

# Viabilitas Demi Embrio Sapi *In Vitro* Hasil *Splitting* Embrio Segar dan Beku

M. IMRON<sup>1</sup>, A. BOEDIONO<sup>2</sup> dan I. SUPRIATNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Embrio Ternak Cipelang, PO Box 485 Bogor 16004  
Email: imron@deptan.go.id

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

(Diterima dewan redaksi 11 Maret 2007)

## ABSTRACT

IMRON, M., A. BOEDIONO and I. SUPRIATNA. 2007. Viability of bovine demi embryo after splitting of fresh and frozen thawed embryo derived from *in vitro* embryo production. *JITV* 12(2): 118-123.

*In vivo* embryo production was limited by number of donor, wide variability respond due to superovulation program and also immunoactifity of superovulation hormone (FSH). Splitting technology could be an alternative to increase the number of transferrable embryos into recipien cows. Splitting is done with cutting embryo becoming two equal pieces (called demi embryo) base on ICM orientation. The objective of this research was to determine the viability of demi embryo obtained from embryo splitting of fresh and frozen thawed embryo. The results showed that demi embryos which performed blastocoel reexpansion 3 hours after embryo splitting using fresh and frozen thawed embryos were 76.9 and 76.2% respectively. Base on existention of inner cell mass (ICM), the number of demi embryos developed with ICM from fresh and frozen thawed embryos were not significantly different (90.6 and 85.7% respectively). The cell number of demi embryo from fresh embryos splitting was not different compared with those from frozen thawed embryos (36.1 and 35.9 respectively). These finding indicated that embryo splitting can be applied to frozen thawed embryos with certain condition as well as fresh embryos.

**Key Words:** *In Vitro* Embryo, Splitting, Demi Embryo, Cell Number

## ABSTRAK

IMRON, M., A. BOEDIONO dan I. SUPRIATNA. 2007. Viabilitas demi embrio sapi *in vitro* hasil splitting embrio segar dan beku. *JITV* 12(2): 118-123.

Produksi embrio *in vivo* ternak sapi dipengaruhi antara lain oleh respon sapi donor terhadap program superovulasi yang sangat bervariasi, immunoaktifitas hormon superovulasi (FSH) serta keterbatasan jumlah sapi donor. Teknologi *splitting* embrio diharapkan dapat menjadi alternatif untuk optimalisasi penambahan jumlah embrio yang dapat ditransfer ke resipien per embrio utuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan viabilitas demi embrio yang dihasilkan setelah proses *splitting* menggunakan embrio *in vitro* segar dan beku. Splitting embrio dilakukan dengan membelah embrio menjadi dua bagian yang sama (demi embrio) dengan mempertimbangkan keberadaan ICM. Setelah dilakukan *splitting* embrio diperoleh hasil bahwa demi embrio yang menunjukkan adanya reekspansi blastosol tiga jam setelah *splitting* menggunakan embrio segar dan beku tidak berbeda nyata (76,9 dan 76,2%). Berdasarkan keberadaan *inner cell mass* (ICM), jumlah demi embrio yang positif memiliki ICM untuk embrio segar dan beku tidak berbeda nyata (90,6 dan 85,7%). Demikian juga dengan rata-rata jumlah sel demi embrio segar dan beku (36,1 dan 35,9) tidak berbeda nyata. Hasil ini mengindikasikan bahwa *splitting* embrio dapat dilakukan pada embrio beku yang memiliki kriteria tertentu dengan kualitas hasil setara dengan embrio segar.

**Kata Kunci:** Embrio *In Vitro*, *Splitting* Embrio, Demi Embrio, Jumlah Sel

## PENDAHULUAN

Aplikasi bioteknologi reproduksi pada ternak sapi di Indonesia dalam beberapa dekade terakhir telah menunjukkan perkembangan yang cukup pesat. Hal ini dimulai dengan penerapan teknologi inseminasi buatan (IB) sekitar tahun 1970-an yang ditandai dengan didirikannya Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. Aplikasi transfer embrio (TE) pada sapi mulai dilaksanakan diawal dekade 90-an yang ditandai dengan didirikannya Balai Embrio Ternak (BET) di Desa Cipelang, Bogor. Teknologi TE memberikan keunggulan lebih dibandingkan dengan IB karena peningkatan kualitas genetik dapat didekati baik dari

sisi pejantan maupun dari sisi betinanya sehingga percepatan mutu genetik ternak dapat dilakukan secara lebih efisien.

