

# KLONING EMBRIO DENGAN PEMBUATAN KEMBAR IDENTIK MELALUI REKAYASA EMBRIO

A. Bocdiono<sup>1</sup>, Y. Rusiyantono<sup>1</sup>, I. Djuwita<sup>1</sup>, K. Mohammad<sup>1</sup>, R.A. Godke<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB,

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

## ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengembangkan produksi embrio kambing melalui teknik fertilisasi *in vitro* serta produksi embrio kembar melalui metode bedah mikro. Produksi embrio secara *in vitro* dilakukan dengan melakukan fertilisasi oosit yang telah matang dengan spermatozoa yang diseleksi dengan metode *swim up*. Kultur *in vitro* untuk mencapai tahap blastosis dilakukan dalam medium CR1aa sampai hari kesembilan atau G1.2 sampai hari ketiga dan selanjutnya pada G2.2 sampai hari kesembilan pada suhu 38,5°C dalam kondisi kadar oksigen yang rendah (O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 5% dan N<sub>2</sub> 5%). Persentase embrio yang membelah tidak berbeda pada kedua sistem kultur, namun perkembangan selanjutnya mencapai tahap blastosis lebih baik ( $P < 0,01$ ) dalam media kultur G1.2 dilanjutkan dalam G2.2 (34,5%) dibandingkan dalam medium CR1aa (7,9%). Kloning embrio kambing tahap perkembangan morula dan blastosis dilakukan dengan metode bedah mikro pada embrio yang diproduksi melalui teknologi fertilisasi *in vitro*. Pemotongan embrio-utuh dilakukan dengan metode sederhana tanpa menggunakan pipet holding dan pemotongan dilakukan menggunakan modifikasi pisau silet. Teknik pemotongan embrio kambing tahap morula relatif lebih mudah daripada tahap blastosis karena orientasi yang lebih mudah. Namun demikian viabilitas embrio-paruh pada kultur *in vitro* hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah daripada embrio tahap blastosis. Keberhasilan pemotongan dengan orientasi ICM didapatkan tingkat keberhasilan yang tidak berbeda nyata (84,3% dan 91,8% masing-masing untuk pemotongan embrio tahap morula dan blastosis).

Kata-kata kunci: embrio kambing, kultur *in vitro*, kembar identik, morula, blastosis

## PENDAHULUAN

Banyak laboratorium yang telah berhasil memproduksi embrio sapi baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Namun demikian informasi mengenai produksi embrio pada kambing khususnya dengan teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) masih sangat sedikit. Teknik FIV pada mamalia merupakan suatu rangkaian proses yang terdiri dari koleksi dan maturasi oosit dan spermatozoa, fertilisasi serta kultur secara *in vitro*. Keberhasilan dari teknik tersebut sangat ditunjang oleh perkembangan penelitian pada proses koleksi sampai terjadinya fertilisasi.

Dengan pengetahuan mengenai kondisi optimum dari sistem maturasi sel gamet dan fertilisasi akan didapatkan tingkat fertilisasi yang tinggi untuk dikembangkan sampai tahap blastosis.

Zigot merupakan hasil penggabungan pronukleus jantan dan betina selanjutnya akan membelah (*cleavage*). Selama awal pembelahan terjadi penambahan kecepatan metabolisme yang relatif kecil dan akan meningkat dengan tajam pada tahap morula dan blastosis (Hafez, 1993). Tahapan yang penting dalam proses pembelahan embrio mamalia adalah pada saat terjadinya kompaksi antar sel anak (blastomer)

hasil pembelahan. Proses kompaksi sangat penting untuk diferensiasi sel blastomer menjadi trofoblas, *inner cell mass* (ICM) dan pembentukan blastosul (Van Soom *et al.*, 1992).

