROH)

Peringkat Kualitas Embrio	Embrio Beku Pascapencairan			
	1,5 M EG		1,5 M PROH	
	Jumlah (n)	Persen (%)	Jumlah (n)	Persen (%)
1	18	42,9 ^a	12	28,6 ^b
2	14	33,3 ^a	13	31,0 ^a
3	7	16,6 ^a	8	19,0 ^a
4	2	4,8 ^c	7	16,6 ^d
5	1	2,4 ^a	2	4,8 ^a

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam baris yang sama berbeda nyata.

^{a,b} Berbeda nyata ($P < 0,05$)

^{c,d} Berbeda nyata ($P < 0,01$)

5.2.2 Survival Rate Embrio Beku Pascapencairan

Kemampuan masing-masing krioprotektan dalam melindungi embrio selama proses pembekuan dapat dilihat dari data yang tersaji dalam Tabel 15. Medium krioprotektan 1,5 M EG dapat mencapai proporsi embrio yang survive sebesar 92,8%, lebih efektif melindungi embrio dari pada 1,5 M PROH sebagai krioprotektan yang memperoleh survival rate 78,6% ($P < 0,05$). Berdasarkan data ini dapat ditunjukkan, bahwa ada penurunan kualitas embrio prakriopreservasi dari kualitas satu (A) dan dua (B) menjadi kualitas lebih rendah empat dan lima setelah dibekukan. Hasil pascapencairan dari proses kriopreservasi masih ada sejumlah embrio beku yang rusak berat, degenerasi bahkan mati. Proporsi embrio beku yang degenerasi atau rusak berat/mati (kualitas empat dan lima) dari 1,5 M EG sebesar 7,2% sedangkan 1,5 M PROH sebanyak 21,4%.

Tabel 16. Pengaruh 1,5 M Ethylene Glycol (EG) dan 1,5 M 1,2-Propanediol (PROH) Sebagai Krioprotektan Terhadap Survival Rate Embrio Beku Pascapencairan

Krioprotektan	Jumlah Embrio Beku (n)	Jumlah Embrio Rusak/Mati (n)	Survival Rate	
			Jumlah (n)	Persen (%)
1,5 M EG	42	3	39	92,8 ^a
1,5 M PROH	42	9	33	78,6 ^b

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

Perbedaan permeabilitas sel-sel embrionik terhadap krioprotektan dan air, menentukan metoda yang harus dipakai dalam pembilasan krioprotektan (*cryoprotectant removal*) dari embrio beku yang telah dicairkan. Pembilasan krioprotektan dengan metoda pengenceran bertahap (*step-wise dilution of cryoprotectant*), akan memberikan kesempatan krioprotektan setiap tahap keluar dari embrio, akan tetapi metoda bertahap ini masih memberikan stress fisik berupa keluar masuknya air sehingga terjadi pengembangan sel (*cellular expansion*) secara berulang di setiap tahap equilibrasi pascapencairan yang dapat memberikan dampak negatif terhadap viabilitas embrio. Untuk mengatasi hal ini sukrosa dapat dipakai sebagai bufer osmotik yang dapat mempertahankan keseimbangan osmotik diantara sel-sel embrionik dengan lingkungan ekstraselular, sementara krioprotektan keluar dari embrio (*exosmose*).