Produksi embrio sapi secara *in vivo* banyak menemui kendala antara lain karena respon sapi donor terhadap program superovulasi sangat bervariasi, keterbatasan jumlah sapi donor dan immunoaktifitas hormon superovulasi (FSH) yang tidak stabil sehingga jumlah produksi embrio *in vivo* sulit dibuat target yang pasti (ANONIMOUS, 2006; GONG *et al.*, 1993; KELLER dan TEEPKE, 1990; KANITZ *et al.*, 2003). Alternatif lain untuk produksi embrio yang dapat dilakukan yaitu dengan memproduksi embrio *in vitro* (IVF). Tetapi karena oosit yang digunakan untuk IVF berasal dari

Rumah Pemotongan Hewan yang tidak jelas tetuanya, mutu genetik embrio *in vitro* tidak dapat dipertanggungjawabkan sehingga pedet yang dihasilkan dari embrio *in vitro* tidak dapat digunakan sebagai bibit dasar.

Teknologi lain yang dapat digunakan untuk optimalisasi produksi embrio adalah dengan teknik *splitting* yaitu memotong embrio menjadi dua bagian yang sama. Potongan embrio yang dihasilkan dalam proses *splitting* selanjutnya disebut "demi embrio". Teknik *splitting* embrio dilaporkan telah dilakukan pada ternak domba (WILLADSEN, 1979), kambing (UDY, 1987; NOWSHARI dan HOLTZ, 1993; BOEDIONO *et al.*, 2005) dan ternak sapi (UTSUMI dan IRITANI, 1990; LOPEZ *et al.*, 2001, HOZUMI, 2001; NORMAN *et al.*, 2002).

Dengan melakukan *splitting* pada embrio, diharapkan akan mampu meningkatkan jumlah embrio yang dapat ditransfer kepada sapi resipien sehingga pada akhirnya akan meningkatkan persentase kebuntingan per embrio utuh yang dihasilkan. Namun karena untuk efisiensi teknis sebagian besar embrio yang diproduksi disimpan dalam bentuk embrio beku (ANONIMOUS, 2006), perlu dikaji apakah embrio beku masih memungkinkan untuk dilakukan *splitting*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan viabilitas demi embrio hasil *splitting* menggunakan embrio *in vitro* segar dan beku.

**MATERI DAN METODE**

**Produksi embrio *in vitro***

Ovarium yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) terdekat. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam media NaCl fisiologis yang disuplementasi antibiotik pada suhu kamar. Aspirasi dilakukan pada folikel antral yang berdiameter 2-5 mm menggunakan jarum suntik 18 G. Oosit ditampung dalam cawan petri yang berisi mPBS dan kemudian dimaturasi menggunakan medium TCM 199 dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 20-22 jam.

Sperma yang digunakan untuk fertilisasi adalah sperma beku yang dicairkan dalam air yang bersuhu 30-35°C. Sperma dicuci dengan medium BO dan disentrifuse dengan kecepatan 500 G selama 5 menit.

Kepadatan populasi sperma diatur pada konsentrasi 5 x 10<sup>6</sup> sperma/ml. Fertilisasi dilakukan dengan mentransfer oosit yang telah dimaturasi kedalam drop sperma (50 µl) sebanyak 10 oosit per drop.

Setelah campuran sperma-oosit diinkubasi sekitar 5 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, oosit dicuci dan dikultur lebih lanjut menggunakan medium CR1aa (10 embrio per 50 µL drop) dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 38,5°C. Embrio yang digunakan lebih lanjut dalam penelitian ini adalah embrio yang mencapai tahap blastosis lanjut pada hari ke- 7, 8 atau 9, dan mempunyai bentuk morfologi yang baik dengan ciri-ciri: 1). Bentuk bulat oval (*spherical*); 2). Rongga blastosol terbentuk dengan baik, jelas dan menempati lebih dari 60% volume total blastosis; 3). Sel-sel blastosis berkembang baik dengan jumlah sel degenerasi maksimal 10%; 4). Bentuk dan posisi *inner cell mass* (ICM) jelas, normal dan berkembang baik (LINARES dan KING, 1980).

