

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING VIII PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 1998/1999**

A. JUDUL

PROOUKSI, 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 Muda/IIC |
| 4. NIP | : 131404216 |
| 5. Bidang Keahlian | : Fisiologi dan Bioteknologi Reproduksi |
| 6. Fakultas/Jurusan | : Fakultas Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan |
| 7. Perguruan Tinggi | : Institut Pertanian Bogor |

C. TIM PENELITI

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Institusi
Bambang Purwantara	Fisiologi dan Bioteknologi Reproduksi	Kedokteran Hewan	IPB
Iman Supriatna	Fisiologi Reproduksi dan Kriopreservasi	Kedokteran Hewan	IPB
Tuty L. Yusuf	Manipulasi Embrio dan IB	Kedokteran Hewan	IPB
Muhammad Agil	Endokrinologi	Kedokteran Hewan	IPB

B. PENDANAN DAN JANGKA WAKTU PENELITIAN :

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



Peneliti Utama

Dr. Bambang Purwantara, MSc
NIP. 131 404 216

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Institut Pertanian Bogor

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

Judul Penelitian :

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

Sub Judul Penelitian Tahun I :

**STIMULASI PERKEMBANGAN FOLIKEL OVARIUM DAN TEKNIK ASPIRASI
SERTA PEMATANGAN SEL TELUR ANAK SAPI *IN VITRO***

(Barnbang Purwantara, Iman Supriatna, Tuty L. Yusuf, Muhammad Agil, 1999,
xiii + 33 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/1/V/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 memanfatkan 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. Penelitian tahun pertama ini pada dasarnya terdiri atas: (1) metode koleksi sel telur, (2) seleksi donor, (3) tatacara stimulasi pertumbuhan folikel, (dan 4) metode pematangan oosit, fertilisasi dan kultur embrio.

Sepuluh ekor anak sapi berumur 5-9 bulan digunakan dalam penelitian ini. Setelah menjalani masa penyesuaian selama 2-3 bulan, hewan dibagi atas 3 kelompok. Masing-masing kelompok memperoleh penyuntikan 1000, 1500 IU eCG dan 16-16 mg FSH. eCG disuntikkan secara tunggal 4 hari sebelum koleksi atau panen sel telur, sedangkan FSH disuntikkan 2 kali sehari selama 3 hari berturut-turut. Dua belas jam setelah penyuntikan FSH yang terakhir, sel telur dikoleksi melalui teknik pembedahan. Pengamatan dilakukan secara seksama terhadap munculnya tanda-tanda berahi.

Sel telur dikoleksi dengan teknik laparotomi pada dua daerah pembedahan yakni pada daerah median perut sepanjang linea alba diantara tali pusar dan ambing; dan pada legok lapar, diantara rusuk terakhir dan tulang panggul. Kedua metode tersebut diperbandingkan dan dievaluasi terhadap kemungkinan adanya hambatan, kesulitan maupun kemudahan pada sebelum, saat dan sesudah operasi.

Sel telur dikultur pada medium TCM199 yang disuplementasi dengan fetal calf serum (FCS) untuk melihat kemampuan pematangannya. Setelah 22 jam diinkubasikan dalam medium pematangan (5% CO₂, kelembaban maksimal dan suhu 38.5°C) sel telur diinseminasi dengan semen beku bibit unggul yang telah diketahui fertilitasnya. Zigot kemudian dikultur dalam medium CR1aa untuk memberi kesempatan kepada embrio untuk tumbuh dan berkembang.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa penyuntikan 1500 IU eCG dianggap cukup untuk perkembangan folikel, terutama jika disuntukkan pada anak sapi yang telah relatif cukup umur (sekitar 8-9 bulan). Namun demikian, derajat respons yang ditimbulkan dari stimulasi secara menyeluruh tidak setinggi apa yang dilaporkan oleh para peneliti lainnya. Di antara sebelas hewan yang menunjukkan indikasi berahi, tanda-tanda yang jelas dan nyata hanya

berlangsung pada 3 ekor, sedangkan 4 ekor lainnya menunjukkan gejala berahi ringan, dan bahkan 4 ekor sisanya tidak menunjukkan gejala berahi sama sekali.

