

Pengaruh Serum Domba Estrus dan Serum Domba Bunting terhadap Produksi Embrio Domba *In Vitro*

J. WATTIMENA

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura,
Jln. Ir. M. Putuhena Kampus Poka-Ambon 97233, Tel. 0911-315984

(Diterima Dewan Redaksi 5 Oktober 2005)

ABSTRACT

WATTIMENA, J. 2006. The effect of estrus and pregnant sheep serum on *in vitro* ovine embryo production. *JITV* 11(2): 116-122.

The aim of this research is to observe the influence of estrus sheep serum (ESS) and pregnant sheep serum (PSS) on *in vitro* ovine embryo development. The research was carried out in Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran university. Oocyte and ovary of local sheep were collected from slaughter house. Maturation, fertilization and embryo culture media were supplemented with 10, 15 and 20% ESS or PSS respectively. Results show that supplementation of 20% ESS had significantly ($P<0.05$) better maturation rate than those of 10-20% PSS (79.98% vs 58.89-68.97%). However, increasing ESS into 15-20% did not affect the maturation rate (71.86-74.98%). Therefore, 10% estrus sheep serum (ESS) can be used as an alternative serum in the ovine maturation media. The supplementation of ESS or PSS did not significantly increase the fertilization rate and *in vitro* ovine embryo development, however, it was suggested to add 10% pregnant sheep serum (PSS) at *in vitro* ovine embryo culture.

Key Words: Serum, Sheep, Maturation, Fertilization, Embryo

ABSTRAK

WATTIMENA, J. 2006. Pengaruh serum domba estrus dan serum domba bunting terhadap produksi embrio domba *in vitro*. *JITV* 11(2): 116-122.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh serum domba estrus (ESS) dan serum domba bunting (PSS) terhadap tingkat perkembangan embrio domba *in vitro*. Penelitian dilakukan di laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Materi penelitian menggunakan oosit domba lokal yang dikoleksi dari ovarium domba dari rumah potong hewan (RPH). Media maturasi, fertilisasi, dan kultur embrio disuplementasi dengan ESS atau masing-masing sebanyak 10, 15, atau 20%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ESS 20% nyata ($P<0,05$) lebih baik daripada PSS 10-15% (79,98% vs 58,89-68,97%), tetapi tidak berbeda nyata dengan ESS 10-15% (71,86-74,98%). Serum domba estrus (ESS) dapat digunakan sebagai serum alternatif untuk pada proses pematangan oosit domba. Perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap tingkat fertilisasi dan tingkat perkembangan embrio domba *in vitro*, tetapi dari hasil penelitian disarankan untuk menggunakan serum domba bunting konsentrasi 10% pada proses kultur perkembangan embrio domba.

Kata Kunci: Serum, Domba, Maturasi, Fertilisasi, Embrio

PENDAHULUAN

Perkembangan dan kehidupan embrio dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain temperatur, cahaya, pH, *osmolarity* media, konsentrasi ion-ion, sumber energi, gas-gas, kualitas air, tempat kultur, faktor-faktor pertumbuhan dan serum (BAVISTER disitasi PETERS, 1992). Serum dalam media kultur memiliki peran yaitu (1) mengurangi keracunan embrio dari bahan-bahan yang terkandung di dalam media atau produk hasil metabolisme embrio, (2) sebagai sumber nutrisi bagi perkembangan awal embrio, (3) sebagai sumber faktor-faktor pertumbuhan dalam menstimulasi perkembangan embrio secara langsung ataupun tidak langsung melalui proliferasi sel-sel kumulus, dan (4) memperlunak zona pelusida pada proses fertilisasi (ECKERT dan NIEMANN,

1994; BAVISTER, 1995). Menurut WANG *et al.* (1997) serum dan serum albumin adalah dua sumber protein utama dalam media kultur embrio mamalia. Protein dalam media kultur diperlukan untuk perkembangan embrio secara sempurna (CAROLAN *et al.*, 1995).

Suplementasi serum sapi estrus (*estrus cow serum*) dalam media kultur akan meningkatkan tingkat maturasi oosit domba *in vitro* (YADAV *et al.*, 1997). Demikian pula serum kambing estrus (*estrus goat serum*) akan meningkatkan maturasi oosit kambing *in vitro* (MOGAS *et al.*, 1997). Menurut GESHI *et al.* disitasi OHBOSHI *et al.* (1996) bahwa jenis serum mempunyai aktivitas biologis yang berbeda terhadap perkembangan embrio sapi secara *in vitro*.

