

**OPTIMALISASI PENENTUAN JENIS KELAMIN EMBRIO
PADA TAHAP MORULA DAN BLASTULA DENGAN
MENGUNAKAN PCR PADA SAPI PESISIR**

ARTIKEL

**Oleh
TINDA AFRIANI
BP. 07 301 017**



**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG**

OPTIMALISASI PENENTUAN JENIS KELAMIN EMBRIO PADA TAHAP MORULA DAN BLASTULA DENGAN MENGUNAKAN PCR PADA SAPI PESISIR.

TINDA AFRIANI

Prof. Dr. Ir. Zaituni Udin , MSc ; Prof. Dr. Ir. Hj. Zesfin BP, MS ;
Dr. Ir. Sarbaini Anwar, MSc ; Dr. Ir. H. Jaswandi, MS

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat viabilitas embrio sapi Pesisir yang dibiopsi dalam pelaksanaan sexing embrio (penentuan jenis kelamin embrio), dan untuk mengetahui efektifitas penentuan jenis kelamin embrio sapi Pesisir menggunakan PCR serta untuk mengetahui sex ratio embrio sapi Pesisir pada tahap morula dan blastula dengan menggunakan 1 dan 2 blastomer. Diharapkan penelitian ini memberikan kontribusi dalam pengembangan bioteknologi reproduksi ternak dengan kelahiran anak jantan atau betina secara seragam tergantung dari struktur populasi yang diharapkan.

Penelitian ini dilakukan di kandang Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Fakultas Peternakan Universitas Andalas (Superovulasi), Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas (Evaluasi embrio), dan Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor (Biopsi embrio dan penentuan jenis kelamin embrio). Penelitian dilaksanakan dari tanggal 1 Januari 2012 Sampai 30 September 2012.

Materi yang digunakan adalah embrio sapi Pesisir yang diperoleh dari hasil superovulasi induk sapi Pesisir dan sapi pejantan yang berumur lebih dari 3 tahun dengan bobot badan $140, 69 \pm 5,51$ kg. Embrio yang digunakan sebanyak 15 embrio yang diperoleh dari seekor sapi Pesisir yang di superovulasi dengan menggunakan CIDR dan hormon FSH. 15 embrio sapi Pesisir dibiopsi dengan microblade pada tahap morula dan blastula dengan mengambil 1 dan 2 blastomer. **Variabel yang diukur** adalah viabilitas embrio pada waktu 1,3,6 dan 12 jam setelah biopsi. Efektifitas penentuan jenis kelamin dengan menggunakan PCR dengan primers BOV 97M dan sex ratio jenis kelamin pada embrio. Data penelitian dianalisis dengan menggunakan Uji *chi square* dan uji Fisher.

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa **viabilitas** embrio pada tahap morula dengan biopsi 1 sel dan 2 sel untuk 1 jam, 3 jam, 6 jam dan 12 jam adalah sama sedangkan viabilitas embrio dengan biopsi 1 sel dan 2 sel pada tahap blastula untuk 1 jam, 3 jam dan 12 jam adalah sama tetapi viabilitas embrio dengan biopsi 2 sel pada tahap blastula dimana 6 jam setelah biopsi perkembangan lebih baik bila dibandingkan dengan viabilitas embrio setelah biopsi baik pada tahap morula dengan biopsi 1 sel dan 2 sel maupun dengan biopsi 2 sel pada tahap blastula. Tetapi setelah dianalisis secara statistik dengan menggunakan **Uji Fisher** viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi pada tahap morula dan blastula dengan 1 sel dan 2 sel adalah berbeda tidak nyata ($P > 0.05$). **Efektifitas** penentuan jenis kelamin pada embrio tahap morula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah sama yaitu 100%. Pada embrio tahap blastula dengan menggunakan 1 sel efektifitasnya adalah 91,

67% dan dengan menggunakan 2 sel efektifitasnya adalah 100 %. Setelah diuji statistik dengan menggunakan Uji Fisher didapatkan bahwa efektifitas penentuan jenis kelamin pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah berbeda tidak nyata ($P>0.05$).

Sex ratio embrio pada tahap morula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah sama yaitu untuk embrio berjenis kelamin jantan adalah 66,67% dan berjenis kelamin betina adalah 33,33% sedangkan pada tahap blastula dengan menggunakan 1 blastomer sex ratio jantan adalah 41,67% sedangkan embrio berjenis kelamin betina adalah 50 %, dan dengan menggunakan 2 blastomer sex ratio berjenis kelamin jantan adalah 41,67% dan berjenis kelamin betina adalah 58,33 %. Sex ratio embrio pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel setelah diuji statistik dengan menggunakan Uji Fisher hasilnya berbeda tidak nyata ($P>0.05$).

Kata kunci : , Penentuan jenis kelamin embrio , morula , blastula ,PCR, sapi Pesisir

Optimizing Embryo Sex Determination In Morula And Blastula Phases Used PCR for Pesisir Cattle.

ABSTRACT

This study aimed to observe the embryos viability of Pesisir cattle were biopsied in the implementation of the embryo sexing (determining the sex of the embryo), and to determine the effectiveness of the determination of the sex of Pesisir cattle embryos using PCR and to investigate the sex ratio in morula and blastula phases using 1 and 2 blastomeres. It is expected that this research contributes to the development of reproductive biotechnology cattle which the born of male or female cattle have an uniformity depending on the expected population structure. This research was conducted in UPT of Animal Science Faculty University of Andalas (Superovulation), Laboratory of Animal Reproduction at Animal Science Faculty, Andalas University (embryo evaluation), and Laboratory of Embryology at Faculty of Veterinary Medicine IPB (embryo biopsy and determination of the sex of the embryo). This research was done between 1st January 2012 and 30th September 2012. The materials were Pesisir cattle embryos obtained from the superovulation of cows and bulls that older than 3 years, and the body weight about 140.69 ± 5.51 kg. Used 15 embryos of Pesisir cattle that have superovulation using CIDR and FSH hormones, an then the embryos were biopsied with microblade the morula and blastula phases by taking 1 and 2 blastomeres. The variables were the embryo viability at 1,3,6 and 12 hours after the biopsy. The effectiveness of sex determination using PCR with primers BOV 97m and sex ratio of the embryo. Data were analyzed using the chi-square test and Fisher's test. The results of this study stated that the embryo viability at the morula phase used biopsy 1 cell and 2 cells for 1 hour, 3 hours, 6 hours and 12 hours was the same, whereas the embryo viability used biopsy 1 cell and 2 cells at the blastula phase for 1 hour, 3 hours and 12 hours of embryo viability was the same but with biopsy 2 cells at the blastula phase where the 6 hours after the biopsy that the progression was better when compared to both embryo viability after biopsy like biopsy 1 and 2 cells at the morula phase and biopsy 2 cells at the blastula phase. Meanwhile, the statistically analyzed using the Fisher test that the embryo viability for 6 hours after the biopsy at the morula and blastula phases with 1 cell and 2 cells was not significant ($P > 0.05$). The effectiveness of embryo sex determination in morula phase using 1 cell and 2 cells was same (100%), in blastula phase using 1 cell was 91.67% and using the 2 cells was 100%. After statistically tested using Fisher test showed that the effectiveness of sex determination in the blastula phase using 1 cell and 2 cell was not significant ($P > 0.05$). Sex ratio of embryos at the morula phase using 1 cell and 2 cells was the same that for the embryo male sex about 66.67% and embryo female sex about 33.33% while at the blastula using 1 blastomer showed the male sex ratio around 41.67% and the female sex embryo was 50%, using 2 blastomeres showed that male sex ratio was 41.67% and the female sex was 58.33%. Sex ratio of embryos at the blastula phase using 1 cell and 2 cell after statistically tested using Fisher test were not significantly ($P > 0.05$).

Keywords: Determination of sex embryo, morula, blastula, PCR, Pesisir cattle

PENDAHULUAN

Sapi Pesisir merupakan salah satu bangsa sapi lokal yang populasinya menyebar di Sumatera Barat dan sebagai plasma nutfah Indonesia dan komoditas unggulan spesifik wilayah Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat. Dan melalui SK Menteri Pertanian No. 2908/Kpts/OT.140/6/2011 ternak ini (sapi Pesisir) telah ditetapkan sebagai salah satu rumpun sapi lokal Indonesia (Anwar, 2013).

Pada tahun 2010 menunjukkan bahwa populasi ternak sapi di Kabupaten Pesisir Selatan tercatat sebanyak 93.581 ekor, sementara pada tahun 2011 turun menjadi 77.383 ekor dengan populasi sapi Pesisir diperkirakan sekitar 90 %. Sapi Pesisir menjadi salah satu sumber sapi potong (daging) bagi masyarakat Sumatera Barat, dan sebagai hewan qurban pada hari raya

Idul Adha dan sapi Pesisir ini bahkan sampai ke provinsi Riau. Sumbangan sapi Pesisir terhadap pendapatan mencapai 24 – 43% dari total pendapatan petani, sedangkan populasinya mencapai 20% dari total populasi sapi potong di Sumatera Barat (Bamualim *et al*, 2006).Keunggulan utama ternak ini adalah tahan terhadap lingkungan yang panas dan mampu memanfaatkan pakan berkualitas jelek. Masyarakat Sumatera Barat menyebut sapi Pesisir dengan nama lokal yaitu *jawi ratuih* atau *bantiang ratuih*, yang artinya sapi yang melahirkan banyak anak. Sapi Pesisir memegang peranan penting sebagai penghasil daging di Sumatera Barat khususnya Padang (Anwar , 2004). Pertumbuhan populasi sapi Pesisir selama 10 tahun terakhir relative rendah rata-rata 1,17% per tahun (BPS, 2012). Data tahun 2010

menunjukkan bahwa populasi ternak sapi di Kabupaten Pesisir Selatan tercatat sebanyak 93.581 ekor, sementara pada tahun 2011 turun menjadi 76.111 ekor dengan populasi sapi pesisir adalah 49.375 ekor . Pertumbuhan populasi dari sapi Pesisir lamban akibat tingginya permintaan untuk ternak potong dimana pada hari raya Idul Adha untuk tahun 2012 adalah 4.793 ekor /tahun dan pematangan komersial tahun 2012 adalah 1.200 ekor /tahun dan penjualan ternak keluar daerah tahun 2012 adalah 9.640 ekor/tahun.