Perkembangan dari morula menjadi blastosis juga merupakan tahapan yang penting karena pada saat tersebut terjadi diferensiasi sel dimana akan terbentuk trofoblas yang akan bertanggung jawab membentuk plasenta dan selaput ekstra embrionik dan ICM yang akan membentuk tubuh fetus. Keberhasilan fertilisasi *in vitro* sampai tahap morula dan blastosis pada kambing telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Hanada, 1985; Younis *et al.*, 1991; Crozet *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 1998; Boediono *et al.*, 1999) walaupun hasilnya belum memuaskan. Mengingat sistem kultur embrio masih belum memadai terutama untuk tahap morula dan blastosis, kajian lebih lanjut mengenai sistem kultur *in vitro* khususnya embrio kambing masih perlu dilakukan antara lain dengan menggunakan modifikasi media.

Kemajuan Bioteknologi khususnya di bidang reproduksi telah berhasil meniru kejadian kembar identik (kembar monozigotik) yang secara alamiah dapat terjadi pada mamalia. Keberhasilan tersebut merupakan suatu terobosan dalam optimalisasi embrio kualitas unggul. Selain daripada itu, produksi hewan kembar identik sangat bermanfaat dalam mempelajari perkembangan embrio (Rands, 1985), peningkatan jumlah embrio per koleksi (Leibo dan Rall, 1987) serta memperkecil jumlah hewan untuk penelitian karena mempunyai sifat genetik yang sama dengan kawan kembarnya (Sreenan, 1983; Biggers, 1986). Rekayasa embrio dengan hasil embrio kembar identik juga bertujuan untuk mendapatkan dua keturunan yang sama dari satu embrio-utuh sehingga didapatkan keberhasilan embrio transfer lebih tinggi (Willadsen dan Godke, 1984).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyediakan embrio masal dan meningkatkan potensi dari embrio yang berkualitas tinggi

dengan pengamatan pada: a). Produksi embrio dengan metode fertilisasi *in vitro* dan b) Teknologi bedah mikro untuk mendapatkan embrio-paruh sebagai upaya mendapatkan embrio kembar identik.

## BAHATAN METODE

Metode fertilisasi *in vitro* yang digunakan untuk produksi embrio dengan fertilisasi adalah sesuai dengan metode yang telah dilakukan sebelumnya oleh Boediono *et al.* (1999) dengan beberapa modifikasi.

### Koleksi dan Maturasi Oosit:

Ovari kambing diambil dari rumah potong hewan dalam medium NaCl fisiologis pada suhu 30°C. Koleksi oosit dilakukan dengan cara aspirasi oosit dari folikel berukuran diameter antara 2-5 mm menggunakan jarum berukuran 20G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang sebelumnya telah diisi 0,5 ml larutan modifikasi phosphate buffered saline (mPBS). Oosit hasil koleksi kemudian dicuci beberapa kali dan dikultur *in vitro* dalam medium maturasi yang terdiri dari CR1aa yang ditambahkan dengan serum kambing 10%, follicle stimulating hormone (FSH; Denka, Kawasaki, Japan) 0,01 mg/ml dan gentamicin sulfat (Sigma, USA) 50 mg/ml. Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C dengan periode inkubasi 24 jam.

### Fertilisasi *In Vitro*:

Spermatozoa yang digunakan untuk penelitian ini adalah spermatozoa segar. Spermatozoa segar didapat dari pejantan dengan menggunakan vagina buatan. Seleksi spermatozoa motil yang akan digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan modifikasi metode *swim up* seperti yang pernah dilaporkan oleh Purvis dan Egdetveit (1993). Spermatozoa dicuci dengan sentrifugasi sebanyak 2 kali masing-masing dengan kecepatan 500G selama 5 menit dalam larutan CR1aa yang telah ditambahkan

kafein (Sigma, USA) 2,5 mM (Younis, *et al.*, 1991). Spermatozoa hasil pncucian ditambahkan dengan medium yang sama sebanyak 1 ml dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C selama 1 jam untuk memberi kesempatan spermatozoa motil berenang ke atas. Hanya spermatozoa yang dapat berenang ke atas yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dengan konsentrasi 5 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/ml.

Oosit yang telah matang, dicuci dalam medium fertilisasi (Kaf-CR1aa) sebanyak 3 kali kemudian dilakukan fertilisasi dalam medium drop/tetes sebanyak 100 ml berisi sebanyak 20-30 oosit per drop. Fertilisasi *in vitro* dilakukan selama 18 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C.

