

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN  
HIBAH BERSAING VII/3 PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 1998-2001**

**A. JUDUL :**

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

**B. PENANGGUNGJAWAB PENELITIAN**

1. Nama lengkap : Drh. Bambang Purwantara, MSc. PhD.
2. Jenis Kelamin : Pria
3. Jabatan/Golongan : Lektor Kepala Madya/IIIc
4. NIP : 131404215
5. Bidang Keahlian : Fisiologi dan Bioteknologi Reproduksi
6. Fakultas/Jurusan : Fakultas Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan
7. Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

**C. TIM PENELITI**

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

- \*Tahun I, \*\* Tahun II, \*\*\* Tahun III dan IV

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

1. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 4 tahun
2. Biaya yang disetujui (4 tahun) : Rp. 148.000.000

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Institut Pertanian Bogor

*Fachri*

Dr. Fachriyan Hasmi Pasaribu  
NIP. 130701878

Peneliti Utama

*Bambang Purwantara*

Dr. Bambang Purwantara, MSc  
NIP. 131 404 216

Mengetahui,  
Kepala Lembaga Penelitian  
Institut Pertanian Bogor

*Aunuddin*

Dr. Ir. Aunuddin, MSc.  
NIP. 130854141

Judul Penelitian :

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

(Bambang Purwantara, Iman Supriatna, Tuty L. Yusuf, Amrozi, Muhammad Agil dan Mohamad Agus Setiadi, 2002, 56 halaman)

(Staf Pengajar *pada* Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, Nomor Kontrak 61/P2PT/DPPM/98/PHB VII/1V/1998, Tanggal 20 Mei 1998)

**RINGKASAN**

Dalam dasawarsa terakhir, perkembangan luar biasa telah berlangsung dalam rangka penyempurnaan prosedur produksi embrio *in vitro*, khususnya dalam pemanfaatan ovarium limbah rumah potong untuk kepentingan penelitian. Sel telur dari hewan merupakan sumber embrio yang sangat penting untuk penelitian, meskipun kepentingannya bagi program perbaikan mutu ternak relatif sangat terbatas. Akhir-akhir ini, metode yang relatif tidak atau kurang invasif telah dikembangkan dalam upaya penampungan atau koleksi sel telur hewan hidup, khususnya *pada* sapi.

Penggunaan anak sapi sebagai donor dalam program transfer embrio memiliki potensi yang sangat besar guna mempercepat perbaikan mutu genetik ternak, melalui pemendekan jarak generasi. Upaya yang telah dilakukan untuk memperoleh embrio dari anak sapi melalui teknik superovulasi telah menemukan jalan buntu dan kegagalan. Hambatan ini diharapkan dapat diatasi dengan memanfaatkan teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) dari sel telur yang diperoleh dari anak-anak sapi melalui aspirasi folikel.

Penelitian ini diharapkan akan mampu mengidentifikasi dan mencari jalan keluar bagi beberapa aspek penting yang masih belum terjawab secara jelas dalam teknik IVF *pada* anak sapi (juvenil). Penelitian ini *pada* dasarnya terdiri

atas: (1) penyempurnaan tatacara stimulasi pertumbuhan folikel dengan memanfaatkan prosedur terbaik dan tahap penelitian sebelumnya, (2) penyempurnaan metode pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio, dan (3) metode pembekuan embrio dengan embrio hasil IVF sel telur sapi dewasa sebagai model, dan (4) evaluasi kinerja reproduksi hewan percobaan setelah mencapai umur produktif.

Sejumlah anak sapi berumur 2-7 bulan digunakan dalam penelitian ini. Setelah menjalani masa penyesuaian selama 1-2 bulan, hewan memperoleh CIDR + 20 AU FSH untuk menstimulasi perkembangan folikel (Purwantara, et al., 1999). FSH disuntikkan 2 kali sehari selama 3 hari berturut-turut. CIDR dipasang pada 5 hari sebelum penyuntikan FSH. Dua belas jam setelah penyuntikan FSH yang terakhir, sel telur dikoleksi melalui teknik pembedahan. Pengamatan dilakukan secara seksama 3-4 kali sehari terhadap munculnya tanda-tanda berahi.

Sel telur dikoleksi dengan teknik laparotomi pada (1) daerah legok lapar antara panggul dan tulang *costae* terakhir dan (2) median abdomen sepanjang linea alba diantara tali pusar dan ambing. Metode tersebut diperbandingkan dan dievaluasi terhadap kemungkinan adanya hambatan, kesulitan maupun kemudahan pada sebelum, saat dan sesudah operasi. Pada tahap penelitian selanjutnya (Tahun II-IV), teknik operasi yang dilakukan menggunakan sistem median abdomen karena dinilai lebih praktis, mudah dan cepat. Berbagai upaya telah dilakukan untuk menyederhanakan dan mengurangi resiko akibat operasi dengan jalan menggunakan teknik endoskopi dan ultrasonografi. Namun oleh karena keterbatasan peralatan yang dimiliki, ke dua sistem pemanenan tersebut tidak dapat dilaksanakan.

Sel telur dikultur pada medium TCM199 yang disuplementasi dengan fetal calf serum (FCS) dan FSH untuk melihat kemampuan pematangannya. Setelah 22 jam diinkubasikan dalam medium pematangan (5% CO<sub>2</sub>, kelembaban maksimal dan suhu 38.5°C) sel telur diinseminasi dengan semen beku bibit unggul yang telah diketahui fertilitasnya pada medium fertilisasi BO. Zigot

kemudian **dikultur** dalam medium CR1aa untuk memberi kesempatan kepada embrio untuk tumbuh dan berkembang.

Hasil dari penelitian ini **menunjukkan bahwa** penyuntikan **20 AU FSH** dan kombinasi **CIDR – 20 AU FSH dianggap cukup untuk** perkembangan folikel pada anak sapi pada umur **tersebut (sekitar 3-4 bulan)**. Derajat **respons** yang ditimbulkan dari stimulasi tersebut dalam beberapa hal sudah relatif sebanding dengan hasil yang dilaporkan oleh beberapa peneliti lainnya.. Dari hewan yang telah menjalani perlakuan diperoleh indikasi berahi dengan tanda-tanda yang jelas berupa pembengkakan dan hiperemia vulva dan keluarnya lendir berahi. Tanda-tanda berupa naik-menaiki dan **diam** tidak dijumpai pada kelompok anak sapi ini. Diduga, **tanda-tanda** berahi yang nyata berupa naik-menaiki dan **dan** diam dinaiki seperti yang terlihat pada beberapa sapi percobaan Tahun I, hanya dapat terjadi pada sapi dengan umur mendekati pubertas.

Dengan teknik laparotomi dimungkinkan untuk meraih ovarium pada sejumlah hewan, terutama yang berumur lebih tua. Teknik median memberikan kemungkinan lebih mudah untuk memanipulasi ovarium maupun proses operasinya. Dari sejumlah hewan yang menjalani pembedahan, tidak dijumpai adanya masalah yang merugikan dan menyulitkan pada sebelum, saat maupun sesudah operasi.

Jika dibandingkan dengan temuan para peneliti lainnya (di luar negeri), kualitas sel telur dan angka pematangan sel telurnya relatif lebih buruk. Hal ini mungkin berkaitan dengan kualitas hewan percobaan, iklim dan teknik pematangan/kultur sel telur dan embrio yang belum memadai.

Sebagai kesimpulan, dari penelitian ini telah dihasilkan sejumlah data dan deskripsi tatacara pemanenan sel telur yang diharapkan dapat memberikan sumbangan bet-harga bagi pemanfaatan anak sapi sebagai sumber materi genetik. Oleh karena itu, perlu adanya upaya yang menjamin kelanjutan dan pengembangan sistem yang telah dirintis agar dapat dirasakan manfaatnya baik untuk kepentingan ilmiah **maupun** kepentingan praktis. Teknik **dan** sistem ini **diharapkan** akan memberikan pula keuntungan dalam upaya menyelamatkan beberapa **spesies satwa asli** Indonesia yang terancam punah.

Research Main Topic :

**PRODUCTION, CRYOPRESERVATION AND SEX DETERMINATION OF *IN VITRO* FERTILIZED EMBRYOS DERIVED FROM BOVINE PREPUBERTAL OOCYTES**

(Bambang Purwantara, Iman Supriatna, Tutty Laswardi Yusuf, Amrozi, Muhammad Agil and Mohamad Agus Setiadi 2001, 56 pages)

(Lecturers at *the Department of Reproduction dan Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine Bogor Agricultural University, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151, Contract Number 61/P2PT/DPPM/98/PHB VII/1V/1998, May 20, 1998*)

**SUMMARY**

The use of **prepubertal** heifers as oocyte donors in breeding programs could decrease generation interval **and** increase *genetic* rate of gained. Remarkable progress has **been made** in the past **decade** in improvement and refinement **of** procedures for **embryo** production *in vitro*, largely from research using oocytes collected from ovaries of slaughtered cattle. Oocytes from slaughtered animal have provided an important source of embryos for variety **of** research purposes, but are of limited value in production of embryos for use in livestock-improvement program. More recently, relatively non invasive methods have been developed for collection of oocytes from naturally cycling domestic species, particularly in cattle.

The use of juvenile donors in embryo transfer program offers great potential for accelerated genetic gain in **domestic** livestock through reduced generation interval. Early attempt to generate embryos from calves by conventional superovulation and embryo recovery procedure **were** unsuccessful. This constrains may **be** by passed **by** the use of *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes *collected* from calf ovaries by follicular aspiration.

This present experiment, therefore, was conducted to elaborate some valuable indicators which are still **laid** uncertainly. The **study** were comprised (1) improvement of stimulatory **regimen based** on the best achievement of the **previous** experiment, (2) improvement of *in vitro* methods for oocyte maturation



fertilization and embryo culture (3) cryopreservation of embryo produced by IVF methods with oocyte from cows as a model, and (4) evaluation on reproductive performance of experimental animals reaching an **adult stage**. Those **valuable information needs to be verified and discussed** in order to optimize condition for *in vitro* embryo production in **prepubertal** cattle.

A number of prepubertal calves at 3-7 months of age, were **subjected for the experiment**. **Following** preconditioning periods of 1-2 months, the animal **received ovarian** stimulatory treatments by **administration of 20 AU FSH and CIDR + 20 AU FSH**. **Decreasing dose** of FSH were administered for **4 days with an interval of 12 h** (morning and evening). For CIDR-FSH Group, **CIDR were inserted in** the vagina 5 days prior to FSH injections **for the period of stimulation (8 days)**. **Twelve** hours following the **last FSH injection**, the oocytes were collected **surgically**. **Intensive observations** were done following the injections in **order** to define whether the animal exhibits estrous signs.

Oocytes were collected by laparotomy techniques in an **area, i.e. median** of the abdomen along white line (linea alba) between umbilicus and mammary gland. The oocytes were **cultured** in TCM199 supplemented with fetal calf serum (FCS) for determination of maturation. Following 22 **hours** incubation periods (5% CO<sub>2</sub>, maximum humidity and 38.5°C) the oocytes were inseminated with frozen semen of **known** fertility bull which has **been washed and capacitated**. **The zygotes were** cultured in CR1aa medium to allow further development of embryos.

Results of the experiment shown that multiple injections of 20 AU FSH is comparable to CIDR + 20 AU FSH. Slight tendency of CIDR insertion to the vagina gives better outcome were observed, although those two regimens gives better result if compared to eCG and its combination with CIDR. The degree of responses **was affected by age of** the calf, **and** the size of ovary. Using FSH as stimulatory agent, results of the experiment **gives comparable response** with other findings. All six calves have been subjected to the experiment has perform **any sign of estrus, especially in form of vaginal mucus, vaginal hyperemia and**

**vaginal** swollen. No **sign** of estrus by mounting and standing heat **has** been **detected during** the **expected** time.

The laparotomy techniques **allows** an **exposure** of ovaries in a number of animals, **especially** of **those older** animals. The **median** techniques offer a better manipulation and less **disturbance** due to a limited muscle layer and **tissues compared** to flank **system**. From all **animal subjected to surgery**, no single animals **has a** problem on the whole **session** of operation i.e. anesthesia, surgical session, post operative maintenance and treatment.

If **compare to other findings**, the **quality of** oocytes and maturation rate **were** relatively **low**. This may **be related to** the **quality of** experimental animals, **climate and environment**, as well as **the** culture medium and **system** for maturation, fertilization and further developmental processes.

In conclusion, the study has a valuable **data and provide** a **descriptive** protocols on new **developing system on** using juvenile **prepubertal** calves as a source of genetic **materials**. It seems necessary to continue and develop a **system** which may **play a role both** for **scientific and** practical purposes. **This** techniques will provide a benefit for an indigenous and endangered Indonesia species.

## KATA PENGANTAR

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

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

Selama 4 tahun kegiatan penelitian ini telah berhasil dilakukan identifikasi beberapa faktor yang mempengaruhi kemampuan individu anak sapi merespons stimulasi hormonal. Disamping itu penelitian ini telah pula menghasilkan penyempurnaan sistem stimulasi hormonal, pengembangan medium pematangan, fertilisasi dan kultur embrio disamping pembekuan embrio dan penentuan gender.