Dinas Peternakan Provinsi Sumatera Barat (2011) melaporkan bahwa populasi sapi Pesisir pada tahun 2011 jauh menurun dibandingkan tahun 2004. Populasi sapi di Kabupaten Pesisir Selatan pada tahun 2011 tercatat 93.581 ekor, dan jauh menurun dibanding tahun 2004 yang mencapai 104.109

ekor. Penurunan populasi diduga berkaitan dengan sistem pemeliharaan yang bersifat ekstensif tradisional, tingginya jumlah pematangan ternak produktif, menyempitnya areal penggembalaan, dan kurang tersedianya pejantan, rendahnya upaya pembudidayaan, tingginya angka ternak keluar daerah. Penurunan populasi sapi Pesisir yang terus menerus tanpa diiringi dengan usaha peningkatan populasinya akan mengakibatkan dampak buruk bahkan kepunahan bagi keberadaan plasma nutfah Sumatra Barat ini (BPS, 2012).

Salah satu usaha untuk meningkatkan populasi dapat dilakukan dengan bioteknologi reproduksi seperti Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE). Bioteknologi reproduksi merupakan teknologi unggul dalam bidang reproduksi untuk meningkatkan

produktivitas ternak. Perkembangan bioteknologi sangat maju dengan pesat dan mempunyai peluang untuk diterapkan dalam membantu secara teknis peningkatan populasi ternak. , bioteknologi dianggap dapat mengatasi tantangan dalam arti dapat memenuhi peningkatan produktivitas tanpa merusak sumber hayati lokal melalui upaya mengatasi kendala-kendala skala produksi yang kecil dari petani atau rendahnya produktivitas ternak asli lokal.

Perkembangan yang pesat dari bioteknologi modern termasuk bioteknologi reproduksi ternak dalam dua dekade di penghujung abad ke - 20 ini dipicu oleh perkembangan dalam bidang molekuler dan biologi sel serta penemuan rekayasa genetik melalui teknologi DNA rekombinan, sehingga biologi molekuler dianggap memberi ciri yang khusus kepada

bioteknologi modern sebagai *science driven technology* (Martoyo, 2003).

Teknologi Inseminasi buatan (IB) merupakan teknologi perkawinan yang telah lama diterapkan termasuk pada sapi Pesisir, sedangkan teknologi TE masih terbatas penggunaannya tetapi mempunyai efektifitas yang lebih baik dibanding IB untuk meningkatkan populasi suatu bangsa ternak. Teknologi Transfer embrio (TE) selain untuk mempercepat peningkatan populasi ternak juga membuka peluang untuk manipulasi embrio. Manipulasi embrio dengan pengaturan jenis kelamin embrio berpotensi untuk meningkatkan jumlah keturunan untuk satu jenis kelamin dalam populasi. Embrio yang telah ditentukan jenis kelaminnya dalam peternakan sapi potong lebih efektif dan sangat membantu untuk mengelola sumber

daya genetik ternak. Usaha pemeliharaan sapi akan lebih menguntungkan apabila dapat ditentukan jenis kelamin embrio sebelum kebuntingan ternak terjadi. Dengan demikian dapat dihindari hilangnya biaya dan waktu pemeliharaan anak sapi dengan jenis kelamin yang tidak dikehendaki. Penggunaan penentuan jenis kelamin embrio dapat meningkatkan efisiensi ekonomi dalam program transfer embrio (Willett dan Hillers, 1994).

Jenis kelamin embrio dapat ditentukan sebelumnya dan penentuan jenis kelamin embrio (*sexing embryo*) dapat dilakukan pada berbagai tahap perkembangan embrio baik pada tahap morula maupun blastula. Pembentukan kelamin telah dimulai semenjak terjadinya pembuahan (Salisbury dan Vandemark, 1985). Embrio yang dikoleksi 7 hari setelah donor

diinseminasi harus berada pada stadium morulla. Morula tersusun lebih kurang 32 sel dengan blastomer yang sulit dibedakan satu sama lainnya karena merupakan massa sel dan sel-sel morula adalah totipoten dan pada hari ke 7 atau 8 berada pada stadium blastula (Udin. Z, 2012).

Keberhasilan penentuan jenis kelamin embrio dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah tingkat keberhasilan perkembangan embrio (umur embrio) dan jumlah sel yang di biopsi . Embrio tahap morula merupakan embrio dengan ciri-ciri tersusun lebih kurang 32 sel, morula berbentuk bulat akibat pembelahan sel terus menerus, keberadaan blastomer satu sama lain sangat rapat dan kompak sel pada tahap morula bersifat totipotency. Sel embrio pada tahap pertama pembelahan sel setelah pembuahan

adalah satu-satunya sel yang totipoten. Tahapan perkembangan morula selanjutnya berkembang menjadi blastula. Pembelahan telah menghasilkan lebih dari 100 sel. Blastula biasanya menyerupai lapisan bola sel yang mengelilingi rongga berisi cairan. Pada blastula, sel-sel bagian dalam akan membentuk bakal janin atau embrioblas (*inner cell mass*), sedangkan bagian luarnya membentuk trofoblas.

Untuk memperoleh materi genetik yang akan dideteksi melalui PCR dalam penentuan jenis kelaminnya maka embrio dibiopsi terlebih dahulu. Optimalisasi keberhasilan penentuan jenis kelamin (*sexing embrio*) sangat ditentukan oleh teknik biopsi yang digunakan. Biopsi dengan mikroblade adalah salah satu metoda biopsi dari embrio untuk mengambil blastomer sebelum

dilakukan penentuan jenis kelamin embrio. Biopsi embrio mempengaruhi viabilitas dan perkembangannya embrio. Kerusakan embrio sebagai hasil dari prosedur biopsi sangat kecil dan persentase hidup tertinggi pada embrio setelah biopsi yaitu pada pada tahap embrio 8 sel dibandingkan tingkat awal (Gianaroli, 2000).

Penentuan jenis kelamin embrio dapat dilakukan melalui beberapa cara yaitu *Karyotyping*, deteksi antigen H-Y, penentuan ikatan enzim X dan identifikasi yang berdasarkan kepada kromosom Y seperti *in situ* hibridisasi, uji kromatin, dan PCR (*polymerase chain reaction*). Windsor *et al.*, (1993) melakukan penentuan jenis kelamin embrio sebelum kebuntingan dengan menggunakan teknik analisis karyotipe. Dengan

teknik karyotyping mempunyai sensitivitas sangat tinggi dengan efisiensi sebesar 95% dan akurasi 98%. Dari semua metode penentuan jenis kelamin yang ada maka PCR lebih baik dibandingkan metode yang lain karena lebih simple, lebih akurat, cepat dan tidak mahal (Chen, Zi-rong and Song-dong, 2007).

Peura *et al*, (1991); Faber *et al*, (2003) dan Manna *et al*, (2003) melaporkan bahwa keberhasilan penentuan jenis kelamin ini tergantung pada amplifikasi Y- kromosom urutan DNA sebagai indikator khusus. Untuk embrio berjenis kelamin jantan ditentukan oleh dua fragmen (XY) dan embrio berjenis kelamin betina ditentukan oleh satu fragmen (XX)

Penentuan jenis kelamin dengan menggunakan 3 sel, 4-6 sel dan 7 sel telah dilakukan oleh Lacaze

et al (2008) juga Zohir dan Allam (2010) menggunakan blastomer lebih dari 3 sel dimana embrio dibiopsi dengan microblade dan penentuan jenis kelamin embrio dengan menggunakan PCR.

Salah satu alternatif untuk mengoptimalkan tingkat keberhasilan sexing embrio adalah dengan menggunakan umur embrio atau tahap perkembangan embrio yang sempurna dan jumlah blastomer yang lebih sedikit. Ini berkaitan dengan viabilitas embrio dan efektifitas dalam penentuan jenis kelamin embrio (sexing embrio), maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan menggunakan 1 dan 2 sel dalam penentuan jenis kelamin embrio pada sapi Pesisir.

Penelitian Ini Bertujuan Untuk ;

(1) Mengetahui viabilitas embrio sapi Pesisir yang dibiopsi dalam

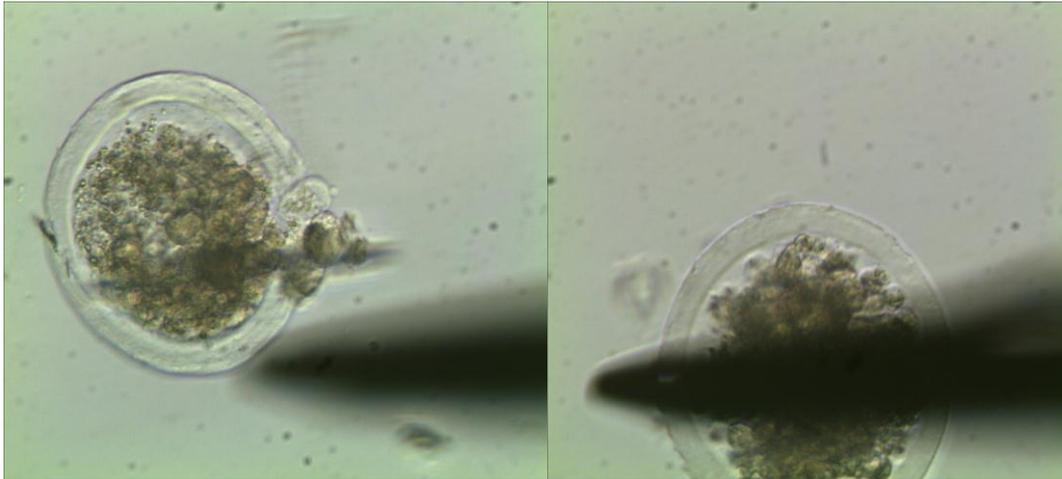
pelaksanaan *sexing embryo* (penentuan jenis kelamin embrio), (2) Mengetahui efektifitas penentuan jenis kelamin embrio sapi Pesisir melalui PCR, (3) Mengetahui sex ratio embrio sapi Pesisir pada tahap morula dan blastula dengan menggunakan 1 dan 2 blastomer.