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. Namun demikian, teknik pembedahan pada legok lapar, dalam beberapa hal mampu memberikan hasil yang baik karena relatif tidak terganggu oleh adanya usus halus. 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 tatacara dan desain stimulasi hormonal yang nampaknya perlu mengkombinasikan eCG atau FSH dengan hormon lainnya (misalnya: progesteron implan). Stimulasi dapat dilakukan pula dengan memberikan "priming" eCG atau GnRH yang diikuti dengan dosis utuh FSH.

Sebagai kesimpulan, dari penelitian ini telah dihasilkan sejumlah data dan deskripsi tatacara pemanenan sel telur yang diharapkan dapat memberikan sumbangsih berharga 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

Research Sub Topic of Year I:

STIMULATION OF FOLLICULAR DEVELOPMENT, ASPIRATION TECHNIQUES AND *IN VITRO* OOCYTE MATURATION IN BOVINE PREPUBERTAL CALVES

(Bambang Purwantara, Iman Supriatna, Tuty Laswardi Yusuf, Muhammad Agil, 1999, xi + 35 pages)

(Lectures 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/1/V/1998, May 20, 1998)

SUMMARY

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)

oocyte-collection methods, (2) donor selection, (3) ovarian stimulation protocols, (4) in vitro methods for oocyte maturation fertilization and embryo culture. Those valuable information needs to be verified and discussed in order to optimize condition for *in vitro* embryo production in prepubertal cattle.

Ten prepubertal calves at 5-9 months of age, were subjected for the experiment. Following preconditioning periods of 2-3 months, the animal were divided into 3 groups. Each group of the animals received ovarian stimulatory treatments by administration of 1000, 1500 IU of eCG and 16-17 mg of FSH. eCG was injected once 4 days prior to oocyte collection, while FSH was injected twice daily for 3 days. Twelve hours following the last FSH injection, the oocyte were collected surgically. Intensive observations were done following the injections in order to define whether the animal exhibit estrous signs.

Oocytes were collected by laparotomy techniques in two areas, i.e. median of the abdomen along white line (linea alba) between umbilicus and mammary gland, and at flank vertically in the middle area between the last ribs and coxae. Those two surgical methods was compared and evaluated for better performance, handicaps, constraints prior to, while and after operation session.

The oocytes were cultured in TCM199 supplemented with fetal calf serum (FCS) for determination of maturation. Following 22 hours incubation periods (5% CO₂, 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 a single injection of 1500 IU eCG was sufficient for follicle development, especially when injected to an old calves (approx. 8-9 month). However, the degree of responses is not as good as other researcher did. Among eleven calves attempted to injections great response was only done in three animals, while four others exhibit only slight indication of estrus and the rest (4 animals) did not perform any sign of estrus.

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. However, in some instance, flank system performed a better manipulation with no or little problem with small intestine. From all animal subjected to surgery , no one has a problem on the whole session of operation i.e. anaesthesia, surgical session, post operative maintainance and treatment.

If compare to other findings, the quality of oocytes and maturation rate were relatively poor. This may be related to stimulation regimen which are necessarily combine with other hormone (progesterone implant) or combining a priming dose of eCG and FSH.

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 dan 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 (eCG dan FSH) terhadap daya tanggap ovarium anak sapi untuk menghasilkan folikel. Teknik panen sel telur melalui pembedahan (laparotomi) pada daerah legok lapar dan *linea alba* telah pula berhasil diidentifikasi kelebihan dan kekurangannya.

