

PENELITIAN SUMBER DAYA PERTANIAN

DAN PANGAN (T.U.01.6306) :

A. MANIPULASI EMBRIO TERNAK (Cloning, Sexing dan Splitting)

B. Tappa, E.T. Margawati, S. Said, B.W. P. Sasongko, T. Hastutie,
F. Afiati, Handrie, R. Aminudin, M. Soewecha, Yanwar, Parjan

ABSTRAK

Produksi embrio dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*. Embrio dikoleksi dari donor sapi perah dan sapi potong yang telah disuperovulasi dengan hormon FSH + pelarut 50% PVP dengan sekali penyuntikan secara sub kutan. Rata-rata jumlah CL, embrio terkoleksi, embrio dapat ditransfer dan embrio dapat dibekukan dengan sekali penyuntikan tidak berbeda dengan perlakuan delapan kali penyuntikan. Jumlah embrio yang difreezing dan ditransfer masing-masing 92 dan 13 embrio sapi potong dan 14 dan 5 embrio sapi perah. Lama penyimpanan 8 dan 12 jam ovari domba dengan penambahan hormon FSH dan Estradiol-17 β masing-masing 1 μ g/ml dalam media penyimpanan masih memberikan tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* sekitar 39% dan 37%. Oosit kambing dengan lama maturasi antara 12 dan 26 jam memberikan proporsi oosit yang masak tidak berbeda (50%). Sedangkan oosit domba relatif masih dapat dimatangkan di dalam inkubator taupa CO₂ dengan proporsi masak oosit sebanyak \pm 30%. Proporsi tahap perkembangan morula dan blastocyst tidak berbeda antara morula atau blastocyst yang dihasilkan dari oosit masak tanpa atau dengan CO₂. Dari 128 embrio paruh yang dikultur selama 72 jam berkembang sampai tahap expanded blastocyst sebesar 78,1%. Daya tahan hidup embrio tahap compact morula dan blastocyst setelah dibekukan pada media 1,8M Ethylene glycol lebih tinggi dibanding dengan media 1,8M Ethylene glycol + 0,25 Sucrose dan 1,4M Glycerol + 0,25M Sucrose. Setelah thawing dan kultur selama 72 jam embrio tahap compact morula berkembang sampai tahap hatched blastocyst sebesar 73,5%. Diperoleh angka fusi yang tertinggi 88,6% dari embrio tahap 2 dan 16-sel yang difusi pada pulse strength 1,5-2,0 kv/cm dan pulse duration 60-90 μ sec. Sedangkan embrio tahap 16 sel memperlihatkan angka fusi yang terendah 34,3% pada 2,0 kv/cm dengan 90 μ sec. Sel blastomer yang telah terjadi fusi setelah dikultur sampai tahap blastosis memperlihatkan bahwa embrio tahap 2-16 sel berbeda pada kondisi pulse strength 1,0 - 2,0 kv/cm dengan pulse duration 30-90 μ sec.

Kata Kunci : Transfer embrio, fertilisasi *in vitro*, mikromanipulasi embrio, mencit, domba, sapi.

PENDAHULUAN

Teknik transfer embrio dan mikromanipulasi embrio sedang diaplikasikan dalam tingkat komersial, namun masih ditemukan beberapa kendala, diantaranya sulitnya mendapatkan donor yang unggul, rendahnya atau bervariasi respon sapi donor terhadap pemberian hormon gonadotropin serta rendahnya kualitas embrio yang dapat dimanipulasi atau ditransfer ke resipien (Tappa, dkk., 1994). Oleh karena itu penelitian penggunaan hormon masih merupakan prioritas utama untuk meningkatkan jumlah dan kualitas embrio yang dihasilkan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

Produksi embrio secara *in vitro* dapat diperoleh tingkat maturasi dan fertilisasi yang seragam sehingga memudahkan untuk melakukan manipulasi embrio seperti *splitting*, *cloning (nuclear transfer)*, *sexing* dan *transgenic*.

Dengan teknik mikromanipulasi embrio diharapkan kita dapat mendapatkan sejumlah kelompok anak-anak sapi kembar identik yang secara genetik mempunyai nilai genetik tinggi. Pengetahuan tentang embrio tahap awal bertujuan untuk melakukan manipulasi genetik seperti memasukkan materi genetik yang baru dengan injeksi gen kedalam tahap awal embrio (tahap pronukleus).

Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan teknik-teknik produksi embrio secara *in vivo* dan *in vitro* untuk menghasilkan embrio yang berkualitas dan dapat dimanipulasi secara mikro seperti *splitting*, *cloning*, *sexing* dan *freezing*.

BAHAN DAN CARA KERJA

A. Produksi Embrio Sapi Secara *In Vivo*.

Penelitian ini menggunakan donor sapi perah Hongarian dan sapi potong Brangus. Sebanyak 25 ekor sapi potong Brangus dan 32 ekor sapi perah Hongarian dosinkron berahinya dengan hormon Prostaglandin $\text{PGF}_2\alpha$ (Prosolvit, Intervet, Holland) sebanyak 15 mg/ekor secara intra muskuler. Pengamatan berahi dilakukan setelah 72 jam penyuntikan $\text{PGF}_2\alpha$. Sapi-sapi donor disuperovulasi pada hari ke-10 setelah berahi dengan penyuntikan hormon FSH (Ovagen, ICP, N. Zealand) yang dilarutkan dalam Polyvinylpirrolidone (PVP; molekular weigh 360.000, SIGMA) 50% dan diberikan sekali penyuntikan dengan dosis perlakuan 18,0 mg (G_1), 13,5 mg (G_2) dan 9,0 mg (G_3) per ekor secara sub-kutan. Sedangkan perlakuan kontrol (G_4) diberikan pagi sore dengan interval waktu 12 jam selama 4 hari berturut-turut dengan total dosis 18,0 mg secara i.m. Pada hari ke-3 setelah pemberian FSH, diberikan prostaglandin $\text{PGF}_2\alpha$ dan diamati berahi 48 jam kemudian. Sapi-sapi donor yang berahi dikawinkan/diinseminasi dengan pejantan unggul 8 jam setelah berahi (standing heat) dan diulangi 12 dan 24 jam kemudian. Koleksi embrio dilakukan dengan teknik tanpa operasi pada hari ke-7 setelah inseminasi menggunakan foley kateter dan media Modifikasi Dulbecco's Phosphat Buffer Saline (M-DPBS) + 2% Fetal Calf Serum (FCS-Gibco). Embrio yang tertampung

dievaluasi berdasarkan tahap perkembangan dan kualitasnya dengan menggunakan mikroskop fase kontras pembesaran 100x. Embrio tahap morula dan blastosis yang terpilih dicuci dengan media MDPBS + 10% FCS sebanyak 3 kali kemudian dipersiapkan untuk ditransfer segar ke resipien atau sisanya *displitting*, *sexing*, *freezing* dan *cloning*.