Manfaat penelitian adalah untuk :

Memberikan kontribusi dalam pengembangan bioteknologi reproduksi ternak dengan kelahiran anak jantan atau betina secara seragam tergantung dari struktur populasi yang diharapkan. Untuk mendapatkan teknik penentuan jenis kelamin embrio dengan menggunakan PCR dalam menentukan jenis kelamin.

METODE PENELITIAN

Embrio yang digunakan sebanyak 15 embrio yang diperoleh dari seekor sapi Pesisir yang di superovulasi dengan menggunakan CIDR dan hormon FSH. Metode yang digunakan adalah metode eksperimen, dengan menggunakan 15 embrio yang dibiopsi dan penentuan jenis kelamin pada embrio dengan menggunakan PCR. Embrio yang diperoleh dari panen embrio dibiopsi menggunakan *microblade*. Proses biopsi pada embrio sapi dapat dilihat pada gambar 1. Proses biopsi embrio dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. Embrio sapi Pesisir yang dibiopsi. **A.** Blastomer yg keluar setelah biopsi. **B.** Perusakan zona pellusida dengan *microblade*

Biopsi menggunakan Narishige Micromanipulators (Narishige Co,Ltd®, Jepang) yang dihubungkan dengan mikroskop Nomarsky Optic (IX71 Olympus®, Jepang). Embrio yang telah dibiopsi diamati perkembangannya didalam media kultur jaringan BlastAssist (Origio Medicult Media ®, Denmark) dengan selang waktu sesaat setelah biopsi, 3 jam , 6 jam dan 12 jam setelah biopsi.

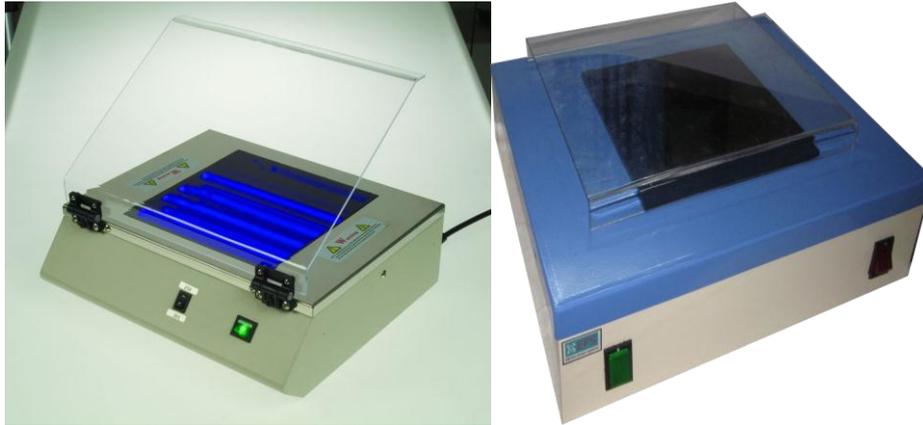
Penentuan jenis kelamin embrio.

Blastomer yang telah keluar dari embrio diambil dengan pipet Pasteur

dan pencucian dengan larutan PBS sebanyak 3 kali yang diletakkan pada petridish sebanyak 10 μ l. Blastomer atau 2 blastomer dimasukkan kedalam *pureTaq Ready To Go* (RTG) (Ready To Go mengandung dNTP 200 μ M dalam 10 mM Tris-HCL, pH 9 50 mM KCl dan 1.5 nM MgCl₂) yang diberi *doubledesrilation water* (ddH₂O) sebanyak 10 μ l, sehingga volume dalam RTG menjadi 25 μ l. Tambahkan primers BOV 97 M sebanyak 5 μ l ke dalam RTG. BOV97M dengan 5' – GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT – 3' dan

5' – GCT ATG CTA ACA CAA ATT CTG – 3 dan rangkaian primer sapi menurut sequence bovine DNA 1.715 satellite dengan 5' – TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT – 3' dan 5' – TCG TCA GAA ACC GCA CAC TG – 3'. Amplifikasi spesifik dari jenis kelamin jantan ditandai dengan 141 bp dan dari amplifikasi spesifik berjenis kelamin betina ditandai dengan 216 bp sesuai dengan yang dilakukan oleh Park et al,(2000). Lakukan PCR dengan Amplification GeneAmp 2400 (PE Corporation, Norwalk, USA) sebanyak 33 *cycles*, dan temperatur denaturasion adalah 95°C selama 30 detik, temperature *annealing* pada suhu 55 °C selama 30 detik dan *primer extension* pada 72 °C selama 30 detik dan setelah selesai reaksi sampel dibiarkan dalam mesin PCR

pada 72°C selama 7 menit. Lakukan elektroforesis dengan agarose 2% dengan pewarna *ethidium bromide*. Masukkan sampel DNA kedalam sumur dengan menggunakan *mikropipet*. Sebagai penanda atau marker digunakan 1 kb.Masukkan larutan buffer (TBE 1x) kedalam alat elektroforesis yang telah dimasukkan agarose yang berisi DNA. Lakukan elektroforesis selama 30-45 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan menggunakan sinar ultraviolet dimana embrio berjenis kelamin jantan akan terlihat dua band (XY) antara 141 bp dan 141 bp sedangkan untuk embrio yang betina terlihat satu band (XX) pada 216 bp .Untuk melihat hasil elektroforesis dengan menggunakan alat seperti Gambar 2.



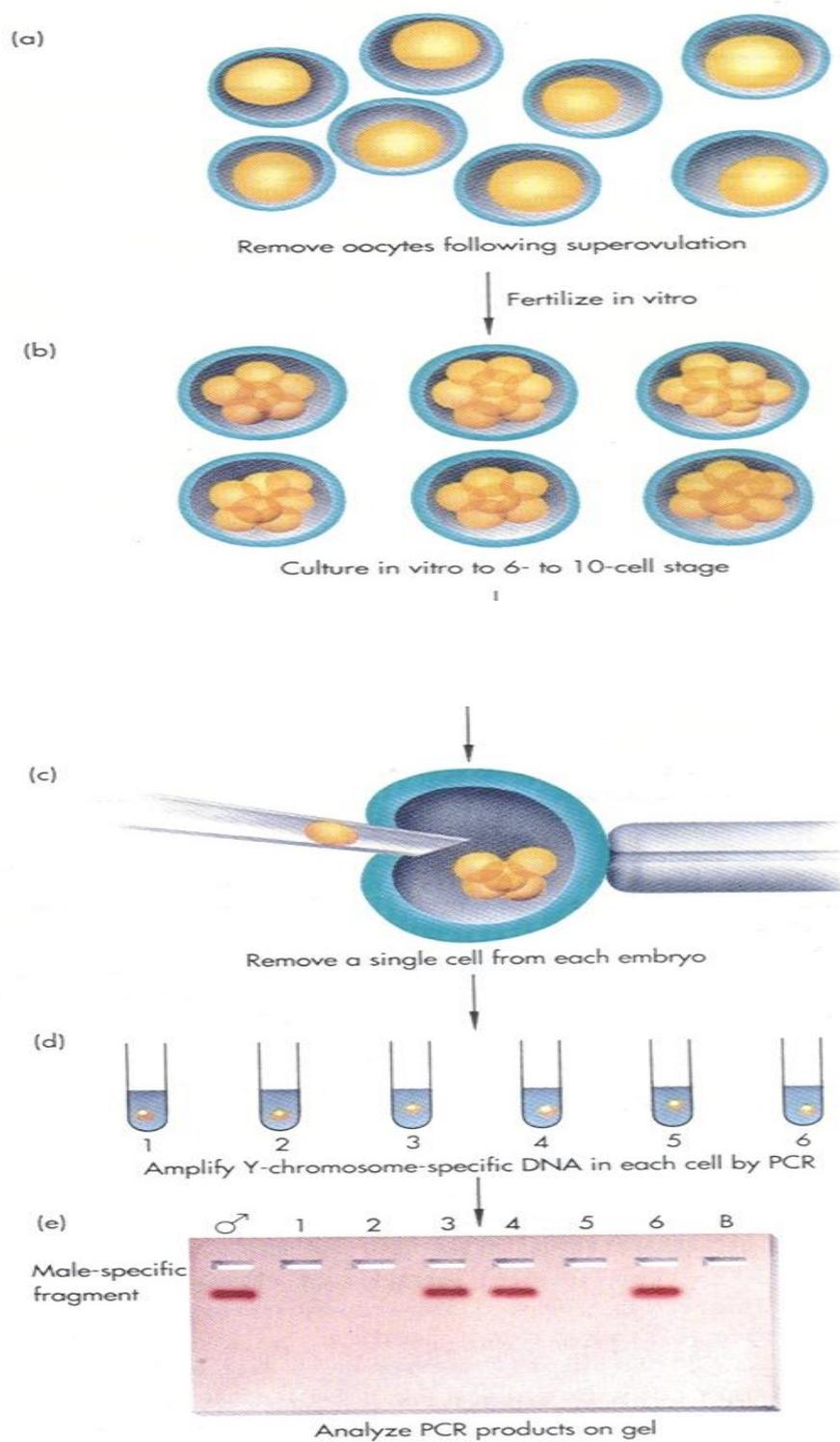
Gambar 2. Alat untuk melihat hasil elektroforesis dengan menggunakan sinar UV

Variabel yang diukur pada penelitian adalah: 1. Viabilitas embrio adalah kemampuan embrio untuk dapat hidup yang ditandai dengan adanya pertumbuhan, 2. Viabilitas embrio setelah dibiopsi sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Boediono et al (2000), 3. efektifitas penentuan jenis kelamin embrio adalah seberapa banyak pita yang dapat dilihat pada hasil elektroforesis pada penentuan jenis kelamin pada sapi Pesisir.

Penentuan jenis kelamin dilakukan dengan polymerase chain reaction (PCR) dengan kit primer spesifik

BOV 97M dan penentu Y kromosom sesuai dengan instruksi dari pabrik (Alves et al., 2003; Pierce et al., 2000). Hasil PCR dideteksi dengan sinar UV (ultra violet) dalam agarose gel dengan ethidium bromida. Sex rasio embrio jantan dan betina yang dilihat dari pita PCR. Embrio jantan ditandai dengan adanya dua band (kromosom XY) sedangkan embrio betina ditandai dengan satu band (kromosom XX)..