**Pembekuan dan pencairan embrio**

Pembekuan embrio dilakukan dengan menggunakan prosedur vitrifikasi standar Balai Embrio Ternak. Embrio diekuilibrasi dalam 3 macam media vitrifikasi (Tabel 1). Equilibrase dilakukan pada suhu ruang (22°C) masing-masing selama lima menit dalam media pembekuan VS 1 dan VS 2. Setelah itu embrio diekuilibrasi dalam VS 3 dan dimasukkan dalam straw yang sebelumnya telah diisi dengan media mPBS yang mengandung sukrose 0,5 M. Proses equilibrase dalam VS 3 sampai ke tahap pencelupan straw kedalam nitrogen cair dilakukan dalam waktu kurang dari satu menit.

Pencairan (*warming*) embrio dilakukan dengan cara mengeluarkan straw dari dalam nitrogen cair, dibiarkan dalam udara terbuka selama 5-6 detik dan kemudian dicelupkan kedalam air pada suhu ruang (22°C). Isi straw ditampung dalam cawan petri, kemudian dilakukan pencarian embrio dibawah mikroskop. Embrio segera dipindahkan ke media mPBS yang mengandung berturut-turut 0,5 M dan 0,25 M sukrose masing-masing selama 5 menit. Setelah itu embrio dicuci menggunakan mPBS dan media kultur CR1aa. Akhirnya embrio dikultur lebih lanjut dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 38,5°C.

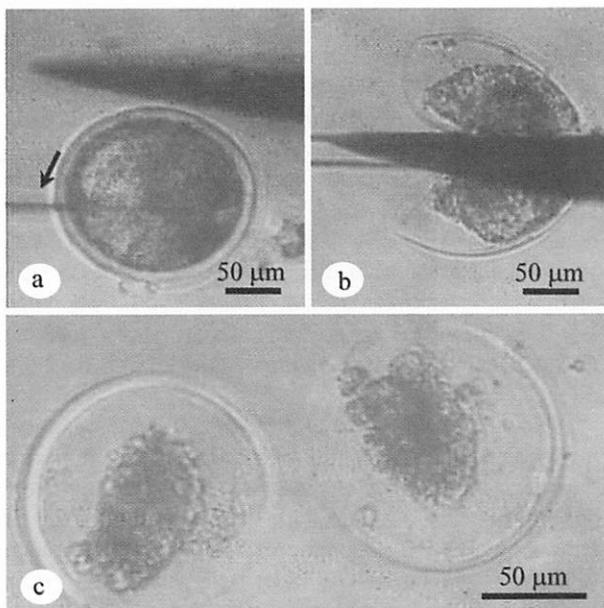
Tabel 1. Komposisi media vitrifikasi yang digunakan untuk pembekuan embrio

Media	Glycerol (%)	Etilen glikol (%)	Sukrose (M)	Xylose (M)	Poly etilen glikol (%)
VS 1	10	-	0.1	0,1	1
VS 2	10	10	0.2	0,2	2
VS 3	10	30	0.3	0,3	3

Embrio beku yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut: 1) terdapat pertambahan ukuran diameter embrio; 2) terjadi reekspansi blastosol; 3) terbentuknya kembali ICM dan trophoblas.

### Splitting embrio

Embrio yang digunakan untuk *splitting* yaitu: 1) embrio sapi *in vitro* segar; 2) embrio *in vitro* beku yang telah dicairkan, dikultur selama 24 jam dan hanya embrio-embrio viable yang digunakan sebagai materi penelitian. *Splitting* embrio dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan oleh BOEDIONO (2005) (Gambar 1). Demi embrio hasil *splitting* dicuci dengan media kultur CR1aa dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 38,5°C. Pengamatan dilakukan terhadap morfologi demi embrio yaitu bentuk embrio, keberadaan ICM, trofoblas, reekspansi blastosol dan jumlah sel hidup selama 3 jam setelah proses *splitting*.



**Gambar 1.** Tahapan proses *splitting* embrio. a) Goresan kecil pada dasar cawan petri (tanda panah); b) *Splitting* embrio; c) Demi embrio sesaat setelah *splitting*.

### Analisa statistik

Data dianalisa dengan menggunakan dasar rancangan acak lengkap (RAL). Perbedaan hasil antar perlakuan diuji secara deskriptif (HOSHMAND, 1998) menggunakan software statistika Minitab<sup>TM</sup> Release 13.20.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan *splitting* embrio dengan menggunakan embrio segar dan beku disajikan pada Tabel 2. Dari 23 embrio beku dan 21 embrio segar yang di-*splitting*, jumlah demi embrio yang dihasilkan berturut-turut adalah 43 (93,5%) dan 39 (92,5%). Jumlah demi embrio beku yang berkembang dan mengalami reekspansi blastosol tiga jam setelah *splitting* adalah 35 buah (76,1%). Hasil *splitting* ini hampir sama dibandingkan dengan jika *splitting* menggunakan embrio segar yang menghasilkan demi embrio sebanyak 32 (76,2%) buah (Tabel 2).