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

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

Bogor, 7 Januari

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
PENDAHULUAN	1
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
Tujuan Penelitian	3
Manfaat Penelitian	3
STUDI PUSTAKA	4
Produksi embrio secara <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i>	4
Pemanfaatan sel telur anak sapi untuk produksi embrio <i>in vitro</i> ..	5
Stimulasi pertumbuhan folikel anak sapi	7
Panen sel telur anak sapi	8
Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio <i>in vitro</i>	9
MATERI DAN METODE PENELITIAN	10
Materi Penelitian	10
Bahan dan Peralatan	10
Metode Penelitian	10
<i>Seleksi dan penyiapan anak sapi donor</i>	10
<i>Stimulasi pertumbuhan folikel</i>	11
<i>Identifikasi respons terhadap stimulasi</i>	11
<i>Panen dan koleksi sel telur</i>	11
<i>Penentuan kualitas sel telur</i>	13
<i>Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio</i>	14
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Respons klinis terhadap stimulasi gonadotropin	16
Panen sel telur	17
<i>Teknik panen sel telur melalui bedah pada legok lapar (flank)</i> ..	18
<i>Teknik panen sel telur melalui bedah pada daerah linea alba</i> ..	19
Hasil stimulasi dan respons ovarium terhadap gonadotropin	20

Teknik aspirasi folikel	20
Evaluasi kualitas dan pematangan sel telur <i>in vitro</i>	22
Fertilisasi <i>in vitro</i>	24
KESIMPULAN DAN SARAN	26
RENCANA PENELITIAN TAHUN KE II (1999/2000)	27
DAFTAR PUSTAKA	30

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Kualitas sel telur sesuai dengan parameter morfologis	13
2.	Respons berahi hasil stimulasi eCG dan FSH pada anak sapi FH berumur 5-9 bulan.	16
3.	Hasil stimulasi hormonal terhadap perkembangan folikel anak sapi	20
4.	Kualitas dan pematangan sel telur secara <i>in vitro</i>	24

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Letak dan proses pembedahan daerah legok lapar dalam rangka panen sel telur anak sapi. (A) letak sayatan, (B) manipulasi ovarium menuju permukaan sayatan.	18
2.	Respons ovarium terhadap stimulasi eCG (A) dan teknik aspitasi dengan sistem " <i>continuous puncture</i> " (B).	21
3.	Sel telur yang dihasilkan dari aspirasi setelah distimulasi dengan eCG, (1) Kualitas A, (2) Kualitas B, (3) Kualitas C dan (4) Kualitas D.	22
4.	Proses penyatuan sel telur dengan spermatozoa pada medium fertilisasi. Sel-sel kumulus sudah mulai menunjukkan kerontokan.	24

PENDAHULUAN

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

Program MOET yang telah dirintis di berbagai negara maju telah mulai menunjukkan hasilnya sebagai salah satu alternatif bagi sistem pemuliaan

konvensional (uji progeni) yang hanya melibatkan pejantan melalui program IB. Melalui sistem *nucleus herd*, interval generasi dalam sistem pemuliaan ternak dapat diperpendek. Hal tersebut didukung dan diperkuat dengan munculnya peluang-peluang baru bagi pemanfaatan atau eksplorasi hewan muda/anak (juvenile) 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* embryo transfer"/JIVET) merupakan pendekatan baru dalam menunjang bioteknologi reproduksi. Dengan teknik tersebut eksplorasi bibit unggul dapat dilakukan secara lebih dini (tanpa menunggu hewan mencapai dewasa) dan lebih berjangka panjang (Lohuis, 1995).

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

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah: (1) penyempurnaan teknik stimulasi hormon dan koleksi sel telur anak sapi serta produksi embrio *in vitro* (2) identifikasi faktor-faktor penghambat perkembangan sel telur anak sapi dan pertumbuhan embrionya, 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.

Pada tahun pertama, tujuan dari penelitian ini adalah untuk: (1) mencari dan menetapkan teknik stimulasi pertumbuhan folikel ovarium anak sapi dengan penyuntikan hormon gonadotropin (eCG dan FSH), (2) mengembangkan teknik panen sel telur anak sapi dengan metode laparotomi dan laparoskopi, dan (3) pematangan sel telur anak sapi, fertilisasi dan kultur embrio *in vitro*.