Prosedur kerja penentuan jenis kelamin embrio menurut prosedur yang dilakukan oleh Sharma et al. 2005. ini dapat dilihat pada gambar



Gambar 3. Prosedur kerja penentuan jenis kelamin embrio dengan menggunakan 1 blastomer

Analisis Data. Data yang didapatkan dari hasil pengamatan akan dihitung baik untuk viabilitas embrio dan efektifitas penentuan jenis kelamin dengan menggunakan uji Fisher (Steel dan Torrie, 1991) dan data olah dengan menggunakan program SAS. Model matematika Uji Fisher menurut (Steel dan Torrie, 1991)

$$P = \frac{n_1! \cdot n_2! \cdot n_1 \cdot n_2!}{n_{11}! \cdot n_{12}! \cdot n_{21}! \cdot n_{22}! \cdot n \dots!}$$

Sedangkan $n_{1j}!$ didefinisikan menurut

$$n! = n(n-1)\dots 1 \quad \text{dan}$$

$$0! = 1$$

lambang $n!$ dibaca sebagai n faktorial

Tabel 1. Viabilitas Embrio Sapi Pesisir Setelah Biopsi

No	Identifikasi	Biopsi Blastomer(sel)	Tingkat Viabilitas			
			1 jam	3 jam	6 jam	12 jam
1	Morula	1	-	+	++	+
		2	-	+	++	+
2	Blastula	1	-	+	+++	+
		2	-	+	++	+

Keterangan: (-) embrio masih stress, (+) embrio mulai kembali normal (bundar), (++) embrio mulai berkembang, (+++) reekspansi blastosul

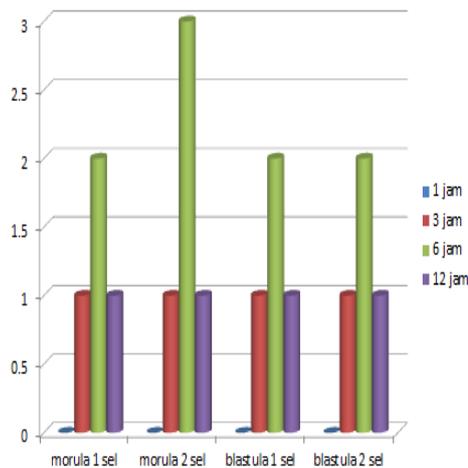
HASIL PENELITIAN.

Viabilitas Embrio Setelah Biopsi

Tingkat viabilitas embrio pada sapi Pesisir setelah biopsi pada tahap morula dan blastula yang diambil 1 blastomer atau 2 blastomer akan dilihat pada waktu 1 jam, 3 jam, 6 jam sampai 12 jam. Viabilitas embrio sapi Pesisir setelah biopsi dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1. dapat dilihat bahwa viabilitas embrio 1 jam, 3 jam, 6 jam dan 12 jam setelah biopsi, diperoleh hasil bahwa viabilitas embrio 1 jam setelah biopsi semua embrio yang dibiopsi masih dalam kondisi stress (embrio rentan, morfologi lonjong dan masih terdapat luka akibat biopsi) hal ini berkaitan dengan tingkat adaptasi embrio setelah biopsi . hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Boediono *et al* (2000) yang melaporkan bahwa embrio yang *displitting* sesaat setelah *splitting* bentuknya lonjong karena pengaruh tekanan pisau mikro pada saat memotong embrio .Pada 3 jam setelah biopsi viabilitas embrio kembali ke kondisi normal (bundar) dengan nilai (+) dan viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi embrio mulai berkembang dengan nilai (++) . Hasil penelitian ini sama dengan

hasil penelitian yang dilakukan oleh Imron (2005) yang menyatakan bahwa kultur selama 3 jam setelah biopsi dianggap cukup untuk memastikan bahwa embrio hidup dan mulai berkembang normal , hidup, dan siap di transfer ke resipien begitu juga dengan morfologi embrio setelah 3 jam tidak mengalami perubahan yang signifikan . Tetapi bila kultur dilanjutkan sampai 24 jam lebih sel embrio akan menempel pada dasar petri kultur dan menyatu dengan sel-sel kumulus . Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Boediono *et al* (2000) yang melaporkan bahwa embrio 3 jam setelah proses *splitting* embrio telah mengalami perkembangan morfologis. Hasil penelitian viabilitas embrio pada sapi Pesisir juga dapat dilihat pada gambar 4



Gambar 4 ; Diagram perkembangan embrio sapi pesisir setelah biopsi

Viabilitas embrio setelah biopsi adalah sangat penting karena akan mempengaruhi keberhasilan dari transfer embrio nantinya. Hal ini diperkuat oleh pendapat Shirazi *et al* (2010) yang mengatakan bahwa viabilitas embrio setelah biopsi embrio adalah faktor penting, yang akan mempengaruhi perkembangan embrio selanjutnya dan ini juga akan mempengaruhi tingkat keberhasilan dari Transfer Embrio. .

Gianaroli (2000) mengatakan bahwa kerusakan embrio setelah

biopsi adalah sangat rendah dan biopsi embrio akan mempengaruhi viabilitas dan perkembangannya embrio, tetapi kecelakaan yang menyebabkan kerusakan embrio sebagai hasil dari prosedur biopsi sangat kecil..

Viabilitas embrio pada penelitian ini terlihat bahwa embrio setelah biopsi pada tahap morula didapatkan viabilitas sama baik viabilitas embrio dengan mengambil 1 sel maupun 2 sel sedangkan pada tahap blastula yang lebih baik adalah viabilitas embrio yang dibiopsi untuk 1 sel blastomer bila dibandingkan dengan biopsi dari 2 sel blastomer. Ini disebabkan karena sel pada tahap blastula lebih kecil bila dibandingkan dengan tahap morula sehingga kerusakan embrio setelah biopsi lebih kecil bila dibandingkan dengan kerusakan pada tahap morula.

Teknik biopsi embrio sangat penting terutama pada embrio yang akan menjalani kriopreservasi karena sangat berpengaruh terhadap viabilitas. Cenariu *et al* (2012) menyatakan bahwa teknik dengan menggunakan *microblade* lebih mudah bila dibandingkan dengan teknik jarum dan teknik aspirasi yang dianggap paling sulit. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Cenariu *et al* (2012). Embrio tahap morula tingkat pemulihannya lebih baik dibandingkan dengan blastula (Hafez, 2000). Udy (1987) menyatakan bahwa *splitting* embrio disarankan menggunakan embrio tahap blastula dibandingkan pada tahap morula.

Penelitian yang dilakukan oleh Pereira *et al* (2008) pada embrio yang dikultur hingga 3,5 jam didapatkan bahwa viabilitas embrio

mencapai 95,6 %. Embrio yang diproduksi secara *in vitro* lebih sensitif dari pada yang diperoleh secara *in vivo*, karena akumulasi lipid selama fertilisasi.

Hasil penelitian pada sapi Pesisir dimana viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi memperlihatkan bahwa embrio telah mulai mengalami perkembangan morfologis yaitu terjadinya reekspansi blastosol selain itu embrio menjadi bulat kembali, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Boediono *et al* (2000). Perkembangan demi embrio dapat berkembang 100% baik pada tahap morula maupun blastula. Hasil penelitian ini lebih baik dibandingkan yang dilaporkan Lopes *et al* (2001); Hasler *et al* (2002); . Hasil penelitian dari . Li *et al* (2007) diperoleh bahwa kelangsungan hidup embrio yang telah dibiopsi untuk

ditransfer dalam bentuk segar adalah sebesar 49 – 62% dengan menggunakan berbagai metoda biopsi.

Urszula *et al* (1990) menyatakan bahwa perkembangan embrio setelah biopsi pada embrio yang diproduksi secara *in vitro* dipengaruhi secara signifikan oleh umur dan jumlah sel embrio pada saat dibiopsi. Perkembangan embrio untuk tahap blastosis yang embrio dibiopsi pada tahap 16 sel adalah lebih tinggi dari pada embrio yang dibiopsi pada tahap 8 sel secara signifikan (Shirazi *et al.*, 2010).

Mitalipov dan Wolf (2009) menyatakan bahwa embrio telah mencapai tahap 16-sel, mempunyai sel-sel totipoten dari morula berdiferensiasi menjadi sel-sel yang akhirnya akan menjadi massa sel blastosis dengan trofoblas. Sekitar empat hari setelah pembuahan dan

setelah beberapa siklus pembelahan sel, sel-sel totipoten mulai mengkhususkan. *Inner cell mass*, sumber sel induk embrionik, menjadi pluripotent. Dalam biologi sel, pluripotency (**plurimus dari bahasa Latin, yang berarti sangat banyak, dan potens yang berarti memiliki kekuatan**) yang mengacu pada sel induk yang memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi salah satu dari tiga lapisan germinal: **endoderm** (lapisan perut interior, saluran pencernaan, paru-paru), **mesoderm** (otot, tulang, darah, urogenital), atau **ektoderm** (jaringan epidermal dan sistem saraf) (Windhorst, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Sugimoto, (2011). menunjukkan bahwa sel dapat berdiferensiasi ke dalam sel totipoten secara tidak sepenuhnya, melainkan menjadi "variasi selular kompleks" dari totipoten .

