PEMBENTUKAN BLASTOSIT SECARA FERTILISASI *IN VITRO* PADA SAPI DARI BANGSA DAN KONSENTRASI SPERMA YANG BERBEDA

Sugiono[1], T. Wijayanto[2], & C. Sumantri[3]

[1]Balai Embrio Ternak Cipelang, Bogor, Indonesia
[2]Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor
[3]Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor
(Diterima 13-09-2000, disetujui 05-11-2001)

ABSTRACT

The aim of this research was to asses the influences of cattle breeds and sperm concentrations in producing blastocyst. This research was conducted at The National Livestock Embryo Center, Cipelang, Bogor, from March to April 2000. Research material used in this experience were ovaries of PO and Brahman Cross cattles collected from a slaughter house, frozen semen collected from Brangus cattle with concentration of 12,5 x 10^6 and 25 x 10^6 and Angus cattle with concentration 25 x 10^6 was obtained from The National Artificial Insemination Center, Lembang. Oocyst produced through aspiration was matured in a medium of TCM-199 + 5% Calf Serum (CS) + Antibiotic, then incubated at the temperature of 38,5°C and 2% CO_2 for 20 hours. Sperm was capatitation in a medium BO suplemented with heparin and BSA. Fertilitation at the temperature of 38,5°C and 2% CO_2 for 5 Hours, After fertilitation embrio cultured at the temperature of 38,5 °C and 5% CO_2 in culture medium CR1aa + 5% CS + antibiotik.

The final result of this research showed that differences of sire breed did not give influence to 2-4, ≥5 cell cleavage, total cleavage and blastocyst at eight day but gave significant influence ($P<0,05$) on the formation of blastocyst at sixth day, seventh day and total blastocyst. The difference of cow breed did not influence 2-4, ≥5 cell cleavage, total cleavage, percentage of blastocyst formation at seventh day, eight day, and total blastocyst, but significantly influenced ($P<0,01$) the blastocyst formation at sixth day. The increase of sperm concentration from 12,5 x 10^6 to 25 x 10^6 did not influence 2-4, ≥ 5 cell cleavage and total cleavage, percentage of blastocyst formation at seventh and eight day and total blastocyst, but significantly influenced ($P<0,05$) blastocyst formation at sixth day.

Key words **: Breeds, concentration, IVF, blastocyst.**

PENDAHULUAN

Fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu pengembangan bioteknologi dalam bidang reproduksi. Dengan fertilisasi *in vitro* dapat dihasilkan embrio pada berbagai tahap perkembangan dalam jumlah yang besar dan waktu yang singkat.

Secara genetik perkembangan embrio dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti bangsa pejantan, bangsa betina dan konsentrasi sperma yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro*. Goldbard & Warner (1982) menyatakan bahwa faktor genetik termasuk efek paternal-maternal berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan. Perkembangan embrio dipengaruhi oleh pejantan (Shire & Whitten, 1980a; Sumantri *et al.*, 1998) dan induk (Shire & Whitten, 1980b). Dengan mengetahui pengaruh beberapa faktor tersebut terhadap perkembangan embrio, maka kita dapat memberikan suatu kondisi yang optimal untuk meningkatkan hasil yang diperoleh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bangsa pejantan, bangsa betina dan konsentrasi sperma terhadap pembelahan sel menjadi 2-4 dan ≥5 sel sampai pada pembentukan blastosit.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Balai Embrio Ternak Cipelang, Bogor, dimulai pada bulan Maret sampai dengan April 2000.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah: semen sapi Brangus dengan nomor lot (149412 V 097) dan Angus (179701X41) dari Balai Inseminasi Buatan Lembang, ovari sapi PO dan Brahman Cross yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Cianjur, saline fisiologis, penisilin, streptomisin, Dulbeco's, M-PBS, calf serum (CS), TCM-199, kafein, heparin, BSA, *mineral oil*, media BO (*Brackett and Oliphant*) dan media CR1aa.

Alat-alat

Termos, gunting bedah, pisau bedah, *bowled mesh*, beaker, *syringe* 5 ml, jarum suntik (18 G), kertas *tissue*, *water bath*, *hot plate*, cawan petri (35 dan 90 mm), pipet pasteur, mikroskop, inkubator, *sentrifuge*, *Neubeur chamber*, pembakar bunsen, pinset, *hand counter*.