Perbandingan morfologis demi embrio sesaat setelah *splitting* dan 3 jam setelah *splitting* dapat dilihat pada Gambar 2. Demi embrio sesaat setelah *splitting* bentuknya lonjong karena pengaruh tekanan *pisau mikro* pada saat memotong embrio (Gambar 2 bagian a). Tiga jam setelah proses *splitting*, demi embrio telah mengalami perkembangan secara morfologis yaitu terjadi reekspansi blastosol dengan membentuk kembali ICM dan trofoblas. Selain itu bentuk demi embrio menjadi bulat kembali dan tidak lonjong (Gambar 2 bagian b). Demi embrio yang mengalami degenerasi atau rusak dapat dibedakan secara jelas dibandingkan demi embrio yang hidup tiga jam setelah *splitting* karena sel-sel pada demi embrio yang rusak akan saling terlepas dan menyebar di dasar cawan petri.

Morfologi demi embrio setelah tiga jam tidak banyak mengalami perubahan jika kultur dilanjutkan 3 sampai 24 jam. Jika kultur dilanjutkan lebih dari 24 jam, sel-sel demi embrio akan menempel pada dasar cawan petri kultur dan menyatu dengan lapisan sel-sel kumulus yang digunakan sebagai kokultur dalam media kultur sehingga menyulitkan dalam proses pemindahan demi embrio. Hasil ini menyarankan bahwa kultur selama 3 jam dianggap cukup untuk memastikan bahwa demi embrio telah berkembang secara normal, *viabel* dan siap untuk ditransfer ke sapi resipien. BOEDIONO (2005) melaporkan bahwa demi embrio yang dihasilkan dalam *splitting* pada embrio kambing setelah kultur selama 3-24 jam menunjukkan terbentuknya ICM dan trofoblas yang secara jelas dapat dibedakan.

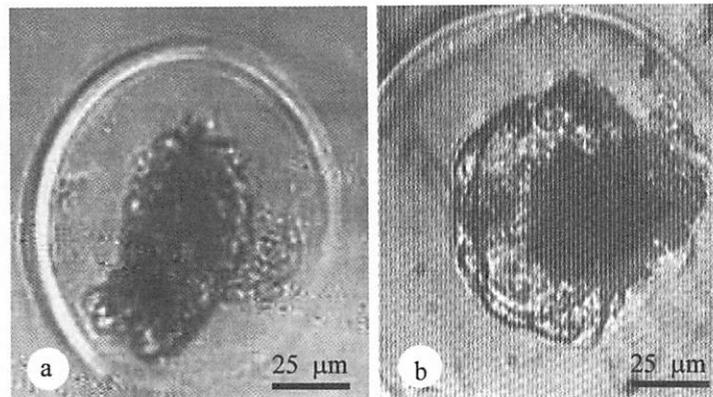
Keberhasilan *splitting* embrio dengan ICM sebagai orientasi menggunakan embrio beku dan embrio segar berturut-turut adalah 30 (85,7%) dan 29 (90,6%) (Tabel 3). Terlihat bahwa keberhasilan *splitting* menggunakan embrio beku adalah hampir sama dibandingkan dengan embrio segar. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh NOWSHARI dan HOLTZ (1993) yang menyatakan bahwa viabilitas demi embrio segar pada kambing nyata lebih tinggi dibandingkan dengan demi embrio beku. Perbedaan hasil ini kemungkinan diakibatkan oleh perbedaan perlakuan dimana

**Tabel 2.** Keberhasilan *splitting* embrio sapi *in vitro* didasarkan pada reekspansi blastosol dengan menggunakan embrio segar dan beku

Jenis embrio	Jumlah embrio utuh	Jumlah demi embrio (%) <sup>1</sup>	Reekspansi Blastosol (%) <sup>1,2</sup>
Embrio beku	23	43 (93,5)	35 (76,1)
Embrio segar	21	39 (92,9)	32 (76,2)
Total	44	82 (93,2)	67 (76,1)

<sup>1</sup>) Persentase berdasarkan jumlah demi embrio yang seharusnya dihasilkan setelah embrio utuh di-*splitting* (dua kali jumlah embrio utuh)

<sup>2</sup>) Pengamatan yang dilakukan tiga jam setelah *splitting*



**Gambar 2.** Morfologi demi embrio: (a) Sesaat setelah *splitting*; (b) Tiga jam setelah *splitting* dalam kultur *in vitro*

NOWSHARI dan HOLTZ membekukan demi embrio setelah *splitting*, sedangkan dalam penelitian ini pembekuan dilakukan sebelum *splitting* sehingga hasil yang diperoleh berbeda.