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, dan (3) dapat memberikan kemungkinan referensi bagi pengembangan bioteknologi reproduksi pada 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).

Callesen *et al.* (1996) melaporkan bahwa program yang kini dikenal sebagai *multiple ovulation and embryo transfer* (MOET) telah diterapkan secara sistematis pada kelompok sapi betina elit sekurang-kurangnya di enam negara Eropa dan Amerika, melalui konsep "*nucleus herd*". Pemerintah Indonesia telah 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 dicari alternatifnya.

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

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

laparoskop 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 (Brogliali 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 respons 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 diterap-

kan 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 pegaruh 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 dengan teknik laparoskopi, laparotomi, maupun aspirasi dengan alat bantu ultrasonografi (Brogliatti dan Adams, 1997). Koleksi *in vitro* dengan teknik aspirasi folikel yang dilanjutkan dengan pencacahan kortex ovarium merupakan teknik yang efisien pada anak sapi yang telah dipotong (Armstrong *et al.*, 1997). Dengan stimulasi menggunakan FSH, aspirasi dengan mengangkat ovarium terlebih dulu (ovariektomi) menghasilkan sel telur lebih banyak dari pada aspirasi *in situ* (Armstrong *et al.*, 1997).

Sel telur dapat dikoleksi *in vivo* dari anak sapi dengan menggunakan metode laparotomi maupun laparoskopi. Teknik laparoskopi sesuai untuk aspirasi dengan jumlah folikel yang sedikit, disamping relatif kurang invasif (mengganggu, sebagaimana pembedahan) dan dapat diulang dalam waktu singkat (Armstrong *et al.*, 1997). Namun demikian, untuk ovarium dengan respons yang melimpah setelah stimulasi dengan gonadotropin, laparotomi dengan anastesi umum merupakan pilihan terbaik. Dengan penanganan yang baik, cara ini relatif aman, tanpa atau kurang menimbulkan kerusakan sekurang-kurangnya setelah tiga kali aspirasi dengan laparoskopi (Armstrong *et al.*, 1992) dan laparotomi (Earl dalam Armstrong *et al.*, 1997).

Penggunaan aspirasi transvagina dengan bantuan ultrasonografi dilaporkan kurang efektif untuk anak sapi berumur kurang dari enam bulan. Hal tersebut berkaitan dengan ukuran transduser transvagina yang masih terlalu besar dan ukuran tubuh yang masih terlalu kecil untuk penanganan manipu-lasi letak ovarium secara palpasi perekta (Armstrong et al., 1987).

Pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio *in vitro*

Produksi embrio *in vitro* (PIEV) dapat dibagi atas empat tahap yakni (1) pematangan sel telur *in vitro*, (2) pengolahan dan kapasitasi spermatozoa, (3) pembuahan *in vitro* dan (4) kultur embrio *in vitro* (Armstrong et al., 1997). Berbagai ragam prosedur dan jenis bahan yang digunakan untuk masing-masing tahap telah ikut memperkaya khasanah teknik PIEV. Akhir-akhir ini penyempurnaan sistem medium dasar kimia murni (*chemically defined medium*) atau semi murni (*semi-chemically defined medium*) telah mampu mengungguli sistem medium dengan kokultur sel-sel somatis (Gardner et al., 1994; Thompson, 1996).

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Hewan Percobaan

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.

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-Streptromisin; medium fertilisasi: Medium Brackett-Oliphant (BO), kafein, BSA, Medium perkembang-an 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 CO₂, laminar cabinet, mikroskop diseksi, cawan-cawan petri, sputit dll,

Metode Penelitian

Seleksi dan penyiapan anak sapi donor

Sebelum dimulainya pelaksanaan percobaan, masing-masing hewan menjalani periode persiapan selama kurang lebih 2-3 bulan. Hewan percoba-an 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

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.

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/sekreasi 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

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 Caeser 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 anastetikum 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 tinctur 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).