Maturasi Oosit *In Vitro*

Ovari sapi dikoleksi dari rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dengan larutan saline steril yang disuplementasi dengan antibiotik (streptomycin 100 mg/l dan penicillin 100.000 IU/l) pada suhu 25 °C, tiga jam setelah pemotongan. Oosit dari folikel yang berukuran 2 sampai 6 mm setelah dicuci dengan modified-PBS yang disuplementasi dengan 3% CS, diaspirasi dengan jarum 18 G. Oosit hasil aspirasi dicuci tiga kali pada medium maturasi (TCM-199, Earle,s salt: Gibco, Grand Island, NY USA) yang di suplemen-tasi dengan 5% CS dan antibiotik (streptomisin 100 mg/l dan penisilin 100.000 IU/I). Oosit yang masih dikelilingi oleh sel-sel kumulus diinkubasi pada media maturasi selama 20 jam pada suhu 38,5 °C dan 2% CO_2.

Fertilisasi *In Vitro*

Semen beku yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* dicairkan pada *waterbath* (37°C), kemudian dicuci dua kali pada medium BO (*Brackett and Oliphant*) ditambah 10 Mm kafein dan 4µg/ml heparin lalu di-*sentrifuge* 1800 rpm selama 5 menit (prosedur ini diulang dua kali). Pada sedimen yang terbentuk ditambahkan 0,5-0,8 ml larutan pencuci sperma dan 20 mg/ml BSA sampai konsentrasi sperma yang diinginkan yaitu 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml. Sperma tersebut dibuat drop (100 µl) pada cawan petri kemudian permukaannya ditambahkan mineral oil dan diprainkubasi selama 1 jam pada suhu 38,5°C dan 2% CO_2. Oosit yang telah matang dipindahkan ke dalam drop sperma agar terjadi fertilisasi.

Evaluasi Embrio

Lima jam setelah fertilisasi, oosit di cuci dan dikultur dengan media kultur CR1aa yang diberi suplemen 5% CS dan antibiotik (penisillin dan streptomisin), pada suhu 38,5°C dan 5% CO_2 (hari pada saat dilakukannya fertilisasi adalah hari ke-0). Setelah 48 jam difertilisasi (hari ke-2), sel-sel kumulus yang melekat pada zigot dipisahkan dengan cara mengetuk-ngetuk cawan petri, sambil dilakukan pengamatan terhadap pembelahan 2-4, dan ≥5 sel, sedangkan blastosit diamati pada hari ke-6 (H6), hari ke-7 (H7), dan hari ke-8 (H8) setelah fertilisasi.

Penelitian ini dikelompokkan dalam tiga aspek yaitu:

1. Pengaruh Bangsa Pejantan
   Oosit yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* berasal dari ovari sapi PO dan sperma berasal dari sapi Brangus dan Angus dengan konsentrasi 25 x10^6 sperma/ml.

2. Pengaruh Bangsa Betina
   Oosit yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* berasal dari ovari sapi PO dan Brahman Cross sedangkan sperma berasal dari sapi Brangus dengan konsentrasi 12.5 x 10^6 sperma/ml.

3. Pengaruh Konsentrasi Sperma
   Oosit yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* berasal dari ovari sapi PO dan sperma berasal dari sapi Brangus dengan konsentrasi 12.5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml.

Analisis Statistik

Pada setiap aspek pengamatan data dianalisis menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan perbedaan bangsa pejantan Brangus dan Angus pada pengamatan 1, perbedaan bangsa betina PO dan Brahman Cross pada pengamatan 2, serta perbedaan konsentrasi 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml untuk pengamatan 3. Pada pengamatan 3 digunakan data fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dan sperma sapi Brangus pada pengamatan 1 dan pengamatan 2. Semua perlakuan diulang empat kali. Data yang tidak normal ditransformasi dalam Arc sin. Model menurut rancangan percobaan Steel & Torrie (1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Bangsa Pejantan yang Berbeda

Persentase pembelahan dan pembentukan blastosit dari total 240 oosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus dan Angus pada konsentrasi 25 x 10^6 sperma/ml disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase pembelahan hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus dan Angus pada konsentrasi 25 x 10^6 sperma/ml