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

Bogor, Januari 2002

Tim Peneliti



## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	I
DAFTAR ISI .....	II
DAFTAR TABEL .....	iv
PENDAHULUAN .....	1
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	5
Tujuan Penelitian .....	5
Manfaat Penelitian .....	5
STUDI PUSTAKA .....	7
Produksi embrio sapi secara <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i> .....	7
Pemanfaatan sel telur anak sapi untuk produksi embrio <i>in vitro</i> . . .	8
Stimulasi pertumbuhan folikel .....	10
Panen sel telur anak sapi .....	11
Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio <i>in vitro</i> .....	12
Sistem kultur dengan inkubator Oxoid CO <sub>2</sub> Gen™ .....	13
Aspek selulo-molekuler dan teknik-teknik kriopreservasi .....	14
Penentuan jenis kelamin embrio .....	14
MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	16
Materi Penelitian .....	16
<i>Hewan Percobaan</i> .....	16
<i>Bahan dan Peralatan</i> .....	17
Metode Penelitian .....	17
<i>Seleksi dan penyiapan anak sapi donor</i> .....	17
<i>Stimulasi pertumbuhan folikel</i> .....	18
<i>Identifikasi respons terhadap stimulasi</i> .....	20
<i>Panen dan koleksi sel telur anak sapi</i> .....	20
<i>Panen dan koleksi sel telur sapi dewasa dari RPH</i> .....	21
<i>Penentuan kualitas sel telur</i> .....	22
<i>Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio</i> .....	23
<i>Kuitur menggunakan inkubator Oxoid CO<sub>2</sub> Gen™</i> .....	25
<i>Preparasi untuk pemeriksaan ultrastruktur</i> .....	26

HASIL DAN PEMBAHASAN .....	27
Respons klinis terhadap stimulasi gonadotropin .....	27
Perkembangan folikel sebagai respons ovarium terhadap gonadotropin .....	32
Panen sel telur .....	34
<b>Teknik panen sel telur melalui bedah pada legok lapar (<i>flank</i>)</b> ...	35
Teknik panen sel telur melalui bedah pada daerah linea alba ..	36
Hasil stimulasi dan respons ovarium terhadap gonadotropin .....	37
Teknik aspirasi folikel .....	38
<b>Teknik aspirasi folikel pada permukaan ovarium</b> .....	39
Evaluasi <b>kualitas dan pematangan</b> sel telur <i>in vitro</i> .....	40
Fertilisasi <i>in vitro</i> .....	44
PEIV sapi <b>dewasa</b> .....	44
Kondisi ovarium dari RPH .....	44
Koleksi dan kualitas sel telur .....	45
Pematangan sel telur dan angka fertilisasi .....	45
<b>Fertilisasi <i>in vitro</i> dan perkembangan embrio</b> .....	46
Perkembangan embrio .....	46
Viabilitas embrio <b>parca pembekuan</b> .....	48
Analisis struktur ultra sel telur dan embrio .....	48
KESIMPULAN DAN SARAN .....	50
DAFTAR PUSTAKA .....	52

## DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Kualitas sel telur sesuai dengan parameter morfologis . . . . .	22
2.	Respons berahi hasil stimulasi eCG dan FSH pada sapi FH berumur 5-9 bulan . . . . .	27
3.	Respons berahi hasil stimulasi eCG dan FSH pada anak sapi FH berumur 4-6 bulan . . . . .	29
4.	Rataan ukuran ovarium sesuai dengan umur sapi . . . . .	30
5.	Rataan jumlah dan ukuran folikel sapi . . . . .	30
6.	Rataan dan kisaran jumlah dan ukuran folikel anak sapi . . . . .	33
7.	Hasil stimulasi dan respons ovarium terhadap gonadotropin . . . . .	37
8.	Hasil stimulasi hormonal terhadap perkembangan folikel sapi . . . . .	40
9.	Kualitas dan pematangan sel telur secara <i>in vitro</i> . . . . .	42
10.	Kualitas sel telur secara <i>in vitro</i> sesuai dengan jenis hormon . . . . .	43
11.	Perkembangan sel telur (oosit) dan embrio sampai tahap blastosis . . . . .	47
12.	Perkembangan embrio pada kultur pasca pembekuan . . . . .	48

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Letak dan proses pembedahan daerah median abdomen dalam rangka panen sel telur anak sapi .....	36
2.	Hasil stimulasi dengan eCG berupa pertumbuhan folikel yang bertimpah. Teknik aspirasi dengan sistem "continuous puncture" .....	38
3.	Sel telur yang dihasilkan dan aspirasi setelah stimulasi dengan eCG dan FSH .....	40
4.	Proses penyatuan sel telur dengan spermatozoa pada medium Fertilisasi .....	49

## PENDAHULUAN

Pengembangan peternakan ruminansia besar khususnya sapi perah dan sapi potong, menghadapi depresi populasi akibat maraknya pemotongan. Pemotongan hewan betina produktif yang seharusnya tidak dilakukan, ternyata dapat berlangsung secara ilegal, termasuk berbagai sumber bibit sapi perah potensial. Hal ini membawa konsekuensi berupa pengurasan sumberdaya bibit yang jika tidak dilakukan restorasi akan membawa akibat penurunan populasi dan mutu genetik ternak.

Teknologi reproduksi mutakhir merupakan generasi baru teknik rekayasa hayati yang dapat digunakan dan dimanfaatkan bagi peningkatan mutu genetik ternak. Salah satu teknologi reproduksi mutakhir yang telah diadopsi secara meluas dalam industri peternakan, khususnya pembibitan adalah *teknologi embrio*. Generasi baru teknologi ini telah diperkaya dengan teknik rekayasa embrio yang mencakup produksi embrio *in vitro* (PIEV), kriopreservasi embrio, mikromanipulasi untuk produksi kembar (kloning), penentuan jenis kelamin embrio (*embryo sexing*), injeksi spermatozoa intra-sitoplasma (ICSI), *embryonic stem cells*, produksi kimera dan parthenogenesis.

Sejarah perkembangan dan pemanfaatan teknologi ini diawali pada tahun 1891, ketika Walter Heape berhasil menampung embrio kelinci Angora dan mentransferkannya pada uterus kelinci biasa. Heape membuktikan bahwa embrio Angora tersebut dapat tumbuh dan berkembang menjadi anak kelinci yang sepenuhnya mewarisi materi genetik kelinci Angora sebagai tetua aslinya (Betteridge, 1977). Dalam bidang peternakan di negara-negara maju, terutama di negara-negara Amerika Utara (AS dan Kanada), Eropa dan Jepang, teknologi ini bersama inseminasi buatan (IB) telah digunakan secara luas dalam sistem pemuliaan ternak.

Pada dasarnya manfaat utama penggunaan teknologi ini adalah untuk meningkatkan potensi reproduksi ternak (Nicholas, 1996). Dengan teknik modern tersebut, untuk menghasilkan sejumlah keturunan hanya diperlukan tetua yang jauh lebih sedikit bila dibandingkan dengan cara perkawinan konvensional. Secara genetik, sistem tersebut akan meningkatkan intensitas

seleksi, yang pada akhirnya akan meningkatkan kemampuan genetik rata-rata dari keturunannya (Callesen *et. al.*, 1996). Namun demikian, perlu dicatat bahwa dalam suatu sistem produksi embrio melalui teknik TE dalam suatu "nucleus herd" angka *inbreeding* cenderung menunjukkan potensi peningkatan (Nicholas, 1996).

Interval generasi merupakan salah satu unsur penentu efisiensi program perbaikan mutu genetik ternak. Dengan memperdek interval generasi, mutu genetik induk atau pejantan unggul dapat dievaluasi dengan cepat. Oleh karena itu dibandingkan dengan inseminasi buatan (IB), transfer embrio (TE) dianggap lebih efisien sebagai piranti perkembangbiakan bibit, oleh karena kemampuannya memperpendek interval generasi. Dengan TE, evaluasi kinerja genetiknya dapat dilakukan terhadap saudara seibu (sister sibling) dibandingkan IB yang harus menunggu anaknya berproduksi (daughter). Dengan ET, bila dibandingkan dengan IB, dapat dihemat waktu evaluasinya sekitar 4 tahun untuk setiap generasi (Lohuis, 1995).

Program MOET yang telah dirintis di berbagai negara maju telah mulai menunjukkan hasilnya sebagai salah satu alternatif bagi sistem pemuliaan konvensional (uji progeni) yang hanya melibatkan pejantan melalui program IB. Melalui sistem *nucleus herd*, interval generasi dalam sistem pemuliaan ternak dapat diperpendek. Hal tersebut didukung dan diperkuat dengan munculnya peluang-peluang baru bagi pemanfaatan atau eksplorasi hewan muda/anak (juvenil) dalam sistem MOET tersebut.

Sebagai teknologi yang masih tergolong mahal dan memerlukan perencanaan yang matang, maka konsep pemanfaatan teknologi embrio masih terbatas pada produksi bibit dan penyiapan induk pengganti (*replacement*), serta dalam jumlah terbatas, untuk program konservasi satwa yang terancam punah.

Dua teknik yang sering saling mendukung adalah teknik produksi embrio *in vitro* (PIEV) dan penggunaan alat bantu ultrasonografi untuk memanen sel telur dari hewan hidup (Purwantara, 1993). Dengan menggabungkan kedua teknik tersebut, PIEV tidak hanya mengandalkan sel telur dari hewan yang dipotong (Galli dan Lazzari, 1996), tetapi dapat melalui

induk unggul yang masih hidup dengan interval pemanenan yang lebih pendek dan hasil embrio yang lebih banyak (Purwantara *et al.*, 1993).

Produksi embrio dengan sumber sel telur anak sapi ("*juvenile in vitro* embrio transfer"/JIVET) merupakan pendekatan baru dalam menunjang bioteknologi reproduksi. Dengan teknik tersebut eksplorasi bibit unggul dapat dilakukan secara lebih dini (tanpa menunggu hewan mencapai dewasa) dan lebih berjangka panjang (Lohuis, 1995). Pemendekan interval generasi diharapkan dapat dilakukan pula dengan memanfaatkan anak sapi prapubertas sebagai "induk" penghasil sel telur. Sel telur tersebut kemudian ditumbuhkan secara *in vitro* untuk selanjutnya dapat menghasilkan embrio (Tervit, *et al.*, 1994, Revel *et al.*, 1995). Dengan pemanfaatan oosit atau embrio yang berasal dari anak sapi yang belum dewasa kelamin, interval antar generasi diharapkan dapat dikurangi secara nyata. Hal ini dapat menghemat waktu dan biaya, sehingga memiliki keunggulan ekonomis bagi industri peternakan disamping sebagai pendukung bagi pengembangan ilmu dan teknologi. Dengan teknologi inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio (TE) saja misalnya, laju perbaikan mutu genetis terhadap efisiensi pertumbuhan diperkirakan meningkat dari 1.4 menjadi 2.6% per tahun. Laju perbaikan mutu ternak diperkirakan meningkat sekitar 12% apabila cadangan bibit yang dihasilkan melalui MOET dapat digantikan dengan jantan dan betina prapubertas (Lohuis, 1995).

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

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

Dalam bidang peternakan di negara-negara maju, terutama di negara-negara Amerika Utara (AS dan Kanada), Eropa dan Jepang, TE bersama inseminasi buatan (IB) telah digunakan secara luas dalam sistem pemuliaan ternak secara terstruktur. Aplikasi pembuahan *in vitro* melalui serangkaian kegiatan meliputi pematangan sel telur (IVM), fertilisasi (IVF), dan kultur embrio (IVC) diduga akan digunakan secara luas sebagai bagian dari sistem pemuliaan modern.



## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah:

1. penyempurnaan teknik stimulasi hormon *ban* koleksi sel telur anak sapi serta produksi embrio *in vitro*
2. identifikasi faktor-faktor penghambat perkembangan sel telur anak sapi dan pertumbuhan embrionya, dan
3. perbaikan dan penyederhanaan teknik kriopreservasi embrio hasil fertilisasi *in vitro* sel telur anak sapi dan
4. penentuan jenis kelamin embrio yang diproduksi dengan sumber sel telur anak sapi melalui teknik biopsi dan PCR.

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. mencari dan menetapkan teknik stimulasi pertumbuhan folikel ovarium anak sapi dengan penyuntikan hormon gonadotropin (eCG dan FSH), dan kombinasinya dengan CIDR (implan progesteron intravaginal)
2. mengembangkan teknik panen sel telur anak sapi dengan metode laparotomi dan laparoskopi,
3. pematangan sel telur anak sapi, fertilisasi dan kultur embrio *in vitro*.
4. Identifikasi faktor-faktor penyebab rendahnya angka kebuntingan melalui kajian struktur ultra sel embrio.
5. Modifikasi sistem kultur menggunakan alat inkubasi sederhana.

### Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi:

1. Pengembangan sistem pemuliaan melalui pendekatan bioteknologi reproduksi modern, khususnya dalam rangka memperpendek interval generasi,

2. Upaya membangun pengertian yang lebih integratif tentang aspek-aspek biologi reproduksi, utamanya pada berbagai fungsi organ reproduksi betina pra-pubertas,
3. Dapat membuka kemungkinan referensi bagi pengembangan bioteknologi reproduksi manusia dengan anak sapi sebagai model.

## STUDI PUSTAKA

### Produksi embrio sapi secara *in vivo* dan *in vitro*

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

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

Program MOET pada induk sapi masih dihadapkan pada berbagai kendala. Kendala utama yang dihadapi adalah pembatasan panen embrio hanya 6 kali koleksi per tahun atau dengan interval koleksi 2 bulan (Purwantara *et al.*, 1995). Disamping itu, betina induk sapi perah tidak selalu berespon secara konsisten terhadap superovulasi (Purwantara *et al.*, 1990),

meskipun ultrasonografi telah mulai banyak digunakan sebagai alat bantu seleksi / penapisan donor (Purwantara *et al.*, 1992; Greve dan Purwantara, 1993). Hal tersebut mendorong usaha agar sistem produksi embrio/anak melalui MOET pada induk dewasa dicarikan alternatifnya. Dua teknik yang mendorong kecenderungan untuk mencari alternatif tersebut adalah teknik produksi embrio *in vitro* (IVEP) dan penggunaan alat bantu ultrasonografi untuk memanen sel telur dari hewan hidup (Purwantara, 1993). Dengan menggabungkan kedua teknik tersebut IVEP tidak hanya mengandalkan sel telur dari hewan yang dipotong (Galli dan Lazzari, 1995), tetapi dapat diperoleh secara berulang dari induk unggul dengan interval pemanenan yang lebih pendek dan hasil embrio yang lebih banyak (Purwantara *et al.*, 1993).

#### **Pemanfaatan sel telur anak sapi untuk produksi embrio *in vitro***

Tervit *et al.* (1995) melaporkan keberhasilan  $\sigma^6\lambda$  sapi umur 3 bulan yang disuperovulasi/disinkronisasi dengan CIDR, *equine chorionic gonadotropin* (eCG), *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). Teknik tersebut dikenal sebagai "juvenile *in vitro* embryo transfer" (JIVET). Dilaporkan bahwa folikel yang dihasilkan umumnya relatif banyak (10.9 folikel) tetapi ovulasi yang terjadi sangat terbatas (3.1 ovulasi). Angka ovulasi tersebut ternyata hanya menghasilkan 0.6 sel telur yang tidak dibuahi. Hasil ini menegaskan temuan sebelumnya (Onuma dan Foote, 1969; Seidel *et al.* 1971) yang menunjukkan bahwa  $\sigma^6\lambda$  sapi tidak layak menjadi donor dalam program MOET. Sampai saat ini belum terungkap mengapa kondisi tersebut terjadi. Pendekatan terbaru dalam pemanfaatan materi genetik unggul secara lebih cepat adalah penggunaan  $\sigma^6\lambda$  hewan (*juvenile*) sebagai penghasil sel telur untuk produksi embrio *in vitro* (Tervit, 1996). Disamping pada anak sapi (Armstrong *et al.*, 1992, 1994) panen sel telur dilaporkan juga pada  $\sigma^6\lambda$  domba (Dahlhausen *et al.*, 1980; Earl *et al.*, 1994, 1995). Menurut Lohuis (1995) uji progeni jika digabung dengan sistem MOET dari sapi dewasa yang dihasilkan dari IVEP dengan sumber sel telur  $\sigma^6\lambda$  sapi umur 1-5 bulan dapat memepercepat peningkatan mutu genetik

terhadap produksi susu sebanyak 22% di atas penggunaan sistem konvensional. Dengan cara ini akan dihasilkan keturunan yang baik dari sumber sel telur yang murah, unik dan dapat diulang (repeatable). Pendekatan ini dapat juga dijadikan model bagi penyelamatan satwa liar yang mendekatt kepunahan (Tervit, 1995).