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 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 beraspesial 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 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 toples (flask) yang dapat mengatur kelembaban maksimal (95%) dan kandungan 5% CO₂ di dalam inkubator dengan suhu 38.5°C. 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.

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 pengencemnya 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 12.5×10^6 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% CO₂ 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% CO₂. Perkembangan embrio diamati pada 48 jam setelah dimulainya kultur untuk melihat adanya pembelahan (*cleavage*) sebagai indikasi terjadinya pembuahan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respons klinis terhadap stimulasi gonadotropin

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, ketidak tenangan/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.

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 ter dorong ke bagian kanan. Pada bagian kiri rongga perut merupakan wilayah lambung yang oleh karena hewan dipuaskan tidak akan mengganggu proses pembedahan dan manipulasi organ. Gambar 1 menunjukkan lokasi pembedahan pada dinding legok lapar sebelah kiri dan visualisasi sebagian proses pembedahan di legok lapar.



Gambar 1. Letak dan proses pembedahan daerah legok lapar dalam rangka panen sel telur anak sapi. (A) letak sayatan, (B) manipulasi ovarium menuju permukaan sayatan.

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

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. Gambar 1 menunjukkan lokasi pembedahan pada dinding legok lapar sebelah kiri dan visualisasi sebagian proses pembedahan di legok lapar.



Gambar 1. Letak dan proses pembedahan daerah legok lapar dalam rangka panen sel telur anak sapi. (A) letak sayatan, (B) manipulasi ovarium menuju permukaan sayatan.

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 fantai 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.

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 pembebedahannya 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 3.

Tabel 3. 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

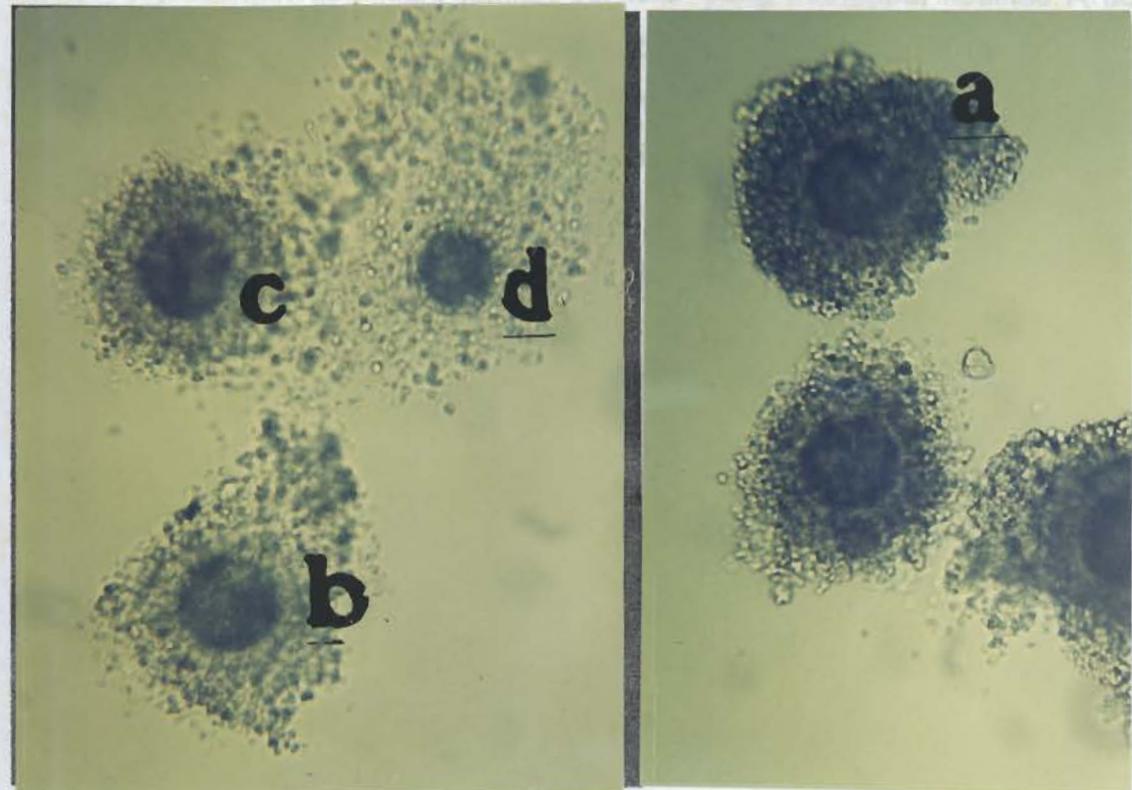
Jumlah folikel yang dihasilkan bervariasi dengan jumlah tertinggi adalah 63 folikel dan yang terendah 7 folikel dengan rata-rata 36.7 folikel per ekor. Hal ini sesuai dengan Tervit *et al.* (1995), Presicce *et al.* (1997) yang masing-masing melaporkan tingkat populasi folikel ukuran 3-8 mm pasca stimulasi sebanyak 40-50 dan 30-35 folikel per ekor anak sapi umur 3-5 bulan. Gambar 2 (A) menunjukkan ovarium yang mengalami stimulasi maksimal pada sapi No. 01.