Bangsa pejantan	Pembelahan		
	2-4 sel	≥5 sel	Total
	%		
Brangus	14,279 ± 6,254[a] (29/220)	28,371 ± 12,886[a] (57/220)	42,664 ± 19,104[a] (86/220)
Angus	21,237 ± 7,015[a] (32/146)	13,735 ± 0,898[a] (20/146)	34,972 ± 6,336[a] (52/146)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Persentase oosit hasil fertilisasi *in vitro* yang mengalami pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel, dan total pembelahan tidak dipengaruhi bangsa pejantan. Sesuai dengan Shi *et al.* (1991) yang menyatakan bahwa sperma dari individu yang berbeda mempunyai kemampuan yang berbeda dalam pembentukan blastosit, tetapi tidak berbeda dalam pembelahan. Hal ini dapat disebabkan oleh penggunaan dosis sperma yang tinggi, seperti halnya Kroetsch & Stubbings (1992) yang melaporkan bahwa pada konsentrasi 4 x 10^6, 2 x 10^6 dan 1 x 10^6 sperma/ml, penggunaan pejantan yang berbeda tidak berpengaruh terhadap angka fertilisasi, sedangkan menurut Rehman *et al.* (1994), oosit yang diinkubasi dengan spermatozoa dalam konsentrasi yang besar, dapat menghasilkan enzim hidrolitik selama fertilisasi *in vitro*, keberadaan enzim tersebut dapat mengganggu kemampuan oosit untuk berkembang.

Persentase pembentukan blastosit dari total 240 oosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus dan Angus pada konsentrasi 25 x 10^6 sperma/ml disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase blastosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus dan Angus pada konsentrasi 25 x 10^6 sperma/ml.

Bangsa pejantan	Pembentukan blasosit			
	H-6	H-7	H-8	Total
	%			
Brangus	6,914 ± 1,68[b] (6/86)	22,597 ± 9,759[b] (20/86)	19,179 ± 16,876[a] (18/86)	48,689 ± 27,464[b] (44/86)
Angus	1,25 ± 2,5[a] (1/52)	3,523 ± 4,397[a] (2/52)	3,523 ± 4,397[a] (2/52)	8,296 ± 9,667[a] (5/52)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Bangsa pejantan berpengaruh (P<0,05) terhadap pembentukan blastosit pada hari ke-6, ke-7 dan total blastosit, sedangkan blastosit yang terbentuk pada hari ke-8 tidak dipengaruhi. Sesuai dengan Shi *et al.* (1990), Larocca *et al.* (1996) dan Sumantri *et al.* (1997a) yang menyatakan bahwa variasi individu sapi dan bangsa pejantan dapat menyebabkan terjadinya perbedaan dalam perkembangan embrio.

Pada hasil diperoleh persentase total blastosit yang terbentuk lebih besar dengan menggunakan sperma yang berasal dari semen sapi Brangus (48,689 ± 27,464) dibanding dengan sperma yang berasal dari sapi Angus (8,296 ± 9,667). Ini dapat terjadi karena adanya efek heterosis pada pembentukan blastosit yang menggunakan semen beku Brangus. Persilangan antara Brangus dengan PO menghasilkan keturunan dengan proporsi gen 3/16 Brahman, 5/16 Angus dan 8/16 PO, sedangkan Angus dan PO menghasilkan keturunan dengan proporsi gen 1/2 Angus dan 1/2 PO. Hasil persilangan Brangus dan PO mempunyai heterosigositas lebih tinggi dibanding hasil persilangan Angus dan PO, sehingga akan menghasilkan efek heterosis yang lebih besar. Menurut Lasley (1963) dan Noor (1996) semakin besar tingkat heterosigositas keturunan hasil persilangan akan menyebabkan efek heterosis yang besar pula. Selanjutnya Noor (1996) menyatakan bahwa persilangan antara F1 hasil persilangan dua bangsa yang berbeda dengan bangsa ketiga memungkinkan untuk mencapai heterosis yang maksimal. Didukung oleh Goldbard & Warner (1982) yang menyatakan bahwa faktor genetik termasuk efek paternal-maternal berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan. Mermillod *et al.* (1992), perbedaan perkembangan embrio dipengaruhi oleh variasi genetik dari individu sapi.

Pengaruh Bangsa Betina yang Berbeda

Persentase pembelahan dari total 240 oosit sapi Brahman Cross dan 180 oosit sapi PO hasil fertilisasi *in vitro* dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 sperma/ml, disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase pembelahan hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi Brahman Cross dan PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 sperma/ml

Bangsa induk	Pembelahan		
	2-4 sel	≥5 sel	Total
	--------------%		
PO	23,417 ± 2,593 [a] (42/183)	36,26 ± 2,183 [a] (66/183)	59,701 ± 4,000 [a] (108/183)
Brahman Cross	29,174 ± 8,683 [a] (44/170)	27,73 ± 7,974 [a] (51/170)	56,904 ± 4,399 [a] (95/170)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Dari hasil analisis, bangsa betina tidak berpengaruh terhadap pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel dan total pembelahan. Sesuai dengan Goto *et al.* (1990) yang menyatakan bahwa oosit dari individu sapi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap pembelahan, tetapi berpengaruh terhadap pembentukan blastosit.

