

Penggunaan Medium CR1aa untuk Produksi Embrio Domba *In Vitro*

YULNAWATI¹, M. A. SETIADI² dan A. BOEDIONO³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, 16911

²Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Kampus Darmaga, Bogor, 16680

³Laboratorium Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Kampus Darmaga, Bogor, 16680

(Diterima dewan redaksi 20 Maret 2006)

ABSTRACT

YULNAWATI, M.A. SETIADI and A. BOEDIONO. 2006. The use of CR1aa for ovine *in vitro* embryo production. *JITV* 11(2): 131-136.

The aim of this study was to investigate the capacity of CR1aa as a simple medium for maturation, fertilization and culture of ovine embryo *in vitro*. Oocytes were collected by slicing method in Phosphate Buffer Saline (PBS) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS) and 100 IU/ml penicillin streptomycin. Oocytes were matured in Tissue Culture Medium (TCM)-199 as control or CR1aa as treatment medium. Both maturation medium were supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 10 IU/ml Follicle Stimulating Hormone (FSH), 10 IU/ml Luteinizing Hormone (LH), 1 µg/ml Estradiol and 100 IU/ml penicillin-streptomycin. Oocytes were incubated in 5% CO₂ incubator, 38°C for 24 h. Matured oocytes were fertilized in BO or CR1aa medium, supplemented with 2.5 mM caffeine benzoate and 20 µg/ml heparin. After 18 h *in vitro* fertilization, oocytes were cultured in TCM-199 or CR1aa medium, both supplemented with 5% FBS, 5 µg/ml insulin and 100 IU/ml penicillin streptomycin. Results showed that the highest maturation rate was found in TCM-199 medium (73.27%) and significantly different ($P<0.05$) from CR1aa (52.88%). Fertilization rate in CR1aa medium (67.59%) was higher ($P<0.05$) than in BO medium (52.94%). Furthermore, there was no significant difference ($P>0.05$) between cleavage rate of ovine embryos in TCM-199 and CR1aa medium (39.45% vs 50.94%). In conclusion, optimum result on ovine *in vitro* embryo production can be achieved from a combination of TCM-199 as maturation medium and CR1aa as fertilization and culture medium.

Key Words: CR1aa, TCM-199, Embryo, Ovine

ABSTRAK

YULNAWATI, M.A. SETIADI dan BOEDIONO. 2006. Penggunaan medium CR1aa untuk produksi embrio domba *in vitro*. *JITV* 11(2): 131-136.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui kemampuan CR1aa sebagai medium sederhana dalam proses pematangan, fertilisasi dan kultur embrio domba *in vitro*. Oosit dikoleksi dengan teknik penyayatan dalam medium *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 5% dan penisilin-streptomisin 100 IU/ml. Oosit dimatangkan dalam *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 sebagai kontrol atau CR1aa sebagai perlakuan. Kedalam masing-masing medium maturasi tersebut ditambahkan FBS 10%, *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) 10 IU/ml, *Luteinizing Hormone* (LH) 10 IU/ml, Estradiol 1 µg/ml and penisilin-streptomisin 100 IU/ml. Oosit matang selanjutnya difertilisasi dalam medium BO atau CR1aa yang disuplementasi dengan caffeine benzoate 2,5 mM dan heparin 20 µg/ml. Zigot dikultur dalam medium TCM-199 atau CR1aa yang disuplementasi dengan FBS 5%, insulin 5 µg/ml, penisilin-streptomisin 100 IU/ml. Hasil penelitian menunjukkan tingkat maturasi dari oosit yang dimatangkan dalam medium TCM-199 (73,27%) lebih tinggi ($P<0,05$) daripada CR1aa (52,88%). Tingkat fertilisasi dalam medium CR1aa (67,59%) lebih tinggi ($P<0,05$) daripada medium BO (52,94%). Tidak ada perbedaan nyata ($P>0,05$) dalam tingkat pembelahan embrio dalam medium TCM-199 maupun CR1aa (39,45% vs 50,94%). Dapat disimpulkan bahwa hasil yang optimal untuk produksi embrio domba *in vitro* diperoleh menggunakan kombinasi medium TCM-199 sebagai medium pematangan oosit dan CR1aa sebagai medium fertilisasi serta kultur embrio.