Viabilitas Embrio Pada Tahap Morula 1 sel dan 2 sel Setelah Biopsi

Hasil penelitian didapatkan bahwa viabilitas embrio tahap morula setelah biopsi 1 sel dan 2 sel adalah sama untuk kembali ke kondisi normal setelah dibiarkan selama 1 jam, 3 jam, 6 jam dan 12 jam. Namun, dari pengamatan yang dilakukan viabilitas embrio terbaik dan paling optimal berada 6 jam (ditandai dengan ++ atau dengan nilai 2) setelah biopsi. Sedangkan viabilitas embrio setelah 3 jam masih rendah yang ditandai dengan nilai + atau satu (1), hal ini disebabkan karena embrio baru

mulai berkembang . Begitu juga dengan 12 jam biopsi turun kembali dan ditandai dengan nilai plus satu (+)., hal ini disebabkan karena kultur yang digunakan . Viabilitas morula yang dibiopsi dan diambil 2 blastomernya juga kembali ke kondisi normal setelah dibiarkan selama 3-12 jam. Namun, dari pengamatan yang dilakukan viabilitas embrio terbaik dan paling optimal berada 6 jam (ditandai dengan ++) setelah biopsi. Viabilitas embrio pada tahap morula yang dibiopsi dengan mengambil 1 blastomer dan 2 blastomer dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Viabilitas Embrio Sapi Pesisir Setelah Biopsi Tahap Morula

No	Identifikasi	Biopsi Blastomer (sel)	Tingkat Viabilitas			
			1 jam	3 jam	6 jam	12 jam
1	Morula	1	-	+	++	+
		2	-	+	++	+

Keterangan: (-) embrio masih stress, (+) embrio mulai kembali normal (bundar), (++) embrio mulai berkembang

Biopsi embrio adalah mengeluarkan 1 atau lebih sel dari embrio sebelum implantasi dan biopsi embrio mempengaruhi viabilitas dan perkembangannya embrio serta kecelakaan yang menyebabkan kerusakan embrio sebagai hasil dari prosedur biopsi sangat kecil. Nainiene *et al* (2007) menyatakan bahwa embrio *in vitro* bila dibiopsi dengan memotong memiliki pengaruh negatif yang lebih besar terhadap viabilitas embrio dibandingkan biopsi dengan pengisapan. Behr dan Shu, (2010) mengatakan bahwa metode biopsi embrio sangatlah penting dan berpengaruh sangat besar terhadap viabilitas embrio, integritas dan kelangsungan hidup embrio yang dikriopreservasi. Integritas zona pellusida merupakan kunci dalam kelangsungan hidup embrio.

Persentase hidup tertinggi setelah biopsi pada saat tingkat 8 sel dibandingkan tingkat awal. Prosedur biopsi tidak memiliki pengaruh berbahaya terhadap viabilitas embrio segar dan embrio yang telah dibiopsi kemudian dibekukan maka perkembangan embrio tidak akan mempengaruhi embrio untuk ditransfer bila dibandingkan dengan embrio utuh yang ditransfer setelah dibiopsi (Gustafsson *et al*, 1994; Thibier dan Nibart; 1999; Shirazi *et al*, 2010).

.Teknik biopsi embrio pada tahap morula, tempat dimana zona pellusida akan dibiopsi tidaklah penting karena itu perusakan zona pellusida dapat dilakukan di mana saja di lingkaran embrio, dan semua teknik biopsi pun dapat digunakan (Bredbacka, 1991). Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Cenariu *et al* (2012) bahwa embrio

morula dibiopsi tempat dimana zona pellusida dibuka tidaklah penting. Karena itu, pembukaan bisa dibuat di lingkaran embrio manapun dan tidak dipengaruhi oleh jenis teknik biopsi yang digunakan. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Mitalipov dan Wolf (2009) menyatakan bahwa embrio telah mencapai tahap 16-sel, mempunyai sel-sel totipoten. Sel totipoten dapat membentuk semua jenis sel dalam tubuh, ditambah ekstraembrionik, atau plasenta. Sel embrio setelah pembuahan akan mengalami pembelahan sel sampai pada tahap morula dan ini adalah satu-satunya sel yang totipoten

Biopsi embrio sapi pada tahap 4-16 sel tidak memiliki efek buruk pada kemampuan perkembangan embrio secara *in vitro* dan begitu juga dengan embrio tahap 16 sel, dibiopsi pada hari ke-4 adalah tahap terbaik untuk menghilangkan

blastomere. Biopsi dilakukan pada tahap 16 sel menghasilkan 94% dari embrio berkembang ke tahap blastosis, yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan yang dibiopsi pada tahap 8-sel (64%). Sedangkan embrio yang dibiopsi pada hari ke-3 yaitu pada tahap 4 sel dan 8 sel menghasilkan embrio yang berkembang ke tahap blastosis sebesar 49% dan pada tahap 46% pada dan pada hari ke yaitu pada tahap 4 dan 8 sel menghasilkan embrio berkembang ke tahap blastokia setelah biopsi adalah 39% dan 33% (Shirazi *et al.*, 2010).

Menurut Tominaga dan Hamada (2004) bahwa jumlah bahan genetik yang diperoleh dengan biopsi menggunakan *microblade* sedikit lebih tinggi dari pada yang diperoleh oleh jarum atau aspirasi dan juga akurasi yang lebih tinggi dari

penentuan jenis kelamin dengan metode biopsi *microblade*.

Viabilitas Embrio Pada Tahap Blastula 1 sel dan 2 sel Setelah biopsi

Viabilitas embrio tahap blastula setelah biopsi terlihat bahwa pada satu jam setelah biopsi embrio masih mengalami stress , viabilitas embrio 3jam setelah biopsi embrio telah mulai normal kembali dengan

morfologi bundar , 6 jam setelah biopsi embrio mulai berkembang tetapi viabilitas embrio yang dibiopsi dengan mengambil 1 blastomer pada tahap blastula lebih baik yaitu mempunyai nilai +++ atau terjadi reekspansi blastosul. Sedangkan pada 12 jam setelah biopsi viabilitas embrio sama dengan 3jam setelah biopsi. Viabilitas embrio pada tahap blastula dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Viabilitas embrio sapi pesisir setelah biopsi tahap blastula

No	Identifikasi	Biopsi Blastomer(sel)	Tingkat Viabilitas			
			1 jam	3 jam	6 jam	12 jam
1	Blastula	1	-	+	+++	+
		2	-	+	++	+

Keterangan: (-) embrio masih stress, (+) embrio mulai kembali normal (bundar), (++) embrio mulai berkembang; (+++) reekspansi blastosul (Penelitian 2012)

Hasil analisis Uji Fisher memperlihatkan viabilitas embrio tahap blastula setelah biopsi 1 sel dan 2 sel berbeda tidak nyata ($P>0,05$) untuk kembali ke kondisi normal setelah dibiarkan selama 1

jam, 3 jam, 6 jam dan 12 jam. Hal ini terjadi karena kerusakan embrio saat biopsi pada blastula lebih kecil, karena sel blastomer dari embrio tahap blastula lebih banyak dan kecil. Jadi biopsi 1 sel ataupun 2 sel

dari tahap blastula tidak akan mempengaruhi tingkat viabilitas embrio setelah biopsi. Pada tahap blastosis, semua metode biopsi dimana akan dilakukan perusakan dari zona pellusida yaitu pada area dimana ada sel trophoctoderm (Cenariu *et al.*, 2012). Kecepatan dan kemudahan biopsi dengan metode *microblade* sudah direkomendasikan sebagai teknik yang paling cocok untuk embrio yang akan ditransfer tanpa kriopreservasi.

Hasil penelitian ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Shirazi *et al* (2010) dimana penelitian ini menggunakan embrio yang dihasilkan dengan panen embrio pada hari 2, 3, dan 4 pasca-inseminasi dengan jumlah sel yang berbeda (4 sampai 16-sel). Embrio dibiopsi dengan setetes dari 100 ml H-SOF dan perusakan zona pellusida dengan pengeboran pronase dengan

aspirasi untuk mengambil satu blastomere. Embrio dibiopsi adalah kemudian dibiakkan di SOFaaBSA co-kultur sampai perkembangan blastosit. Dan didapatkan hasil bahwa tidak ada perbedaan antara waktu terhadap viabilitas embrio pada tahap yang berbeda dari embrio biopsi yaitu pada tahap morula.

Gustafsson *et al*, (1994) ; Thibier dan Nibart , (1995) melakukan penelitian pada embrio domba dan didapatkan bahwa prosedur biopsi tidak memiliki pengaruh berbahaya terhadap viabilitas embrio segar, kapasitas mengembangkan dari embrio dibiopsi untuk di transfer jauh berkurang ketika mereka cryopreserved .

Urszula *et al*, (1990) melaporkan bahwa praimplantasi embrio tikus yang dibiopsi pada tahap 4 sel, tahap 8-sel dan morula,

biopsi memiliki dampak pada perkembangan embrio dan berpotensi lebih baik secara *in vitro* dan *in vivo* bila dilakukan pada tahap 8-cell.

Umur dan jumlah sel embrio pada saat biopsi tidak berpengaruh signifikan terhadap embrio blastosis setelah thawing. Dan secara signifikan lebih tinggi viabilitas embrio pada embrio yang dibiopsi yang umur 2 hari yaitu pada tahap 4-cell dibandingkan dengan embrio yang dibiopsi pada hari 2 (8-sell), hari ke 3 (stadium 8 sell), atau hari ke - 4 (tahap 16 sell). Kesalahan biopsi yang akan mempengaruhi viabilitas embrio karena jumlah sel (1 sampai 2 sel) kurang dari satu persen (Shirazi et al, 2010).

Pada sapi, biopsi pada tahap morula tidak memiliki efek yang merugikan pada perkembangan embrio selanjutnya sampai tahap

blastokista..Hal ini diketahui bahwa vitrifikasi dan prosedur thawing memiliki efek merusak yang lebih rendah pada tingkat kelangsungan hidup embrio yg berhubung dgn domba . (Naitana et al, 1996; Syirazi et al, 2010; Ali et al, 1993; Szell dan Windsor, 1994). Selanjutnya, vitrifikasi tidak merugikan dan berpengaruh terhadap tingkat penetasan embrio dibiopsi dibandingkan dengan tanpa dibiopsi yang mana ini berbeda dengan apa yang dilaporkan oleh Naitana et al (1993) yang berhubung dgn embrio domba .