Teknik aspirasi folikel

Penyedotan atau aspirasi folikel pada hewan hidup (*in vivo*) amat berbeda dibandingkan dengan aspirasi ovarium yang berasal dari rumah

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. (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).



Gambar 3. Sel telur yang dihasilkan dari aspirasi setelah stimulasi dengan eCG, (1) Kualitas A, (2) Kualitas B, (3) Kualitas C dan (4) 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 ooplasnya 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 4 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.

Tabel 4. Kualitas dan pematangan sel telur secara *in vitro*

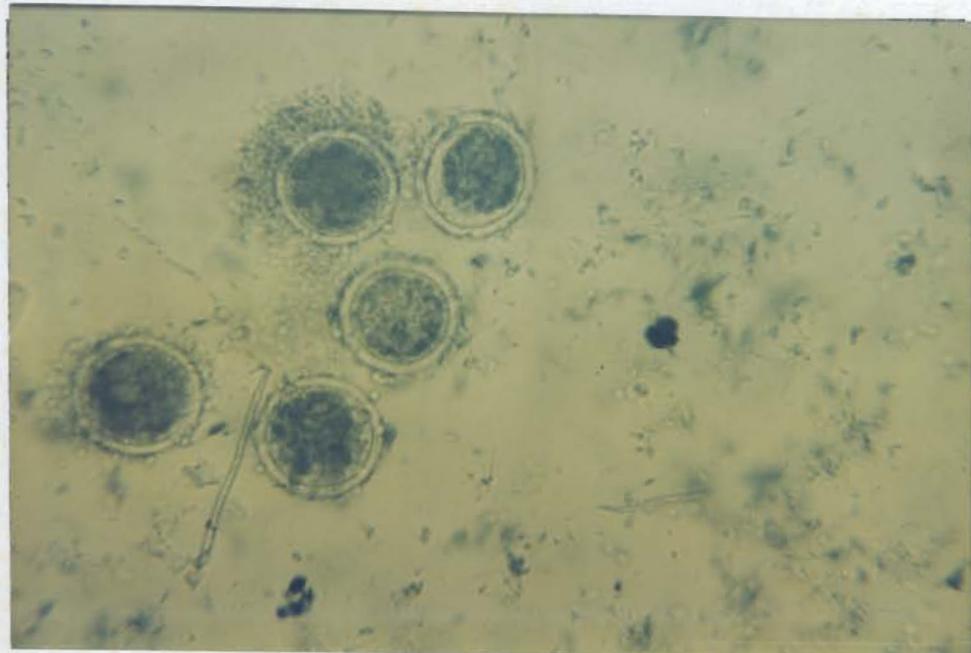
No. sapi	Kualitas sel telur				Juml. sel telur	Sel telur layak	Sel telur matang	% sel telur matang
	A	B	C	D				
01	4	2	3	5	14	6	4	67%
02	3	2	3	4	12	5	3	60%
04	0	1	1	1	3	1	0	0%
05	4	4	1	5	13	8	6	75%
Total	10	9	8	15	42	20	13	65%

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. 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.