Kata Kunci: CR1aa, TCM-199, Embrio, Domba

PENDAHULUAN

Keberhasilan proses produksi embrio *in vitro* dipengaruhi oleh berbagai hal, seperti jenis medium yang digunakan pada tiap tahapan (maturasi, fertilisasi dan kultur), pH dan osmolaritas medium, serta lingkungan kultur yang meliputi suhu, kelembaban dan

keeseimbangan gas O₂ dan CO₂. Ada banyak jenis medium yang telah umum digunakan untuk produksi embrio. Medium komersial seperti *Tissue Culture Medium*-199 (TCM-199) merupakan salah satu contoh medium yang sering dipakai pada proses produksi embrio sapi (GANDHI *et al.*, 2000), babi (WANG *et al.*, 1997), domba (O'BRIEN *et al.*, 1996), kambing

(BOEDIONO *et al.*, 2000), manusia (ROBERTS *et al.*, 2002) dan kuda (SHABPAREH *et al.*, 1993). Komposisi bahan penyusun TCM-199 terdiri dari garam anorganik untuk mengatur osmolaritas medium, asam amino yang mendukung proses pematangan dan perkembangan sel oosit, vitamin, glukosa dan beberapa bahan lain yang mendukung proses pematangan inti oosit dan perkembangan embrio selanjutnya serta natrium bicarbonat yang akan mempertahankan derajat keasaman (pH) medium.

Charles Rosenkrans (CR) 1aa merupakan *semi defined medium* yang telah digunakan untuk embrio pada sapi (ROSENKRANS *et al.*, 1993; ROSENKRANS dan FIRST, 1994), oosit unta (ABDOON, 2000), oosit dan embrio kerbau (ABDOON *et al.*, 2001), embrio kucing (FAHRUDIN, 2001), oosit dan embrio kambing (RUSIYANTONO dan BOEDIONO, 2003). Komposisi medium CR1aa diketahui dengan jelas dan dapat dibuat sendiri. Hal tersebut akan memudahkan dan menurunkan biaya proses produksi embrio secara *in vitro*.

Medium CR1aa terdiri dari garam anorganik (NaCl, KCl), buffer (NaHCO₃) dan sumber energi yakni asam laktat, sodium piruvat dan glutamin serta asam amino esensial dan nonesensial yang diperlukan untuk pertumbuhan embrio (ROSENKRANS *et al.*, 1993; ROSENKRANS dan FIRST, 1994). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk membandingkan kemampuan medium alternatif CR1aa dengan TCM-199 dan BO sebagai medium standar yang telah umum digunakan sehingga diharapkan dapat menghasilkan suatu rekomendasi mengenai medium yang paling sesuai dan efisien untuk proses produksi embrio domba *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Pematangan oosit *in vitro*

Ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) ditempatkan dalam medium NaCl fisiologis dan dibawa ke laboratorium dalam waktu kurang dari tiga jam setelah pemotongan. Koleksi oosit dengan teknik *slicing* (pencacahan permukaan ovarium) menggunakan larutan *dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (dPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 5% dan penisilin-streptomisin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Selanjutnya oosit dimatangkan dalam medium TCM-199 (Sigma, USA) atau CR1aa yang disuplementasi dengan FBS 10%, *Follicle Stimulating Hormone* (FSH; Antrin[®], Denka Pharmaceutical Co., Kawasaki, Japan) 10 IU/ml, *Luteinizing Hormone* (LH; Chorulon[®], Intervet International B.V., Boxmer, Holland) 10 IU/ml, Estradiol (Estradiol Benzoate[®], Intervet International

B.V., Boxmer, Holland) 1 µg/ml dan penisilin-streptomisin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Pematangan oosit dilakukan dalam medium maturasi dalam bentuk drop masing-masing 50 µl untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral oil (Sigma, USA) dalam inkubator CO₂ 5%, 38°C selama 24 jam.