Penggunaan serum untuk produksi embrio secara *in vitro* hingga saat ini masih bersumber dari produk

industri farmasi seperti *fetal calf serum* (FCS), *estrus cow serum* (ECS), *bovine serum* (BS) dan *bovine serum albumin* (BSA) dan *sheep serum* (SS) dengan harga relatif mahal, kemasan besar dan di daerah tertentu sulit diperoleh. Mengingat hal tersebut maka perlu diupayakan serum lain sebagai alternatif seperti *estrus sheep serum* (ESS) dan *pregnant sheep serum* (PSS) yang dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas media sehingga dapat memberikan hasil optimal dalam proses maturasi, kapasitas, fertilisasi dan kultur embrio *in vitro*.

Pemilihan ESS untuk dipakai sebagai bahan suplementasi karena diduga memiliki komposisi yang mirip dengan *estrus cow serum* (ECS). Sejumlah penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ECS dalam media kultur memberikan hasil optimal terhadap produksi embrio *in vitro* pada sapi (LU dan GORDON, 1987; SCHELLANDER *et al.*, 1990), domba (DJUWITA *et al.*, 1998; RAO *et al.*, 2002). Serum yang dikoleksi pada waktu estrus, memberikan respons sangat baik terhadap tingkat maturasi. Hal ini disebabkan serum mengandung hormon dan faktor-faktor lain yang potensial untuk perkembangannya (YOUNIS *et al.*, 1989).

Serum merupakan salah satu unsur esensial dalam media kultur yang diperlukan untuk menunjang keberhasilan proses fertilisasi *in vitro*. Suplementasi serum di dalam media kultur sebagai upaya untuk menciptakan kondisi agar media kultur memiliki unsur-unsur yang mirip dengan cairan folikel yang membantu proses maturasi, fertilisasi dan perkembangan embrio (HAFEZ, 2000). Menurut DJUWITA *et al.* (1998) bahwa serum domba dapat dipakai sebagai imbuhan pengganti FCS untuk mendukung proses maturasi dan pemuahan oosit domba secara *in vitro*. RUSIYANTONO *et al.* (2000) mengatakan bahwa suplementasi serum domba estrus hari ke-0 dan hari ke-6 akan meningkatkan perkembangan dini embrio domba secara *in vitro*.

Secara *in vivo* konsentrasi progesteron dalam plasma darah akan meningkat pada fase luteal, konsentrasi tertinggi terjadi pada waktu kebuntingan. Dengan demikian PSS diduga memiliki progesteron cukup tinggi, kondisi ini dibutuhkan untuk memelihara kebuntingan dan perkembangan awal embrio. Progesteron berpengaruh terhadap perkembangan awal embrio sapi dalam oviduk dan uterus, demikian juga estrogen sangat penting untuk transformasi embrio babi tahap morula menjadi tahap blastosis pada embrio umur 5 hari (NIEMANN dan ELSAESSER, 1986; 1987). Embrio sapi tahap morula yang dikultur dengan ko-kultur sel-sel uterus dan disuplementasi kombinasi hormon estrogen 10 pg/mL dan hormon progesteron 10 ng/mL menghasilkan tingkat blastosis lebih baik daripada tanpa pemberian hormon steroid (WIEMER disitasi oleh FUKUI, 1989).

Penelitian bertujuan untuk mengkaji serta mengetahui pengaruh serum domba estrus dan serum domba bunting terhadap produksi embrio domba secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Bandung.

MATERI DAN METODE

Koleksi ovarium, oosit dan maturasi *in vitro*

Ovarium domba lokal dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) dan disimpan dalam media NaCl fisiologis + penisilin 100 IU/mL, streptomisin 100 µg/mL pada suhu 30-35°C. Oosit dikoleksi dengan *modified phosphate buffered saline* (mPBS) menggunakan metode *slicing*, hanya oosit kualitas A dan B digunakan sebagai sampel penelitian (kualitas A, oosit yang memiliki sel kumulus lengkap atau utuh dan kualitas B, oosit dengan yang sebagian sel kumulusnya hilang). Oosit dimaturasi *in vitro* selama 24 jam pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator. Media maturasi adalah *Charles Rosenkrans-1aa* (CR1aa)+penisilin 100 IU/mL, streptomisin 100 µg/mL dan *follicle stimulating hormone*/FSH (Sigma USA) 0,01 mg/mL, disuplementasi dengan *estrus sheep serum* (ESS) atau *pregnant sheep serum* (PSS) dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% sebagai perlakuan.