#### Perkembangan Embrio *In vitro*:

Zigot hasil fertilisasi *in vitro* dicuci dari medium inseminasi untuk selanjutnya dilakukan kultur dalam medium kultur CR1aa dengan penambahan insulin (Sigma, USA) 5 mg/ml, gentamicin sulfat 50 mg/ml dan serum kambing sebanyak 10% atau medium G1.2 (IVF Science, Scandinavia) sampai hari ketiga setelah fertilisasi dilanjutkan dengan G2.2 (IVF Science, Scandinavia) sampai hari kesembilan dimana embrio berkembang mencapai tahap blastosis (Gardner *et al.*, 1998). Pengamatan dilakukan pada hari ke dua sampai hari kesembilan untuk menghitung tingkat perkembangan sampai tahap blastosis.

#### Bedah Mikro Embrio:

Embrio tahap morula atau blastosis hasil perkembangan *in vitro* digunakan untuk pembuatan kembar identik dengan metode bedah mikro. Pisau mikro yang digunakan juga merupakan pisau mikro modifikasi yang dibuat dengan memanfaatkan pisau silet yang terbuat dari baja. Pisau mikro dibuat dengan mematahkan bagian ujung pisau silet menggunakan tang mulut buaya sehingga didapatkan potongan ujung silet yang tajam.

Setelah dilakukan sterilisasi dengan panas, potongan pisau mikro dilekatkan pada pipa kapiler (Narishige, Japan) yang sudah dibentuk sesuai dengan keperluan menggunakan perekat yang kuat.

Metode bedah mikro embrio dilakukan dengan metode sederhana dengan memotong sekaligus zona pellusida dan blastomer menggunakan pisau mikro (micro blade) tanpa menggunakan pipet holding seperti yang dilaporkan oleh Nowshari dan Holtz (1993) dengan beberapa modifikasi. Bedah mikro embrio dilakukan di bawah mikroskop inverted (Nikon, Japan) yang dilengkapi dengan perangkat manipulasi mikro (Narishige, Japan). Pemotongan embrio dilakukan dalam 10 µL drop medium mPBS(-) untuk satu embrio-utuh per drop pada cawan petri (Falcon 1006, USA) yang ditambahkan mineral oil (Sigma, USA) di atasnya untuk mencegah penguapan medium. Untuk ketepatan orientasi pemotongan dan mencegah embrio bergerak (menggclinding) dibuat goresan terdahulu pada cawan petri. Pemotongan embrio dilakukan dengan menempatkan embrio diatas goresan yang telah dibuat dengan harapan bisa didapatkan embrio-paruh yang sama besarnya. Pemotongan embrio tahap morula dapat dilakukan pada semua posisi, sedangkan pada embrio blastosis pemotongan harus berorientasi pada ICM dan trofoblas sehingga didapatkan embrio-paruh yang masing-masing mempunyai ICM dan trofoblas yang berkembang. Embrio-paruh hasil pemotongan dicuci dalam medium kultur G2.2 untuk kemudian dikultur kembali secara *in vitro* dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37,5°C.

#### Viabilitas Embrio-paruh:

Keberhasilan pemotongan embrio dilakukan dengan pengamatan embrio-paruh hasil pemotongan >1 jam setelah pemotongan dengan melihat morfologi daripada embrio-paruh. Pengamatan selanjutnya untuk melihat viabilitas embrio-paruh dilakukan 24 jam setelah