Gambar 4. Proses penyatuhan sel telur dengan spermatozoa pada medium fertilisasi. Sel-sel kumulus sudah mulai menunjukkan kerontokan.

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.

Saran

1. Perlu diupayakan penyempurnaan desain stimulasi dengan melibatkan kombinasi hormon secara ganda (eCG, FSH, GnRH dan progesteron).
2. Panen sel telur anak sapi diharapkan dapat mulai diarahkan pada teknik-teknik pemanenan yang lebih praktis, bersifat non invasif dan dapat dengan cepat diulang.
3. Teknik produksi embrio dengan tatacara yang sedang dikembangkan ini dapat di terapkan pula pada anak hewan (juvenile) jenis satwa lainnya, terutama pada satwa yang terancam punah.

RENCANA PENELITIAN TAHUN KE II (1999/2000)

TUJUAN KHUSUS

Pada penelitian tahun kedua beberapa aspek penting akan dikerjakan mencakup: (1) penyempurnaan teknik stimulasi hormonal dengan menggunakan kombinasi jenis hormon (eCG, FSH dan progesteron) serta variasi waktu pemberian, (2) studi penggunaan teknik non invasif dengan teknik ultrasonografi dan "less invasive" dengan teknik laparoskopi, (3) peningkatan kompetensi medium pematangan, fertilisasi dan kultur, (4) mengetahui status seluler dari sel telur anak sapi yang menjadi penyebab rendahnya kemampuan berkembang, dan (5) jika diperoleh embrio tahap blastosis akan dibekukan dengan teknik kriopreservasi vitrifikasi dan "multisteps".

Rencana tersebut dimungkinkan akan dapat dicapai dan dibantu dengan adanya komitmen kerjasama dengan Utrecht University Belanda yang akan membantu sebagian peralatan yang belum dimiliki oleh laboratorium tempat penelitian ini dilaksanakan. Kesediaan kerjasama dengan Royal Veterinary and Agricultural University Kopenhagen Denmark juga telah diperoleh untuk studi ultrastruktur sel telur dan zigot.

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini akan digunakan 10 ekor anak sapi dengan umur dibawah 6 bulan dan 6-9 bulan, masing-masing 5 ekor. Hewan akan menjalani program stimulasi hormonal secara reguler melibatkan gonadotropin (eCG dan FSH) dan progesteron (Synchromate B® atau CIDR®) dengan protokol terbaru yang disesuaikan dengan hasil workshop tentang juvenile IVF pada IETS Meeting 15 Janauari 1999.

Hewan tersebut akan menjalani teknik panen non invasif dengan ultrasonografi atau minimal ("less invasive") dengan laparoskopi. Pada kondisi tertentu hewan dapat juga dihadapkan dengan teknik invasif (bedah). Disamping untuk digunakan dalam pematangan, beberapa sel telur akan digunakan dalam penyiapan struktur ultramikroskopis. Pematangan oosit akan dikombinasi dengan suplementasi hormon (FSH dan LH), variasi serum yang digunakan dan penambahan growth factors.