B. Produksi Embrio Secara *In Vitro*

1. Pengaruh Lama Penyimpanan Ovari dalam Media PBS(+) yang ditambahkan Hormon FSH dan/atau Estradiol.

Ovari domba diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) dengan menggunakan larutan; PBS+Hormon Estradiol 1 μ g/ml (H₁), PBS+Hormon FSH (H₂), PBS+Estradiol+FSH (H₃) dan PBS tanpa hormon (H₄) sebagai kontrol. Semua perlakuan disimpan pada suhu 30-37°C dalam termos. Perlakuan lama penyimpanan ovari masing-masing 4, 8 dan 12 jam. Oosit dengan sel kumulus lengkap dispirasi dari folikel ovari (diameter 1-5mm) dengan menggunakan syringe ukuran 10ml dan jarum ukuran 18G. Oosi dengan sel kumulus kompak dicuci 3 kali dan dikultur selama 24 jam dalam spot media TCM-199 (25nM Hepes TCM-199 with Earle salt, Gibco, NY, USA) ditambah dengan 10% (v/v) Calf Serum (Gibco, Lot.33K-6184), hormon FSH 1 μ g/ml, LH 1 μ g/ml dan Estradiol 17 β 1 μ g/ml. Media kultur ditempatkan pada sebuah cawan petri (\varnothing 35mm, Nunclon) dan ditutup dengan mineral oil (SIGMA) dalam inkubator CO₂ 5% temperatur 38,5°C. Kapasitasi sperma dilakukan dengan metoda BO (Brackett & Oliphant).

Semen segar ditampung dari pejantan dengan menggunakan vagina buatan. Sebanyak 2-3 ml semen dicuci 2 kali dalam media BO+10mM Caffein Sodium Benzoate (SIGMA) dengan sentrifugasi 2000 selama 5 menit. Akhirnya, sperma yang telah dicuci diencerkan dengan media BO untuk fertilisasi sampai mencapai konsentrasi sperma 2-4 x 10⁶ spermatozoa/ml. Sebanyak 50 μ l media yang mengandung oosit yang telah dipersiapkan sebelumnya untuk fertilisasi.

Setelah 6 jam inkubasi dengan spermatozoa dalam inkubator CO₂ 5% pada temperatur 38,5°C, sel-sel kumulus dilepas dengan menggunakan pipet mulut. Sebanyak 10-15 oosit yang telah difertilisasi ditransfer ke media bekas maturasi (co-culture) yang telah membentuk sel-sel monolayer dari sel kumulus. Pengamatan perkembangan embrio

mulai tahap 1 sel sampai morula dan blastosis dilakukan 24 jam dan 96 jam setelah fertilisasi menggunakan mikroskop phase kontras pembesaran 200-400 kali.

2. Pengamatan Oosit Kambing dengan Lama Inkubasi Berbeda (6, 9, 12 dan 26 jam), Pemasakan dan Pematangan Oosit Domba yang Diinkubasi di dalam Inkubator tanpa CO₂.

Koleksi Oosit. Oosit kambing diaspirasi dari ovarium hewan mati di rumah pemotongan hewan (RPH) Mampang, Jakarta. Sedangkan oosit domba dari RPH Kodya Bogor dan RPH swasta di Jembatan Merah, Cibinong. Medium yang digunakan untuk koleksi oosit terdiri dari Hepes 199 (H-199) + 0,4% BSA + 0,5% Heparin, kemudian dicuci dengan medium H-199 + 10% FCS; Bicarbonat 199(B-199) + 10% FCS dan terakhir dicuci dengan medium IVM (B-199 + 10% FCS + 10µg/ml FSH + 10µg/ml hCG + 1µg/ml Estradiol).

Maturasi *In Vitro*. Penelitian I, oosit kambing dimaturasi dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan diberhentikan berturut-turut setelah 6, 9, 12 dan 26 jam. Masing-masing setelah perlakuan IVM tersebut, oosit dibersihkan dari sel kumulus kemudian ditempatkan dalam gelas slide, direndam dalam larutan fiksasi selama 48 jam kemudian di staining dengan 1% lacmoid selama 1-2 menit, kemudian dicuci dengan 45% asam asetat dan oosit siap diamati kematangannya. Penelitian II, oosit terkoleksi dibagi kedalam 3 bagian sesuai dengan perlakuan yang dicobakan. T1 = oosit dikultur dalam eppendorf berisi medium IVM tertutup dengan minyak mineral, dimana sebelumnya eppendorf yang berisi medium diekuilibrasi ± 2 jam didalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 38°C dan humiditas tinggi, kemudian dimaturasi di dalam inkubator tanpa CO₂. T2 = Oosit dikultur dalam drop medium IVM (sama dengan T1) pada cawan petri yang telah ditutup dengan minyak mineral kemudian dimaturasi di dalam inkubator tanpa CO₂. T3 = oosit dikultur dalam spot medium IVM (sama dengan T1) yang ditutup dengan minyak mineral, sebelumnya drop IVM telah diekuilibrasi didalam inkubator 5% CO₂ (seperti T1), kemudian dimaturasi didalam inkubator CO₂. Lama maturasi ketiga perlakuan yaitu 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan tingkat kematangan oosit dilakukan seperti pada penelitian I. Penelitian III, Perlakuan yang diberikan seperti pada penelitian II, akan tetapi pada penelitian ini dilanjutkan pada kapasitasi sperma dan fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio *in vitro* untuk melihat perkembangan embrio secara *in vitro*.

Kapasitasi Sperma dan Fertilisasi *In Vitro*. Sperma segar (ditampung pada waktu IVF) digunakan untuk fertilisasi *in vitro* pada ketiga perlakuan. Kapasitasi sperma dilakukan dengan metode BO (Brackett & Oliphant).