pemotongan pada embrio tahap morula selingga diharapkan embrio akan berkembang mencapai tahap blastosis. Sedangkan pada pemotongan embrio tahap blastosis pengamatan dilakukan 3 jam setelah pemotongan. Evaluasi dilakukan dengan melihat kemampuan embrio-paruh untuk membentuk kembali blastosul yang rusak akibat pemotongan.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Seerti yang telah diaporkan sebelumnya bahwa produksi embrio kambing mengalami kendala hambatan perkembangan (*cell-block*) pada tahap diatas 8-sel ke tahap selanjutnya serta pembentukan blastosis (Boediono *et al.*, 1999). Perbaikan sistem kultur yang dilakukan adalah penggunaan medium CR1aa sebagai medium pertumbuhan embrio dibandingkan dengan medium kultur G1.2 untuk perkembangan embrio tahap pembelahan (sampai hari ke-2) dilanjutkan dengan kultur dalam G2.2 untuk perkembangan embrio sampai tahap blastosis. Dari total 500 zigot yang telah difertilisasi didapatkan tingkat pembelahan embrio mencapai tahap 2-8 sel pada kultur *in vitro* dalam medium CR1aa (86,3%) tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan kultur *in vitro* dalam G1.2-G2.2 (91,2%). Namun demikian kemampuan embrio kambing untuk tumbuh mencapai tahap blastosis didapatkan nilai yang lebih tinggi ( $P<0,01$ ) pada kultur *in vitro* dalam G1.2-G2.2 (34,6%) dibandingkan dengan kultur *in vitro* dalam medium CR1aa (7,9%). seperti

tertera dalam Tabel 1. Hasil yang didapat sesuai dengan yang pernah dilaporkan sebelumnya oleh Gardner *et al.* (1998) pada embrio manusia. Perkembangan embrio kambing tahap 2, 4 dan 8 sel didapatkan pada 48 jam setelah fertilisasi, sedangkan perkembangan sampai tahap blastosis diamati sampai hari ke 9.

Beberapa faktor yang diduga dapat mengakibatkan rendahnya perolehan tingkat blastosis pada penelitian sebelumnya adalah faktor sistem kultur, dimana sistem kultur untuk embrio kambing tidak semaju pada sistem kultur pada embrio sapi atau hewan domestik lain. Selain itu kemungkinan rendahnya kadar glukosa pada medium CR1aa dengan perlakuan tanpa pergantian medium (*medium exchange*) seperti yang telah dilakukan serta tekanan oksigen yang terlalu tinggi dalam inkubator (Batt. *et al.*, 1991) bisa mengakibatkan rendahnya perolehan embrio mencapai tahap blastosis. Permasalahan tersebut dapat teratasi dengan melakukan kultur embrio menggunakan G1.2 dengan kandungan glukosa yang relatif rendah selama masa pembelahan dan dilanjutkan dengan G2.2 dengan kandungan glukosa lebih banyak untuk tahap perkembangan selanjutnya sampai tahap blastosis. Kadar glukosa yang terlalu tinggi akan menghambat pembelahan embrio, namun diperlukan untuk pertumbuhan embrio sampai tahap blastosis (Kim *et al.*, 1992). Selain daripada itu, kultur embrio kambing pada penelitian ini dilakukan pada kondisi dengan kadar oksigen yang rendah ( $O_2$  5%,  $CO_2$  5% dan  $N_2$  90%).

Tabel 1. Tingkat Pembelahan dan Perkembangan Embrio Kambing dalam Medium CR1aa dan G1.2-G2.2

Medium	Jumlah zigot	Membelah			total (%)	Blastosis (%)
		2-sel	4-sel	8-sel		
CR1aa	240	66	113	63	207(86,3) <sup>a</sup>	19(7,9) <sup>a</sup>
G1.2-G2.2	260	54	112	94	237(91,2) <sup>a</sup>	90(34,6) <sup>b</sup>

Pada kolom yang sama perbedaan huruf menunjukkan perbedaan yang nyata (a-b,  $P<0,01$ )

Hasil produksi embrio kambing secara *in vitro* digunakan untuk manipulasi bedah mikro dalam upaya penggandaan embrio dengan pembuatan kembar identik. Bedah mikro dilakukan pada 81 embrio-utuh (tahap morula dan blastosis) dan dihasilkan 149 embrio-paruh dengan tingkat keberhasilan 92,0% (Tabel 2).