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

Namun demikian, keberhasilan tersebut di atas tidak didukung oleh Kajihara *et al.* (1991), Palma *et al.* (1992) dan Palms (1994) yang mencatat rendahnya kemampuan berkembang oosit anak sapi mencapai blastosis dibandingkan dengan oosit asal induk (hewan dewasa). Revel *et al.* (1995) juga melaporkan penurunan kompetensi oosit berkembang menjadi blastosis setelah mampu berkembang dengan baik sampai tahap pembelahan dua sel ("cleavage"). Studi yang mendalam tentang kecenderungan penurunan angka blastosis ini perlu ditingkatkan dengan menggunakan analisis seluler pada tingkat oosit, zigot dan perkembangan embrio dini.

Dalam kaitan hasil kebuntingannya, dilaporkan bahwa kemampuan embrio anak sapi tersebut untuk menghasiikan anak hanya mencapai 13% (Armstrong *et al.*, 1992), 23% (Tervit *et al.*, 1995), 33% (Kajihara *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1995) dan 43% untuk embrio segar dan 9% untuk embrio beku

terhadap produksi susu sebanyak 22% di atas penggunaan sistem konvensional. Dengan cara ini akan dihasilkan keturunan yang baik dari sumber sel telur yang murah, unik dan dapat diulang (*repeatable*). Pendekatan ini dapat juga dijadikan model bagi penyelamatan satwa liar yang mendekati kepunahan (Tervit, 1995).

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

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

Dalam kaitan hasil kebuntingannya, dilaporkan bahwa kemampuan embrio anak sapi tersebut untuk menghasilkan anak hanya mencapai 13% (Armstrong *et al.*, 1992), 23% (Tervit *et al.*, 1995), 33% (Kajihara *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1995) dan 43% untuk embrio segar dan 9% untuk embrio beku

(Kotaras *et al.*, 1995). Jika dijabarkan antara hasil kebuntingan embrio asal sel telur induk dan sel telur anak sapi, Revel *et al.* (1995) melaporkan angka kebuntingan yang cukup jauh berbeda yakni 38% versus 3%. Kondisi tersebut memerlukan kajian yang lebih lanjut tentang kompetensi perkembangan embrio setelah implantasi, khususnya dalam proses perkembangan embrio dini. Penggunaan ultrasonografi dapat dilakukan untuk pemeriksaan kebuntingan dan kemungkinan penyimpangannya (Purwantara *et al.*, 1992; Greve dan Purwantara, 1992, 1993), dan dapat dikombinasikan dengan pemeriksaan biopsi dan morfologi struktur ultra (Assey *et al.*, 1993).

Teknik koleksi sel telur yang lazim digunakan pada anak sapi adalah laparotomi (Lewis *et al.*, 1995), laparoskopi (Armstrong *et al.*, 1992; Tervit *et al.*, 1995) dan koleksi setelah pembedahan (Revel *et al.*, 1995). Guna menjamin pengulangan koleksi dengan selang waktu 3 minggu, maka teknik laparoskopi merupakan pilihan terbaik. Aspirasi oosit pada induk sapi telah dilakukan dengan alat bantu ultrasonografi (Pieterse *et al.*, 1990; Purwantara, 1993), demikian juga pemanfaatannya untuk anak sapi (Brogliatti dan Adams, 1996).

### **Stimulasi pertumbuhan folikel anak sapi**

Stimulasi pertumbuhan folikel pada anak sapi melalui pemberian gonadotropin dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah folikel yang dapat diaspirasi sehingga efisiensi koleksi sel telur dapat ditingkatkan. Disamping itu, stimulasi tersebut dapat meningkatkan kemampuan pertumbuhan sel telur melalui percepatan pematangan sitoplasma dan pengontrolan terhadap waktu pematangan meiotik (Armstrong *et al.*, 1997).

Secara umum, donor anak sapi membutuhkan dosis yang lebih rendah dari induk dewasa karena bobot badan yang lebih ringan. Disamping itu, Armstrong *et al.* (1997) menduga bahwa daya tanggap ovarium terhadap stimulasi relatif tinggi pada umur prapubertas. Hal ini diduga berkaitan dengan belum berlangsungnya mekanisme pengaturan intraovarium yang dapat membatasi jumlah ovulasi. Armstrong dan Opavsky (1988) melaporkan

bahwa pada mencit repons ovarium yang belum matang terhadap pemberian FSH lebih tinggi.

Tatacara perlakuan pemberian gonadotropin guna pemanenan sel telur pada anak sapi dilandasi oleh teknik baku yang digunakan pada sapi betina dewasa. Dua macam gonadotropin yakni *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *equine chorionic gonadotropin* (eCG) atau disebut juga *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) digunakan dalam proses stimulasi pertumbuhan folikel. Menurut Armstrong *et al.*, (1994) stimulasi biasanya berlangsung selama 3-4 hari dengan penyuntikan dosis tunggal bagi gonadotropin dengan masa paruh panjang (eCG/PMSG) dan dosis ganda bagi gonadotropin dengan masa paruh pendek (FSH). Respons terhadap penyuntikan tunggal FSH dikombinasi dengan dosis rendah eCG dilaporkan sebanding dengan penyuntikan ganda FSH untuk periode 3-4 hari (Armstrong *et al.*, 1997).

Pertimbangan penting dalam memilih tata cara pemberian hormon yang digunakan untuk stimulasi dilandaskan atas tujuan pematangan sel telur secara *in vivo* atau *in vitro*. Pendekatan pematangan *in vivo* banyak diterapkan pada program bayi tabung manusia maupun pada pembuahan *in vitro* pertama pada sapi (Brackett *et al.*, 1982). Teknik pematangan *in vivo* memiliki pembatas berupa hasil pematangan yang tidak menentu yang diduga akibat kesulitan untuk mengontrol waktu paling tepat terjadinya lonjakan LH endogen (Armstrong *et al.*, 1997).

Penggunaan progesteron yang dipasangkan secara intravagina dapat pula memberikan pengaruh stimulasi pertumbuhan folikel. Pemberian *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) selama pemberian maupun setelah pencabutan progestagen dilaporkan tidak meningkatkan jumlah folikel yang terbentuk (Armstrong *et al.*, 1997).

### **Panen sel telur anak sapi**

Sel telur anak sapi dapat dikoleksi secara *in vitro* dengan menggunakan teknik ovariektomi maupun dengan memanfaatkan ovarium limbah rumah potong hewan (Armstrong *et al.*, 1997). Disamping itu, guna memberikan kesempatan untuk koleksi yang bersifat sinambung, sel telur dapat dikoleksi



mengungguli sistem medium dengan kokultur sel-sel somatis (Gardner *et al.*, 1994; Thompson, 1996).

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

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

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk memperbaiki dan menstabilkan sistem inkubasi seperti penyekatan ruang inkubasi, penggunaan toples yang dialiri CO<sub>2</sub> dan penggunaan inkubator mini (Avery dan Greve, 1992). Disamping itu, Vajta *et al.* (1997) melaporkan penggunaan kantung aluminium yang digembungkan dengan campuran gas dengan kandungan CO<sub>2</sub> tertentu dan dimasukkan ke dalam inkubator biasa atau penangas air. Keseluruhan pendekatan tersebut di atas dilandaskan pada pengaliran campuran gas ke dalam ruangan (toples atau inkubator) untuk memenuhi kebutuhan kandungan gas dan suhu yang dikehendaki. Pada studi yang dilakukan oleh Suzuki *et al.* (1999), CO<sub>2</sub> disediakan secara *in situ* melalui penggunaan butiran *effervescent* yang berisi asam tartarat, hidrogen natrium yang terkarbonasi dan air.

Avery *et al.* (2000) menggunakan sistem kultur AnaeroJar™, sebagai alternatif bagi penggunaan inkubator CO<sub>2</sub> biasa. Kondisi optimum dapat dicapai dengan menempatkan sachet CO<sub>2</sub>Gen™ dengan asam askorbat di dalam AnaeroJar™. Setelah berkontak dengan udara, CO<sub>2</sub>Gen™ akan bereaksi untuk menghasilkan kandungan udara dengan komposisi 15% O<sub>2</sub> dan 6% CO<sub>2</sub> yang dianggap cukup untuk mengkultur embrio sapi. Penggunaan sachet ini diharapkan dapat mengurangi biaya produksi dengan

mengungguli sistem medium dengan kokultur sel-sel somatis (Gardner *et al.*, 1994; Thompson, 1996).

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

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

Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk memperbaiki dan menstabilkan sistem inkubasi seperti penyekatan ruang inkubasi, penggunaan toples yang dialiri CO<sub>2</sub> dan penggunaan inkubator mini (Avery dan Greve, 1992). Disamping itu, Vajta *et al.* (1997) melaporkan penggunaan kantung aluminium yang digembungkan dengan campuran gas dengan kandungan CO<sub>2</sub> tertentu dan dimasukkan ke dalam inkubator biasa atau penangas air. Keseluruhan pendekatan tersebut di atas dilandaskan pada pengaliran campuran gas ke dalam ruangan (toples atau inkubator) untuk memenuhi kebutuhan kandungan gas dan suhu yang dikehendaki. Pada studi yang dilakukan oleh Suzuki *et al.* (1999), CO<sub>2</sub> disediakan secara *in situ* melalui penggunaan butiran *effervescent* yang berisi asam tartarat, hidrogen natrium yang terkarbonasi dan air.

Avery *et al.* (2000) menggunakan sistem kultur AnaeroJar™, sebagai alternatif bagi penggunaan inkubator CO<sub>2</sub> biasa. Kondisi optimum dapat dicapai dengan menempatkan sachet CO<sub>2</sub>Gen™ dengan asam askorbat di dalam AnaeroJar™. Setelah berkontak dengan udara, CO<sub>2</sub>Gen™ akan bereaksi untuk menghasilkan kandungan udara dengan komposisi 15% O<sub>2</sub> dan 6% CO<sub>2</sub> yang dianggap cukup untuk mengkultur embrio sapi. Penggunaan sachet ini diharapkan dapat mengurangi biaya produksi dengan

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

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

#### *Hewan Percobaan*

##### Eksperimen I

Sepuluh ekor anak sapi betina Frisian Holstein (FH) berumur sekitar 5-9 bulan dengan berat badan antara 70-130 kg dan tinggi badan antara 70-95 cm digunakan dalam penelitian ini. Pada saat kedatangan (2-3 bulan sebelum percobaan dimulai) hewan tersebut baru berumur 3-6 bulan dengan berat badan antara 50-90 kg. Hewan dipelihara dalam kandang bersama dengan masing-masing kelompok terdiri atas 3-4 ekor sesuai umur dan bobot badan.

##### Eksperimen II

Dua belas ekor anak sapi betina Frisian Holstein (FH) berumur sekitar 3-6 bulan dengan berat badan antara 60-75 kg dan tinggi badan antara 60-70 cm digunakan dalam penelitian ini. Pada saat kedatangan (1-2 bulan sebelum percobaan dimulai) hewan tersebut baru berumur 1-3 bulan dengan berat badan antara 40-60 kg. Hewan dipelihara dalam kandang bersama dengan masing-masing kelompok terdiri atas 3-5 ekor sesuai dengan umur, ukuran dan bobot badan.

##### Eksperimen III

Enam ekor anak sapi betina Frisian Holstein (FH) berumur sekitar 3-4 bulan dengan berat badan antara 60-70 kg dan tinggi badan antara 70-75 cm digunakan dalam penelitian tahap I. Pada saat kedatangan (1-2 bulan sebelum percobaan dimulai) hewan tersebut baru berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 40-60 kg. Hewan dipelihara dalam kandang bersama dengan masing-masing kelompok terdiri atas 3 ekor. Hewan yang sama

digunakan pada percobaan Tahap II (2 bulan setelah Tahap I atau berumur sekitar 5-6 bulan).

#### Eksperimen IV

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

#### **Bahan dan Peralatan**

##### ***Bahan***

Hormon untuk stimulasi folikel: FSH (*Antrin*®), eCG/PMSG (*Serumon*®); bahan untuk bedah: xylazin (*Xylazil-20*®), atropin sulfat, lidokain-adrenalin, desinfektan dan antibiotika; medium pembilasan dan pematangan oosit: PBS, TCM199, fetal calf serum (FCS), Penisilin-Streptomisin; medium fertilisasi: Medium Brackett-Oliphant (BO), kafein, BSA, Medium perkembangan embrio: CR1aa, BSA.

##### ***Peralatan***

Perangkat bedah: skalpel, klem arteri, gunting, *needle holder*, dll; alat evaluasi dan kultur perkembangan sel telur: Inkubator, toples (flask) inkubasi, tabung CO<sub>2</sub>, laminar cabinet, mikroskop diseksi, cawan-cawan petri, spuit dll,

#### **Metode Penelitian**

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

Anak sapi sebagai hewan percobaan diperoleh dari stok peternakan sapi perah rakyat yang ada disekitar Bogor atau didatangkan dari luar daerah.

Hewan-hewan percobaan tersebut dipersyaratkan memiliki kondisi yang baik termasuk pemberian susu selama masa pemeliharaan di tingkat peternak. Pada Eksperimen I, sebelum dimulainya pelaksanaan percobaan, masing-masing hewan menjalani periode persiapan dan adaptasi selama kurang lebih satu bulan. Setelah sampai di kandang, hewan percobaan memperoleh pengobatan cacing (*Valbazen*®), pemberian multivitamin (*Hematopan*® dan *Biosalamin*®) dan pengobatan/ pencegahan massal terhadap ektoparasit (*Butox*®). Hewan percobaan yang masih berumur 2-3 bulan pada saat kedatangan memperoleh 4-5 liter susu pengganti (*milk replacer*) dan pakan konsentrat (*Indofeed*®) sebanyak 2 kg per ekor dan rumput seperlunya (sekitar 5-6 kg per ekor) selama 1 bulan. Secara bertahap, susu pengganti dikurangi dan komposisi rumput ditingkatkan.