Kultur Embrio *In Vitro*. Medium kultur (IVC = *in vitro culture*) yang digunakan yaitu SOF/AA/BSA. Setiap 5 oosit dikultur di dalam 30 μ l IVC drop. Seperti pada IVM, drop medium IVC ditutup dengan minyak mineral telah diekuilibrasi \pm 12 jam sebelumnya didalam inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 38°C dengan humiditas tinggi. Medium IVC diganti setiap 48 jam untuk memungkinkan oosit berkembang ketahap lanjut (morula dan blastosis).

C. Mikromanipulasi Embrio (*Cloning, Splitting dan Freezing*).

Cloning. Pada penelitian ini digunakan mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C dan AJ umur 8-10 minggu. Mencit dipelihara dalam ruangan kandang hewan percobaan Puslitbang Bioteknologi-LIPI, Cibinong yang diberi penerangan listrik selama 12 jam (pukul 6.00 wib sampai 18.00 wib). Pakan berupa pellet dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Mencit betina disuperovulasi dengan injeksi Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin (PMSG, Folligon, Intervet, Holland) sebanyak 5.0 IU secara intra peritoneal dan Human Chorionic Gonadotrophin (HCG, Chorulon, Intervet, Holland) sebanyak 5.0 IU, 48 jam setelah pemberian PMSG. Setelah injeksi HCG, mencit betina dicampur dengan mencit jantan. Pada keesokan harinya diperiksa adanya sumbat vagina dan ditetapkan sebagai Hari nol (H₀). Koleksi embrio tahap 2-sel, 4-sel, 8-sel dan 16-sel dilakukan pada H₁ dan H₂. Mencit betina yang telah disuperovulasi dimatikan dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah dan diambil saluran reproduksinya berupa oviduk dan uterus. Embrio 2-sel, 4-sel, 8-sel dan 16-sel dikoleksi dari oviduk dengan media M2 + BSA kemudian dievaluasi dibawah dissecting mikroskop pembesaran 100x. Embrio yang terpilih dicuci tiga kali dengan media M16 + BSA.

Zona pelusida dilarutkan dengan 0,5% pronase (Actinase, Keken, Pharmaceutical, Co. Ltd, Japan) dalam media M16 tanpa BSA. Setelah zona dilarutkan embrio dipindahkan ke spot media M16 + BSA dan zona dihilangkan dengan melakukan pipetting. Embrio 2, 4, 8 dan 16-sel tanpa zona selanjutnya dipindahkan ke spot media

M16 + BSA untuk dilakukan pemisahan blastomer dengan bantuan mikromanipulator. Sel-sel blastomer yang sudah terpisah selanjutnya dipindahkan ke Chamber fusi elektrik (Kruss, Hamburg, Jerman) yang terdiri dari 2 paralel elektrode dengan jarak antara kedua elektrode adalah 1,0 mm. Chamber fusi di set kemudian diisi dengan larutan 0,3 M Mannitol yang mengandung 0,05 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂ dan 1,0 mg/ml BSA (Taniguchi dkk. 1990). Sel-sel blastomer diekuilibrasikan selama 5 menit dalam larutan fusi sebelum dimasukkan ke dalam chamber fusi. Fusi elektrik menggunakan mesin fusi elektrik (BIOJET CF, B. Braun, Jerman) dengan program alternative current (a.c) 5 V, 500 kHz field selama 5 detik. Setelah itu, tiga pulse direct current (d.c) dengan waktu dan kekuatan diberikan selang selang selama 1 detik. Parameter yang diukur pulse d.c masing-masing waktu pulse adalah 30, 60 dan 90 µsec dan kekuatan (strength) pulse adalah 0,5; 1,5 dan 2,0 kv/cm dengan interval 10 detik. Embrio yang telah difusi dicuci dalam media M16 + BSA dan selanjutnya dikultur dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 37°C selama 96 jam untuk mengamati perkembangan sampai tahap blastocyst.

Data (3 kali ulangan) dari semua perlakuan terhadap perkembangan embrio hasil fusi dianalisa dengan Chi-square test.

Splitting. *Splitting* (pembagian dua) embrio dilakukan dengan metode Nagashima *et al*, 1984 menggunakan embrio tahap kompak morula dan blastosis. Embrio sebelum dibelah menjadi dua bagian, zona pelusida dilarutkan dengan menggunakan pronase 0,25% dalam media MDPBS selama 5 menit. Kemudian dicuci tiga kali dengan media kultur M16+BSA selanjutnya embrio dipindahkan ke spot media 50µl ditutup dengan minyak mineral (SIGMA). Untuk membelah embrio digunakan sebuah pisau bedah (Feather Biocut Blades, Japan) yang dipasang pada mikromanipulator (Narishige, Nikon, Japan) tanpa menggunakan pipet penahan. Embrio dibelah menjadi 2 bagian yang sama. Embrio hasil pembelahan (embrio-paruh) dipindahkan ke spot media kultur M16 yang selanjutnya dikultur dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 37°C selama 72-79 jam.

Freezing. *Freezing* (penyimpanan embrio beku) menggunakan 4 tahap dengan menguji beberapa konsentrasi gliserol. Embrio terpilih dicuci secara bertahap pada media:

D-MPBS + 20% FCS + 0 % Gliserol

D-MPBS + 20% FCS + 3,3% Gliserol

D-MPBS + 20% FCS + 6,7% Gliserol

D-MPBS + 20% FCS + 10% Gliserol

masing-masing selama 5-7 menit. Selanjutnya embrio dimasukkan kedalam straw 0,25ml dan dimasukkan kedalam program freezer. Temperatur diturunkan secara bertahap, dari suhu ruang (24°C) sampai suhu -6°C dengan kecepatan 1°C/menit. Pada suhu -6°C dilakukan *seeding* dan ditahan selama 10 menit. Selanjutnya suhu diturunkan sampai suhu -30°C dengan kecepatan 0,3°C/menit, kemudian ditransfer kedalam larutan N₂ sampai tersedianya sapi-sapi resipien.

Kriopreservasi embrio micit menggunakan embrio umur 3 hari dibekukan dengan media krioprotektan yaitu 1,8M Ethylene glycol (EG); 1,8M EG + 0,25M Sucrose (EG+SUC) dan 1,4M Glycerol + 0,25 SUC (GLY+SUC). Selain itu digunakan 10% GLY + 0,3M SUC sebagai kontrol. Baik media EG+SUC maupun GLY+SUC dicampur selanjutnya bersama dengan embrio dimasukkan dalam straw kemudian dibekukan menggunakan programable freezer dengan dua macam perlakuan, (1) penurunan secara bertahap dengan melalui *seeding* pada temperatur -6°C, (2) penurunan secara bertahap tanpa *seeding* atau langsung dimulai pada temperatur -7°C.