Evaluasi hasil maturasi dilakukan dengan metode pewarnaan *aceto-orcein* (SHARMA *et al.*, 2001). Setelah penggundulan sel-sel kumulus, oosit difiksasi dalam larutan *asam asetat* dan *ethanol* (1:3) pada suhu kamar selama 24 jam. Oosit diwarnai dengan 1% *orcein* dalam 45% *asam asetat* dan dievaluasi dengan mikroskop fase kontras.

Kapasitasi spermatozoa, fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio

Spermatozoa yang digunakan adalah spermatozoa segar. Pencucian (*washing*) semen dengan sentrifugasi 500G dalam larutan *Brckett and Oliphant* (BO)+2,5 mM *caffeine* selama 5 menit. Semen diencerkan dalam larutan BO-Caff +20mg/ml heparin+1% BSA+20% serum domba estrus (DESMEDT *et al.*, 1992) hingga konsentrasi 5×10^6 spermatozoa/ml. Fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan cara mencampurkan 100 µl suspensi spermatozoa dengan 10-15 oosit selama 5 jam pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator menggunakan media BO-Caff +20mg/ml heparin+1% BSA+20% serum domba estrus. Evaluasi hasil fertilisasi *in vitro* dilakukan 16-18 jam setelah diinkubasi melalui pewarnaan *aceto-orcein*. Oosit yang dipakai sebagai

sampel untuk evaluasi merupakan hasil cuplikan dari total oosit yang difertilisasi.

Oosit hasil fertilisasi setelah 5 jam diinkubasi dipindahkan ke media kultur embrio *Charles Rosenkrans-1aa* (CR1aa) disuplementasi dengan *estrus sheep serum* (ESS) atau *pregnant sheep serum* (PSS) dengan konsentrasi 10, 15 dan 20% sebagai perlakuan, kemudian dikultur pada suhu 38,5°C dalam 5% CO₂ inkubator hingga terbentuk blastosis. Evaluasi perkembangan embrio tahap 2-4 sel dilakukan 48 jam setelah dilakukan inseminasi, tahap 8-16 sel dilakukan 96 jam setelah inseminasi, tahap morula dilakukan 144 jam setelah inseminasi dan tahap blastosis dilakukan 192 jam setelah inseminasi (HILL *et al.*, 1996).

Analisis data

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan yaitu: ESS10%, ESS15%, ESS20%, PSS10%, PSS15% dan PSS20% (10, 15 dan 20% adalah konsentrasi serum), setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap tingkat maturasi, fertilisasi dan perkembangan embrio dilakukan analisis ragam. Uji beda nilai tengah menggunakan Duncan's Test (GASPERSZ, 1994) pada hasil ragam yang memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat maturasi

Hasil penelitian (Tabel 1) menunjukkan bahwa ESS konsentrasi 20% nyata ($P < 0,05$) meningkatkan tingkat maturasi yang lebih baik dibandingkan dengan PSS konsentrasi 10-20%, tetapi tidak nyata ($P > 0,05$) dengan

ESS konsentrasi 10-15%. Hal tersebut menunjukkan bahwa media yang disuplementasi dengan ESS memiliki komposisi dan komponen penyusun yang lebih sesuai untuk merangsang dan menunjang proses maturasi. Menurut SANBUISSHO dan THRELFALL (1989); YOUNIS *et al.* (1989), serum yang dikoleksi pada waktu estrus memberikan respons sangat baik terhadap tingkat maturasi. Hal tersebut disebabkan serum mengandung hormon dan faktor-faktor lain yang potensial untuk proses maturasi. FALLON *et al.* (1988) mengatakan bahwa efektivitas serum dalam IVM dan IVF sangat bervariasi dan hal ini disebabkan bervariasinya konsentrasi substansi serum seperti hormon, faktor pertumbuhan, asam amino, sitokinesis, vitamin dan faktor lainnya.