Pada Eksperimen II-IV, sebelum dimulainya pelaksanaan percobaan, masing-masing hewan menjalani periode persiapan selama kurang lebih 2-3 bulan. Hewan percobaan setelah sampai di kandang memperoleh pengobatan cacing (*Valbazen*®), pemberian multivitamin (*Hematopan*® dan *Biosalamin*®) dan pengobatan/ pencegahan massal terhadap ektoparasit (*Butox*®). Hewan percobaan yang masih berumur 2-3 bulan pada saat kedatangan memperoleh pakan susu pengganti (*milk replacer*) dan pakan konsentrat (*Indofeed*®) sebanyak 1-2 kg per ekor dan rumput seperlunya (sekitar 3-5 kg per ekor) selama 1 bulan. Secara bertahap, susu pengganti dikurangi dan komposisi rumput ditingkatkan. Bagi kelompok anak sapi dengan umur pasca sapih (4-7 bulan) pakan konsentrat diberikan sebanyak 2-3 kg per ekor dan rumput secukupnya (sekitar 6-12 kg per ekor).

### ***Stimulasi pertumbuhan folikel***

#### **Eksperimen I**

Hewan percobaan dibagi atas 3 kelompok masing-masing memperoleh penyuntikan gonadotropin 1000, 1500 IU eCG/PMSG dan 16-17 mg (AU) FSH. Penyuntikan eCG dosis tunggal dilakukan secara intramuskuler 4 hari sebelum koleksi (panen) oosit. Penyuntikan FSH dilakukan dua kali sehari

(pagi-sore) selama 3 hari berturut-turut dimulai 4 hari sebelum koleksi sel telur.

### Eksperimen II

Hewan percobaan dibagi atas 4 kelompok masing-masing memperoleh penyuntikan gonadotropin 20 mg (AU) FSH (Klp. A), 1500 IU eCG/PMSG (Klp. B) dan kombinasi CIDR-20 AU FSH (Klp C) dan CIDR-1500 IU eCG (Klp D) . Pada Klp. A penyuntikan FSH dilakukan dua kali sehari (pagi-sore) selama 3 hari berturut-turut dengan dosis turun bertingkat (5, 5, 3, 3, 2, 2 IU) dimulai 4 hari sebelum koleksi sel telur. Pada Klp B penyuntikan eCG dosis tunggal dilakukan secara intramuskuler 4 hari sebelum koleksi (panen) oosit. Pada kelompok C dan D, CIDR tipe kecil (untuk domba/kambing) dipasang secara intravaginal selama 8 hari. Pada Klp. C penyuntikan 20 AU FSH dosis menurun (seperti Klp A) dilakukan pada hari ke 5, 6 dan 7 (dimulai 4 hari sebelum koleksi), Pada Klp D, penyuntikan eCG dosis tunggal dilakukan pada hari ke 5. Pada hari ke 8 CIDR dilepas dan koleksi dilakukan pada hari yang sama.

### Eksperimen III dan IV

Stimulasi hormonal dilakukan dengan menggunakan FSH dan kombinasi FSH-CIDR sebagaimana disimpulkan sebagai teknik terbaik dari penelitian Tahun I dan II. Hewan percobaan masing-masing memperoleh penyuntikan gonadotropin 20 atau 25 mg (AU) FSH (Kelompok. A, masing-masing 3 ekor untuk Tahap I dan II), dan kombinasi CIDR dan 20 atau 25 AU FSH (Kelompok B, masing-masing 3 ekor untuk Tahap I dan II). Penyuntikan FSH dilakukan dua kali sehari (pagi-sore) selama 3 hari berturut-turut dengan dosis turun bertingkat (5, 5, 3, 3, 2, 2 AU atau total 20 AU untuk Tahap I, dan 6, 6, 4, 4, 3, 2 IU atau total 25 AU untuk Tahap II) dimulai 4 hari sebelum koleksi sel telur. Pada Kelompok B CIDR tipe kecil (untuk domba/kambing) dipasang secara intravaginal selama 8 hari dan penyuntikan hari ke 5, 6 dan 7.

### **Identifikasi respons terhadap stimulasi**

Manifestasi respons terhadap stimulasi folikel dengan menggunakan gonadotropin dapat muncul dalam bentuk: (1) perubahan fisik berupa pembengkakan vulva, hiperemia dan pembentukan/sekresi lendir, (2) perubahan perilaku seksual berupa gejala tidak tenang, mounting (menaiki anak betina lainnya dan *standing heat* (diam dinaiki), (3) hasil stimulasi berupa pembentukan sejumlah besar folikel dengan diameter diatas 3 mm.

Tanda-tanda tersebut diatas dapat menunjukkan indikasi bahwa hewan memberikan respons positif terhadap pemberian gonadotropin. Respons yang ditunjukkan kemudian dapat menjadi prasyarat apakah koleksi sel telur dapat dilakukan.

### **Panen dan koleksi sel telur anak sapi**

Panen sel telur dilakukan dengan menggunakan teknik laparotomi melalui pembedahan pada daerah legok lapar (*flank*) dan median abdomen (*linea alba*). Teknik ini merupakan adaptasi teknik pembedahan pada operasi Caesar dan ovariektomi masing-masing untuk teknik pembedahan pada legok lapar dan median abdomen. Hewan terlebih dahulu memperoleh penyuntikan premedikasi atropin sulfat sebanyak 10 cc. Sekitar 10 menit kemudian dilakukan penyuntikan anestetikum xylazine (*Xylazil-20®*) sebanyak 0.15-0.30 mg/kg berat badan. Anastesi epidural dilakukan dengan penyuntikan lidokain adrenalin 2% sebanyak 2 cc pada sela antara tulang sakrum dan ruas pertama tulang ekor (*coxygea*). Disamping itu anastesi infiltrasi dilakukan dengan menyuntikkan lidokain adrenalin 2% sebanyak 10-20 cc pada daerah paralumbal (untuk teknik bedah pada posisi legok lapar) dan otot/jaringan di sekitar lokasi penyayatan.

Daerah operasi dicukur dan dibersihkan dengan sabun untuk selanjutnya dibilas dengan alkohol dan diolesi dengan yodium tinktur pekat. Daerah sekitar operasi ditutup dengan kain yang terbuka pada sekitar daerah sayatan. Untuk teknik bedah di daerah legok lapar, sayatan dimulai dari kulit sepanjang 8-10 cm tegak lurus terhadap sumbu memanjang tubuh kurang lebih 5-7 dibawah *processus transversus* tulang lumbal. Sayatan kemudian



dilanjutkan pada otot *obliquus abdominis* yang terdiri atas dua lapis yakni lapis *externus* dan *internus*. Pada teknik bedah di daerah median abdomen (*linea alba*), penyayatan dilakukan sepanjang 8-10 cm di bagian ventral abdomen antara umbilikus dan kelenjar ambing. Setelah menyayat kulit, penyayatan dilanjutkan pada jaringan ikat (*linea alba*). Operator kemudian mencari letak ovarium dengan dibantu lokalisasinya melalui kateter yang dimasukkan ke dalam vagina. Ovarium yang dapat teraih kemudian ditarik menuju ke permukaan sayatan.

Folikel yang tersebar di permukaan ovarium diaspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18 dan 21 G yang dihubungkan dengan alat suntik plastik ukuran 20 cc yang berisi 2-3 cc larutan *phosphate buffer saline* (PBS). Untuk menghindari pembekuan akibat teraspirasinya darah bersama dengan cairan folikel ditambahkan 10 IU heparin/ml larutan PBS. Teknik aspirasi dilakukan dengan dua pendekatan yakni *aspirasi tunggal* melalui permukaan masing-masing folikel dan *aspirasi ganda* yakni dengan mengarahkan jarum menuju folikel yang berdekatan dengan folikel pertama melalui jaringan ovarium. Cairan hasil aspirasi yang berisi sel telur ditempatkan pada filter embrio dan dibilas dengan PBS guna mengurangi campuran darah di dalam medium koleksi. Cairan yang telah tersaring tersebut kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri besar.

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

#### ***Panen dan koleksi sel telur sapi dewasa dari RPH***

Kompleks oosit-kumulus (COC) dikoleksi dari folikel berdiameter 2-8 milimeter yang terdapat di ovarium dengan menggunakan jarum ukuran 18 G dengan sisi miring (*bevel*) yang pendek yang dihubungkan dengan spuit plastik steril. Dengan menggunakan *conical tube*, seluruh cairan folikel yang teraspirasi

disimpan dan disatukan untuk beberapa ovarium yang tersedia. Sel telur yang dikoleksi kemudian dibilas dengan medium pembilas TCM199.

### ***Penentuan kualitas sel telur***

Sel telur yang terkoleksi dievaluasi terhadap kualitasnya melalui dua indikator yang lazim digunakan yakni jumlah lapisan dan integritas sel-sel kumulus serta integritas sel-sel ooplasmnya. Rincian indikator dan klasifikasi kualitas sel telur yang dievaluasi sesuai dengan kriteria Loos *et al.* (1989) dan Presicce *et al.* (1997) seperti dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas sel telur sesuai dengan parameter morfologis

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

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

### ***Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio***

Medium pematangan sel telur dipersiapkan dengan membuat tetesan medium TCM199 yang disuplementasi dengan 5% FCS sebanyak 200 ul diatas cawan petri ukuran sedang (diameter 6 cm). Untuk menghindari peng-uapan dilakukan penutupan permukaannya dengan menggunakan minyak mineral yang telah disterilisasi.

Pematangan sel telur dilakukan dengan menempatkan 10-20 sel telur pada setiap tetesan medium pematangan yang telah terlebih dahulu diinku-basikan selama sekitar 2 jam. Medium yang berisi oosit ditempatkan di dalam toples (flask) yang dapat mengatur kelembaban maksimal (95%) dan kandungan 5% CO<sub>2</sub>. di dalam inkubator dengan suhu 38.5°C. Kultur pema-tangan sel telur berlangsung dalam kondisi tersebut di atas dalam jangka waktu sekitar 22 jam. Pematangan oosit dievaluasi dengan mengacu pada indikator utama berupa ekspansi sel-sel kumulus.

Setelah evaluasi kematangan sel telur yang dilakukan secara morfologik, sel telur dicuci dengan medium pencuci yakni medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Fertilisasi atau inseminasi *in vitro* dilakukan dengan menggunakan semen beku yang diketahui fertilitasnya. Spermatozoa yang diperoleh dimurnikan dari larutan pengencemya melalui pencucian beberapa kali. Untuk proses kapasitasi, spermatozoa diinkubasi dalam medium BO yang disuplementasi dengan sodium piruvat, penisilin-strepto-misin, kafein dan heparin. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan adalah  $12.5 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Sel telur kemudian dimasukkan ke dalam medium fertilisasi (berupa tetesan 100 ul dan ditutup minyak mineral) yang telah berisi spermatozoa dan diinkubasikan pada suhu 38.5°C, dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5% CO<sub>2</sub> selama 5 jam.

Setelah proses fertilisasi, sel telur dibersihkan dari sel-sel kumulus dan dicuci beberapa kali dengan medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Kultur zigot dilakukan dengan menempatkan pada tetesan medium CR1aa pada suhu 38.5°C, dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5% CO<sub>2</sub>. Perkembangan embrio diamati pada 48 jam setelah dimulainya

kultur untuk melihat adanya pembelahan (*cleavage*) sebagai indikasi terjadinya pemuahan.

### ***Evaluasi dan penentuan kualitas sel telur***

Sel telur yang terkoleksi dievaluasi terhadap kualitasnya melalui dua indikator yang lazim digunakan yakni jumlah lapisan dan integritas sel-sel kumulus serta integritas sel-sel ooplasmanya. Rincian indikator dan klasifikasi kualitas sel telur yang dievaluasi sesuai dengan kriteria Loos *et al.* (1989) dan Pracicce *et al.* (1997) seperti termuat pada Laporan Tahun I dapat dilihat pada Lampiran 1.

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

### ***Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio***

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

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

Setelah evaluasi kematangan sel telur yang dilakukan secara morfologik, sel telur dicuci dengan medium pencuci yakni medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Fertilisasi atau inseminasi *in vitro* dilakukan dengan menggunakan semen beku yang diketahui fertilitasnya. Spermatozoa yang diperoleh dimumikan dari larutan pengencernya melalui pencucian beberapa kali. Untuk proses kapasitasi, spermatozoa diinkubasi dalam medium BO yang disuplementasi dengan sodium piruvat, penisilin-streptomisin, kafein dan heparin. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan adalah  $12.5 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Sel telur kemudian dimasukkan ke dalam medium fertilisasi (berupa tetesan 100 ul dan ditutup minyak mineral) yang telah berisi spermatozoa dan diinkubasikan pada suhu  $38.5^{\circ}\text{C}$ , dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5%  $\text{CO}_2$  selama 5 jam.

Setelah proses fertilisasi, sel telur dibersihkan dari sel-sel kumulus dan dicuci beberapa kali dengan medium BO yang disuplementasi dengan BSA. Kultur zigot dilakukan dengan menempatkan pada tetesan medium CR1aa pada suhu  $38.5^{\circ}\text{C}$ , dengan kelembaban maksimum dan kandungan 5%  $\text{CO}_2$ . Perkembangan embrio diamati pada 48 jam setelah dimulainya kultur untuk melihat adanya pembelahan (*cleavage*) sebagai indikasi terjadinya pembuahan. Perkembangan selanjutnya diamati setiap hari sampai pada pertumbuhan maksimal pada tahap perkembangan blastosis.

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

Sebuah toples polikarbonat volume 2.5 liter AnaeroJar™ dan sachet  $\text{CO}_2$  Gen™ berisi asam askorbat digunakan dalam kultur oosit/embrio. Sesuai dengan pabrik pembuatnya, sachet akan aktif setelah berkontak dengan udara. Reaksi asam askorbat dengan udara adalah bersifat eksotermik dengan temperatur sachet tak lebih dari  $65^{\circ}\text{C}$ . Setelah cawan berisi oosit/embrio diletakkan ke dalam toples, sachet dibuka dan diletakkan ke dalam toples. Toples kemudian ditutup rapat dengan memasang tutupnya yang fiksasi dengan 4 buah klip pengunci. Klip pengunci akan memungkinkan

berkembangnya tekanan positif di dalam toples, sehingga tutup agak terangkat dan bertambah rapat.