5.2.3 Viabilitas Embrio Beku

Untuk menentukan efektivitas rehidrasi langsung tanpa sukrosa dan rehidrasi langsung melalui perantara medium sukrosa dapat dilihat pada data yang terkompilasi pada Tabel 16. Viabilitas 24 jam kultur kelompok kontrol (I) yang juga merupakan metoda rehidrasi langsung tanpa sukrosa, pada embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG mencapai 80,0%, lebih baik dari pada kelompok kontrol yang dibekukan dalam 1,5 M PROH yang hanya memberikan angka viabilitas 22,2 % ($P < 0,01$). Demikian pula halnya viabilitas 24 jam kultur in vitro embrio beku pasca pencairan pada kelompok II yang direhidrasi menggunakan 0,2 M sukrosa, menunjukkan bahwa viabilitas embrio yang dibekukan dengan 1,5 M EG mencapai 80,0%, lebih banyak ($P < 0,05$) dari pada yang dibekukan dengan 1,5 M PROH dengan viabilitas 36,3%. Sedangkan embrio beku pada kelompok III dan IV baik yang dibekukan dalam 1,5 M EG maupun 1,5 M PROH, memiliki kemampuan berkembang atau viabilitas yang tidak berbeda jika direhidrasi dalam medium 0,4 M ataupun 0,8 M sukrosa ($P > 0,05$). Secara empiris viabilitas embrio 24 jam kultur in vitro dari embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG dan direhidrasi dengan 0,4 M dan 0,8 M sukrosa masing-masing 90,9% dan 81,8%, begitu pula pada embrio yang dibekukan dalam 1,5 M PROH memiliki viabilitas berturut-turut 83,3% dan 90,0%.

Tabel 17. Viabel Rate Embrio Beku Pascapencairan (Pascapembilasan) Setelah Dikultur In Vitro Selama 24 Jam

Kelompok	Konsentrasi Sukrosa (M)	Krioprotektan					
		Embrio Beku (n)	1,5 M EG		Embrio Beku (n)	1,5 M PROH	
			Embrio Viabel			Embrio Viabel	
		(n)	(n)	(%)	(n)	(n)	(%)
I	0,0	10	8	80,0 ^a	9	2	22,2 ^b
II	0,2	10	8	80,0 ^a	11	4	36,3 ^b
III	0,4	11	10	90,9 ^a	12	10	83,3 ^a
IV	0,8	11	9	81,8 ^a	10	9	90,0 ^a

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Secara global, dari data viabilitas 24 jam kultur in vitro, embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG toleran terhadap pemaparan langsung dengan medium kultur MPBS 10%FBS (rehidrasi langsung) tanpa pengenceran melalui medium sukrosa. Krioprotektan 1,5 M PROH kurang efektif jika diperlakukan dengan cara rehidrasi langsung tanpa sukrosa, atau rehidrasi langsung dengan sukrosa tetapi berkonsentrasi rendah 0,2 M. Dalam penelitian ini, diperoleh viabel rate yang rendah jika dipergunakan PROH sebagai krioprotektan, akan tetapi Suzuki *et al.*, (1990) justru sebaliknya memperoleh viabel rate yang cukup tinggi dari eksperimennya, yaitu 83% dan 91%, setelah masing-masing embrio beku dalam 1,5 M PROH direhidrasi dengan 0 M dan 0,2 M sukrosa.

Viabilitas embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG akan tetap tinggi baik yang direhidrasi langsung tanpa ataupun dengan medium sukrosa berkonsentrasi 0,2 M, 0,4 M, ataupun 0,8 M, yaitu masing-masing viabel rate-nya berurutan 80%, 80%, 90%, 81,8% dan tidak ada perbedaannya untuk masing-masing kelompok ($P > 0,05$). Embrio yang dibekukan dalam 1,5 M PROH, akan mencapai viabel rate yang tinggi, hanya jika direhidrasi langsung dengan 0,4 M atau 0,8 M sukrosa, yaitu mencapai masing-masing 83,3% dan 90,0%.

Secara kronologis merunut ke laporan penelitian terdahulu seperti Miyamoto dan Ishibashi (1979) mengungkapkan efektivitas EG sebagai krioprotektan untuk embrio murine. Dalam penelitiannya terobservasi bahwa EG lebih baik dari pada DMSO dan gliserol dalam proteksi embrio terhadap efek pembekuan di bawah -60°C . EG juga memperlihatkan efektivitasnya sebagai krioprotektan untuk embrio domba (Heyman *et*