D. Analisa Hormon Progesteron (P4) dan Estradiol (E2).

Penelitian ini dilakukan selama bulan September 1996 pada enam sapi betina. Sampel urine, 500 mL/sapi, dikumpulkan pada hari Senin, Rabu dan Jumat selama empat minggu. Sampel langsung diekstrak pada hari pengumpulan atau disimpan di dalam lemari es. Menurut Touchstone (1986) sampel urine tidak mengalami perubahan bila disimpan pada suhu 4° C selama seminggu.

Ekstraksi urine dilakukan menurut teknik Touchstone (1986), dengan modifikasi. 7 ml urine ditambah 2 ml HCl (37%) kemudian ditambahkan dengan 7 ml khloroform (CHCl₃) yang dipanaskan dengan temperatur 75°C selama kurang lebih 30 menit, dan kemudian didinginkan. Lapisan khloroform (*organic phase*) dipisahkan dari lapisan air (*liquid phase*) dan ditambah dengan NaOH (2 M) 2 M sebanyak 7 ml, lalu divortex. *Liquid phase* dari NaOH dibuang dan 5 ml air ditambahkan ke dalam *organic phase* lalu divortex kembali. *Liquid phase* dibuang dan *organic phase* siap untuk dianalisa pada *thin-layer chromatography* (TLC).

Satu tetes dari *organic phase* ditotol ke plat TLC. Setelah kering dimasukkan ke dalam larutan pengembang hingga rata. Kemudian TLC dikeringkan kembali, lalu disemprot dengan Cesium Sulfat ($CeSO_4$) dalam H_2SO_4 pekat dan dipanaskan sampai terlihat bercak hitam. Keberadaan hormon diketahui dari bercak hitam sample yang sejajar bercak hitam dari standar.

E. Isolasi DNA Kerbau Belang (*Bubalus bubalis*)

Sampel darah kerbau belang dikoleksi di Tana Toraja, Propinsi Sulawesi Selatan. Selanjutnya disentrifuse 4000 rpm selama 30 menit untuk mengambil buffy coatnya. Dengan menggunakan metoda standar, buffy coat dilisiskan untuk mengisolasi DNA. Dari 3 kali isolasi DNA, masih diperoleh tingkat kemurnian yang rendah $\pm 50\%$.

Dilakukan perjalanan ke Tana Toraja, Sulawesi Selatan selama 6 hari, 2 orang. Dari perjalanan ini berhasil dikoleksi sampel berupa bulu dari beberapa ekor kerbau belang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Koleksi Embrio Sapi Secara *In Vivo*.

Hasil koleksi embrio sapi potong Brangus dan sapi perah Hongarian secara *in vivo* dengan perlakuan hormon Ovagen + 50% PVP dengan satu kali penyuntikan secara sub cutan (s.c) dilihat pada Tabel 1 dan tabel 2.

Tabel 1. Jumlah (mean \pm SEM) corpus luteum, embrio terkoleksi, embrio dapat ditransfer dan embrio dapat dibekukan pada sapi potong Brangus

Grup	Grup perlakuan			
	G ₁ 1 x s.c	G ₂ 1 x s.c	G ₃ 1 x s.c	G ₄ (kontrol) 8 x i.m
Jumlah donor	6	6	6	7
Jumlah corpus luteum (CL)	4,7 \pm 1,5*	8,5 \pm 1,3	13,7 \pm 5,4	11,1 \pm 3,6
Embrio terkoleksi	3,8 \pm 1,5*	6,8 \pm 1,8	11,3 \pm 4,4	9,4 \pm 3,0
Embrio dapat ditransfer	3,3 \pm 1,1*	5,7 \pm 1,7	10,2 \pm 3,9	8,0 \pm 2,2
Embrio dapat dibekukan	2,7 \pm 0,7*	4,8 \pm 1,1	9,2 \pm 3,4	7,3 \pm 2,1

* P < 0.05 dibanding dengan G₄ (kontrol)

Tabel 2. Jumlah (mean \pm SEM) corpus luteum, embrio terkoleksi, embrio dapat ditransfer dan embrio dapat dibekukan pada sapi perah Hongarian

Grup	Grup Perlakuan			
	G ₁ 1 x s.c	G ₂ 1 x s.c	G ₃ 1 x s.c	G ₄ (kontrol) 8 x i.m
Jumlah donor	7	7	7	7
Jumlah corpus luteum (CL)	9,9 \pm 3,5*	7,8 \pm 2,4	12,7 \pm 5,8	10,8 \pm 2,6
Embrio terkoleksi	5,6 \pm 3,2*	7,1 \pm 3,1	11,6 \pm 7,2	9,2 \pm 2,1
Embrio dapat ditransfer	4,3 \pm 3,3*	6,9 \pm 2,9	9,7 \pm 1,3	8,6 \pm 3,0
Embrio dapat dibekukan	4,1 \pm 1,2*	6,2 \pm 0,4	8,9 \pm 2,4	7,6 \pm 2,7

* P < 0.05 dibanding dengan G₄ (kontrol)

Pada Tabel 1 dan 2 terlihat bahwa jumlah CL, embrio terkoleksi, embrio dapat ditransfer dan embrio dapat dibekukan pada grup 2 dan 3 tidak berbeda nyata dengan grup 4. Sedangkan sapi-sapi donor yang diberikan dosis 9,0 mg OFSH dengan pemberian sekali penyuntikan hasilnya lebih kecil (P<0,05) dibanding dengan perlakuan G₄ (kontrol).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa apabila OFSH dilarutkan oleh 50% PVP, dengan dosis 13,5 mg dan 18,0 mg dengan sekali penyuntikan secara sub kutan akan memberikan respon superovulasi yang sama dengan 8 kali penyuntikan hormon secara i.m. Penggunaan 50% PVP sebagai pelarut OFSH adalah lebih praktis, tidak menyebabkan stres pada sapi donor, selain itu juga dapat menghemat penggunaan hormon FSH sehingga biaya produksi dapat berkurang.