Kapasitasi spermatozoa dan fertilisasi *in vitro*

Sebanyak 0,5 ml semen yang berasal dari dua *straw* semen beku pejantan domba Garut yang sama *dithawing* dengan mencairkan semen beku dalam air bersuhu 37°C selama 30 detik. Selanjutnya semen disentrifugasi dua kali masing-masing 500G selama 5 menit dalam 3 ml medium kapasitasi spermatozoa yakni BO (BRACKETT dan OLIPHANT, 1975) atau CR1aa yang mengandung *caffeine benzoate* (Sigma, USA) 2,5 mM. Kemudian dilakukan *swim-up* untuk menyeleksi spermatozoa berdasarkan motilitasnya dalam inkubator CO₂ selama 60 menit. Spermatozoa yang terseleksi diencerkan dalam medium fertilisasi yang mengandung *caffeine benzoate* 2.5 mM dan heparin (Shimizu, Japan) 20 µg/ml. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan untuk keperluan IVF adalah sebesar 2x10⁶ spermatozoa/ml.

Spermatozoa disiapkan dalam bentuk drop masing-masing sebanyak 100 µl dalam cawan petri untuk 20-25 oosit dan ditutup dengan mineral oil (BOEDIONO *et al.*, 2003). Oosit yang telah dicuci dalam medium fertilisasi sebanyak dua kali untuk keperluan fertilisasi kemudian diekuilibrasi selama 30 menit sebelum IVF. Oosit kemudian dipindahkan ke dalam drop spermatozoa dan diinkubasi selama 18 jam dalam inkubator CO₂ 5%, 38°C.

Perkembangan embrio *in vitro*

Setelah 18 jam, oosit dicuci dalam medium kultur sebanyak dua kali dan dipindahkan ke dalam 100 µl medium kultur (TCM-199 atau CR1aa) yang disuplementasi dengan FBS 10%, insulin (Sigma, USA) 5 µg/ml dan penisilin-streptomisin 100 IU/ml. Perkembangan embrio diamati sampai hari kelima. Penggantian medium IVC dilakukan setiap 48 jam.

Evaluasi

Setelah 24 jam pematangan dan 18 jam fertilisasi *in vitro*, status inti oosit dievaluasi dengan cara melepaskan sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dengan bantuan enzim hyaluronidase (Sigma, USA) 0,25% dan dilanjutkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter 110-120 µm (yang sesuai dengan ukuran oosit). Oosit yang telah bebas dari sel kumulus diletakkan pada drop KCl 0,9% di atas kaca obyek, lalu difiksir dengan kaca penutup

yang memiliki bantalan parafin dan vaselin (1 : 9) di keempat sudutnya. Kaca obyek tersebut dimasukkan dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan etanol dengan perbandingan 1 : 3 selama 3 hari. Satu jam sebelum diwarnai, kaca objek direndam terlebih dahulu dalam larutan etanol absolut. Setelah itu preparat oosit diwarnai dengan aceto-orcein 2% selama 5 menit. Kemudian larutan pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi kaca penutup diberi larutan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi inti dengan mikroskop fase kontras.

Pada penelitian ini status inti oosit setelah pematangan dikelompokkan menjadi tiga tahap yaitu *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), *Metaphase I* (M I) dan *Metaphase II* (M II). GVBD ditandai dengan robeknya membran inti dan inti sudah tidak terlihat jelas, M I ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang ekuator serta M II (oosit matang) ditandai dengan adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap M I.

Proses fertilisasi yang diamati meliputi dekondensasi kepala spermatozoa dan pembentukan pronukleus (PN) jantan. Sel telur yang telah mengalami fertilisasi ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (jantan dan betina, 2 PN) atau lebih (>2PN) dalam sitoplasma sel telur. Tingkat fertilisasi merupakan perbandingan antara jumlah sel telur yang dibuahi (membentuk dua atau lebih pronukleus) dengan jumlah keseluruhan sel telur yang difertilisasi.