Perkembangan oosit secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: kondisi tubuh sapi (Dominguez, 1995), kumulus sel (Kim *et al.*, 1996), waktu inkubasi sperma-oosit (Sumantri *et al.*, 1997b).

Kondisi tubuh sapi yang berpengaruh terhadap jumlah folikel dan kualitas oosit, sapi dengan *score* tubuh rendah mempunyai jumlah oosit normal lebih sedikit dibanding sapi dengan *score* tubuh tinggi. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan terjadinya fertilisasi normal (Dominguez, 1995). Kumulus berperan sebagai pemelihara dan sumber nutrisi bagi oosit (Toelihere, 1993), memperbaiki angka fertilisasi melalui mekanisme kapasitasi dan memfasilitasi interaksi antara spermatozoa yang sudah mengalami kapasitasi dengan permukaan zona pellusida (Cox *et al.*, 1993), tetapi hal ini tidak akan terjadi sebelum oosit mencapai tahap akhir maturasi pada meiosis II (Xu & King, 1990).

Pembentukan blastosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi Brahman dan PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 sperma/ml, disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pembentukan blastosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi Brahman Cross dan PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 sperma/ml

Bangsa induk	Pembentukan blasosit			
	H-6	H-7	H-8	Total
	--------%			
PO	$23{,}669 \pm 12{,}086^{b*}$ (24/108)	$14{,}185 \pm 7{,}724^{a}$ (14/108)	$10{,}624 \pm 5{,}851^{a}$ (11/108)	$48{,}477 \pm 19{,}802^{a}$ (49/108)
Brahman Cross	$1 \pm 2^{a*}$ (1/95)	$5{,}176 \pm 3{,}538^{a}$ (6/95)	$12{,}333 \pm 10{,}281^{a}$ (15/95)	$18{,}508 \pm 12{,}88^{a}$ (22/95)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05), tanda* menunjukan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01).

Persentase oosit yang membentuk blastosit pada hari ke-6, sangat dipengaruhi oleh bangsa induk (P<0,01), tetapi pada hari ke-7, ke-8 dan total blastosit yang terbentuk adalah tidak dipengaruhi. Berbeda dengan Sumantri *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa oosit yang berasal dari setiap individu mempunyai kemampuan yang berbeda untuk membentuk blastosit. Persilangan Brangus dan PO menghasilkan keturunan dengan komposisi gen 3/16 Brahman, 5/16 Angus dan 8/16 PO. Persilangan dari beberapa bangsa yang berbeda akan meningkatkan heterosigositas genotip keturunannya, yang dapat menyebabkan terjadinya heterosis. Persilangan antara Brangus dan Brahman Cross akan menghasilkan keturunan yang memiliki gen 1/2 Brangus dan 1/2 Brahman Cross yang dapat menyebabkan terjadinya efek heterosis, namun persilangan antara Brangus dan Brahman Cross yang sama-sama memiliki gen Brahman akan berpengaruh terhadap produktivitas keturunannya. Noor (1996) menyatakan bahwa sapi-sapi hasil persilangan yang disilangkan kembali dengan salah satu bangsa tetuanya dapat mengurangi kemungkinan pencapaian heterosis maksimal. Menurut Diggins & Bundy (1962) hanya Brangus yang memiliki 3/8 gen Brahman dan 5/8 gen Angus yang diakui sebagai Brangus murni. Terjadinya perubahan genotip pada F1 hasil persilangan dapat menyebabkan perubahan produktivitasnya, sehingga tidak sebaik Brangus murni.