Jumlah embrio segar yang difreezing dan ditransfer ke sapi resipien di Peternakan Tri 'S' Tapos dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah embrio segar difreezing dan ditransfer ke sapi resipien Peternakan Tri 'S' Tapos

Jenis Sapi	Jumlah embrio freezing	Jumlah embrio transfer
Sapi Potong	92	13
Sapi Perah	14	5

B. Produksi Embrio Secara *In Vitro*.

1. Pematangan dan Fertilisasi *In Vitro*

Hasil Pematangan dan Fertilisasi *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 4. Rata-rata tingkat pematangan *in vitro* pada perlakuan 4, 8 dan 12 jam penyimpanan

Lama penyimpanan	Perlakuan (%)				Rataan
	H ₄	H ₁	H ₂	H ₃	
4 jam	53,38 ^{ac}	38,42 ^{bc}	57,51 ^{ac}	35,89 ^{bc}	46,30
8 jam	47,81 ^{ac}	42,97 ^{ac}	55,17 ^{bc}	38,71 ^{ac}	46,165
12 jam	36,69 ^{ad}	36,46 ^{ad}	48,58 ^{bc}	34,59 ^{ad}	39,08
Rataan	45,96	39,28	53,75	36,397	-

Keterangan :

H₁ = PBS + Estradiol 17-β

H₂ = PBS + FSH

H₃ = PBS + Estradiol 17-β + FSH

H₄ = PBS tanpa hormon (kontrol)

a,b huruf berbeda pada baris yang sama P<0,05

a,d huruf berbeda pada kolom yang sama P<0,05

Tabel 5. Rata-rata tingkat fertilisasi *in vitro* pada perlakuan 4, 8 dan 12 jam penyimpanan

Lama penyimpanan	Perlakuan (%)				Rataan
	H ₄	H ₁	H ₂	H ₃	
4 jam	50,55	36,72 ^{bc}	55,87 ^{ac}	46,78 ^{abc}	47,73
8 jam	35,17	35,05 ^{ac}	51,23 ^{bc}	36,00 ^{ac}	39,36
12 jam	33,88	36,71 ^{ac}	35,98 ^{ad}	42,37 ^{ac}	37,18
Rataan	39,80	36,16	47,62	41,72	-

Keterangan :

H₁ = PBS + Estradiol 17-β

H₂ = PBS + FSH

H₃ = PBS + Estradiol 17-β + FSH

H₄ = PBS tanpa hormon (kontrol)

a,b huruf berbeda pada baris yang sama P<0,05

c,d huruf berbeda pada kolom yang sama P<0,05

Kematangan Oosit Kambing. Setelah pematangan *in vitro* dengan lama inkubasi yang berbeda, tingkat kematangan oosit kambing dapat dilaporkan seperti pada Tabel 6.

Proporsi jumlah oosit yang masak (Metaphase II) meningkat berhubungan positif dengan lama pematangan yang diperpanjang (6 jam = 16,67%; 9 jam = 33,33%; 12 jam = 50% dan 26 jam = 50%). Dari deskripsi ini menunjukkan bahwa lama pematangan oosit kambing antara 12-26 jam memberikan proporsi oosit masak yang tidak berbeda.

Tabel 6. Tingkat kematangan oosit kambing setelah lama maturasi *in vitro* (IVM) berbeda

Lama IVM (jam)	Jumlah oosit	Met I (%)	Ana II (%)	Tel I (%)	Met II (%)
6	12	6(50)	4(33,33)	0	2(16,67)
9	9	3(33,33)	2(22,22)	1(11,11)	3(33,33)
12	12	2(16,67)	3(25)	1(8,33)	6(50)
26	14	4(28,57)	3(21,43)	0	7(50)

Kematangan Oosit Domba. Tingkat kematangan oosit domba setelah maturasi *in vitro* dengan dan tanpa gas CO₂ dapat dilaporkan seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Tingkat kematangan oosit domba setelah maturasi *in vitro* dengan dan tanpa CO₂

Perlakuan	Jumlah oosit	Met I (%)	Ana II (%)	Tel I (%)	Met II (%)
T1	33	1(3,03)	15(45,45)	4(12,12)	13(39,40)
T2	38	6(15,79)	16(42,10)	5(13,16)	11(28,95)
T3	33	5(15,15)	8(24,24)	4(12,12)	16(48,49)

Proporsi oosit domba yang masak menunjukkan lebih tinggi pada oosit yang dimatangkan dengan 5% gas CO₂ (T3 = 48,5%) dibandingkan dengan pemasakan oosit tanpa CO₂ (T1 = 39,4%; T2 = 29%). Hasil ini juga menunjukkan bahwa oosit yang dimatangkan tanpa CO₂ menghasilkan proporsi oosit masak yang lebih tinggi apabila media IVM sebelumnya telah diekuilibrasikan dengan 5% CO₂.

Perkembangan Embrio Domba *In Vitro*. Perkembangan embrio domba secara *in vitro* dari oosit yang dimaturasi tanpa CO₂ dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Perkembangan embrio domba hasil dari maturasi oosit secara *in vitro* tanpa CO₂

Perlakuan	Jumlah Oosit	Jumlah oosit membelah (cleaved) (%)	Laju Morula/Blastocyst (Morula/Blastocyst rate) (%)*
T1	44	11(25,00)	5(45,45)
T2	39	9(23,08)	4(44,44)
T3	41	15(36,58)	5(33,33)

* $\frac{\text{Morula/Blastocyst}}{\text{Jml. oosit membelah}} \times 100\%$

Proporsi jumlah oosit yang membelah relatif lebih rendah pada oosit yang dimaturasi tanpa CO₂ (T2 = 23%) dibanding T1 (25%) dan T3 (36%). Namun demikian perkembangan lebih lanjut ke tahap morula dan blastocyst tidak menunjukkan perbedaan yang berarti pada ke tiga perlakuan yaitu 45%, 44% dan 33% masing-masing untuk T1, T2 dan T3. Proporsi oosit yang membelah maupun laju perkembangan oosit ke tahap morula dan blastocyst ternyata masih lebih tinggi dari hasil yang dikemukakan oleh Byrd *et al.* (1995) pada embrio domba hasil maturasi dengan inkubator mini. Hasil ini ternyata tidak terlalu rendah seperti yang diperkirakan pada hasil maturasi *in vitro* tanpa CO₂ (Margawati, 1997 in Press).

C. Mikromanipulasi Embrio (*Cloning, Splitting dan Freezing*).

Cloning. Pengaruh lama dan kekuatan d.c pulses pada sel blastomer embrio 2-sel yang diberikan 3 pulses 1.0; 1.5 dan 2.0 kv/cm dengan waktu 30, 60 dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai blastocyst secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 9.