Dari Tabel 1, nampak bahwa terdapat 20,02-41,11% oosit yang tidak mengalami maturasi dan dari jumlah tersebut sebagian besar tertahan pada tahap metafase-I (M-I). Tertahannya sejumlah oosit pada tahap M-I diduga oleh faktor lama waktu maturasi yang dalam penelitian ini dilakukan selama 24 jam. Hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa tingkat maturasi oosit kambing (tahap M-II) yang dikultur selama 26 jam (88,0%) lebih baik dibandingkan dengan 22 jam (68,0%) dan 18 jam (42,5%) (RUSYANTONO, 2001). Dikatakan pula rataan oosit tidak maturasi (tahap M-I) untuk lama waktu maturasi 26 jam (10,0%) lebih rendah dibandingkan dengan lama waktu maturasi 22 jam (16,0%) dan 18 jam (27,50%). CIPTADI *et al.* (1999) mengatakan bahwa terdapat interaksi antara waktu maturasi oosit kambing dengan tingkat maturasi inti dan tingkat maturasi tahap M-II terbesar (62,0%) diperoleh pada lama waktu maturasi 30 jam. Lama waktu maturasi lebih dari 24 jam diduga memberikan kesempatan lebih lama bagi oosit untuk menyediakan nutrisi terutama protein yang dibutuhkan untuk menginduksi terjadinya *germinal vesicle breakdown*

Tabel 1. Pengaruh perlakuan terhadap tingkat maturasi

Perlakuan	Jumlah oosit	Tahap Perkembangan (Jumlah oosit)			Total tidak maturasi	Maturasi (tahap M-II)
		GV	GVBD	M-I		
ESS10%	77	2,50 (2)	3,78 (3)	21,86 (17)	28,14 (22)a	71,86 (55)a
ESS15%	75	2,71 (2)	4,89 (4)	17,42 (13)	25,02 (19)a	74,98 (56)a
ESS20%	76	0,00 (0)	2,30 (2)	17,71 (13)	20,02 (15)a	79,98 (61)a
PSS10%	70	4,43 (3)	8,26 (6)	28,41 (20)	41,11 (29)b	58,89 (41)b
PSS15%	67	2,90 (2)	4,09 (3)	29,08 (19)	36,08 (24)b	63,92 (43)b
PSS20%	71	1,04 (1)	4,22 (3)	25,77 (18)	31,03 (22)b	68,97 (49)b
Jumlah	436					

ESS = serum domba estrus

PSS = serum domba bunting

10%, 15% dan 20% = konsentrasi serum

GV = *germinal vesicle*

GVBD = *germinal vesicle breakdown*

M-I = Metafase-I dan M-II = Metafase-II

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

(GVBD) dan perkembangan oosit dari tahap M-I ke tahap M-II. Sintesis protein sangat dibutuhkan oleh oosit pada waktu maturasi, untuk menginduksi terjadinya GVBD dan perkembangan oosit dari tahap M-I ke tahap M-II (NAKAYA *et al.*, 2001). Menurut SIMON *et al.* disitasi oleh GORDON (1994) bahwa oosit sapi, domba dan babi sangat membutuhkan protein untuk kondensasi kromatin dan *nucleus membran breakdown*.

Tingkat fertilisasi

Fertilisasi adalah proses penetrasi spermatozoa ke dalam oosit yang ditandai dengan terbentuknya 2 pronukleus (fertilisasi normal) atau >2 pronukleus (fertilisasi abnormal). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap tingkat fertilisasi (2 pn). Akan tetapi dari hasil penelitian ini (Tabel 2) nampak bahwa tingkat fertilisasi dalam media CR1aa + 20% serum domba bunting (69,33%) lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hasil penelitian RUSIYANTONO *et al.* (2000) mendapatkan nilai sebesar 65,4% dalam media TCM199+ESS, sedangkan DJUWITA *et al.* (1995) mendapatkan nilai sebesar 31,7% dalam media TCM199+ewe fetal serum (EFS) dan 25,6% dalam media TCM199 + FCS.