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

#### ***Preparasi untuk pemeriksaan ultrastruktur***

Oosit yang terkoleksi dipersiapkan untuk pemeriksaan ultrastruktur dengan beberapa tahap persiapan: (a) inkubasi uridine dengan persiapan pada larutan TCM199 yang disuplementasi dengan BSA dan penambahan 20 µl of <sup>3</sup>H-uridine (5(<sup>3</sup>H) Uridine selama 20 menit (untuk selengkapnya lihat Lampiran). (b) pencucian oosit pada medium PBS yang disuplementasi dengan FCs sebanyak 10%, (c) oosit kemudian difiksasi pada glutaraldehyde 3% dalam 0.1 M Na-fosfat buffer untuk 1 jam pada 4°C, (d) oosit disimpan pada 0.1 M buffer Na-fosfat dan (e) oosit ditempatkan di dalam straw untuk pengiriman.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Respons klinis terhadap stimulasi gonadotropin

#### Eksperimen I

Dari sebelas kali stimulasi hormonal dengan penyuntikan eCG dan FSH, tujuh ekor anak sapi menunjukkan berbagai derajat respons berupa tanda-tanda berahi sebagaimana lazim dijumpai pada betina dewasa berahi. Empat ekor sisanya gagal menampilkan tanda-tanda berahi. Dari tujuh ekor yang berespons tersebut, tiga ekor (No. 01, 02, 05) menunjukkan gejala berahi yang sangat nyata dengan tanda-tanda khas seperti naik-menaiki (*mounting*), diam dinaiki (*standing heat*), kehilangan nafsu makan, ketidaktenangan/frekuensi gerak yang meningkat dan sejumlah perubahan pada vulva (pembengkakan, hiperemi, kebasahan dan penampakan lendir). Empat ekor lainnya (No. 04, 06, 07, 08\*) hanya menunjukkan gejala berahi yang samar-samar dengan salah satu atau beberapa perubahan organ reproduksi luar. Rincian mengenai penampilan respons klinis terhadap stimulasi dengan eCG dan FSH dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Respons berahi hasil stimulasi eCG dan FSH pada anak sapi FH berumur 5-9 bulan.

No. sapi	Umur (bulan)	Bobot Badan	Stimulasi Hormon	Respons berahi
01	8	80 kg	1500 IU eCG	+++ MA, SH, LV, VB, VH, NM, TT, EU
02	9	110 kg	1500 IU eCG	+++ MA, SH, LV, VB, VH, NM, TT, EU
03	6	80 kg	1000 IU eCG	-
04	9	110 kg	1000 IU eCG	+ VB, VH
05	9	115 kg	1500 IU eCG	+++ MA, SH, LV, VB, VH, NM, TT, EU
06	8	80 kg	1500 IU eCG	+ VB
07	7	75 kg	1500 IU eCG	+ LV, VB, VH
08	6	75 kg	1500 IU eCG	-
08*	6	75 kg	17 AU FSH	+ VB, VH
09	6	75 kg	17 AU FSH	-
10	5	70 kg	16 AU FSH	-

Catatan : MA - mounting activity , SH - standing heat, LV - lendir vulva, VB - vulva bengkak, VH - vulva hiperemi, NM - nafsu makan rendah, TT - tak tenang, EU - ereksi uterus.

Di antara hewan yang menunjukkan respons terhadap stimulasi eCG, gejala berahi nampak lebih nyata terlihat pada anak-anak sapi dengan umur yang lebih tua dan bobot badan yang lebih berat. Hal ini sesuai dengan Armstrong *et al.* (1997) yang menyatakan bahwa kondisi hormonal dan ovarium sapi-sapi prapubertas lebih responsif terhadap stimulasi. Presicce *et al.* (1997) melaporkan kenaikan kompetensi anak sapi untuk menghasilkan sel telur yang lebih baik seiring dengan peningkatan umur.

Dari 3 ekor anak sapi yang distimulasi dengan FSH, hanya satu ekor (No 08\*) yang menunjukkan gejala berahi samar-samar. Sementara itu dari 3 ekor anak sapi yang berespons maksimal (No 01, 02 dan 05), keseluruhannya berasal dari kelompok eCG dengan tanda-tanda berahi yang berlangsung persisten bertahan antara 5-7 hari setelah panen sel telur. Hal ini diduga berkaitan dengan sisa folikel yang tidak teraspirasi dan berkembang menjadi folikel besar yang mengandung estrogen tinggi (Looney *et al.*, 1995). Tanda-tanda berahi yang bertahan tersebut dapat pula berkaitan dengan masa paruh eCG yang panjang (Supriatna *et al.*, 1998), sehingga stimulasi masih terus berlangsung meskipun aspirasi sudah berlangsung secara tuntas.

### Eksperimen II

Dari sembilan ekor anak sapi yang digunakan dengan penyuntikan eCG atau FSH dengan atau tanpa kombinasi pemberian CIDR, tidak satupun menunjukkan gejala berahi berupa *mounting* atau *standing heat*. Hal ini berbeda dengan kelompok anak sapi pada eksperimen yang sama tahun lalu. Pada penelitian kali ini anak sapi hanya menunjukkan gejala berahi sekunder seperti kehilangan nafsu makan, ketidaktenangan/frekuensi gerak yang meningkat dan sejumlah perubahan pada vulva (pembengkakan, hiperemi, kebasahan dan penampakan lendir). Rincian mengenai penampilan respons klinis terhadap stimulasi dengan eCG dan FSH dapat dilihat pada Tabel 3.



Tabel 3. Respons berahi hasil stimulasi eCG dan FSH pada anak sapi FH berumur 5-9 bulan.

No. sapi	Umur (bulan)	Bobot Badan	Stimulasi Hormon	Respons berahi
01	6	75 kg	1500 IU eCG	LV, VB, VH, NM, TT,
02	5	60 kg	20 AU FSH	LV, VB, VH, NM, TT,
03	6	70 kg	1500 IU eCG	LV, VH, NM, TT
04	6	75 kg	CIDR + 1500 IU eCG	LV, VB, VH
05	6	70 kg	CIDR + 20 AU FSH	LV, VB, VH, NM, TT,
06	4	60 kg	CIDR + 20 AU FSH	LV, VB, VH
07	4	60 kg	1500 IU eCG	LV, VB, VH
08	5	65 kg	20 AU FSH	LV, VB, VH, NM, TT,
09	4	60 kg	20 AU FSH	LV, VB, VH

Catatan : LV - lendir vulva, VB - vulva bengkak, VH - vulva hiperemi, NM - nafsu makan rendah, TT - tak tenang, EU - ereksi uterus.

Perbedaan penampilan berahi dengan tanda naik menaiki (*mounting*) dan diam dinaiki (*standing heat*) yang tidak dijumpai pada penelitian ini diduga berkaitan dengan umur sapi yang relatif lebih muda. Tanda berahi nyata juga tidak dilaporkan oleh para peneliti lain yang melakukan program stimulasi gonadotropin baik dengan menggunakan FSH maupun eCG, pada anak sapi muda (Earl, *et al.*, 1995; Adam *et al.*, 1996). Pada penelitian tahun lalu, gejala berahi naik-menaiki dan diam dinaiki, terjadi pada anak sapi umur 8-9 bulan dan tidak pada anak sapi yang lebih muda. Pada kondisi tersebut, secara acak respons naik-menaiki dan diam dinaiki terjadi pada pemberian eCG dan bukan pada pemberian FSH. Tanda-tanda berahi yang bertahan tersebut diduga berkaitan dengan masa paruh eCG yang panjang (Supriatna *et al.*, 1998), sehingga stimulasi masih terus berlangsung meskipun aspirasi sudah berlangsung secara tuntas. Variasi ukuran ovarium dan respons superovulasi anak sapi sesuai dengan umur masing-masing dapat diamati pada tabel 4.

Tabel 4. Rataan ukuran ovarium sesuai dengan umur anak sapi

Parameter	Umur anak sapi		
	3-4 bulan	4-5 bulan	5-6 bulan
Ukuran ovarium (cm)			
□ Sumbu memanjang	1.8 ± 1.3	2.0 ± 0.8	2.4 ± 0.5
□ Sumbu melebar	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4
□ Ketebalan	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.3

Hal lain yang mendukung kondisi tersebut diduga berkaitan dengan sisa folikel kecil yang tidak teraspirasi dan kemudian berkembang menjadi folikel besar karena sisa-sisa eCG. Folikel tersebut terus berkembang dan cenderung menghasilkan estrogen dalam kadar yang tinggi, sehingga ekspresi berahi yang nyata dapat diamati (Looney *et al.*, 1995).

Hal ini sesuai dengan Armstrong *et al.* (1997) yang menyatakan bahwa kondisi hormonal dan ovarium sapi-sapi prapubertas lebih responsif terhadap stimulasi. Presicce *et al.* (1997) melaporkan kenaikan kompetensi anak sapi untuk menghasilkan sel telur yang lebih baik seiring dengan peningkatan umur.

Tabel 5. Rataan jumlah dan ukuran folikel anak sapi

Perlakuan	Jumlah folikel > 3 mm (range)	Ukuran folikel dan range
FSH	22.5 (14 - 28)	0.5 (0.3 - 0.9)
eCG	10.4 (6 - 10)	0.7 (0.4 - 1.3)
CIDR + FSH	12.5 (12 - 24)	0.8 (0.2 - 1.0)
CIDR + eCG	10.0 (6 - 10)	0.5 (0.7 - 1.2)

Pada Eksperimen III dan IV telah dilakukan program stimulasi hormonal Kelompok A dengan FSH (3 ekor) dan kombinasi FSH-CIDR (3 ekor) Seluruh hewan percobaan, tidak satupun menunjukkan gejala berahi berupa *mounting* atau *standing heat*. Pada penelitian kali ini anak sapi hanya menunjukkan gejala berahi sekunder seperti kehilangan nafsu makan, ketidakterangannya/frekuensi gerak yang meningkat dan sejumlah perubahan pada vulva seperti pembengkakan, hiperemi, kebasahan dan penampakan lendir.

Perbedaan penampilan berahi dengan tanda naik menaiki (*mounting*) dan diam dinaiki (*standing heat*) yang tidak dijumpai pada penelitian ini diduga berkaitan dengan umur sapi yang relatif lebih muda. Hal yang sama dilaporkan oleh Purwantara et al. (1999, 2000) dimana anak sapi dengan umur maksimum 6 bulan tidak menunjukkan tanda-tanda berahi *mounting* dan *standing heat*. Tanda berahi nyata juga tidak dilaporkan oleh para peneliti lain yang melakukan program stimulasi gonadotropin baik dengan menggunakan FSH maupun eCG, pada anak sapi muda (Earl, et al., 1995; Adam et al., 1996). Pada penelitian Tahun I (Purwantara et al., 1998, 1999), gejala berahi naik-menaiki dan diam dinaiki, terjadi pada anak sapi umur 8-9 bulan yang distimulasi dengan eCG dan tidak pada anak sapi yang lebih muda.

Tanda-tanda berahi yang bertahan tersebut diduga berkaitan dengan masa paruh eCG yang panjang (Supriatna et al., 1998), sehingga stimulasi masih terus berlangsung meskipun aspirasi sudah berlangsung secara tuntas. Hal lain yang mendukung kondisi tersebut diduga berkaitan dengan sisa folikel kecil yang tidak teraspirasi dan kemudian berkembang menjadi folikel besar karena sisa-sisa eCG. Folikel tersebut terus berkembang dan cenderung menghasilkan estrogen dalam kadar yang tinggi, sehingga ekspresi berahi yang nyata dapat diamati (Looney et al., 1995). Hal ini sesuai dengan Armstrong et al. (1997) yang menyatakan bahwa kondisi hormonal dan ovarium sapi-sapi prapubertas lebih responsif terhadap stimulasi. Presicce et al. (1997) melaporkan kenaikan kompetensi anak sapi untuk

menghasilkan sel telur yang lebih baik seiring dengan peningkatan umur. Pada kelompok FSH-CIDR, terdapat indikasi adanya *discharge* berwarna keputihan yang diduga berasal dari luruhan komponen CIDR yang menyerupai tepung berwarna putih. Pemeriksaan dengan vaginoskop menunjukkan tidak dijumpainya kelainan seperti peradangan pada uterus atau lendir keruh yang keluar melalui serviks.

### **Perkembangan folikel sebagai respons ovarium terhadap gonadotropin**

Variasi ukuran ovarium dan jumlah serta ukuran folikel dapat diamati pada penelitian ini. Indikasi menunjukkan meskipun terdapat keseragaman umur dan berat/besar tubuh hewan variasi ukuran ovarium masih dapat diamati sebagai bagian dari variasi individu. Namun demikian secara umum rata-rata ukuran ovarium mengalami peningkatan seiring bertambahnya umur anak sapi (Purwantara et al., 1999; 2000).

Dari data sementara yang terkumpul dapat disimpulkan bahwa pada masa pertumbuhan, ukuran ovarium menunjukkan perkembangan yang berlanjut. Ovarium semakin besar dengan semakin bertambahnya umur anak sapi tersebut menuju pubertas. Meskipun tidak ada data pembandingan ukuran ovarium pada anak sapi di negara maju, namun melihat respons yang ditimbulkan, dan berat badan anak sapi pada umur yang sama, diduga kelambatan perkembangan tubuh anak sapi memberikan andil bagi ukuran ovariumnya.

Penggunaan FSH dan FSH-CIDR dalam proses stimulasi pertumbuhan folikel sebagai rekomendasi hasil penelitian Tahun II telah menunjukkan konsistensi dan rendahnya variasi respons. Pada kondisi dengan jumlah folikel yang rendah terdapat indikasi ukuran folikel meningkat dan sebaliknya pada kondisi ukuran folikel yang rata-rata kecil cenderung jumlah folikelnya meningkat. Namun demikian, hampir semua hewan kecuali satu hewan pada kelompok FSH menunjukkan indikasi pembentukan folikel >6 mm (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa meskipun proporsinya jauh dibawah kelompok eCG dan eCG-CIDR (Purwantara et al., 1999), penyuntikan FSH maupun FSH-CIDR belum mampu menghindarkan ovarium dari folikel berukuran

besar (6-9 mm). Folikel besar tersebut diduga berasal dari kelompok gelombang folikel yang mendekati ukuran optimal (Damiani et.al., 1996). Seperti dimaklumi, ovarium dari anak sapi prapubertas menunjukkan perkembangan pola pertumbuhan folikel "menyerupai gelombang" (*wavelike pattern*) sebagaimana dilaporkan oleh Adam et al. (1994) dan Evans et al. (1994). Meskipun tidak ada data kuantitatif tentang hubungan antara ukuran ovarium dengan jumlah sel telur yang berhasil dikoleksi, terdapat indikasi bahwa ovarium yang berukuran besar cenderung menghasilkan oosit lebih banyak (Purwantara et al., 1999).