Tingkat pembelahan diperoleh dengan menghitung persentase jumlah zigot yang berhasil membelah dibandingkan dengan keseluruhan jumlah zigot yang dikultur. Sementara itu, tingkat perkembangan embrio diperoleh dengan menghitung jumlah embrio yang mencapai tahap 4 dan 8 sel serta morula dibandingkan dengan keseluruhan jumlah zigot yang membelah.

Analisis data

Jumlah oosit yang diamati pada setiap tahap (pematangan, fertilisasi dan kultur) berkisar antara 12-18 oosit untuk setiap kali ulangan dan masing-masing perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap masing-masing dua perlakuan dan tujuh

kali ulangan. Uji terhadap perbedaan perlakuan dilakukan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT; STEEL dan TORRIE, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat pematangan inti oosit

Hasil pematangan inti oosit domba *in vitro* dalam medium TCM-199 dan CR1aa terlihat pada Tabel 1. Oosit yang dimatangkan dalam medium TCM-199 mencapai tingkat pematangan yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan medium CR1aa. Oosit yang mencapai tahap metafase II setelah dimatangkan selama 24 jam dalam TCM-199 mencapai 73,27%, sedangkan dalam medium CR1aa hanya 52,88%. Hal ini diduga karena perbedaan komponen penyusun kedua jenis medium yang berpengaruh terhadap tekanan osmotik medium serta metabolisme sel secara keseluruhan.

Jumlah oosit yang tertahan pada fase GVBD dalam medium CR1aa lebih tinggi dan berbeda nyata dengan TCM-199 ($P<0,05$). Komposisi bahan penyusun TCM-199 sebagai medium komersial lebih kompleks karena terdiri dari sumber energi, garam anorganik, buffer, asam amino dan vitamin yang mendukung pematangan inti oosit secara *in vitro*. Oleh karena itu, kemungkinan proses metabolisme sel menjadi lebih optimal dan oosit dapat mencapai tahapan metafase II sebagai oosit matang, meskipun tidak diketahui secara pasti apakah keseluruhan komponen yang terdapat dalam TCM-199 tersebut dibutuhkan atau bahkan memberikan efek inhibitor pada konsentrasi tertentu (YANG *et al.*, 1995).

Pada pematangan oosit sapi *in vitro*, metabolisme piruvat, glutamin dan glycin meningkat secara nyata setelah 12-18 jam kultur. Disamping itu metabolisme glutamin semakin meningkat bersama dengan adanya suplementasi LH ke dalam medium (RIEGER, 1996). Kombinasi piruvat dan laktat dapat meningkatkan perkembangan embrio sapi *in vitro* (ROSENKRANS *et al.*, 1993). Tingkat kematangan inti dalam medium CR1aa dapat mencapai angka 52,88%, namun tidak cukup mampu mengimbangi kemampuan TCM-199 dalam mendukung pematangan inti oosit domba.

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit domba dalam medium TCM-199 dan CR1aa

Medium	Jumlah oosit	Status inti (%)			
		GVBD	M-I	M-II	TI
TCM-199	101	9 (8,91) ^b	17 (16,83) ^a	74 (73,27) ^a	1 (0,99) ^a
CR1aa	104	22 (21,15) ^a	25 (24,04) ^a	55 (52,88) ^b	2 (1,92) ^a

GVBD: *Germinal Vesicle Break Down* M-I : Metafase I M-II : Metafase II TI : Tidak teridentifikasi
Huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P<0,05$)