Tahapan Rancangan Penelitian Tahun II

Tahun	Aktivitas penelitian	Hasil yang ingin dicapai
Tahun II 1999/ 2000	<p>Penyempurnaan desain/ protokol stimulasi hormonal.</p> <p>Teknik pemanenan sel telur yang lain (USG dan laparoskopii)</p> <p>Penyempurnaan pematangan sel telur, fertilisasi dan kultur embrio</p>	<p>Hasil stimulasi yang lebih konsisten dan lebih sempurna</p> <p>Panen sel telur non invasif , tanpa pembedahan yang efisien dan dapat berulang dalam waktu pendek.</p> <p>Peningkatan angka pematangan, kemampuan fertilisasi dan hasil embrio yang lebih baik.</p>

Jadwal pelaksanaan Penelitian berikutnya

Tahun II

Jenis Kegiatan	Bulan ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penyiapan hewan	**	**										
Penyiapan peralatan	**	**										
Penyempurnaan teknik superovulasi dan pemanenan sel telur.			**	**	**	**						
Kombinasi medium kultur dan suplementasi komponen penumbuh			**	**	**	**	**	**				
Teknik kriopreservasi embrio hasil pembuahan <i>in vitro</i>			**	**	**	**	**	**				
Identifikasi morfologis struktur ultra sel telur dan embrio.								**	**			
Evaluasi data										**		
Pelaporan hasil											**	**

Tahun III

Jenis Kegiatan	Bulan ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penyiapan hewan	**	**										
Penyiapan peralatan	**	**										
Pemilihan kombinasi medium kultur			**	**	**	**						
Karakterisasi faktor penentu kualitas embrio.				**	**	**	**	**				
Penggunaan teknik biopsi untuk penentuan jenis kelamin embrio				**	**	**	**	**	**	**		
Penentuan jenis kelamin embrio dengan metode PCR.					**	**	**	**	**			
Penentuan viabilitas embrio beku pasca biopsi									**	**		
Evaluasi data										**		
Pelaporan hasil										**	**	

Tahun IV

Jenis Kegiatan	Bulan ke-											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penyiapan hewan	**	**										
Penyiapan peralatan	**	**										
Produksi embrio <i>in vitro</i> dengan protokol terbaik.			**	**	**	**	**	**				
Transfer embrio pada respien dan produksi anak sapi				**	**	**	**	**	**	**		
Evaluasi kinerja reproduksi donor setelah mencapai umur dewasa					**	**	**	**	**			
Evaluasi data										**		
Pelaporan hasil										**	**	

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, D.T., Holm P., Irvine B., Petersen, B.A., Stubbing, R.B., McLean, B., Stevens, G., and Seemark, 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 Seemark, 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.
- Bedirian, K.N., and Baker, R.D. 1975. Follicular development , oocyte maturation and ovulation in gonadotropin treated prepuberal calves. *Canadian Journal of Animal Science* 55, 193-199.
- Betteridge, K.J. 1977. Embryo transfer in farm animals : A review of techniques and applicalition. 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
- Calleesen, H. Liboriussen, T., Greve, T., 1996. Practical aspects of multiple ovulation - transef in cattle. *Animal Reproduction Science* 42: 215-226.
- Dahlhausen, R. D.,Dresser, B. L.,and Ludwick, T. M. 1980. In vitro maturation of prepubertal lamb oocytes and preliminary report on fertilisation and cleavage. *Theriogenology* (vol.13): 93.
- Earl, C. R., Armstrong, D. T.,and Irvine, B. J. 1994b. Juvenile in vitro fertilization-embryo transfer (JIVET): the in vitro production of viable embryos from oocytes obtain from gonadotropin-stimulatet 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.
- Gardner, D.K., Lane, M., and Batt, P.A. 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 Purwantara. 1992. Ultrasonography in embryo transfer practice. A Review. Proceeding 8th Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France.
- Greve, T. and Purwantara, B. Ultrasonography in embryo transfer practice. 1993. A Review. Proceeding 9th Scientific Meeting, European Embryo Transfer Association, Lyon France, 137-147.
- 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.
- 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 Duby 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 Kruip, T.A.M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamet Research* 24: 197-204.

- Nicholas, F. W., and Smith, C. 1983. Increased retes 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 β 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 7th 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 cloprostenol induced luteolysis. Proceeding 12th. 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. 1994Follicular 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.
- Revel, F., Mermilliod, 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 producytion 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 rumunants. Reprod. Fertil. Dev. 9, 341-354