Tahapan embrio-utuh yang direkayasa akan menentukan keberhasilan embrio-paruh yang dihasilkan untuk tumbuh kembali setelah kultur *in vitro*. Viabilitas embrio-paruh setelah bedah mikro menunjukkan bahwa manipulasi embrio (untuk mendapatkan kembar identik) tahap blastosis didapatkan hasil yang lebih baik daripada tahap morula. Pada satu jam pengamatan setelah bedah mikro didapatkan kemampuan hidup yang lebih tinggi pada manipulasi embrio tahap blastosis (89,7%) lebih baik ( $P < 0,01$ ) dibandingkan dengan manipulasi tahap morula (69,0%). Hal yang sama didapatkan pada pengamatan setelah 3 atau 24 jam setelah bedah mikro. Kerusakan sel yang terlalu banyak akibat bedah mikro dapat menurunkan viabilitas embrio-paruh. Tingkat keberhasilan yang lebih baik pada embrio-paruh hasil rekayasa embrio tahap blastosis dikarenakan tahapan tumbuh yang lebih baik dengan jumlah sel yang lebih banyak pada embrio tahap blastosis dibandingkan tahap morula. Selama proses

pemotongan terjadi kerusakan sel secara fisik yang menyebabkan berkurangnya jumlah sel yang mampu bertahan tumbuh dan berkembang. Pada pemotongan embrio babi dilaporkan antara 31% sampai 66% jumlah sel kembali intak setelah dikultur selama 24 jam tergantung dari kualitas embrio-utuh yang dipotong (Reichelt dan Nicmann, 1994). Namun demikian sebaiknya disarankan untuk seminimal mungkin terjadi kerusakan sel dalam proses manipulasi embrio. Kerusakan lebih dari 50% total sel embrio akibat manipulasi akan mengakibatkan embrio tidak mampu tumbuh dan berkembang menjadi individu normal (Heyman, 1985). Selain daripada itu, pada kambing, hambatan perkembangan morula baik embrio-utuh maupun embrio-paruh mencapai tahap blastosis masih menjadi permasalahan yang dialami oleh banyak peneliti. Sebagai perbandingan Tsunoda *et al* (1985) mendapatkan angka keberhasilan 38% untuk kultur embrio-paruh tahap morula.

Pemotongan embrio dengan metode bedah mikro merupakan upaya secara mekanik untuk membelah embrio tahap perkembangan awal meniru kejadian kembar identik yang bisa terjadi secara alamiah. Kloning embrio dengan teknologi pembuatan kembar identik sangat tergantung dari keberhasilan bedah mikro dengan menghasilkan embrio-paruh dengan

Tabel 2. Keberhasilan Pemotongan Embrio Kambing dengan Bedah Mikro dan Viabilitas Embrio-paruh pada Kultur *In Vitro*

Tahapan embrio	Jumlah embrio-utuh	Jumlah embrio-paruh (%)	Viabilitas embrio-paruh setelah	
			1 jam (%)	3-24 jam (%) <sup>*</sup>
Morula	39	71 (91.1) <sup>a</sup>	49 (69.0) <sup>a</sup>	51 (71.8) <sup>a</sup>
Blastosis	42	78 (92.9) <sup>a</sup>	70 (89.7) <sup>b</sup>	73 (93.6) <sup>b</sup>
Total	81	149 (92.0)	121 (81.2)	124 (83.2)

Pada kolom yang sama perbedaan huruf menunjukkan perbedaan yang nyata (a-b,  $P < 0,05$ )

<sup>\*</sup> Pengamatan dilakukan 3 jam setelah pemotongan embrio tahap blastosis dan 24 jam setelah pemotongan embrio tahap morula.