Tingkat pematangan oosit secara *in vitro* juga dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan. BILODEAU-GOESELS dan PANICH (2002) menyatakan persentase tingkat pembelahan sel yang berasal dari oosit yang memiliki lebih dari lima lapis sel kumulus secara signifikan mencapai angka yang lebih tinggi daripada tingkat pembelahan sel yang berasal dari oosit dengan lapisan sel kumulus kurang dari lima lapis, walaupun sitoplasmanya homogen. Keberadaan sel kumulus dapat mendukung pematangan oosit melalui zat metabolit yang dihasilkan dan disekresikan melalui mekanisme *gap junction* ke sel oosit. Ekspansi sel kumulus dapat didukung oleh penambahan sel granulosa dari folikel, walaupun menurut penelitian SETIADI (2002) tidak terdapat perbedaan nyata pada tingkat pematangan inti antara oosit yang dimatangkan dengan *co-culture* sel granulosa folikel dengan yang tidak. Pada penelitian ini sel-sel kumulus dalam medium TCM-199 dan CR1aa sama-sama mengalami ekspansi setelah 24 jam proses maturasi oosit.

Tingkat fertilisasi oosit

Oosit yang mencapai tingkat fertilisasi tertinggi diperoleh dari medium CR1aa dan berbeda nyata dengan medium BO ($P<0,05$) (Tabel 2). Oosit yang dapat membentuk 2 PN dalam medium CR1aa mencapai 65,74% sedangkan dalam medium BO adalah sebesar 50,98%. Perbedaan ini diduga karena adanya perbedaan komposisi bahan penyusun yang terkandung sehingga berpengaruh pada osmolaritas dari kedua jenis medium tersebut. Rata-rata osmolaritas medium yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebesar 320 mOsM untuk medium BO dan 282 mOsM untuk medium CR1aa. Osmolaritas medium CR1aa yang digunakan masih berada dalam kisaran normal (275-295 mOsM) untuk mendukung perkembangan embrio (GARDNER

dan LANE, 2000) dan lebih rendah daripada medium BO.

Tingkat fertilisasi oosit kambing dalam medium CR1aa adalah sebesar 54,5% (RUSIYANTONO dan BOEDIONO, 2003). Sementara itu, tingkat fertilisasi oosit domba dalam medium CR1aa yang dilaporkan oleh DJUWITA *et al.* (2005) adalah sebesar 84%. Perbedaan hasil yang diperoleh diduga akibat perbedaan jenis hewan dan spermatozoa yang digunakan. Dalam penelitian ini spermatozoa yang digunakan adalah spermatozoa domba Garut, sementara sel telur berasal dari bukan domba Garut sehingga terbentuk embrio yang hibrid.

Perkembangan embrio

Tingkat perkembangan embrio setelah mengalami pematangan dan fertilisasi *in vitro* terlihat pada Tabel 3. Kemampuan embrio berkembang dalam medium kultur ditunjukkan dengan kemampuan embrio membelah dan berkembang hingga tahap morula.

Oosit yang telah dimatangkan dalam medium TCM-199 dan difertilisasi dalam medium CR1aa selanjutnya dikultur dalam medium TCM-199 atau CR1aa. Tingkat pembelahan (embrio 2-8 sel) dan perkembangan embrio yang mencapai morula cenderung lebih tinggi dalam medium CR1aa daripada dalam medium TCM-199 ($P>0,05$). Hal ini diduga karena adanya kandungan glukosa sebanyak 1 g/l dalam TCM-199 yang dapat menghambat pertumbuhan embrio tahap awal. Glukosa lebih dibutuhkan selama perkembangan blastosis sedangkan piruvat digunakan oleh embrio selama tahap preimplantasi sebelum mencapai blastosis.

Kemampuan perkembangan embrio yang dikultur secara *in vitro* berbeda untuk setiap jenis hewan (BOEDIONO dan SUZUKI, 1996). Hal tersebut ditunjukkan dengan perbedaan tingkat pembelahan

Tabel 2. Tingkat fertilisasi oosit domba dalam medium BO dan CR1aa

Medium	Jumlah oosit	Status inti (%)				
		DK	1 PN	2 PN	> 2 PN	TF
BO	102	13 (12,75) ^a	15 (14,71) ^a	52 (50,98) ^b	2 (1,96) ^a	54 (52,94) ^b
CR1aa	108	7 (6,48) ^a	13 (12,04) ^a	71 (65,74) ^a	2 (1,85) ^a	73 (67,59) ^a