Tabel 6 menunjukkan bahwa antara Kelompok FSH dan FSH-CIDR tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P>0.05$ ) dalam hal jumlah folikel 3-6 mm dan jumlah folikel >6 mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah dan terutama ukuran folikel pada kelompok FSH-CIDR cenderung lebih seragam.

Tabel 6. Rataan dan kisaran jumlah dan ukuran folikel anak sapi

Perlakuan	Juml. folikel 3-6 mm		Ukuran folikel (mm)		Jumlah Folikel >6 cm
	Rataan $\pm$ SD	Kisaran	Rataan $\pm$ SD	Kisaran	
FSH	17.3 $\pm$ 4.3 a	9 - 24	4.5 $\pm$ 0.7a	0.2 - 0.9	4 (2)
CIDR + FSH	19.7 $\pm$ 3.5 a	10 - 28	4.8 $\pm$ 0.5 a	0.2 - 0.8	3 (3)

Jumlah dan ukuran folikel yang diamati sangat bervariasi antara hewan yang satu dengan hewan lainnya. Hal ini sesuai dengan anggapan bahwa daya tanggap ovarium terhadap pemberian gonadotropin selalu sulit diramalkan dan selalu bervariasi. Pada hewan dewasa, superovulasi dengan pemberian gonadotropin memiliki hasil yang bervariasi dan sulit diramalkan. Faktor-faktor yang dapat dianggap berperan adalah status intraovarium,

profil hormonal dan perbedaan "batch" hormon yang digunakan (Greve dan Purwantara, 1993).

Dibandingkan dengan hasil penelitian sejenis yang dilakukan di berbagai negara maju, dalam penelitian ini jumlah folikel yang tumbuh pada ovarium masing-masing hewan relatif bervariasi. Precisse et al. (1997), Duby et al. (1996) dan Brogliatti et al (1996) mencatat kapasitas produksi sel telur yang teraspirasi masing-masing adalah  $21.6 \pm 0.2$ ,  $45 \pm 7$  dan  $14.9 \pm 0.2$  folikel. Respons stimulasi yang dihasilkan oleh FSH dan kombinasi FSH dan CIDR terbukti relatif konstan tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata hasil stimulasi secara keseluruhan dari penelitian Tahun I dan II (Purwantara et al., 1998, 1999). Hal ini terjadi karena jumlah folikel yang dihasilkan oleh teknik stimulasi yang lain (eCG dan eCG-CIDR) dalam penelitian Tahun I dan II relatif rendah.

### **Panen sel telur**

Panen sel telur dilakukan dengan teknik bedah laparotomi pada daerah legok lapar (*flank*) dan pada daerah median diantara umbilikus (tali pusar) dan ambing. Masing-masing teknik bedah tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan dalam upaya melokalisir dan memanipulasi ovarium untuk aspirasi folikel. Kedua teknik tersebut juga memiliki perbedaan dalam hal waktu yang diperlukan untuk menyelesaikan seluruh proses pembedahan. Disamping itu, perbedaan dapat dijumpai dalam hal kerumitan proses menjahit dan kemungkinan persembuhan lukanya. Beberapa paparan deskriptif berikut ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang keuntungan dan kerugian kedua teknik bedah tersebut.

Disamping itu, kondisi fisiologis ovarium dan folikel pada hewan hidup amat berbeda dengan kondisi ovarium yang dikoleksi dari RPH atau melalui teknik ovariektomi. Oleh karena itu deskripsi tentang teknik aspirasi yang efisiensi menjadi bagian yang penting untuk diketahui.

### ***Teknik panen sel telur melalui bedah pada legok lapar (flank)***

Panen oosit melalui pembedahan di daerah legok lapar didasarkan atas teknik bedah Caesar. Pembedahan dilakukan pada sisi dinding perut sebelah kiri dengan tujuan untuk menghindari gangguan akibat usus yang biasanya terdorong ke bagian kanan. Pada bagian kiri rongga perut merupakan wilayah lambung yang oleh karena hewan dipuaskan tidak akan mengganggu proses pembedahan dan manipulasi organ.

Dari lima ekor hewan yang dibedah dengan teknik ini, ovarium dapat dengan mudah dicapai dan dimanipulasi mendekati permukaan sayatan pada tiga ekor hewan percobaan (No. 01, 02 dan 04). Sedangkan dua ekor lainnya (No. 03 dan 05) menunjukkan kesulitan manipulasi yang diduga diakibatkan oleh ukuran organ reproduksi serta sistem penggantung ovarium dan uterus yang masih kecil dan belum berkembang. Hal ini nampaknya berkaitan dengan umur dan ukuran/bobot badan hewan dimana hewan yang berumur lebih tua cenderung memiliki organ yang relatif sudah lebih pesat berkembang. Dari proses pembedahan, teknik ini memiliki kelemahan yaitu terlalu banyak jaringan yang disayat karena pada bagian ini terdapat dua lapis otot *obliquus abdominis* yakni lapis *externus* dan *internus*. Dua lapis otot tersebut tersusun dalam alur serat dengan posisi miring terhadap arah sayatan dan tegak lurus satu dengan lainnya. Hal ini membawa konsekuensi bentuk sayatan menjadi kurang beraturan sehingga perlu proses penjahitan yang teliti. Oleh karena banyaknya jaringan otot yang tersayat, maka diperlukan penjahitan yang lebih rumit dan memerlukan waktu yang relatif lebih lama. Pada posisi ini umumnya perdarahan berlangsung lebih banyak karena adanya otot yang tebal dan berlapis-lapis. Disamping itu posisi sayatan dari teknik ini memiliki jarak yang relatif lebih jauh terhadap ovarium karena posisinya yang agak lebih ke depan.

Teknik pembedahan legok lapar memiliki keunggulan yakni ovarium relatif lebih mudah dicapai karena tidak terganggu oleh posisi usus halus karena posisi sayatannya lebih tinggi dari letak usus. Ovarium kanan yang letaknya bersebelahan dengan ovarium kiri dapat pula diraih dari sisi sebelah

kiri tanpa kesulitan yang berarti. Tekanan dinding perut yang relatif rendah memungkinkan ketahanan jahitan yang lebih tinggi. Teknik ini juga relatif lebih aman terhadap infeksi karena kemungkinan kontaminasi oleh feses dan kotoran lantai kandang relatif lebih kecil.

***Teknik panen sel telur melalui pembedahan pada daerah linea alba***

Panen sel telur dengan sistem pembedahan median dilakukan melalui penyayatan dinding perut bagian bawah sejajar dengan sumbu memanjang tubuh berimpit pada garis putih (*linea alba*) dan pada posisi antara umbilikus dan kelenjar ambing. Teknik ini membutuhkan posisi hewan dalam keadaan terlentang serta tubuh bagian belakang diletakkan pada posisi yang lebih tinggi. Gambar 1 menunjukkan lokasi pembedahan pada median abdomen yakni dengan melakukan sayatan pada linea alba.



Gambar 1. Letak dan proses pembedahan daerah median abdomen dalam rangka panen sel telur anak sapi..

Dalam posisi telentang, ovarium dan saluran reproduksi berada di balik konfigurasi usus halus dan usus besar. Oleh karena itu, kelemahan teknik ini adalah ovarium tidak dapat dengan mudah diraih karena tersembunyi dibalik usus halus. Keunggulan teknik ini adalah bahwa jaringan kulit dan jaringan



ikat disekitar *linea alba* relatif tipis dan amat sedikit mengandung pembuluh darah sehingga proses pemembedahannya sedikit sekali menimbulkan perdarahan. Dengan teknik ini jarak ovarium ke sayatan relatif lebih pendek sehingga dengan manipulasi sederhana ovarium dapat diraih.

### Hasil stimulasi dan respons ovarium terhadap gonadotropin

Penggunaan gonadotropin eksogen yakni eCG dan FSH dalam proses stimulasi perkembangan folikel menunjukkan variasi hasil yang sangat beragam. Hal ini diduga merupakan kombinasi antara rendahnya dosis dan umur hewan. Hasil stimulasi sel telur dengan menggunakan eCG dapat dilihat pada Tabel 7.

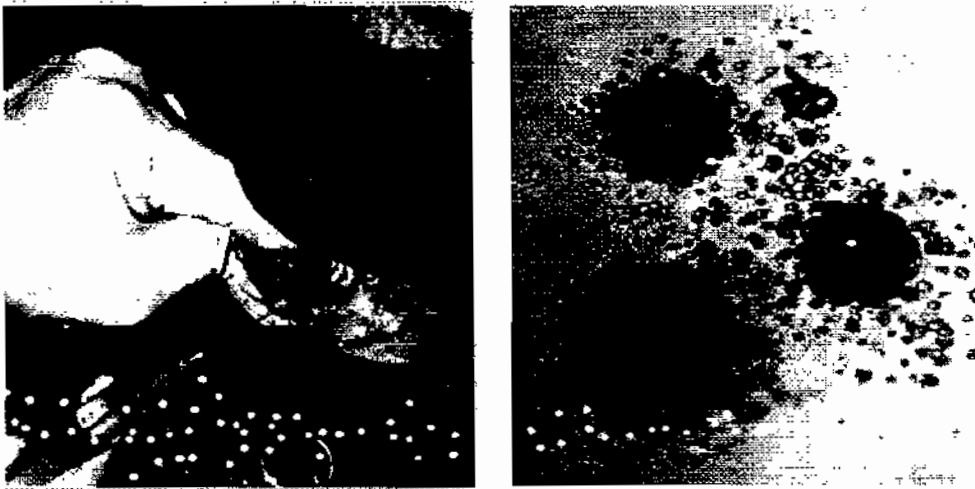
Tabel 7. Hasil stimulasi hormonal terhadap perkembangan folikel anak sapi

No. Sapi	Jumlah folikel			Jumlah aspirasi			% Aspirasi	Juml. Oosit	%oosit/ aspirasi
	OvKi	OvKa	Total	OvKi	OvKa	Total			
01	35	28	63	26	25	51	80.9	14	27.5
02	21	18	39	15	14	29	74.4	12	41.4
04	4	3	7	3	2	5	71.4	3	60.0
05	16	22	38	12	19	31	83.5	13	41.9
Total	76	71	147	56	53	116	78.9	42	36.2

Jumlah folikel yang dihasilkan bervariasi dengan jumlah tertinggi adalah 63 folikel dan yang terendah 7 folikel dengan rata-rata 36.7 folikel per ekor. Hal ini sesuai dengan Tervit *et al.* (1995), Presicce *et al.* (1997) yang masing-masing melaporkan tingkat populasi folikel ukuran 3-8 mm pasca stimulasi sebanyak 40-50 dan 30-35 folikel per ekor anak sapi umur 3-5 bulan.

### Teknik aspirasi folikel

Penyedotan atau aspirasi folikel pada hewan hidup (*in vivo*) amat berbeda dibandingkan dengan aspirasi ovarium yang berasal dari rumah potong hewan (*in vitro*). Pada aspirasi *in vitro*, oleh karena ovarium diperoleh setelah hewan dipotong, hampir pasti tidak dijumpai adanya perdarahan. Namun sebaliknya, aspirasi *in vivo* pada ovarium hewan hidup selalu menimbulkan perdarahan karena permukaan ovarium mengandung pembuluh darah yang sangat aktif. Perdarahan akan semakin banyak apabila digunakan jarum suntik ukuran besar (18 G) yang menembus stroma ovarium, disamping melukai banyak folikel. Gambar 2 (B) menampilkan aspirasi folikel melalui teknik "*continuous puncture*" dimana tusukan jarum akan diteruskan dari satu folikel menuju folikel terdekat lainnya.



Gambar 2. Hasil stimulasi dengan eCG berupa pertumbuhan folikel yang berlimpah, Teknik aspirasi dengan sistem "*continuous puncture*"

Tabel 7 menunjukkan efisiensi teknik aspirasi pada masing-masing individu yang baru mencapai 10.5 sel telur/ekor. Efisiensi aspirasi ini masih belum sebanding dengan Lewis *et al.* (1995) dan Kotaras *et al.* (1995) yang melaporkan aspirasi folikel dengan teknik yang sama masing-masing mamapu menghasilkan 25 dan 22.8 sel telur/ekor. Dari data tersebut dapat pula dihitung dan dibandingkan efisiensi teknik aspirasi tunggal melalui

permukaan folikel (Sapi no. 04 dan 05) dan melalui *continuous puncture* (Sapi no. 01 dan 02) yang mencapai masing-masing 44.4 dan 32.5%.

### **Teknik aspirasi folikel pada permukaan ovarium**

Bila dibandingkan dengan teknik aspirasi ovarium yang berasal dari rumah potong hewan (*in vitro*), aspirasi folikel pada hewan hidup (*in vivo*) amat berbeda dan lebih sulit. Pada aspirasi *in vitro*, oleh karena ovarium diperoleh setelah hewan dipotong, hampir pasti tidak dijumpai adanya perdarahan. Namun sebaliknya, aspirasi *in vivo* pada ovarium hewan hidup selalu menimbulkan perdarahan karena permukaan ovarium mengandung pembuluh darah yang sangat aktif. Perdarahan akan semakin banyak apabila digunakan jarum suntik ukuran besar (18 G) yang menembus stroma ovarium, disamping melukai banyak folikel. Aspirasi dilakukan dengan menusukkan jarum ukuran 21 G pada folikel yang diperkirakan mengandung sel telur. Posisi aspirasi dilakukan beberapa milimeter disamping dan mengarah pada folikel yang dituju.

Di sisi lain keterbatasan ruang dan resistensi penggantung ovarium dan uterus terhadap upaya ekspose ovarium ke permukaan menghambat proses aspirasi. Pada lokasi-lokasi tertentu dimana folikel tersembunyi dibalik jari-jari tangan pemegang ovarium, folikel seringkali lolos dan tidak dapat diaspirasi.