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (88,6%) adalah diperoleh apabila embrio diberikan perlakuan pulse listrik berkekuatan 1.5 kv/cm dengan lama waktu 90 μ sec. Sedangkan angka fusi blastomer yang paling rendah (46.4%) terdapat pada embrio yang diberikan perlakuan pulse listrik yang berkekuatan 2.0 kv/cm dan lama 30 μ sec. Apabila embrio diperlakukan pada 1.0 kv/cm dengan waktu 30 dan 90 μ sec, diperoleh angka fusi yang lebih rendah (57.1 dan 64.4%) dibandingkan dengan embrio yang diperlakukan pada 1.5 kv/cm dengan waktu 30 dan 90 μ sec (84.2% dan 88.6%).

Tabel 9. Pengaruh lama dan kekuatan d.c pulse terhadap fusi pada tahap embrio 2-sel

Duration of d.c pulse	Strength of d.c pulse	Fusion rate ^a (%)	Blastocyst development rate (%)
30 μ sec	1.0 kv/cm	12/21 (57.1) ^{b,d}	07/12 (58.3) ^{b,d}
	1.5 kv/cm	16/19 (84.2) ^{b,e}	11/16 (68.8) ^{c,e}
	2.0 kv/cm	13/28 (46.4) ^{b,j}	05/13 (38.5) ^{b,j}
60 μ sec	1.0 kv/cm	21/30 (70.0) ^{b,d}	11/21 (52.4) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	23/40 (57.5) ^{b,e}	10/23 (43.5) ^{c,d}
	2.0 kv/cm	34/40 (85.0) ^{b,f}	23/34 (67.6) ^{c,e}
90 μ sec	1.0 kv/cm	29/45 (64.4) ^{b,d}	15/29 (51.7) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	31/35 (88.6) ^{b,c}	21/31 (67.7) ^{c,e}
	2.0 kv/cm	27/40 (67.5) ^{b,d}	15/27 (55.6) ^{e,f}

^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer

^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)

^{d-f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Perkembangan embrio setelah dikultur mulai terjadi kompak sel setelah 36 jam kultur (sekitar 4-8 sel) dan berkembang sampai tahap blastocyst selama 92 jam. Embrio yang diperlakukan dengan pulse listrik berkekuatan 1.5 kv/cm dengan lama 30 dan 90 μ sec diperoleh angka fusi masing-masing 68.8% dan 67.7%. Sedangkan perkembangan embrio yang paling rendah diperoleh pada embrio yang diperlakukan 2.0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec.

Pengaruh lama dan kekuatan d.c pulse pada sel blastomer embrio 4-8 sel yang diberikan 3 macam pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm dengan waktu 30, 60 dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai tahap blastocyst secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 10.

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (80.0%) pada embrio yang diberikan kekuatan d.c pulse 1.5 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan angka fusi blastomer paling rendah (53.6%) pada perlakuan d.c pulse 1.0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec.

Apabila embrio diperlakukan dengan waktu 60 μ sec pada kekuatan d.c pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm diperoleh angka fusi lebih tinggi dibanding dengan waktu 30 dan 90 μ sec pada perlakuan d.c pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm. Begitu juga perkembangan embrio sampai tahap blastocyst paling tinggi pada perlakuan d.c pulse 1.5 kv/cm dengan lama waktu 60 μ sec.

Tabel 10. Pengaruh lama dan kekuatan d.c. pulse terhadap fusi pada tahap embrio 4-8 sel

Duration of d.c pulse	Strength of d.c pulse	Fusion rate ^a (%)	Blastocyst development rate (%)
30 μ sec	1.0 kv/cm	15/28 (53.6) ^{b,d}	09/15 (60.0) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	11/18 (61.1) ^{b,e}	07/11 (63.6) ^{b,d}
	2,0 kv/cm	17/30 (56.6) ^{b,d}	11/17 (64.7) ^{b,e}
60 μ sec	1.0 kv/cm	22/35 (62.9) ^{b,d}	12/22 (54.5) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	32/40 (80.0) ^{b,d}	25/32 (78.1) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	29/40 (72.5) ^{b,c}	20/29 (68.9) ^{c,j}
90 μ sec	1.0 kv/cm	21/35 (60.0) ^{b,d}	11/21 (52.4) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	28/40 (70.0) ^{b,e}	19/28 (67.9) ^{c,d}
	2,0 kv/cm	20/30 (66.7) ^{b,f}	12/20 (60.0) ^{c,e}

^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer

^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)

^{d-f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Pengaruh lama dan kekuatan d.c pulse pada sel blastomer embrio 16-sel yang diberikan 3 macam pulses 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm dengan waktu 30, 60 dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai tahap blastocyst dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Pengaruh lama dan kekuatan d.c. pulse terhadap fusi pada tahap embrio 16 sel

Duration of d.c pulse	Strength of d.c pulse	Fusion rate ^a (%)	Blastocyst development rate (%)
30 μ sec	1.0 kv/cm	21/40 (52.5) ^{b,d}	10/21 (47.6) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	28/40 (70.0) ^{b,e}	18/28 (64.3) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	30/35 (85.7) ^{b,f}	22/30 (73.3) ^{c,f}
60 μ sec	1.0 kv/cm	21/34 (61.7) ^{b,d}	16/21 (76.2) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	30/38 (78.9) ^{b,e}	26/30 (86.7) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	31/35 (88.6) ^{b,f}	28/31 (90.3) ^{b,f}
90 μ sec	1.0 kv/cm	22/40 (55.0) ^{b,d}	14/22 (63.6) ^{c,d}
	1.5 kv/cm	19/40 (47.5) ^{b,e}	09/19 (47.4) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	12/35 (34.3) ^{b,f}	04/12 (33.3) ^{b,f}

^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer

^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)

^{d-f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (70.0% - 85.7%) diperoleh apabila embrio difusi pada perlakuan 1.5 - 2.0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec dan 78.9% - 88.6% pada perlakuan 1.5 - 2.0 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan embrio yang difusi

pada kekuatan d.c pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec memberikan hasil fusi yang rendah, masing-masing 55.0%, 47.5% dan 34.3%. Perkembangan embrio sampai tahap blastocyst paling tinggi (90.3%) pada blastomer yang difusi dengan perlakuan 2.0 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan yang paling rendah dan paling banyak terjadi kerusakan sel blastomer (lysis) terjadi pada perlakuan d.c pulse 2.0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec.