DK: Dekondensasi PN: Pronukleus TF: Tingkat Fertilisasi
Huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P<0,05$)

Tabel 3. Tahapan perkembangan embrio *in vitro* dalam medium TCM-199 dan CR1aa

Medium	Tingkat pembelahan sel (%)	Perkembangan embrio (%) mencapai tahap		
		4 sel	8 sel	Morula
TCM-199	43/109 (39,45) ^a	16/43 (37,21) ^a	12/43 (27,91) ^a	4/43 (9,30) ^a
CR1aa	54/106 (50,94) ^a	28/54 (51,85) ^a	17/54 (31,48) ^a	10/54 (18,52) ^a

Huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P<0,05$)

embrio dari berbagai spesies seperti kambing (RUSIYANTONO dan BOEDIONO, 2003), kerbau (ABDOON *et al.*, 2001) dan sapi (ROSENKRANS dan FIRST, 1994), meskipun dikultur dalam medium yang sama.

Perkembangan embrio sapi dan domba tahap awal sering terhenti pada tahap 8-16 sel. Hambatan perkembangan embrio *in vitro* merupakan suatu fenomena yang umum terjadi pada embrio dari berbagai spesies (PETTERS, 1992; BARNETT dan BAVISTER, 1993). Kejadian tersebut berhubungan dengan konsentrasi glukosa dalam medium. Salah satu upaya untuk mengatasinya adalah dengan *co-culture* menggunakan sel kumulus, sel oviduk dan sebagainya. Faktor biologis yang terdapat pada cairan sel *epithelial oviduct* diduga juga dapat mengatasi persoalan tersebut. Sistem *semi defined sequential media* dapat bekerja efektif seperti halnya menggunakan *co-culture* maupun media yang disuplementasi dengan serum (GANDHI *et al.*, 2000). Medium CR1aa tidak mengandung glukosa dan mengalami penambahan asam amino esensial dan nonesensial. Selama perkembangan dari tahap 8 sel menuju blastosis, asam amino nonesensial dan glutamin berfungsi untuk menstimulasi pembentukan blastosis dan *hatched* sementara asam amino esensial berguna untuk meningkatkan jumlah sel pada blastosis dan membantu proses diferensiasi sel membentuk *Inner Cell Mass/ICM* (STEEVES dan GARDNER, 1999). Oleh karena itu, diduga hal tersebut menjadi salah satu penyebab mengapa CR1aa dapat mendukung perkembangan embrio domba *in vitro* lebih baik daripada TCM-199.

Insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa sebagai sumber energi. Karena reseptor insulin baru muncul pada tahap 8 sel embrio rodensia maka penggunaan glukosa sebagai sumber energi utama juga baru akan efektif setelah 8 sel. Sebelumnya embrio akan menggunakan piruvat dan laktat sebagai sumber energi utama (SCHULTZ *et al.*, 1992).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa pemilihan jenis medium sangat mempengaruhi hasil yang diperoleh pada setiap tahapan produksi embrio domba *in vitro*. Medium maturasi oosit yang lebih baik untuk mendapatkan tingkat maturasi yang tinggi pada domba adalah TCM-199 ($P < 0,05$). Medium fertilisasi CR1aa yang disuplementasi dengan *caffeine benzoate* dan heparin terbukti menghasilkan tingkat fertilisasi yang lebih baik ($P < 0,05$) daripada medium BO. Untuk medium kultur embrio, CR1aa dan TCM-199 menunjukkan kemampuan yang sama dalam mencapai tingkat pembelahan dan perkembangan embrio ($P > 0,05$).

SARAN

Dari hasil penelitian disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh penambahan glukosa ke dalam medium alternatif CR1aa terhadap perkembangan embrio tahap lanjut (blastosis) dan pengaruhnya terhadap kemampuan hidup embrio untuk implantasi pada tubuh induk setelah proses embrio transfer.