Tabel 8. menunjukkan efisiensi teknik aspirasi pada masing-masing individu yang baru mencapai 18.5 sel telur/ekor. Efisiensi aspirasi ini masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Lewis *et al.* (1995) dan Kotaras *et al.* (1995) yang melaporkan aspirasi folikel dengan teknik yang sama masing-masing mampu menghasilkan 25 dan 22.8 sel telur/ekor. Dari data tersebut dapat pula dihitung dan dibandingkan efisiensi teknik aspirasi yang mencapai sekitar 60.4%. Dari Tabel 2 ini dapat pula disimpulkan bahwa pemakaian FSH relatif lebih berprospek karena memperoleh hasil oosit terkoleksi yang tinggi baik jika diberikan sendiri maupun dikombinasi dengan CIDR. Hal ini dapat diperkuat dengan

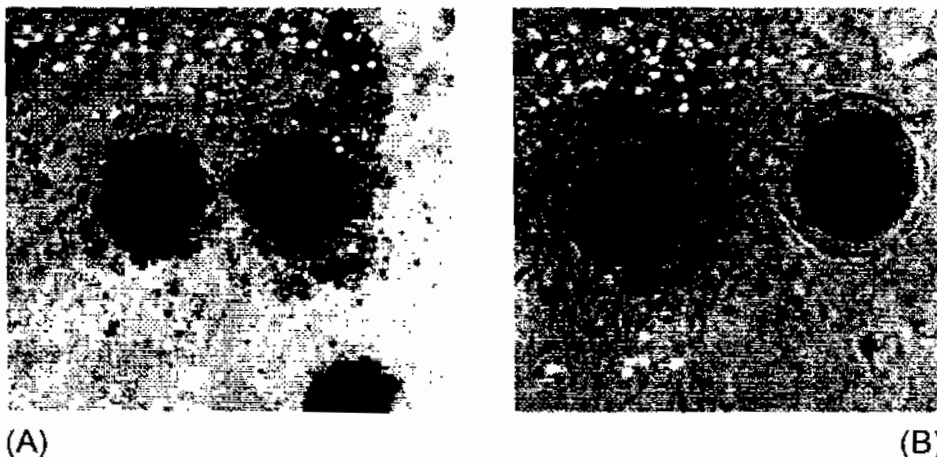
kenyataan bahwa ovarium yang distimulasi dengan eCG cenderung menghasilkan folikel berukuran terlalu besar. Diduga pembesaran folikel yang melebihi kemampuan daya dukung permukaan ovarium akan menekan fungsi folikel kecil lain disekelilingnya (Purwantara et al., 1999)

Tabel 8. Hasil stimulasi hormonal terhadap perkembangan folikel anak sapi

Perlakuan	Juml folikel Total	Juml. Oosit total	%oosit/ folikel	Juml Folikel /ekor	Juml. Oosit /ekor
FSH (n=3)	52	30	57.7	17.3	10.0
CIDR + FSH (n=3)	59	37	62.7	19.7	12.3
Total (Rataan)	111	67	60.4	18.5	11.2

### Evaluasi kualitas dan pematangan sel telur *in vitro*

Sel telur yang terkumpul dikelompokkan sesuai dengan kualitasnya berdasarkan kriteria yang digunakan oleh Loos (1984) dan Presicce et al.



Gambar 3. Sel telur yang dihasilkan dari aspirasi setelah stimulasi dengan eCG dan FSH. (A) Sel telur dengan sel-sel kumulus yang meluas (kanan) dan (B) sel telur mengalami pemekaran sel-sel kumulus (kiri) dan gundul (kanan).

(1997). Gambar 3 menunjukkan beberapa sel telur anak sapi hasil aspirasi dengan kualitas masing-masing dari yang terbaik dengan sel-sel kumulus yang tebal dan kompak (Kualitas A), sampai yang terburuk yakni sel telur dengan sel-sel kumulus yang gundul atau berfibrin (Kualitas D).

Dalam percobaan ini sel telur dengan kualitas A dan B diperhitungkan dalam proses pembuahan sedangkan sel telur dengan kualitas C dan D hanya digunakan dalam proses evaluasi seluler, untuk melihat perubahan sel ooplasmanya maupun sel-sel kumulusnya. Gordon (1994) melaporkan bahwa apabila sel-sel telur kualitas C dan D dimatangkan dan dibiarkan terfertilisasi, angka keberhasilannya untuk mencapai perkembangan lebih lanjut akan sangat kecil.

Tabel 9 menunjukkan klasifikasi kualitas sel telur yang diperoleh dan kemampuannya berkembang lebih lanjut melewati proses pematangan. Dari data yang tersaji, proporsi sel telur dengan kualitas A dan B (masing-masing 10 dan 9) relatif lebih sedikit dibandingkan dengan C dan D (masing-masing 8 dan 15). Ditinjau dari jumlah sel telur yang dihasilkan, data penelitian ini menunjukkan angka yang setara dengan Presicce *et al* (1997) dan Tervit (1996) bahkan lebih tinggi daripada Kajihara *et al*, (1991) dan Palma *et al*. (1993). Namun demikian, jumlah sel telur yang mencapai kualitas A dan B (kurang dari 50% ) jauh lebih rendah daripada Presicce *et al*. (1997) yang melaporkan kemampuan menghasilkan 92% osit dengan kualitas A dan B pada anak sapi umur 5 bulan. Hal ini mungkin berkaitan dengan kondisi hewan tropis dimana pada program PIEV sapi-sapi induk saja, rendahnya kualitas maupun kuantitas sel telur masih menjadi persoalan. Fenomena ini tentu dapat dikaitkan pula dengan rendahnya kompetensi anak sapi ini dalam merespons stimulasi pertumbuhan folikel.

Dari sejumlah kecil sel telur yang layak ditumbuhkan, persentase sel telur matang rata-rata mencapai 65% . Kondisi ini masih berada di bawah standar pematangan sel telur induk sapi yang dapat mencapai 85-90%. Angka pematangan yang relatif rendah tersebut dapat pula berkaitan dengan lamanya sel-sel telur itu terekspos pada medium yang kurang cocok.

Tabel 9. Kualitas dan pematangan sel telur secara *in vitro*

No. sapi	Kualitas sel telur				Juml. sel telur	Sel telur layak	Sel telur matang	% sel telur matang
	A	B	C	D				
01	4	2	3	5	14	6	4	67%
02	3	2	3	4	12	5	3	60%
04	0	1	1	1	3	1	0	0%
05	4	4	1	5	13	8	6	75%
Total	10	9	8	15	42	20	13	65%

Medium *handling* yang bercampur dengan darah pada saat evaluasi diduga berperan-an dalam mengubah lingkungan mikro yang kurang menguntungkan dan berpotensi mematikan atau mengganggu sel-sel telur tersebut. Pemaparan sel telur di dalam cairan yang memiliki kandungan heparin 10 AU/ml dalam waktu yang relatif panjang diduga juga berperan dalam memperkecil angka pematangan dan fertilisasi.

Sel telur yang terkumpul dikelompokkan sesuai dengan kualitasnya berdasarkan kriteria yang digunakan oleh Loos (1984) dan Presicce *et al.* (1997) sebagaimana dilakukan pula pada penelitian Tahun I dan II. Dalam percobaan ini sel telur dengan kualitas A dan B diperhitungkan dalam proses pembuahan sedangkan sel telur dengan kualitas C dan D hanya digunakan dalam proses evaluasi seluler, untuk melihat perubahan sel ooplasmnya maupun sel-sel kumulusnya. Gordon (1994) melaporkan bahwa apabila sel-sel telur kualitas C dan D dimatangkan dan dibiarkan terfertilisasi, angka keberhasilannya untuk mencapai perkembangan lebih lanjut akan sangat kecil. Tabel 10 menunjukkan klasifikasi kualitas sel telur yang diperoleh dan kemampuannya berkembang lebih lanjut melewati proses pematangan.

Tabel 10. Kualitas dan pematangan sel telur secara *in vitro*

Perlakuan	Juml. sel telur	Sel telur layak	Sel telur matang	% sel telur layak	% sel telur matang
FSH	30	22	10	73.7	45.4
CIDR + FSH	37	28	14	75.7	50.0
Total	67	50	24	74.6	48.0

Dari data yang tersaji, proporsi sel telur layak (kualitas A dan B) mencapai 73.7 dan 75.7% masing-masing untuk Kelompok FSH dan FSH-CIDR membuktikan bahwa sistem perangsangan relatif berhasil dan kemampuan sel telur untuk berkembang lebih lanjut menjadi besar. Ditinjau dari jumlah sel telur yang dihasilkan, data penelitian ini menunjukkan angka yang setara dengan yang dilaporkan oleh Tervit (1996) bahkan lebih tinggi daripada hasil kerja Kajihara *et al.*, (1991) dan Palma *et al.* (1993). Namun demikian, jumlah sel telur layak jauh lebih rendah daripada Presicce *et al.* (1997) yang melaporkan kemampuan menghasilkan 92% osit dengan kualitas A dan B pada anak sapi umur 5 bulan. Hal ini mungkin berkaitan dengan kondisi hewan tropis dimana pada program PIEV sapi-sapi induk saja, rendahnya kualitas maupun kuantitas sel telur masih menjadi persoalan. Fenomena ini tentu dapat dikaitkan pula dengan rendahnya kompetensi anak sapi ini dalam merespons stimulasi pertumbuhan folikel.

Dari sejumlah kecil sel telur yang layak ditumbuhkan, persentase sel telur matang rata-rata mencapai 48.0% atau masing-masing 45.5 dan 50.0% masing-masing untuk Kelompok FSH dan FSH-CIDR. Kondisi ini masih berada di bawah standar pematangan sel telur induk sapi yang dapat mencapai 85-90%. Angka pematangan yang relatif rendah tersebut diduga dapat pula berkaitan dengan lamanya sel-sel telur itu terekspos pada medium yang kurang cocok. Medium *handling* yang bercampur dengan darah pada saat evaluasi diduga berperan dalam mengubah lingkungan mikro yang

kurang menguntungkan dan berpotensi mematikan atau mengganggu sel-sel telur tersebut. Pemaparan sel telur di dalam cairan yang memiliki kandungan heparin 10 AU/ml dalam waktu yang relatif panjang diduga juga berperan dalam memperkecil angka pematangan dan fertilisasi.

### **Fertilisasi *in vitro***

Gambar 4 menunjukkan proses fertilisasi pada beberapa sel telur yang mengalami pematangan secara *in vitro*. Fertilisasi dilakukan dengan menggunakan semen pejantan yang telah diketahui fertilitasnya. Dari seluruh sel telur yang matang, tidak satupun yang mampu menghasilkan "cleavage" embrio, yakni pembelahan sel zigot menjadi embrio 2 sel. Perkembangan sel oosit yang gagal dibuahi.

### **PEIV sapi dewasa**

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

### **Kondisi ovarium dari RPH**

Kondisi ovarium dari sapi betina dewasa yang dipotong di RPH, tidak semuanya menunjukkan kondisi normal. Dari 24 pasang ovarium yang telah dikoleksi hanya 16 pasang (67%) menunjukkan kondisi ovarium normal sedangkan 8 pasang sisanya (33%) menunjukkan kondisi buruk dan tidak layak untuk digunakan. Kelainan tersebut meliputi atropi, hipofungsi, hipoplasia dan kista ovarium. Kelainan tersebut dapat merefleksikan



gangguan fungsional dan abnormalitas perkembangan struktur ovarium yang dapat disebabkan oleh faktor genetik dan lingkungan seperti malnutrisi, suhu dan cahaya yang erat hubungannya dengan musim (Toelihere, 1985). Dari ovarium yang dianggap normal, 10 pasang (62.5%) memiliki siklus reproduksi yang normal, terbukti dengan adanya corpus luteum (CL) pada salah satu atau ke dua ovarium, sedangkan 6 pasang sisanya (37.5%) hanya menunjukkan perkembangan folikel tapi tanpa ditemukan CL.

### **Koleksi dan kualitas sel telur**

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

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

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

Angka fertilisasi yang ditunjukkan dengan *cleavage rate* (angka pembelahan sel dari satu ke dua sel) dalam penelitian ini adalah 52.54%. Hasil ini sedikit lebih baik dari Hendri (1997) yang melaporkan angka *cleavage* rata-rata 40.36% dan dibawah hasil yang dicatat dari studi yang dilakukan oleh Avery et al. (2000) yang mencatat *cleavage rate* mencapai 75% atau bahkan diatas 85%.

### **Fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio**

Fertilisasi dilakukan dengan menggunakan semen pejantan yang telah diketahui fertilitasnya. Dari seluruh sel telur yang matang, ternyata beberapa diantaranya sanggup menghasilkan "cleavage" embrio, yakni pembelahan sel zigot menjadi embrio 2 sel. Dari 24 sel telur yang matang, 10 diantaranya (42%) mengalami "cleavage" dan hanya 2 embrio yang sanggup berkembang mencapai tahap 8 sel. Perkembangan selanjutnya untuk mencapai tahap morula dan bahkan blastosis masih memerlukan upaya-upaya penyempurnaan.

Angka "cleavage", perkembangan sel-sel embrio mencapai tahap blastosis sangat bervariasi tergantung umur, macam medium yang digunakan dan prosedur yang pelaksanaan di laboratorium. Earl *et al.* (1994) telah melaporkan keberhasilan mencapai *cleavage* dan blastosis, masing-masing 79-85% dan 16-20%. Hal ini berkebalikan dengan laporan Kajihara *et al.* (1991) dan Palma *et al.* (1993) yang menyatakan bahwa kompetensi sel telur untuk mencapai blastosis relatif sangat rendah.

### **Perkembangan embrio**

Perkembangan embrio yang diamati dari penelitian ini adalah pembentukan embrio dari 8, sampai 16 sel, morula dan blastosis. Angka keberhasilan mencapai tahap perkembangan embrio tersebut dapat diamati pada Tabel 11.

Dari Tabel 11 di atas dapat dilihat bahwa kemampuan produksi oosit sampai pada tahap blastosis relatif masih sangat rendah apabila dibandingkan dengan hasil yang dicapai oleh Avery *et al.* (2000) yang mencatat angka blastosis diatas 30%. Namun demikian angka tersebut masih lebih baik dari Hendri (1997) yang mencatat angka morula sebesar 12.92% dan tanpa blastosis dapat dihasilkan. Kelemahan yang dihadapi dengan sistem yang ada saat ini diduga berkaitan dengan kualitas oosit yang relatif rendah diakibatkan oleh rendahnya kualitas hewan yang digunakan.