Pengaruh Konsentrasi Sperma yang Berbeda

Persentase pembelahan dari total 240 oosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml, disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase pembelahan hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml

Konsentrasi sperma	Pembelahan		
	2-4 sel	≥5 sel	Total
12,5 x 10^6	$23{,}417 \pm 2{,}593^{a}$ (42/183)	$36{,}261 \pm 2{,}183^{a}$ (66/183)	$59{,}701 \pm 4{,}000^{a}$ (108/183)
25 x 10^6	$14{,}279 \pm 6{,}254^{a}$ (29/220)	$28{,}371 \pm 12{,}886^{a}$ (57/220)	$42{,}664 \pm 19{,}104^{a}$ (86/220)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Dari hasil analisis persentase oosit hasil fertilisasi *in vitro* yang mengalami pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel dan total pembelahan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi sperma. Sesuai dengan Kurtu *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa perbedaan konsentrasi sperma tidak mempengaruhi pembelahan. Didukung oleh Mulyawan (1999) yang menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi sperma berpengaruh terhadap pembentukan blastosit tetapi tidak berpengaruh dalam pembelahan. Konsentrasi 12,5 x 10^6 sperma/ml paling optimal untuk membentuk blastosit dibanding 8 dan 10 x 10^6 sperma/ml.

Pembentukan blastosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml, disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pembentukan blastosit hasil fertilisasi *in vitro* oosit sapi PO dengan semen beku Brangus pada konsentrasi 12,5 x 10^6 dan 25 x 10^6 sperma/ml

Konsentrasi sperma	Pembentukan blasosit			
	H-6	H-7	H-8	Total
12,5 x 10^6	23,669 ± 12,086 ^{b} (24/108)	14,185± 7,724 ^{a} (14/108)	10,624± 5,851 ^{a} (11/108)	48,477 ± 19,802 ^{a} (49/108)
25 x 10^6	6,914 ± 1,68 ^{a} (6/86)	22,597± 9,759 ^{a} (20/86)	19,179± 16,876 ^{a} (18/86)	48,689 ± 27,464 ^{a} (44/86)

Keterangan : Huruf kecil yang berbeda menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Konsentrasi sperma berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap pembentukan blastosit pada hari ke-6, tetapi tidak berpengaruh pada hari ke-7, ke-8 dan total blastosit yang terbentuk. Menurut Totey *et al.* (1993) peningkatan konsentrasi sperma mengakibatkan peningkatan penetrasi oosit tetapi dapat menyebabkan terjadinya polispermia. Long *et al.* (1993) menyatakan bahwa polispermia dapat disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi sperma, lamanya maturasi (Chian *et al.*, 1992), waktu inkubasi sperma-oosit (Sumantri *et al.*, 1997b), sedangkan Saeki *et al.* (1995) menyatakan bahwa penggunaan heparin dalam medium yang disuplementasi dengan BSA akan meningkatkan terjadinya polispermia, seiring dengan meningkatnya dosis heparin. Secara normal setelah sperma pertama berkontak dengan permukaan vitellus, akan merangsang terjadinya blokade vitellin yang menghalangi pemasukan spermatozoa berikutnya. Apabila terdapat sperma ekstra yang berhasil memasuki vitellus, walaupun telah terjadi reaksi zona maka ovum dikatakan mengalami polispermia (Toelihere, 1993).

KESIMPULAN

Bangsa pejantan yang berbeda tidak mempengaruhi persentase pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel, total pembelahan dan pembentukan blastosit hari ke-8, tetapi berpengaruh (P<0,05) terhadap pembentukan blastosit hari ke-6, hari ke-7 dan total pembentukan blastosit. Persentase total pembentukan blastosit yang lebih tinggi pada fertilisasi *in vitro* yang menggunakan semen beku Brangus (48,689 ± 27,464) dibanding semen beku Angus (8,296 ± 9,667).

Perbedaan bangsa induk tidak berpengaruh baik terhadap pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel dan total pembelahan, maupun pada persentase pembentukan blastosit pada hari ke-7, 8 dan total blastosit, tetapi sangat berpengaruh (P<0,01) terhadap pembentukan blastosit pada hari ke-6.

Peningkatan kosentrasi sperma dari 12,5 x 10^6 menjadi 25 x 10^6 sperma/ml tidak mempengaruhi pembelahan 2-4 sel, ≥5 sel, total pembelahan, maupun persentase pembentukan blastosit pada hari ke-7, 8 dan total blastosit, tetapi berpengaruh (P< 0,05) terhadap pembentukan blastosit pada hari ke-6. Pengunaan kosentrasi sperma 12,5 x 10^6 sperma/ml lebih efisien dengan persentase total pembentukan blastosit 48,477 ± 19,802 dibanding konsentrasi 25 x 10^6 sperma/ml dengan persentase total pembentukan blastosit 48,689 ± 27,464.

DAFTAR PUSTAKA

Chian, R.C., H. Nakahara, K. Niwa & H. Funahashi. 1992. Fertilization and early cleavage *in vitro* of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology*, 37: 665-672.