Hasil penelitian tersebut di atas memperlihatkan bahwa fusi sel blastomer dan perkembangan embrio sampai tahap blastocyst secara *in vitro* dari embrio tahap 2, 4, 8 dan 16-sel dengan perlakuan kekuatan dan waktu d.c pulse yang berbeda-beda memberikan hasil yang berbeda-beda pula. Hasil ini sama dengan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya seperti Taniguchi, dkk. 1991 menggunakan pasangan blastomer dari embrio mencit tahap 2 dan 4-sel. Ozil dan Modlinski, 1986 menggunakan embrio kelinci 2-sel dan Funahashi dan Niwa, 1990 menggunakan embrio tikus 2-sel. Telah diamati bahwa terjadi perbedaan angka fusi blastomer pada setiap tahap perkembangan embrio. Embrio tahap 2-sel, angka fusi terendah diperoleh pada perlakuan 1.0 - 2.0 kv/cm dan 30 μ sec. Ini memperlihatkan bahwa dengan d.c pulse ini kemungkinan waktu yang digunakan masih sangat singkat dan kekuatan d.c pulse lemah sehingga menyebabkan belum terjadi fusi yang sempurna. Berbeda dengan waktu 90 μ sec memperlihatkan angka fusi yang tinggi pada d.c pulse 1.0 - 2.0 kv/cm. Sedangkan pada embrio tahap 4-8 sel dengan perlakuan d.c pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm pada waktu yang sama yaitu 60 μ sec memberikan hasil yang tinggi. Ini menunjukkan bahwa embrio tahap 4-8 sel sudah sesuai dengan kondisi waktu 60 μ sec dibandingkan dengan waktu 30 μ sec dan 90 μ sec. Pada embrio tahap 16-sel, dengan perlakuan d.c pulse 1.0, 1.5 dan 2.0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec embrio banyak yang mengalami kerusakan sel (lysis) sehingga angka fusi dan perkembangan embrio menjadi rendah. Ini menunjukkan bahwa kekuatan d.c pulse sangat kuat dan waktu yang digunakan terlalu lama. Pada embrio tahap 16-sel bentuk sel blastomernya lebih kecil dibanding dengan embrio tahap 2 dan 4-8 sel sehingga sel blastomer 16 sel mudah mengalami kerusakan pada waktu dilakukan fusi.

Berdasarkan hasil tersebut diatas, bahwa terjadinya fusi blastomer adalah tergantung pada waktu, kekuatan d.c pulse dan tahap sel blastomer, hal ini sama dengan yang pernah dilaporkan oleh peneliti-peneliti sebelumnya (Taniguchi, dkk. 1990; Kubiak

dan Tarkowski, 1985). Apabila kekuatan dan waktu d.c pulse meningkat, menyebabkan kerusakan pada sel blastomer, sedangkan sebaliknya apabila kekuatan dan waktu d.c pulse terlalu rendah, kemungkinan tidak terjadi fusi. Oleh karena itu kondisi yang cocok merupakan faktor penting dalam melakukan fusi sel. Proses terjadinya fusi juga sangat ditentukan oleh struktur membran sel blastomer. Kondisi yang cocok untuk melakukan fusi pada blastomer tanpa zona pellucida berbeda dengan blastomer yang masih dilengkapi zona pellucida. Begitu juga tahap perkembangan embrio dan kondisi cytoplasma embrio. Oleh karena itu penting untuk melakukan penelitian terhadap fusi sel blastomer-cytoplasma, termasuk mengamati dari berbagai sumber cytoplasma yang digunakan.

Splitting Embrio. Sebanyak 64 embrio compact morula dan blastocyst dibelah dua menjadi 128 embrio paruh. Setelah dikultur pada media M16 + BSA selama 72 jam, tumbuh menjadi embrio paruh tahap expanded blastocyst sebesar 78,1%. Sedangkan embrio paruh, baik yang menggunakan zona pelusida (62 embrio paruh) dan tanpa zona pelusida (54 embrio paruh) setelah dikultur 48 jam tidak mengalami perkembangan (degenerasi).

Kriopreservasi Embrio. Daya tahan hidup dan perkembangan embrio beku setelah thawing dari berbagai tahap perkembangan embrio dan program pembekuan dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Daya tahan hidup embrio beku setelah thawing dari berbagai tahap perkembangan embrio dan program pembekuan

Tahap perkembangan embrio	Ethylene glycol (%)	Ethyleneglycol + Sucrose (%)	Glycerol + Sucrose(%)	Kontrol (Gly+Suc) (%)
Program Freezing I				
Kompak Morula	21/35(60,0)	10/19(52,6)	9/22(40,9)	30/42(71,4)
Blastosis	40/54(74,1)	13/29(44,8)	24/34(70,5)	23/34(67,6)
Jumlah	61/89(68,5) ^a	23/48(47,9) ^b	33/56(58,9) ^{ab}	53/74(71,6) ^a
Program Freezing II				
Kompak Morula	14/21(66,6)	14/23(60,9)	23/39(58,9)	63/74(85,1)
Blastosis	61/76(80,2)	29/61(47,5)	29/41(70,7)	52/58(89,6)
Jumlah	75/97(77,3) ^{ac}	43/84(51,2) ^{ab}	52/80(65,0) ^a	115/132(87,1) ^c

^{abc} yang berbeda pada lajur yang sama berbeda nyata X^2 ($P < 0,05$)

^{abc} yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata X^2 ($P < 0,05$)

Embrio yang dibekukan dalam media kontrol dengan menggunakan program freezer I (71,6%) memperlihatkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan media krioprotektan EG (68,5%), EG+SUC (47,9%) dan GLY+SUC (58,9%). Kontrol berbeda nyata baik dengan EG maupun GLY+SUC, tetapi kontrol dan EG berbeda nyata ($X^2; P < 0,05$) lebih tinggi dengan EG+SUC. Sedangkan EG+SUC tidak berbeda nyata dengan GLY+SUC. Pada program freezing kedua, embrio yang dibekukan dalam media kontrol juga memperlihatkan hasil yang lebih tinggi (87,1) dibandingkan dengan penggunaan media krioprotektan lainnya EG (77,3%), EG+SUC (51,2%) dan GLY+SUC (65,0%). Kontrol tidak berbeda nyata dengan EG, tetapi berbeda nyata dengan EG+SUC ($X^2; P < 0,05$) maupun GLY+SUC ($X^2; P < 0,05$). Sedangkan EG tidak berbeda nyata dengan EG+SUC maupun GLY+SUC, demikian juga EG+SUC terhadap GLY+SUC.