Tabel 11. Perkembangan sel telur (oosit) dan embrio sampai tahap blastosis

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

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

Faktor lainnya yang diduga dapat dianggap sebagai penyebab rendahnya angka pembentukan blastosis adalah sistem kultur yang relatif kurang memadai. Salah satu faktor yang sangat penting untuk diperhatikan adalah kualitas air terutama yang bebas dari cemaran endotoksin. Demikian pula kontaminasi udara lingkungan (inkubator dan laboratorium) dari bakteri dapat pula menurunkan angka keberhasilan pembentukan blastosis. Angka cleavage yang relatif masih rendah dapat pula diduga berkaitan dengan mutu semen yang digunakan dalam penelitian ini. Rendahnya motilitas dan kerusakan membran akrosom dapat pula menyebabkan rendahnya fertilisasi yang dicerminkan oleh rendahnya angka pembelahan (*cleavage*).

### Viabilitas embrio pasca pembekuan

Embrio yang dihasilkan melalui program IVF harus dapat dan mampu menghadapi cekaman akibat pembekuan. Tabel 12 menunjukkan kemampuan tumbuh dan berkembangnya morula dan blastosis yang dihasilkan pada eksperimen ini setelah mengalami pembekuan dan "thawing". Lebih dari 70% morula yang dibekukan mampu berkembang menjadi blastosis dan *expanded blastocyst*. Dan hanya 20% yang mengalami degenerasi, sedangkan sekitar 10% menunjukkan stagnasi perkembangan pada stadium yang sama. Perlu kajian lebih mendalam apakah morula yang ada telah pula mengalami kematian sel atau menuju degerasi.

Tabel 12. Perkembangan embrio pada kultur pasca pembekuan

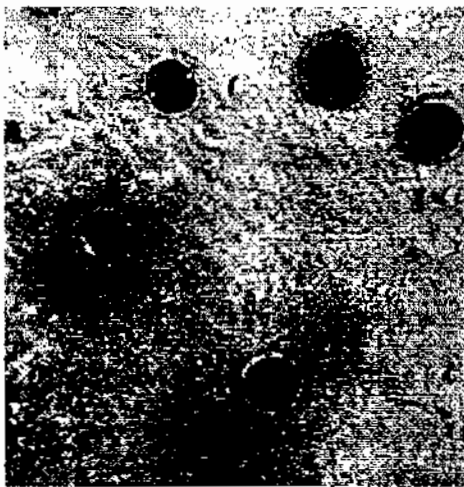
Stadium perkembangan saat pembekuan	Stadium perkembangan setelah kultur pasca pembekuan			
	M	BL	XBL	DEG
Morula (M)	2 (10%)	11 (55%)	3 (15%)	4 (20%)
Blastosis (BL)	-	2 (18%)	8 (73%)	1 (9%)

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

### Analisis struktur ultra sel telur dan embrio

Analisis struktur ultra guna melihat perkembangan dan hambatan yang dihadapi oleh sel telur dan embrio dalam upayanya tumbuh dan berkembang merupakan unsur penting yang dikerjakan dalam penelitian ini. Pengerjaan preparat dan analisis menggunakan mikroskop elektron transmisi, akan dikerjakan di Jurusan Anatomi dan Fisiologi, Royal Veterinary and Agricultural

University (RVAU), Kopenhagen Denmark. Para peneliti akan mengoleksi sel telur dan embrio sebagaimana protokol yang dijelaskan secara garis besar di depan dan sebagaimana secara rinci dijelaskan pada Lampiran. Kesepakatan dengan pihak RVAU Denmark memungkinkan sampel baik berasal dari sel telur anak sapi dan sapi dewasa dapat dikerjakan pada bulan Februari 2002. Gambaran dari analisis struktur ultra diharapkan dapat menjelaskan kondisi sel telur anak sapi secara ultra mikro pada taraf seluler dan molekuler, guna menjawab rendahnya angka pembentukan embrio dari sel telur yang berasal dari anak sapi.



(A)



(B)

Gambar 4. Proses penyatuan sel telur dengan spermatozoa pada medium fertilisasi. Sel-sel kumulus sudah mulai menunjukkan kerontokan (A) dan embrio yang telah mengalami pembelahan (*leavage*) dan akan membelah menjadi 4 sel.

Angka "*cleavage*", perkembangan sel-sel embrio mencapai tahap blastosis sangat bervariasi tergantung umur, macam medium yang digunakan dan prosedur yang pelaksanaan di laboratorium. Earl *et al.* (1994) telah melaporkan keberhasilan mencapai *cleavage* dan blastosis, masing-masing 79-85% dan 16-20%. Hal ini berkebalikan dengan laporan Kajihara *et al.* (1991) dan Palma *et al.* (1993) yang menyatakan bahwa kompetensi sel telur untuk mencapai blastosis relatif sangat rendah.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Stimulasi dengan menggunakan satu macam hormon gonadotropin (eCG maupun FSH) menunjukkan respons yang kurang menentu. Meskipun demikian pemberian eCG 1500 IU telah mampu menstimulasi pertumbuhan folikel anak sapi menjelang pubertas.
2. Untuk meningkatkan konsistensi respons terhadap stimulasi hormonal, dapat dicobakan kombinasi eCG, FSH dan progesteron implan.
3. Pembedahan pada *linea alba* dan legok lapar untuk panen sel telur dapat dilakukan tanpa menimbulkan masalah pasca operatif.
4. Anak sapi dengan umur mendekati pubertas cenderung memiliki respons stimulasi lebih baik dibandingkan dengan anak-anak sapi yang masih tergolong sangat muda.
5. Sel telur hasil anak sapi masih menghadapi kendala hambatan kompetensi pertumbuhan dan rendahnya kualitas. Hal ini diduga berkaitan dengan kondisi hewan pada awal perkembangannya.
6. Produksi embrio dengan sumber sel telur sapi dewasa dapat berjalan pada kondisi laboratorium yang terbatas, meskipun masih relatif rendah dibandingkan dengan yang dicapai di negara maju.
7. Dengan berbagai upaya perbaikan sistem kultur angka keberhasilan berupa produksi embrio yang layak transfer dapat dicapai.
8. Embrio hasil PEIV dapat dibekukan dengan kemampuan berkembang pasca pembekuan yang relatif tinggi.

### Saran

1. Panen sel telur anak sapi diharapkan dapat mulai diarahkan pada teknik-teknik pemanenan yang lebih praktis, bersifat non invasif dan dapat dengan cepat diulang.

2. Teknik produksi embrio dengan tatacara yang sedang dikembangkan ini dapat di terapkan pula pada anak hewan (juvenil) jenis satwa lainnya, terutama pada satwa yang terancam punah.
3. erlu improvisasi penggunaan alat kultur yang lebih murah dan sederhana agar hasil yang dicapai relatif memadai meskipun dikerjakan pada laboratorium yang serba terbatas.
4. Guna mengetahui kondisi seluler dan molekuler pada tingkat oosit dan embrio tahap perkembangan dini perlu analisis struktur ultra.

### DAFTAR PUSTAKA

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



- Earl, C. R., Armstrong, D. T., and Irvine, B. J. 1994b. Juvenile in vitro fertilization-embryo transfer (JIVET): the in vitro production of viable embryos from oocytes obtain from gonadotropin-stimulated juvenile calves and Lambs. Proc. Aust. Assoc. Anim. Artif. Breeders. 7:25-27.
- Earl, C. R., Irvine, B. J., Kelly, J. M., Rowe, J. P., and Armstrong, D. T. 1995. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. Theriogenology. 43: 203.
- Galli, C., and G. Lazzari. 1996. Practical Aspects of IVM/IVF in cattle. Animal Reproduction Science. 42: 371-379.
- Garcia, M. 1988. An abattoir survey of reproductive organ abnormalities from female zebu cattle. ACTA Vet. Scandinavian (Suppl. 83). 34-45.
- Garcia-Bojalil, C. M., C. R. Staples., J. D. Savio., M. Drost., and W. W. Tatcher. 1991. Effect of dietary protein on follicle growth and embryo development of superovulated non-lactating Holstein cows. J. Dairy Sci. 74 (suppl. 1) : 95.
- Gardner, D.K., Lane, M, and Batt, P.A. 1994. 1994. Nutrient uptake and enzyme activity of the preattachment goat embryo developed in vivo. Theriogenology 41: 204.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. Wallingford. 640 p.
- Greve, T. and B. Purwantara. 1992. Ultrasonography in embryo transfer practice. A Review. Proceeding 8<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France.
- Greve, T. and B. Purwantara. 1993. Ultrasonography in embryo transfer practice.. A Review. Proceeding 9<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France. 137-147.
- Hendri. 1997. Efektifitas penambahan berbagai jenis dan konsentrasi serum serta kokultur sel-sel epitel tuba fallopii dan kumulus pada TCM-199 dalam produksi embrio sapi *in vitro*. Disertasi. Program Pascasarjana Institut pertanian Bogor. Bogor. 140 p.
- Kajihara, Y., Blakewood, E. G., Myers, M. W., Kometani, N., Goto, K., and Godke, R. A. 1991. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. Theriogenology. 35: 220.

- Kotaras, P. J., Earl, C. R., Kelly, J. M., Rowe, J. P., de Barro, T. M., and Armstrong. 1995. Pregnancies from in vitro matured and fertilised prepubertal calf oocytes. *Serono Int. Symp. on Superovulation and Oocyte Maturation*. p. 30.
- Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser., and N. L. First. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*. 23 : 753-759.
- Lewis, I., Owens, J., and Prime, P. 1995. The commercial production of offspring from two to five months old heifers and the effects on later fertility. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 27: 29.
- Lohuis, M. M. 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programmes. *Theriogenology*. 43: 51-60.
- Looney, C. R., Damiani, P., Lindsey, B. R., Long, C. R., Gonseth, C. L., Johnson, D. L., and Doby R, T. 1995. Use of prepubertal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotropin treatment. *Theriogenology*. 43 : 269 (abstract).
- Loos de, F.A.M., van Vliet , C, van Maurick, P and Kruij, T.A.M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamet Research* 24: 197-204.
- Mermillod, P., C. Boccart., C. Wils., A. massip., and F. Dessy. 1992. Effect of oviduct-condition medium and of cumulus cells on bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology*. 37 : 256.
- Moreno, J. F., C. J. Turczynski., G. Flores-Foxworth., and D. C. Craemer. 1992. Influence of parity of donor and presence of a CL on quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Biol. Reprod.* 46 (suppl. 1). 65 (Abs. 60).
- Nicholas, F. W., and Smith, C. 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36: 341-353.
- Nicholas, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. 1996. *Animal Reproduction Science*. 42: 205-214.
- Onuma, H., and Foote, R. H. 1969. In vitro development of ova from pubertal cattle. *J. Dairy Sci.* 52: 1085-1087.
- Palma, G. A., Clement-Sengevald ., and Krefft, H. 1993. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. *Theriogenology*. 39: 278.

- Palma, G. A. 1994. Effects of FSH and Estradiol-17 $\beta$  for maturation of calf oocytes on the in vitro development to blastocyst. *Theriogenology*. 41: 267.
- Pieterse, M.C. 1990. Clinical use of ultrasound in bovine reproduction. Thesis. Rijksuniversiteit Utrecht. The Netherlands. 171 pp.
- Presicce, G. A., Jiang, S., Simkin, M., Zhang, L., Looney, C.R., Godke, R. A., and Yang, X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biology of Reproduction*. 56 : 386 - 392.
- Purwantara, B. and T. Greve. 1991. Dynamics of ovarian follicular population prior to and during superovulation in heifers. *ARTA Vol II*, 130.
- Purwantara, B. and T. Greve. 1991. Effect of intra ovarian status on the superovulatory response in heifers, *ARTA Vo. II*, 162.
- Purwantara, B., M. Schmidt, T. Greve. 1991. Intra ovarian changes and embryo recovery rate in two different superovulation regiment in cattle. *Proceeding 7<sup>th</sup> Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Cambridge, UK.*
- Purwantara, B., R.J. Assey, M. Schmidt, P. Hyttel, T. Greve. 1992. Dynamics of the first follicular wave in cattle following cloprestenol induced luteolysis. *Proceeding 12<sup>th</sup>. International Congress on Animal Reproduction (ICAR), The Hague, The Netherlands.*
- Purwantara, B. M. Schmidt, T. Greve and H. Callesen. 1993. Follicular Dynamics Prior to and During Superovulation in Heifers. *Theriogenology* 40:913-921,.
- Purwantara B. M. Schmidt, H. Callesen, T. Greve. 1994. Follicular development and embryo Recovery following 3 versus 8 FSH injections in Heifers *ACTA Vet Scand*, 33, 89-92.
- Purwantara, B. . 1995. Ultrasonography of Donor and Recipient in Bovine Embryo Transfer program. *Proc. Symp on Biotech of Animal Reprod, Bogor, Indonesia.*
- Purwantara B, H. Callesen, T. Greve. 1995. Characterization of Ovulation on Superovulated Cattle. *Anim Reprod. Sci.*
- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf dan M. Agil. 1999. Produksi, Kriopreservasi, dan Penentuan Jenis kelamin Embrio Hasil Fertilisasi in vitro menggunakan sumber sel telur anak sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/1.

- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf dan Amrozi. 2000. Produksi, Kriopreservasi, dan Penentuan Jenis kelamin Embrio Hasil Fertilisasi *in vitro* menggunakan sumber sel telur anak sapi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/2.
- Purwantara, B, I. Supriatna, T. L. Yusuf , M. Agil and Amrozi. 2000. Effect of age and hormone administration on ovarian stimulatory response in bovine juvenile. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden 2-6 July, 2000.
- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Benard, J. P. and Heyman. 1995. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilised oocytes from calves compared to that of cows. *J. Reprod. Fertil.* 103 : 115-120.
- Seidel, G. E., Larson, C. H., Spilman, C. H. Hahn, J., and Foote, R. H. 1971. Culture and transfer of calf ova. *J. Dairy Sci.* 54: 923-926.
- Supriatna, I., T.L. Yusuf, B. Purwantara, D. G. Moekti, L.P. Hernomoadi. A study on the purification of anti-PMSG and its neutralization dose against PMSG on superovulation in dairy cattle. *Proceeding 13th International Congress on Animal Reproduction. Vol 3. P19-27 (1996).*
- Tervit, R. , Mc Millan, W., Mc Gowan, L., Smith, J., Voges, H., Lynch, P., Larsen, J., and Hall, D. 1995. Follicle development, superovulation and *in vitro* embryo production from calves. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 27:1
- Tervit. H. R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science.* 42: 227-238.
- Thompson, J. G. 1997. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 341-354
- Vajta G, P. Holm, T. Greve, H. Callesen. 1997. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture. A technique report. *Theriogenology.* 48 : 1379-1385.