DAFTAR PUSTAKA

- ABDOON, A.S.S., O.M. KANDIL, T. OTOI and T. SUZUKI. 2001. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotrophins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 65: 215-223.
- ABDOON, A.S.S. 2000. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 66: 71-79.
- BARNETT, D.K. and B.D. BAVISTER. 1996. What is relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 43: 105-133.
- BILODEAU-GOESSELS, S. and P. PANICH. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 71 (3-4): 143-155.
- BOEDIONO, A., T. SUZUKI and R. GODKE. 2003. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 1-11.
- BOEDIONO, A., Y. RUSIYANTONO, K. MOHAMAD, I. DJUWITA, and HERLIATIE. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Vet.* 7(4): 11-17.
- BOEDIONO, A. and T. SUZUKI. 1996. *In vitro* development of Holstein and Japanese Black breeds embryo. *Media Vet.* 3(1): 3-15.
- BRACKETT, B.G. and G. OLIPHANT. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
- DJUWITA, I., A. BOEDIONO, S. AGUNGPRIYONO, I. SUPRIATNA, M. TOELIHIRE and Y. SUKRA. 2005. *In vitro* fertilization and embryo development of vitrified ovine oocytes stressed in sucrose. *Hayati* 12: 73-76.
- FAHRUDIN, M. 2001. Studies on the Production of Embryo by Embryonic and Somatic Cells Nuclear Transfer in Bovine and Domestic Cat. Ph.D. Thesis. Yamaguchi University. Japan.
- GANDHI, A.P., M. LANE, D.K. GARDNER, R.I. KRISHER. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum. Reprod.* 15: 395-401.

- GARDNER, D.K. and M. LANE. 2000. Embryo culture systems. In: Handbook of *In Vitro* Fertilization. TROUNSON A.O. and DK. GARDNER. 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton.
- JASWANDI. 2002. Penggunaan Hepes dan Butiran Efervesen Dalam Sistim Inkubasi pada Produksi Embrio Domba secara *In Vitro*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- JASWANDI, A. BOEDIONO and M.A. SETIADI. 2001. *In vitro* maturation and fertilization of ovine oocytes in system with absence of 5% CO₂. *Reprotech* 1 (1): 19-22.
- O'BRIEN, J.K., S.I. CATT, K.A. IRELAND, W.M.C. MAXWELL and G. EVANS. 1996. *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 47: 1433-1443.
- PETTERS, R.M. 1992. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 415-421.
- RIEGER, D. 1996. The metabolic activity of cattle oocytes and early embryos. *J. Reprod. Dev.* 42 (Suppl): 85-89.
- ROBERTS, R., S. FRANKS and K. HARDY. 2002. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum. Reprod.* 17: 2950-2956.
- ROSENKRANS, C.F. and N.L. FIRST. 1994. Effects of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72: 434-437.
- ROSENKRANS, C.F., G.Q. ZENG, G.T. MCNAMARA, P.K. SCHOFF and N.L. FIRST. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49: 459-462.
- RUSIY ANTONO, Y. and A. BOEDIONO. 2003. The effectivity of CR1aa medium on *in vitro* maturation, fertilization and early embryo development of goat oocyte. *Indones. J. Biotechnol.* June: 621-626.
- SCHULTZ, G.A., A. HOGAN, A.J. WATSO, R.M. SMITH and S. HEYNER. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: Temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 4: 361-371.
- SETIADI, M.A. 2002. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes *in vitro*. *Reprotech* 1(2): 87-91.
- SHABPAREH, V., E.L. SQUIRES, G.E. SEIDEL JR. and D.J. JASKO. 1993. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 40: 1161-1175.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- STEEVES, T.E. and D.K. GARDNER. 1999. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 61: 731-740.
- WANG, W.H., L.R. ABEYDEERA, T.C. CANTLEY and B.N. DAY. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 111: 101-108.
- YANG, B.K, GILES JR, X. YANG and R.H. FOOTE. 1995. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes in a simple defined (KSOM) medium. *J. Reprod. Dev.* 41: 213-218.