Viabilitas Embrio Tahap Morula dan Blastula Setelah Biopsi (1 sel)

Viabilitas embrio tahap morula dan blastula setelah dibiopsi dengan mengeluarkan 1 sel dapat dilihat pada Tabel 4

Tabel 4. Viabilitas embrio sapi pesisir tahap morula dan blastula (1 sel)

No	Identifikasi	Biopsi Blastomer(sel)	Tingkat Viabilitas			
			1 jam	3 jam	6 jam	12 jam
1	Morula	1	-	+	++	+
2	Blastula	1	-	+	+++	+

Keterangan: (-) embrio masih stress, (+) embrio mulai kembali normal (bundar), (++) embrio mulai berkembang; (+++) reekspansi blastosul (Penelitian 2012)

Pada Tabel 4 dapat dilihat viabilitas embrio tahap blastula setelah biopsi dengan mengeluarkan 1 sel baik untuk 1 jam, 3 jam dan 12 jam setelah biopsi. adalah sama. Viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi pada tahap blastula lebih cepat mengalami perkembangan (reekspansi blastosul). Tetapi viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi pada tahap morula dan blastula setelah dianalisis dengan Uji Fisher hasilnya berbeda tidak nyata ($P > 0.05$).

Viabilitas embrio setelah biopsi lebih baik pada tahap blastula bila dibandingkan dengan tahap morula dengan pengambilan 1 blastomer. Tingginya nilai viabilitas

embrio tahap blastula (1 sel) dibandingkan tahap morula (1 sel) dapat terjadi karena ukuran blastomer blastula lebih kecil dan jumlah blastomernya lebih banyak dibandingkan morula, sehingga kemampuan untuk memperbaiki diri kembali lebih optimal setelah terjadi perlukaan.

Namun hasil penelitian ini berbeda dengan pernyataan Imron (2005) yang mengatakan bahwa embrio pada tahapan morula lebih rentan dibandingkan pada tahapan blastosis, karena Imron (2005) melakukan *splitting* embrio pada tahap morula dan didapatkan bahwa embrio tahap morula lebih rentan dibandingkan dengan embrio tahap

blastosis karena jumlah sel blastosis lebih banyak dibandingkan dengan embrio tahap morula

Macháty et al, (1993) melaporkan bahwa pengambilan satu sel dari embrio sapi tahap 16-32 sel embrio praimplantasi tidak mengubah perkembangan embrio in vitro sampai tahap perkembangan blastokista. Herr dan Reed (1991), Thibier dan Nibart (1992) melakukan biopsi dengan memotong beberapa sel dari morulae atau blastosis menggunakan microblade mendapatkan hasil bahwa embrio dapat berkembang sampai tahap blastokia.

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Imron dkk (2007) dimana tiga jam setelah proses *splitting*, demi embrio telah mengalami perkembangan secara morfologis yaitu terjadi reekspansi

blastosol dengan membentuk kembali ICM dan tropoblas. Selain itu bentuk demi embrio menjadi bulat kembali dan tidak lonjong .

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 tropoblas yang secara jelas dapat dibedakan.

Takeuchi et al (1992) menggunakan tiga metode untuk biopsi , yaitu enukleasiaspirasi dan ekstrusi , dan menemukan hanya sedikit perbedaan diantaraketiga metoda biopsi terhadap perkembangan embrio selanjutnya/ Viabilitas embrio setelah biopsi..

Viabilitas embrio beku yang telah *dithawing* lalu dibiopsi baik dengan pemotongan (*microblade*) ataupun dihisap (*aspirasi*) dan

kemudian dikultur selama 48 jam didapatkan viabilitasnya embrio setelah biopsi adalah 20% untuk pemotongan dengan *microblade* dan 30% untuk embrio yang dibiopsi dengan dihisap dan akan mencapai tahap blastula dan berhasil menetas dari ZP.. Karena biopsi yang dilakukan setelah pencairan embrio memiliki pengaruh langsung terhadap perkembangan selanjutnya dan akan menurunkan perkembangan embrio *in vitro* sebesar 15%. Embrio yang dibekukan lalu dibiopsi maka tingkat kebuntingan pada sapi yang ditransfer adalah sekitar 30% dan tingkat kebuntingan dari embrio yang ditransfer mengalami penurunan sebesar 15% dibandingkan dengan embrio utuh yang ditransfer.

Viabilitas embrio beku setelah di *thawing* dilanjutkan dengan biopsi sangat berpengaruh terhadap

hasil kebuntingan. Hasil penelitian Li *et al* (2007) mengamati tingkat kebuntingan ternak lebih rendah (41,8%) dengan embrio yang terkena pembekuan, sedangkan implantasi embrio segar setelah biopsi tidak mempengaruhi tingkat kebuntingan (49,6%).

Tetapi embrio yang telah dibiopsi kemudian dilakukan pembekuan maka perkembangan embrio tidak akan mempengaruhi embrio untuk ditransfer bila dibandingkan dengan embrio utuh yang ditransfer setelah dibiopsi (Gustafsson *et al.*,1994; Thibier dan Nibart, 1999; Shirazi *et al.*, 2010).

Memilih biopsi yang memadai sangat penting dalam embrio yang akan menjalani kriopreservasi berikutnya, karena sangat berpengaruh terhadap viabilitas. Dari penelitian ini didapatkan hasil yang berbeda secara signifikan antara tiga

metode biopsi: tingkat kebuntingan adalah dari 57% pada embrio dibiopsi oleh jarum, 43% pada embrio dibiopsi dengan aspirasi, dan 31% pada embrio dibiopsi oleh *microblade*. Metode biopsi embrio sangat penting dan berpengaruh sangat besar terhadap viabilitas embrio, integritas dan kelangsungan hidup embrio yang dikriopreservasi. Integritas zona pellusida merupakan kunci dalam kelangsungan hidup embrio (Behr dan Shu, 2010).

Ketika embrio tahap morula yang dibiopsi, tidak menjadi masalah tempat dimana zona pellusida akan dibiopsi, karena perusakan zona pellusida dapat dilakukan dimana saja pada lingkaran embrio, dan dapat dilakukan dengan semua teknik biopsi yang ada (Bredbacka, 1991).

Sedangkan embrio tahap blastosis, semua metode biopsi akan merusak zona pellusida di daerah

dimana hanya sel trofektoderm hadir (Bredbacka, 1991). Ketiga teknik biopsi mampu menyediakan cukup sel dan DNA untuk penentuan jenis kelamin embrio dengan PCR. Tetapi jumlah bahan genetik yang diperoleh biopsi dengan *microblade* sedikit lebih tinggi daripada yang diperoleh oleh jarum atau aspirasi, teknik yang terakhir masih mampu menyediakan sel-sel dan DNA yang cukup untuk memungkinkan amplifikasi. Selanjutnya Tominaga dan Hamada

(2004) melaporkan akurasi yang lebih tinggi dengan menggunakan embrio yang dibiopsi dengan *microblade* dalam penentuan jenis kelamin. **.Viabilitas Pada Tahap Morula dan Blastula Setelah Biopsi (2 sel)**

Viabilitas embrio setelah biopsi pada tahap morula dan blastula dengan pengambilan 2 blastomer dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Viabilitas Embrio Sapi Pesisir Tahap Morula Dan Blastula (2 Sel)

No	Identifikasi	Biopsi Blastomer(sel)	Tingkat Viabilitas			
			1 jam	3 jam	6 jam	12 jam
1	Morula	2	-	+	++	+
2	Blastula	2	-	+	++	+

Keterangan: (-) embrio masih stress, (+) embrio mulai kembali normal (bundar), (++) embrio mulai berkembang, (+++) reekspansi blastosul (Penelitian 2012)

Hasil penelitian memperlihatkan viabilitas embrio tahap morula dan blastula setelah biopsi dengan pengambilan 2 blastomer adalah sama baik

viabilitas embrio pada 1 jam, 3 jam, 6 jam dan 12 ja setelah biopsi ‘

Macháty et al , (1993) , melaporkan bahwa 53,3 % dari embrio yang manipulasi dapat berkembang sampai tahap blastokia.

Selain itu, biopsi tidak memiliki efek merugikan pada tingkat kehamilan dicapai menggunakan embrio yang dibiopsi untuk transfer. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara tingkat kehamilan dicapai untuk embrio yang dibiopsi dengan embrio yang tidak dibiopsi (52,6 % dan 54,1 %).

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. Sel-sel embrio yang degenerasi/mati akan hancur dan terlihat seperti *debris* (kotoran) dalam pewarnaan Giemsa (IMRON dkk, 2007).

Efektifitas Penentuan Jenis

Kelamin

Efektifitas Penentuan Jenis Kelamin pada Tahap Morula dan Blastula.

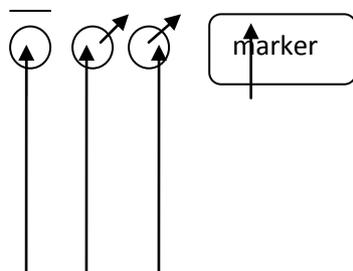
Efektifitas penentuan jenis kelamin embrio pada sapi Pesisir dengan melihat jumlah pita hasil elektroforesis dimana embrio berjenis kelamin jantan dengan 2 pita dan embrio berjenis kelamin betina dengan 1 band pita dan dapat dilihat pada Tabel 6.

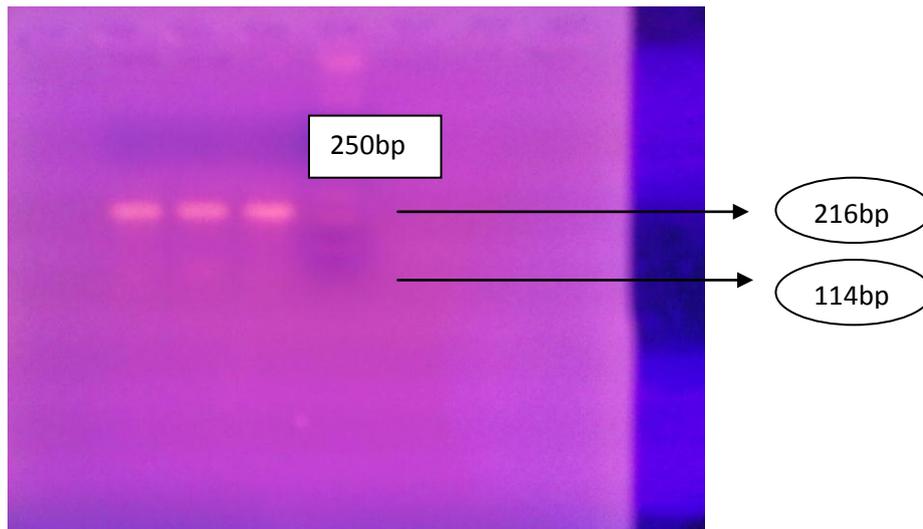
Tabel 6. Jumlah pita embrio tahap morula dan blastula sapi pesisir

Tahapan	Jumlah Sel	Jumlah Pita (band)	
		Betina (1 band)	Jantan(2 band)
Morula	1	1	2
	2	1	2
Blastula	1	6	5
	2	7	5

Hasil penelitian pada sapi Pesisir terlihat bahwa semua embrio tahap morula baik pengambilan 1 sel maupun 2 sel teridentifikasi seluruhnya (100%), sedangkan pada tahap blastula pengambilan 1 sel terdapat 1 embrio yang tidak teridentifikasi (91,67%) sedangkan pada tahap blastula pengambilan 2 sel semua embrio teridentifikasi (100%).