**Tabel 3** Keberhasilan *splitting* embrio hasil produksi *in vitro* dengan ICM sebagai orientasi

Jenis embrio	Jumlah demi embrio	Keberadaan ICM (%)
Embrio beku	35	30 (85,7)
Embrio segar	32	29 (90,6)
Total	67	59 (88,1)

Dari sisi produksi embrio, *splitting* embrio mampu meningkatkan jumlah embrio yang diproduksi per embrio utuh awal yang dihasilkan. Persentase keberhasilan *splitting* pada embrio beku mencapai 130,4%, sedangkan persentase keberhasilan *splitting* pada embrio segar menghasilkan 138,1% (Tabel 4). Artinya terdapat penambahan embrio yang *viabile* sekitar 30% terhadap total produksi embrio, jika dilakukan proses *splitting* pada embrio utuh segar maupun beku. LOPEZ *et al.* (2001) menyatakan bahwa meskipun *splitting* embrio akan sedikit menurunkan

viabilitas embrio, tetapi tingkat keberhasilan transfer embrio akan meningkat karena jumlah embrio yang dihasilkan menjadi dua kali lebih banyak. Persentase keberhasilan *splitting* embrio diduga akan lebih tinggi jika embrio yang digunakan untuk *splitting* berasal dari embrio yang diproduksi secara *in vivo*. HASLER (1992).

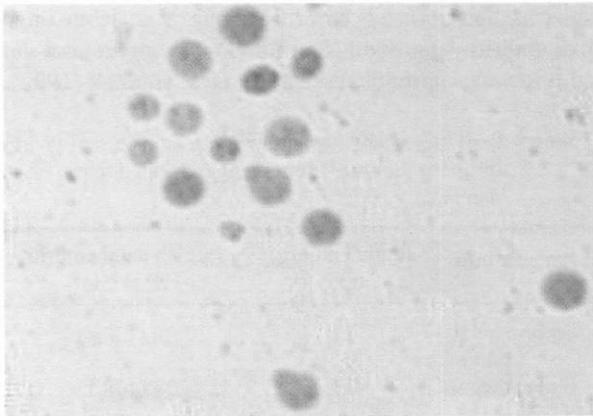
**Tabel 4** Persentase keberhasilan *splitting* embrio sapi *in vitro* terhadap embrio utuh menggunakan embrio segar dan beku

Jenis embrio	Jumlah embrio utuh	Jumlah demi embrio <i>viabile</i> (%)*
Embrio beku	23	30 (130,4)
Embrio segar	21	29 (138,1)
Total	44	59 (134,1)

\*Persentase dihitung berdasarkan embrio utuh

melaporkan keberhasilan *splitting* embrio adalah satu sampai satu setengah kali (50-100%) kebuntingan per embrio utuh menggunakan embrio *in vivo*. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan data yang diperoleh dalam penelitian ini dimana *splitting* menggunakan embrio *in vitro*. Beberapa penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa kualitas dan viabilitas embrio sapi

yang diproduksi secara *in vivo* lebih baik dibandingkan dengan embrio yang diproduksi secara *in vitro* (CROSIER *et al.* 2000; MCEVOY *et al.* 2001; GREVE 2002), sehingga embrio *in vivo* akan lebih tahan dan memiliki daya hidup lebih tinggi terhadap perlakuan *splitting* dibandingkan dengan embrio *in vitro*. Penghitungan jumlah sel dilakukan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel embrio sebelum (embrio utuh) dan setelah *splitting* (demi embrio). Sel-sel yang dihitung adalah sel yang mempunyai bentuk bulat atau lonjong dengan membran sel yang masih utuh (Gambar 3). Sel-sel embrio yang degenerasi/mati akan hancur dan terlihat seperti *debris* (kotoran) dalam pewarnaan Giemsa. Rataan jumlah sel embrio utuh embrio segar ( $81,9 \pm 19,3$ ) tidak berbeda nyata dibandingkan dengan jumlah sel embrio beku ( $80,7 \pm 14,0$ ). LINARES dan KING (1980) menyatakan bahwa embrio tahap blastosis yang mempunyai kualitas baik minimal mempunyai sel lebih dari 70 buah. Peneliti lain melaporkan bahwa jumlah sel embrio bervariasi antara 70-136 sel (IWASAKI *et al.*, 1980; SUZUKI *et al.*, 1999). Perbedaan ini umumnya diakibatkan perbedaan proses produksi embrio *in vitro* pada masing-masing laboratorium, mulai dari seleksi oosit sampai pada berbagai jenis media dan suplemen yang digunakan. Sementara itu, jumlah sel untuk demi embrio beku ( $35,9 \pm 7,3$ ) tidak berbeda nyata dengan demi embrio dari embrio segar ( $36,1 \pm 8,9$ ). Secara umum rata-rata jumlah sel demi embrio kurang dari setengah jumlah sel embrio utuh karena adanya kerusakan sel saat dilakukan *splitting* embrio.