Pembekuan embrio menggunakan program freezing kedua memperlihatkan kecenderungan hasil yang lebih baik daripada program freezing pertama. Namun secara statistik hanya embrio yang dibekukan dengan media kontrol yang memberikan perbedaan yang nyata ($X^2; P < 0,05$).

D. Analisa Hormon Progesteron (P4) dan Estradiol (E2).

Hasil analisis hormon P4 dan E2 dapat dilihat pada Tabel 13 dan Tabel 14.

Kondisi sapi-sapi berbeda dari satu dengan yang lain. Sapi "Bule" mendapatkan inseminasi buatan (IB) pada tanggal 23/7/96 dan mengalami kebuntingan. Sapi "Jelita" dan "Irma" mendapatkan IB pada tanggal 24/8/96. "Irma" mengalami kebuntingan tetapi "Jelita" mengalami *estrus* pada tanggal 16/9/96. Sapi "Ireng" dalam keadaan *post-partus*. Sapi "Romeo" bunting delapan bulan pada awal percobaan dan melahirkan pada tanggal 26/9/96. Sedangkan sapi "Rosi" dalam keadaan bunting lima bulan pada awal penelitian.

Percobaan ini berhasil mengisolasi hormon-hormon P4 dan E2. Kelemahan dari percobaan adalah tiadanya pengulangan. Setiap sampel hanya dianalisa satu kali. Meskipun demikian, cara ini menjanjikan cara yang lebih murah dalam analisa hormon yang bisa dikaitkan pada program transfer embrio.

Tabel 13. Hasil TLC pada E2. (+) ada bercak hitam. (-) tidak ada bercak hitam

Tanggal	Bule	Ireng	Jelita	Irma	Romeo	Rosi
2/9	+	+	+	+	+	+
4/9	+	+	+	+	+	+
6/9	+	+	+	+	+	+
9/9	+	+	+	+	+	+
11/9	+	+	+	+	+	+
13/9	+	-	+	+	+	+
16/9	+	+	+	+	+	+
18/9	+	+	+	+	+	+
20/9	-	-	-	-	+	+
23/9	+	-	+	+	+	+
25/9	+	+	+	-	+	+
27/9	+	-	+	-	-	+
30/9	-	-	+	-	-	-

Tabel 14. Hasil TLC pada P4. (+) ada bercak hitam. (-) tidak ada bercak hitam.

Tanggal	Bule	Ireng	Jelita	Irma	Romeo	Rosi
2/9	+	+	+	+	+	+
4/9	+	+	+	+	+	+
6/9	+	+	+	+	+	+
9/9	+	+	+	+	+	+
11/9	+	+	+	+	+	+
13/9	+	-	+	+	+	+
16/9	+	+	+	+	+	+
18/9	+	+	+	+	+	+
20/9	-	-	-	-	+	+
23/9	+	-	+	+	+	+
25/9	+	+	+	-	+	+
27/9	+	-	+	-	-	+
30/9	-	-	+	-	-	-

Ekstrak yang telah dikumpulkan masih harus melalui spectrophometer untuk mengukur kadar P4 dan E2 dalam sampel. Hal ini bisa dilakukan dalam waktu singkat (kurang dari seminggu).

Transfer Embrio Sapi Perah. Jumlah embrio sapi perah dalam bentuk embrio Banpres yang ditransfer di Kabupaten Bandung dan Kabupaten Garut dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Jumlah embrio beku setelah thawing yang ditransfer di Kabupaten Bandung dan Kabupaten Garut

Lokasi	Jumlah Resipien (ekor)
Kab. Bandung	
KUD Cisarua	39
KUD Lembang	16
Kab. Garut	
KUD Cisarupan	11
KUD Bayombong	4
KUD Cikajang	2

KESIMPULAN

Pemberian hormon FSH (Ovagen) dengan pelarut 50% PVP dengan sekali penyuntikan secara sub cutan memberikan respons superovulasi yang sama dengan 8 kali penyuntikan pada sapi potong dan sapi perah. Penyimpanan ovari domba 8 dan 12 jam dalam media yang ditambahkan hormon masih memberikan tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* sekitar 39% dan 37%. Sedangkan oosit kambing yang maturasi selama 12 dan 26 jam tidak berbeda (50%), begitu juga oosit domba dapat dimaturasi dalam inkubator tanpa CO₂ dengan tingkat maturasi sekitar 30%. Splitting embrio sebaiknya dilakukan pada embrio tahap compact morula dan blastocyst. Kriopreservasi embrio tahap compact morula dan blastocyst menggunakan media 1,8M Ethylene glycol setelah thawing dan kultur selama 72 jam dapat berkembang sampai hatched blastocyst. Keberhasilan fusi sel untuk memproduksi hewan cloning ditentukan oleh tahapan sel blastomer, teknik dan alat yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bracket, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capasitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Byrd, S.R., G.Flores-Foxworth and M.E. Westhusin.1995.Normal ovine embryo development following *in vitro* oocyte maturation in a portable incubator in the absence of CO₂. *Theriogenology* 43.p.179 (Abstract).
- Funahashi, H. and K. Niwa. Electric fusion of 2-cell rat embryo blastomeres. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 36:114-119.
- Margawati, E.T., I. Supriatna, T.L. Yusuf, Y. Supriondo dan T. Hastuty. 1997. Maturasi oosit domba secara *in vitro* tanpa CO₂. (disampaikan pada *seminar PBI I di Surabaya*, in Press).
- Nagashima, K., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morula. *J. Reprod. Fert.* 70:357-362.
- Taniguchi, T., H.T. Cheong and H. Kanagawa. 1991. Fusion and development rates of single blastomere pairs of mouse two and four-cell embryos using the electrofusion method. *Theriogenology* 36(4):645-653.
- Tappa, B., E.M. Kaiin, S. Said and M. Soewecha. 1994. Respons of dairy cows treated with repeated superovulation and embryo recovery. *Proc. of the 7th AAAP Animal Science Congress*, Bali, Vol. III:19-20.
- Touchstone, J.C. (1986). Steroids. *Handbook of Chromatography*. eds.: Zweig, G. & Sherma, J. CRC Press, Inc. Boca Raton. FL.