Kegagalan fertilisasi ditandai dengan adanya satu pronukleus dan pada penelitian ini bervariasi antara 19,00%-31,67% (Tabel 2). Kegagalan fertilisasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: (1) tingkat maturasi oosit baik inti maupun sitoplasma tidak sempurna (MOORE dan TROUNSON disitasi oleh BOEDIONO *et al.* 2000), (2) kemampuan spermatozoa membuahi oosit kurang optimal akibat kapasitas dan reaksi akrosom kurang memadai dan (3) kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma

oosit sehingga menyebabkan kegagalan pembentukan pronukleus jantan (CROZET *et al.*, 1995). Kejadian polispermi pada penelitian ini bervariasi antara 0,00-8,33% (Tabel 2). Kejadian polispermi kemungkinan disebabkan oleh berbagai faktor antara lain konsentrasi spermatozoa (NADIR *et al.*, 1993; LONG *et al.*, 1994), lama waktu inkubasi spermatozoa dan oosit (SAEKI *et al.*, disitasi oleh LONG *et al.*, 1994) dan tidak sepenuhnya blokade vitelin (DANDEKAR dan TALBOT, 1992).

Tingkat perkembangan embrio

Hasil penelitian menunjukkan pula bahwa perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap tingkat perkembangan embrio (Tabel 3). Tingkat perkembangan embrio tahap blastosis tertinggi dicapai pada media CR1aa yang disuplementasi dengan 10% serum domba bunting (PSS)(46,04%), walaupun pada tahap 2-4 sel lebih rendah dibandingkan dengan PSS konsentrasi 15% dan 20%. PSS memberikan pengaruh yang baik terhadap perkembangan embrio diduga karena memiliki hormon progesteron dan estrogen yang lebih sesuai untuk perkembangan embrio. Menurut NIEMANN dan ELSAESSER (1986; 1987) bahwa progesteron mempunyai pengaruh terhadap perkembangan awal embrio sapi dalam oviduk dan uterus, demikian juga estrogen sangat penting untuk transformasi embrio babi tahap morula menjadi tahap blastosis pada embrio umur 5 hari. Menurut WIEMER disitasi oleh FUKUI (1989), bahwa embrio sapi tahap morula yang dikultur dengan ko-kultur sel-sel uterus dan disuplementasi kombinasi hormon estrogen 10 pg/mL dan hormon progesteron 10 ng/mL menghasilkan tingkat blastosis lebih baik daripada tanpa pemberian hormon steroid.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap tingkat fertilisasi

Perlakuan	Jumlah oosit	Persentase tingkat fertilisasi (jumlah oosit)			Tidak teridentifikasi
		1 Pn	2 Pn	>2 Pn	
PSS10%	26	27,19 (8)	64,45 (15)	5,56 (2)	2,80 (1)
PSS15%	36	19,00 (8)	66,33 (22)	4,00 (2)	10,67 (4)
PSS20%	40	25,67 (10)	69,33 (28)	0,00 (0)	5,00 (2)
ESS10%	26	20,00 (8)	63,01 (14)	8,33 (2)	6,66 (2)
ESS15%	32	31,67 (10)	68,33 (22)	0,00 (0)	0,00 (0)
ESS20%	28	21,67 (6)	65,33 (16)	8,00 (4)	5,00 (2)
Jumlah	188				

ESS = serum domba estrus
1 Pn = 1 Pronukleus

PSS = serum domba bunting
2 Pn = 2 Pronukleus

10%, 15% dan 20% = konsentrasi serum

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap tingkat perkembangan embrio tahap 2-4 sel, 8-16 sel, 32 sel/morula dan blastosis

Perlakuan	Jumlah zigot	Tingkat perkembangan embrio (jumlah embrio) (%)			
		2-4 Sel	8-16 Sel	32 Sel/Mrl	Blastosis
PSS10%	75	54,81 (41)	51,85 (38)	49,01 (36)	46,04 (34)
PSS15%	82	62,16 (51)	53,78 (44)	42,63 (34)	33,76 (28)
PSS20%	92	60,35 (56)	50,48 (47)	41,89 (40)	37,44 (36)
ESS10%	73	50,53 (37)	45,84 (33)	38,71 (28)	35,56 (26)
ESS15%	67	57,27 (38)	50,51 (34)	38,58 (26)	31,16 (22)
ESS20%	97	56,99 (55)	46,61 (45)	39,84 (39)	34,67 (34)
Jumlah	486				