Tabel 3. Keberhasilan Pemotongan Embrio Kambing dengan ICM sebagai Orientasi

Tahapan embrio	Embrio-paruh	Keberadaan ICM (%)	
		Positif	Negatif
Morula	51	43 (84,3) <sup>a</sup>	8 (15,7) <sup>a</sup>
Blastosis	73	67 (91,8) <sup>a</sup>	6 (8,2) <sup>a</sup>
Total	124	110 (88,7)	14 (11,3)

Pada kolom yang sama huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ )

komposisi trofoblas dan ICM yang lengkap. Dari 124 embrio yang diperoleh dengan bedah mikro didapatkan 110 (88,7%) embrio-paruh dengan ICM dan trofoblas yang lengkap dan sebanyak 14 (11,3%) embrio-paruh tanpa ICM (Tabel 3). Hanya embrio-paruh dengan ICM dan trofoblas yang lengkap yang akan mampu berkembang menjadi individu normal. Untuk mendapatkan kembar identik, ICM sebagai sel utama mutlak harus terdapat pada masing-masing embrio-paruh hasil pemotongan. Tanpa ICM, implantasi masih memungkinkan terjadi namun fetus yang berasal dari ICM tidak akan berkembang.

Orientasi ICM pada saat bedah mikro perlu diperhatikan pada saat rekayasa menggunakan embrio tahap blastosis karena pada tahapan tersebut blastomer sudah terdeferensiasi menjadi sel utama (ICM) yang bertanggung jawab membentuk fetus dan sel penunjang (trofoblas) yang bertanggung jawab membentuk plasenta (Willadsen, 1979). Namun demikian bila bedah mikro untuk mendapatkan kembar identik dilakukan pada tahap morula, orientasi tersebut tidak diperlukan karena pada tahapan tersebut belum terjadi deferensiasi sel. Pemotongan embrio tahap morula relatif lebih mudah dibandingkan tahap blastosis pada embrio kambing. Hasil yang diperoleh sependapat dengan yang dilaporkan oleh Williams *et al.* (1984) dan Rho *et al.* (1998) pada pemotongan embrio sapi.

Viabilitas embrio-paruh pada kultur *in*

*vitro* menunjukkan angka yang relatif lebih rendah pada pemotongan embrio tahap morula dibandingkan tahap blastosis, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Hasil serupa juga dilaporkan oleh peneliti terdahulu: (Tsunoda *et al.*, 1985; Nowshari dan Holtz, 1993) bahwa viabilitas embrio-paruh hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah dibandingkan embrio-paruh hasil pemotongan embrio tahap blastosis. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa hal antara lain: 1) Jumlah sel embrio tahap morula lebih sedikit daripada tahap blastosis. Kerusakan fisik sebagai akibat proses pemotongan embrio akan mengakibatkan berkurangnya jumlah blastomer, 2) Hubungan antar sel yang terdapat pada embrio tahap morula lebih longgar dari pada tahap blastosis. Kemungkinan terjadi pelepasan ikatan antar blastomer pada proses pemotongan embrio tahap morula akan lebih besar dibandingkan embrio tahap blastosis, 3) Teknik pemotongan untuk menghasilkan embrio-paruh yang tidak sama besar dan beberapa hal lain yang berkaitan dengan hal tersebut. Dapat dikatakan bahwa tahap blastosis merupakan tahap yang paling baik untuk pemotongan embrio dalam rangka produksi embrio kembar identik. Hal yang sama dilaporkan pada produksi kembar identik pada babi (Tao *et al.*, 1995), kambing (Tsunoda *et al.*, 1985) dan domba (Chesne *et al.*, 1987; Shelton, 1992).

Keberhasilan pemotongan dilihat dari

morfologi embrio-paruh setelah pemotongan dengan metode yang dikembangkan dalam penelitian ini tidak berbeda bila dilakukan pada tahap morula dan blastosis. Pemotongan dilakukan secara langsung dengan memotong zona pelusida dan blastomer sekaligus dan selanjutnya dikultur secara *in vitro* tanpa zona pelusida. Pemilihan embrio tahap perkembangan morula dan blastosis untuk produksi embrio kembar identik didasarkan bahwa pada tahap tersebut embrio telah mengalami kompaksi sehingga untuk perkembangan selanjutnya dalam kondisi *in vitro* tidak diperlukan keberadaan zona pelusida (Boediono *et al.*, 1993; Boediono *et al.*, 1995).

#### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil beberapa kesimpulan:

1. Tingkat produksi embrio kambing melalui teknik fertilisasi *in vitro* sampai tahap blastosis dapat ditingkatkan dengan mengkultur zigot hasil fertilisasi dalam media G1.2 tanpa glukosa selama proses pembelahan (sampai hari ketiga) dan dilanjutkan dengan media G2.2 dengan kandungan glukosa yang cukup untuk mendukung perkembangan embrio mencapai tahap blastosis. Penggunaan medium ini didukung dengan kondisi kultur dengan menggunakan kadar oksigen yang rendah.
2. Teknik pemotongan embrio kambing tahap morula relatif lebih mudah daripada tahap blastosis karena orientasi yang lebih mudah. Namun demikian viabilitas embrio-paruh pada kultur *in vitro* hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah daripada embrio tahap blastosis. Keberhasilan pemotongan dengan orientasi ICM didapatkan tingkat keberhasilan yang hampir sama.

#### PENGHARGAAN:

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek

Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat kontrak nomor: 011/P21PT/DPPM/20/PHB/VII/3/V/2000, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Dirjen Dikti DIKNAS.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Batt PA, Gardner DK and Cameron Awn. 1991. Oxygen concentration and proteins source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 3:601-607.
- Biggers JD. 1986. Pioneering mammalian embryo culture. In: Bavister (ed) *The mammalian preimplantation Embryo. Regulation of growth and differentiation In Vitro*. Plenum Press. New York. Pp 1-22.
- Boediono A, Ooe M, Yamamoto M, Takagi M, Saha S and Suzuki T. 1993. Production of chimeric calves by aggregation of *in vitro* fertilized bovine embryos without zonae pellucida. *Theriogenology*, 40:1221-1230.
- Boediono A, Saha S, Sumantri C and Suzuki T. 1995. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:1073-1079.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Mohamad K, Djuwita I and Sukra Y. 1999. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. Pros. Seminar Nasional Peternakan & Veteriner, Bogor. 258-263.
- Chesne P, Colas G, Cognie Y, Guerin Y and Sevellec C. 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology*, 27:751-757.
- Crozet N, Ahmed-Ali M and Dubos MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 103:293-298.

- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J and Hesla J. 1998. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 13:3434-3440.
- Hafez ESE. 1993. Reproduction in farm animals. Lea & Febiger. Philadelphia. 573 pp.
- Hanada A. 1985. In vitro fertilization in goat. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 31:21-26.
- Heyman Y. 1985. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
- Izquierdo D, Villamediana P, Palomo MJ, Mogas T and Paramio MT. 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 49:1501-1513.
- Kim JH, Niwa K, Lin JH and Okuda K. 1993. Effect of phosphate, energy substrate, and amino acids on development of in vitro fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein free culture medium. *Biol Reprod*, 48:1320-1325.
- Leibo SP and Rall WF. 1987. Increase in the production and pregnancy by bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 27:245 (Abstr.).
- Nowshari MA and Holz W. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *J. Anim. Sci.*, 71:3403-3408.
- Purvis K and Egdetveit I. 1993. Factors affecting sperm yield during swimp-up. *J Assist Reprod Gen*, 10:145-150.
- Rands GF. 1985. Cell allocation in half and quadruple-sized preimplantation mouse embryos. *J Exp Zool*, 236:67-70.
- Reichelt B and Niemann H. 1994. Generation of twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J Reprod Fertil*, 100:163-172.
- Rho GJ, Johnson WH and Betteridge KJ. 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 50:885-895.
- Shelton JN. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology*, 37:713-721.
- Sreenan JM. 1983. Embryo transfer procedure and its use as a research technique. *Vet Rec*, 112:494-500.
- Tao T, Reichelt B and Niemann H. 1995. Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi- and intact pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 104:251-258.
- Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T and Katsumata M. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology*, 24:337-343.
- Van Soom A, Van Vlaenderen V, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H and de Kruif A. 1992. Corapaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 38:905-919.
- Willadsen SM and Godke RA. 1984. A simplified procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.*, 114:240-243.
- Willadsen SM. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
- Williams TJ, Elsdon RP and Seidel GE Jr. 1984. Pregnancy rate with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22:521-531.
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL and Brackett BG. 1991. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod*. 44:1177-1182.