Untuk melihat uji elektroforesis pada tahap morula dan efektifitas penentuan jenis kelamin embrio dapat dilihat pada gambar 18. Embrio berjenis kelamin janta ditandai dengan 2 pita (kromosom XY) dan embrio berjenis kelamin betina dengan 1 pita (kromosom XX).





Gambar 5. Foto elektroforesis penelitian. Embrio jantan ditandai dengan 2 band dan embrio betina dengan 1 band.

Pada Gambar 5 ini terlihat jenis kelamin betina ditentukan dengan 1 pita (XX) dengan 216 bp dan jenis kelamin jantan dengan 2 pita (XY) dengan 141 bp.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu (Zoheir and Allam, 2010) yang telah memperlihatkan bahwa biopsi dari satu blastomer cukup untuk penentuan jenis kelamin dan analisis genotip lain pada embrio, keakuratan dari penentuan jenis kelamin 100% telah dilaporkan ketika sejumlah blastomer diambil dari morula lebih

dari 3 sel. Oleh karena itu, keseimbangan telah ditemukan antara pengeluaran sejumlah besar blastomer dan kerusakan embrio dan pengeluaran satu/*single* blastomer dan resiko penurunan akurasi dalam penentuan jenis kelamin pada embrio (Cenariu, *et al.*, 2012).

Hasil penelitian ini berbeda dengan yang didapatkan oleh Park *et al* (2000) dimana didapatkan bahwa penentuan jenis kelamin dengan menggunakan 1 blastomer mendapatkan effsiensinya hanya

90% sedangkan untuk 8 sel baru didapatkan efisiensi 100%.

Efektifitas Penentuan Jenis Kelamin pada Tahap Morula (1 dan 2 sel)

Efektifitas penentuan jenis kelamin embrio pada tahapan morula dengan menggunakan PCR untuk 1 dan 2 blastomer pada embrio sapi Pesisir memperlihatkan hasil yang sama yaitu efektifitasnya sampai 100%.

Klimanskaya *et al* (2006) mengatakan bahwa biopsi dengan menggunakan blastomer dapat digunakan untuk penentuan jenis kelamin, adapun yang menjadi masalah adalah integritas dari zona pellusida pada waktu embrio dibekukan atau dicairkan setelah biopsi.

Park *et al* (2000); Chrenek *et al* (2001); Carneiro *et al* (2011)

melaporkan bahwa biopsi dari beberapa blastomer sudah dapat digunakan untuk melakukan penentuan jenis kelamin (sexing) dan analisis genotip lainnya pada embrio dengan akurasi bisa mencapai 100%. Penelitian ini juga telah dilakukan oleh Zoheir dan Allam, (2010). dengan menggunakan sejumlah blastomer yang dipisahkan dari morula lebih dari 3 sel sudah dapat digunakan untuk menentukan jenis kelamin embrio

Biopsi pada tahap morula untuk ditentukan jenis kelaminnya lebih baik dibandingkan blastula. Hal ini dapat terjadi karena sel-sel pada morula masih terlihat jelas dibandingkan sel-sel pada blastula. Keuntungan biopsi pada akhir tahapan pertumbuhan embrio seperti morula atau blastula, secara relatif lebih banyak sel yang bisa dikoleksi dibandingkan dengan biopsi pada

awal tahapan perkembangan. Bagaimanapun, tahapan morula mewakili lebih baik tahapan untuk biopsi embrio karena pematangan yang luas, yang muncul pada tahapan 16-32 sel embrio (Hardy *et al.*, 1996 dalam De vos *et al.*, 2001).

Pada embrio mencit ditunjukkan bahwa biopsi paling merusak pada tahapan morula, penurunan tingkat implantasi, viabilitas fetus dan bobot badan fetus secara signifikan (Krzyminska *et al.*, 1990 dalam De vos *et al.*, 2001). Namun Yu *et al* (2006) mengusulkan bahwa sample yang besar lebih baik untuk penentuan jenis kelamin tetapi viabilitas dari perlakuan terhadap embrio bisa dikompromikan.

Efektifitas Penentuan Jenis Kelamin Pada Tahap Blastula (1 dan 2 sel)

Dari analisis data menggunakan uji Fisher yang dilakukan pada tahapan blastula memperlihatkan nilai yang tidak berbeda antara perolehan embrio jantan dibandingkan embrio betina dimana ($P>0.05$), Efektifitas penentuan jenis kelamin embrio pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel/1 blastomer adalah 91,67% sedangkan dengan menggunakan 2 blastomer efektifitasnya mencapai 100%.

Perbedaan efektifitas penentuan jenis kelamin embrio dengan menggunakan embrio tahap blastula yang dibiopsi jumlah sel yang berbeda yaitu 1 dan 2 blastomer terlihat hasil yang berbeda walaupun setelah di uji dengan statistik berbeda tidak nyata. Ini disebabkan karena sel yang terdapat pada embrio tahap blastula lebih kecil dan banyak dimana jumlah sel pada tahap

blastula lebih dari 100 sel, kemungkinan waktu pengambilan dan pencucian sel hilang atau melekat pada dinding pipet pasteur atau pada dinding cup untuk PCR, sehingga tidak dapat terdeteksi.

Tominaga and Hamada (2004) mengisolasi hanya dengan 1 atau 2 sel dari blastomer embrio pada tahap 8 – 16 sel dan dilakukan penentuan jenis kelamin diperoleh efisiensinya sekitar 90%. Park *et al* (2000) melaporkan bahwa efisiensinya baru mencapai 100% dengan menggunakan 8 blastomer sedangkan dengan menggunakan 4, 2 dan 1 blastomer hasilnya hanya mencapai 96,3 – 92,1%.

Penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh King *et al* (1992) dan Gutierrez *et al* (2001) menemukan bahwa embrio jantan lebih tahan terhadap manipulasi. Nedambale *et al* (2004)

menambahkan bahwa embrio yang diproduksi secara *in vitro* lalu embrio divitrifikasi dan setelah *thawing* embrio dikultur selama 48 jam dan ditentukan jenis kelamin dengan PCR. Embrio yang mencapai tahap blastula pada embrio jantan memiliki morfologi yang lebih baik dan kemudian akan lahir dengan tingkat yang lebih besar dari embrio betina.

Dari analisis data menggunakan uji Fisher yang dilakukan pada tahapan blastula dengan menggunakan 2 blastomer yang terlihat pada Lampiran 8 memperlihatkan nilai yang tidak berbeda nyata antara perolehan embrio jantan dibandingkan embrio betina dimana ($P > 0.05$), dimanawalaupun dalam angka jumlah embrio kelamin jantan lebih sedikit dibandingkan embrio berkelamin betina di tahapan blastula

yaitu 5 embrio jantan dan 7 embrio betina.

Hasil penelitian pada sapi Pesisir didapatkan persentase embrio berjenis kelamin betina sebesar 41,6% hasil penelitian ini bertolak belakang dengan penelitian Hasler *et al* (2002) yang menunjukkan bahwa rasio jenis kelamin dari blastula secara signifikan condong mendukung embrio betina (60,3%). Hasler *et al.* (2002) lebih lanjut membuktikan bahwa keseluruhan yang diproduksi secara *in vitro* persentase embrio betina secara signifikan lebih tinggi (53%) dari persentase jantan *in vivo* menghasilkan embrio (49,2%) ini diperkuat karena karena embrio sapi Pesisir diproduksi secara *in vivo*.

Embrio yang dihasilkan secara *in vivo* yang dilakukan biopsi untuk penentuan jenis kelamin dengan menggunakan PCR adalah suatu

metoda praktis yang dapat dilakukan di lapangan. Cenariu *et al* (2012) menyatakan bahwa dalam bioteknologi reproduksi ternak merekomendasikan bahwa PCR sebagai metode penentuan jenis kelamin yang lebih mudah, lebih cepat dan lebih murah dimana untuk hasil penelitian menunjukkan akurasi 95,65%.

Sampling dengan biopsi telah diterapkan untuk IVP embrio untuk pada tahap 16-32-sel, morula, dan blastula. Karena efisiensi *sexing* menurun secara signifikan bila kurang dari lima sel dalam penentuan jenis kelamin dengan PCR, ukuran sampel yang lebih besar (8 – 10 sel) telah direkomendasikan untuk keberhasilan penentuan jenis kelamin dengan PCR (Park *et al.*, 2000).