ESS = serum domba estrus

PSS = serum domba bunting

10%, 15% dan 20% = konsentrasi serum

Secara umum hasil penelitian (Tabel 3) menunjukkan bahwa tingkat perkembangan embrio mencapai persentase tertinggi pada tahap 2-4 sel dan mengalami penurunan seiring dengan tahap perkembangan embrio. Persentase terendah terjadi pada konsentrasi serum 10%, namun memasuki tahap blastosis menjadi yang tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi 15-20%. Penyebab terhambatnya awal pembelahan embrio oleh karena adanya oksigen radikal di dalam media kultur (RIEGER *et al.*, 1992). Glukosa, hipoksantin dan oksigen merupakan penyebab meningkatnya oksigen radikal di dalam sel. Hasil analisis konsentrasi glukosa, serum domba bunting (PSS) = 47,0 mg/dl, sedangkan serum domba estrus (ESS) = 59,0 mg/dl. Menurut RIEGER *et al.* (1992) bahwa tingginya kadar glukosa akan menghambat perkembangan embrio akibat terjadinya fenomena sel blok pada embrio. Menurut THOMPSON disitasi oleh RIEGER *et al.* (1992) bahwa konsentrasi glukosa >1,5 mmol/L akan menghambat pembelahan embrio domba tahap 1 atau 2 sel. Menurut ROZELL *et al.* (1992) bahwa proses glikolisis diatur oleh enzim *phosphofructokinase* (PFK). Pada awal perkembangan embrio nilai ATP:ADP yang tinggi di dalam media kultur akan menghambat kerja PFK dan pada domba hambatan ini berlangsung sampai embrio tahap 8 sel. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh PINYOPUMMINTR dan BAVISTER (1994), BAVISTER (1995), bahwa serum mempunyai pengaruh ganda (*biphasic*) terhadap perkembangan embrio *in vitro*. Serum akan menghambat perkembangan awal embrio tahap 2 sel sampai tahap morula sebaliknya serum akan menstimulasi perkembangan embrio dari tahap blastosis sampai tahap *hatches* blastosis.

KESIMPULAN

Serum domba estrus (ESS) berpengaruh nyata terhadap tingkat maturasi oosit domba, oleh sebab itu dapat digunakan sebagai bahan suplementasi dalam media maturasi CR1aa. Serum domba estrus (ESS) dan serum domba bunting (PSS) dengan berbagai konsentrasi berpengaruh tidak nyata terhadap tingkat fertilisasi dan tingkat perkembangan embrio domba *in vitro*. Namun disarankan untuk menggunakan serum domba bunting konsentrasi 10% dalam media kultur embrio domba CR1aa.

DAFTAR PUSTAKA

- BAVISTER, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Human Reprod. Update* 1: 91-148.
- BOEDIONO, A., Y. RUSYANTONO, M. KUSDIANTORO, I. DJUWITA dan HERLIATIEN. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Vet.* 7(4): 11-17.
- CAROLAN, C., P. LONERGAN, A.V. LANGENDONCK and P. MERMILLOD. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43: 1115-1128.
- CIPTADI, G., S. DJATI, M. FATCHIYAH, S. WAHYUNINGSIH, N. ISNAINI dan A. SADIYAH. 1999. Profil transformasi kromosom oosit kambing Peranakan Etawah pada sistem kultur *in vitro*. Abstrak Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia, Forum Komunikasi Reproduksi. Malang, 3-4 Desember 1999.
- CROZET, N., M.A. ALI and M.P. DUBOS. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 103: 293-298.