Gambar 3. Bentuk sel-sel embrio *viable* dalam satu bidang pandang mikroskop

### KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah bahwa *splitting* embrio merupakan metode alternatif yang dapat dilakukan untuk memperbanyak jumlah embrio yang dapat ditransfer. Embrio beku

memiliki potensi dan kualitas yang sebanding dengan embrio segar untuk dilakukan *splitting* jika telah dikultur dan diseleksi secara morfologi. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat kebuntingan dari transfer demi embrio segar maupun beku akan sangat berguna dalam menilai efisiensi aplikasi *splitting* embrio di tingkat lapang.

### DAFTAR PUSTAKA

- ANONIMOUS. 2006. Laporan Tahunan. Balai Embrio Ternak Cipelang. Bogor.
- BOEDIONO, A. 2005. Produksi embrio kembar identik melalui bedah mikro pada embrio kambing hasil *in vitro*. *J. Vet.* 6: 39-46.
- CROSIER, A.E., P.W. FARIN, M.J. DYKSTRA, J.E. ALEXANDER and C.E. FARIN. 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62: 1459-1465.
- GONG, J.G., T.A. BRAMLEY, I. WILMULF and R. WEBB. 1993. Effect of Recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.* 48: 1141-1149.
- GREVE, T. 2002. Cattle eggs *in vitro* and *in vivo*: What have we learned? Convention Proceedings. Quebec City, August 23-25, 2002. Canadian Embryo Transfer Association. Canada. pp. 28-29.
- HASLER, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75: 2857-2879.
- HOSHMAND, A.R. 1998. Statistical methods for environmental and agricultural sciences. Ed ke-2. New York: CRC Press.
- HOZUMI, T. 2001. Reproductive biology and biotechnology. Indonesia: JICA.
- IWASAKI, S., N. YOSHIBA, H. USHJIMA, S. WATANABE and T. NAKAHARA. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocyst fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.* 90: 279-284.
- KANITZ, W., F. BECKER, F. SCHENEIDER, E. KANITZ, C.LEIDING, H.P. NOHNER and R. POHLAND. 2003. Superovulation in Cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 587-599.
- KELLER, D.S. and G. TEEPKE. 1990. Effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *J. Dairy Sci.* 73: 549-554.
- LINARES, T. dan W.A. KING. 1980. Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology* 14: 123-133.
- LOPEZ, R.F.F., F. FOREL, A.T.D. OLIVIERA and J.L. RODRIGUES. 2001. Splitting and biopsy for bovine

- sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.
- MCEVOY, T.G., J. JOHN, ROBINSON and D.S. KEVIN. 2001. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction* 122: 507-518.
- NORMAN, H.D., T.J. LAWLOR and J.R. WRIGHT. 2002. Performance of holstein clones in the United States. Board on Agriculture and Natural Resources. National Research Council Online: [http://www.nationalacademies.org/banr/Animal biotechnology.html](http://www.nationalacademies.org/banr/Animal_biotechnology.html). (5 Juni 2004)
- NOWSHARI, M.A. and W. HOLTZ. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *J. Anim. Sci.* 71: 3403-3408.
- SUZUKI, T., C. SUMANTRI, KHAN NHA, M. MURAKAMI and S. SAHA. 1999. Development of simple portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 149-157.
- UDY, G.B. 1987. Commercial splitting of goat embryos. *Theriogenology* 28: 837-842.
- UTSUMI, K. dan A. IRITANI. 1990. Production of cattle identical twins by splitting blastocysts using a metal microblade. *Theriogenology* 33: 341.
- WILLADSEN, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298-300.