Cox, J.F., J. Hormazabal & A.S. Maria. 1993. Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*, 40: 1259-1267.

Diggins, R.V. & C.E. Bundy. 1962. *Beef Production*. 2nd Ed. Prentice-Hall Inc, United States of America.

Dominguez, M.M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on folicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43: 1405-1418.

Goldbard, S.B & C.M. Warner. 1982. Genes affect the timing of early mouse embryo development. *Biol Reprod* 27: 419-424.

Goto, K., Y. Takuma, N. Ooe & K. Ogawa. 1990. *In vitro* development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after *in vitro* fertilization. *Jpn. J. Anim Reprod* 36: 110-113.

Kim, K.S., N. Minami, M. Yamada & K. Utsumi. 1996. Functional role of cumulus cells during maturation in development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 278 (Abstr).

Kroetsch, T.G. & R.B. Stubbings. 1992. Sire and insemination dose does effect *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 37: 240 (Abstr).

Kurtu, J.M., J.D. Ambrose & R. Rajamahendra. 1996. Cleavage rate of bovine oocytes *in vitro* is affected by bulls but not sperm concentrations. *Theriogenology* 45: 257 (Abstr).

Larocca, C., J.E. Romano, J. Calvo, I. Lago, D. Fila, G. Roses, M. Vigueira, S. Kaid. & K. Imai. 1996. Relation between bulls and semen preparation on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 45: 267 (Abstr).

Lasley, J.F. 1963. *Genetics of Livestock Improvement*. Prentice-Hall Inc, New Jersey.

Long, C.R., C.N. Chase, J.J. Balise, R.T. Duby & J.M. Robi. 1993. Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameter and development of bovine embryo *in vitro*. *Theriogenology* 39: 261 (Abstr).

Mermillod, P., C. Wils & A. Massip. 1992. Collection of oocytes and production of blastocyt *in vitro* from individual slaughtered cows. *J. Reprod. Fert.* 96: 717-723.

Mulyawan, Y. 1999. Pembentukan blastosit pada embrio sapi secara fertilisasi *in vitro* dengan variasi konsentrasi sperma. *Skripsi*. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Noor, R.R. 1996. *Genetika Ternak*. Penebar Swadaya, Jakarta.

Rehman, N., A.R. Collins, T.K. Suh & R.W. Wright, Jr. 1994. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured. *Theriogenology* 41: 1447-1452.

Saeki, K., Y. Nagao, M. Hoshi & M. Nagai. 1995. Effect of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43: 751-759.

Shi, D.S., K.H. Lu & I. Gordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 33: 324 (Abstr).

Shi, D.S., K.H. Lu, I. Gordon & C. Polge. 1991. Variation in cleavage and embryonic development of bovine oocytes *in vitro* fertilized with different bull ejaculates. *Theriogenology* 35: 271 (Abstr).

Shire, J.G.M. & W.K. Whitten. 1980a. Genetic variation in timing of first cleavage in mice: Effect of paternal genotype. *Biol. Reprod.* 23: 363-368.

Shire, J.G.M. & W.K. Whitten. 1980b. Genetic variation in timing of first cleavage in mice: Effect of maternal genotype. *Biol. Reprod.* 23: 369-376.

Steel, R.G.D. & R.A. Torrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Gramedia, Jakarta.

Sumantri, C., A. Boediono, M. Ooe, S. Saha & T. Suzuki. 1997a. Fertility of sperm from a tetraparental chimeric bull. *J. Anim Reprod Sci* 46: 35-45.

Sumantri, C., A. Boediono, M. Ooe, M. Murakami, S. Saha & T. Suzuki. 1997b. The effect of sperm-oocyte incubation time on *in vitro* embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *J.Anim Reprod Sci* 48: 187-195.

Sumantri, C., M. Murakami, M.D. Varisanga, M. Fahrudin & T. Suzuki. 1998. The relationship of the number of follicles present in an ovary and developmental competence of bovine IVF embryo derived from individual cows. *Jpn. J. Fertil. Steril* 43: 165-169.

Toelihere, M.R. 1993. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak.* Penerbit Angkasa, Bandung.

Totey, S.M., C.H. Pawshe &G.P. Singh. 1993. Effect of bull and heparin and sperm concentration on *in vitro* fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured *in vitro. Theriogenology* 39: 887-898.

Xu, K.P & W.A. King. 1990. The biology of mammalian fertilization and embryo development. *Agtech News and Information* 2: 25-28.