- DANDEKAR, P. and P. TALBOT. 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes extra-cellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol. Reprod. Develop.* 31: 135-143.
- DESMEDT, V., N. CROZET, M.A. ALI, A. MARTINO and Y. CONIE. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 37: 1049-1060.
- DJUWITA, I., B. PURWANTARA, M. FAHRUDIN and Y. SUKRA. 1995. The effect of superovulated cow serum on *in vitro* maturation and fertilization in sheep. Symp. Biotechnol. Anim. Reprod. Bogor, 1 Agustus 1995. Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural Institute. Bogor: 20-22.
- DJUWITA, I., Y. RUSIYANTONO, K. MUHAMAD, B. PURWANTARA dan Y. SUKRA. 1998. Pengaruh serum homolog dan heterolog terhadap proses pematangan dan pembuahan oosit domba di dalam medium biakan *in vitro*. *Media Vet.* 5: 7-10.
- ECKERT, J. and H. NIEMANN. 1994. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.
- FALLON, M.N., C.G. RAMMEL and J.J.L. HOOGENBOOM. 1988. Amino acids in bovine sera. *N.Z. Vet. J.* 36: 96-98.
- FUKUI, Y. 1989. Effect of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.* 67: 1318-1323.
- GASPERSZ, V. 1994. Metode Perancangan Percobaan. Armico. Bandung.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Ireland.
- HAFEZ, E.S.E. 2000. Reproduction in Farm Animals, 7th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- HILL, J.L., S.K. WALKER, G.H. BROWN and C.D. NANCARROW. 1996. The effects of an-estrus associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilization and development of ovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 46: 1379-1388.
- LONG, C.R., P. DAMIANI, C.P. CORREIA, R.A. MACLEAN, R.T. DUBY and J.M. ROBL. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 102: 361-369.
- LU, K.H AND I. GORDON. 1987. Effect of serum, hormone and cumulus cells on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. Proc. the Society for the Study of Fertility (Abs.). *Annu. Conf. Soc. Study Fert.* 81: 85.
- MOGAS, T., M.D. IZQUIERDO, M.J. PALOMO and M.T. ARAMIO. 1997. Developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 47: 284.
- NADIR, S., R.G. SAACKE, J. BAME, J. MULLINS and S. DEGELOS. 1993. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 71: 199-204.
- NAKAYA, Y., M. HATTORI and N. FUJIHARA. 2001. Participation of protein synthesis *in vitro* oocyte maturation and fertilization in cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 754-758.
- NIEMANN, H. and F. ELSAESSER. 1986. Evidence for estrogen dependent blastocyst formation in the pig. *Biol. Reprod.* 35: 10.
- NIEMANN, H. and F. ELSAESSER. 1987. Accumulation of oestrone by pig blastocysts and its potential physiological significance for blastocyst development *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 80: 221.
- OHBOSHI, S., K. HANADA, J. ZHAO, M. HATTORI, N. FUJIHARA, R. UMETSU, T. YOSHIDA and H. TOMOGANE. 1996. *In vitro* development of bovine one-cell embryos fertilized *in vitro* in serum and feeder cell-free culture system. *Aust. J. Anim. Sci.* 9: 583-590.
- PETTERS, R.M. 1992. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 415-421.
- PINYOPUMMINTR, T. and B.D. BAVISTER. 1994. Development of bovine in cell-free culture medium; effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.
- RAO, B.S., K.S. NAIDU, D. AMARNOTH, R. VAGDEVI, A.S. RAO, K.V. BRAHMAIAH and V.H. RAO. 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin. Res.* 43: 31-36.
- RIEGER, D., N.M. LOSKUTOFF and K. BETTERIDGE. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95: 585-595.
- ROZELL, M.D., J.E. WILLIAMS and J.E. BUTLER. 1992. Changes in concentration of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in individual pre-implantation sheep embryos. *J. Biol. Reprod.* 47: 866-870.
- RUSIYANTONO, Y., I. DJUWITA, B. PURWANTARA dan Y. SUKRA. 2000. The influence of ewe serum on *in vitro* oocyte maturation and early development of ovine embryos. *Media Vet.* 7: 13-16.
- RUSIYANTONO, Y. 2001. Pemakaian Medium CR1aa untuk Produksi Embrio Kambing *In Vitro* dan Upaya Kriopreservasi dengan Metode *Vitrifikasi*. Disertasi. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- SANBUISSHO, A. and W.R. THRELFALL. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31: 693-699.
- SHELLANDER, K., F. FUHRER, B.G. BRACKETT, B. KORB and W. SCHLEGER. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.

- SHARMA, G.T., A. TEOTIA and A.C. MAJUMDAR. 2001. Meiotic competence of caprine oocytes during ivm on granulosa cell monolayers developed from small and large follicles in comparison to the granulosa cell coculture. *Asian-Just. J. Anim. Sci.* 14: 777-784.
- WANG, S., Y. LIU, G.R. HOLYOAK and T.D. BUNCH. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre and post cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 37-45.
- YADAV, B.R., R.K. KATIYAR, M.S. CHAUHAN and M.L. MADAN. 1997. Chromosome configuration during *in vitro* maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 47: 943-951.
- YOUNIS, A.I., B.G. BRACKETT and R.A.F. HOSKEN. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23: 189-201.