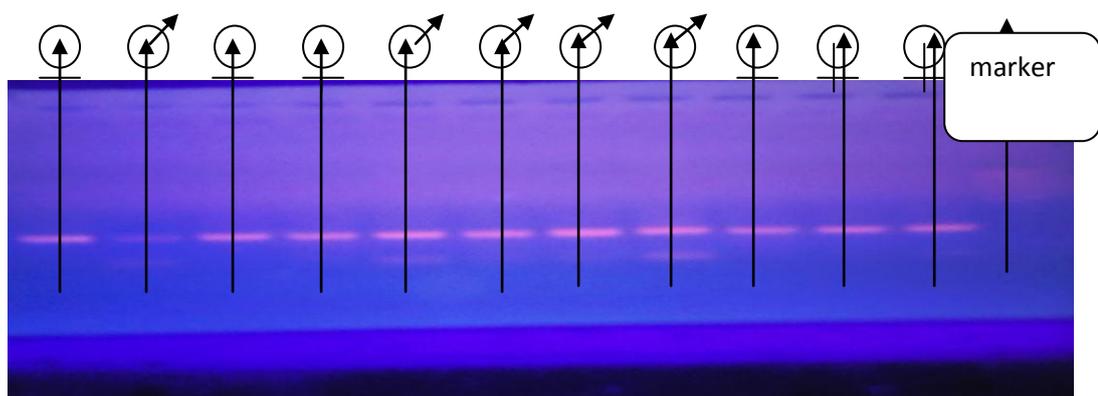
Namun, pengembangan "ekstensi primer preamplification-PCR (PEP-PCR)" yang merupakan

divitro-sistem untuk memperkuat sebagian besar urutan DNA hadir dalam sel haploid tunggal, memungkinkan untuk mengidentifikasi jenis kelamin embrio menggunakan blastomere tunggal. Penerapan PEP-PCR untuk penentuan jenis kelamin sapi menghasilkan 91% tingkat identifikasi.

Taman *et al* (2000); Chrenek *et al* (2001); Carneiro *et al* (2011) telah menunjukkan bahwa biopsi dari blastomere tunggal sudah cukup untuk penentuan jenis kelamin dan analisis genotip pada embrio dengan

akurasi diprediksi 100%. Ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Zoheir dan Allam (2010) dengan menggunakan sejumlah blastomer yang dipisahkan dari morula melebihi lebih dari tiga. Oleh karena itu, keseimbangan harus ditemukan antara pengambilan sejumlah besar blastomer dan merusak embrio karena akan mengurangi tingkat kebuntingan.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat hasil PCR untuk penentuan jenis kelamin pada embrio sapi Pesisir pada tahap Blastula pada Gambar 6.



Gambar 6. Foto elektroforesis pada sapi Pesisir. Embrio jantan dengan 2 band (XY). Betina dengan 1 band (XX)

Pada Gambar 6 terlihat di urutan 1, 3, 4, 9, 10 dan 11 terlihat

dengan jelas ada 1 garis yang menandakan tidak mengandung

kromosom Y dan ini menjelaskan bahwa embrio ini berjenis kelamin betina, sedangkan urutan 2, 5, 6, 7 dan 8 terlihat ada 2 garis yang menandakan adanya kromosom Y dan menjelaskan bahwa embrio ini berjenis kelamin jantan.

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Shea (1999) dan Lacaze *et al* (2008) melaporkan bahwa 44 – 48% adalah berjenis kelamin betina. Hasler *et al* (2002) mendapatkan bahwa rasio jenis kelamin blastula secara signifikan condong betina yaitu sekitar 60,3%. Persentase embrio yang diperoleh dari *in vitro* jantan secara signifikan lebih tinggi (53%) dari persentase embrio jantan yang diproduksi secara *in vivo* yaitu 49,2%. Penelitian dari King *et al* (1992) dan Gutierrez-Adan *et al* (2001) menemukan bahwa embrio jantan lebih tahan terhadap manipulasi.

Nedambale *et al* (2004) melakukan penelitian pada embrio *in vitro* yang telah dibekukan dan setelah *dithawing* dikultur selama 48 jam lalu ditentukan jenis kelamin dengan PCR didapatkan bahwa embrio yang mencapai tahap blastula sebagian besar adalah jantan yang memiliki morfologi yang lebih baik. Penelitian ini dikuatkan oleh Tominaga (2004) bahwa penentuan jenis kelamin dengan menggunakan embrio *in vivo* yang diperoleh pada hari ke-7 mendapatkan embrio berjenis kelamin jantan dan perkembangannya lebih cepat bila dibandingkan dengan embrio betina. Persentase penentuan jenis kelamin di tahap morula lebih tinggi karena ukuran blastomer pada morula lebih besar dan kemungkinan untuk hilangnya blastomer waktu pencucian lebih kecil bila dibandingkan dengan blastomer pada

tahap blastula sehingga penentuan jenis kelaminnya lebih efektif.

Efektifitas Penentuan Jenis Kelamin Pada Embrio Morula Dan Blastula (1 sel)

Dari analisis data menggunakan uji *chi square* yang dilakukan pada tahapan morula dan blastula memperlihatkan nilai yang tidak berbeda nyata antara perolehan embrio jantan pada tahap 1 sel morula dibandingkan tahap 1 sel blastula dengan nilai 1,286 ($P > 0.05$), walaupun dalam angka *sex ratio* jantan pada tahap morula 1 sel lebih sedikit dibandingkan tahapan blastula 1 sel yaitu 2 embrio pada morula dan 5 embrio pada blastula. Perolehan embrio betina pada tahap 1 sel morula dibandingkan tahap 1 sel blastula dengan nilai 3,572 ($P > 0,05$). Dengan angka *sex ratio*

betina 1 embrio pada tahap morula dan 6 embrio pada tahap blastula.

Hasil penelitian pada embrio sapi Pesisir didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Lopatarova *et al.* (2010) mendapatkan hasil penelitiannya bahwa kualitas embrio yang tinggi diperoleh dari donor disuperovulasi kemudian embrio dibiopsi dan sel-sel embrio (5-10) dianalisis dengan PCR menggunakan spesifik primer untuk penentu Y-kromosom. Penentuan jenis kelamin didapatkan 91,3% untuk embrio segar (44% betina) dan 87,5% dari embrio beku (45,9% betina).

Efektifitas Penentuan Jenis Kelamin Pada Embrio Morula dan Blastula (2 Sel)

Dari analisis data menggunakan uji *chi square* yang dilakukan pada tahapan morula dan blastula memperlihatkan nilai yang tidak berbeda nyata antara perolehan

embrio jantan pada tahap 1 sel morula dibandingkan tahap 1 sel blastula dengan nilai 1,286 ($P>0.05$), walaupun dalam angka *sex ratio* jantan pada tahap morula 1 sel lebih sedikit dibandingkan tahapan blastula 1 sel yaitu 2 embrio pada morula dan 5 embrio pada blastula.

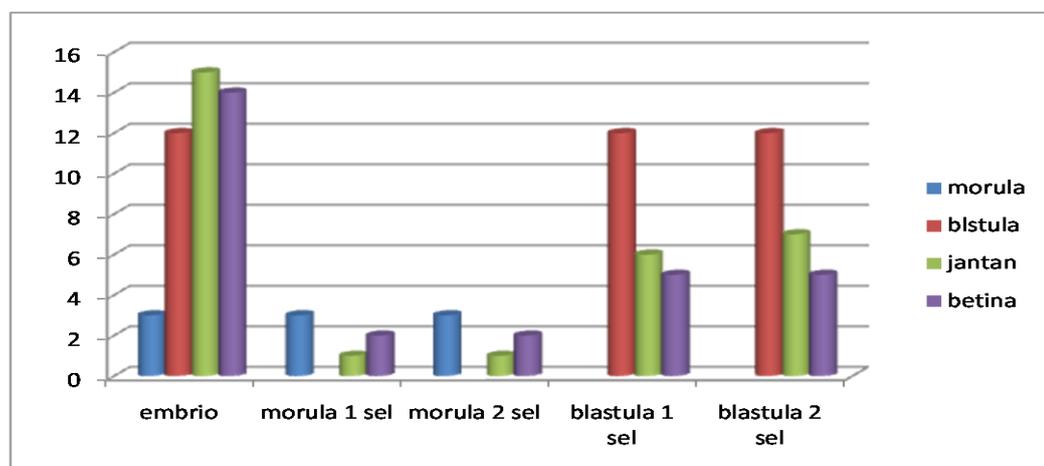
Perolehan embrio betina pada tahap 1 sel morula dibandingkan

tahap 1 sel blastula dengan nilai 6 ($P<0.05$). Dengan angka *sex ratio* betina 1 embrio pada tahap morula dan 7 embrio pada tahap blastula.

Pada penelitian ini didapat *sex ratio* sapi pesisir pada berbagai tahap perkembangan embrio morula dan blastula dengan blastomer 1 sel dan 2 sel. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 7.

Tabel 7. Jumlah *sex ratio* embrio sapi pesisir pada tahap morula dan blastula dengan blastomer 1 dan 2 sel.

No	Identifikasi	Blastomer	Jantan	Betina	Persentase jantan	Persentase betina
1	Morula	1	2	1	66,67	33,33
		2	2	1	66,67	33,33
2	Blastula	1	5	6	41,67	50,00
		2	5	7	41,67	58,33



Gambar 7. Jumlah *sex ratio* embrio sapi pesisir pada tahap morula dan blastula dengan blastomer 1 dan 2 sel.

Sex ratio Embrio Sapi Pesisir Dengan PCR

Pada penelitian juga memperlihatkan *sex ratio* dari embrio sapi pesisir tahap morula dengan blastula (Tabel 8 dan Gambar 8). Dimana pada tahap morula 1

blastomer dan 2 blastomer embrio jantan 66,67% dan embrio betina 33,33%. Untuk tahap blastula 1 blastomer embrio jantan 41,67% dan embrio betina 50%, pada 2 blastomer embrio jantan 41,67% dan embrio betina 58%.

Tabel 8. *Sex ratio* embrio pada sapi pesisir

No	Identifikasi	Blastomer	Jenis Kelamin	
			Jantan	Betina
1	Morula	1	2(66.67%)	1(33,33 %)
		2	2(66.67%)	1(33,33 %)
2	Blastula	1	5 (41, 67%)	6 (50%)
		2	5(41, 67%)	7 (58,33%)

Dari analisis data menggunakan uji χ^2 yang dilakukan pada tahapan morula 1 dan 2 blastomer 8 memperlihatkan nilai yang tidak berbeda antara perolehan embrio jantan dibandingkan embrio betina dengan nilai 0,334 ($P>0,05$),

walaupun dalam angka jumlah embrio kelamin jantan lebih banyak dibandingkan embrio berkelamin betina yaitu 2 embrio jantan dan 1 embrio betina. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian yang didapatkan oleh Avery *et al* (1992) dan Nedambale *et al* (2004) karena

perkembangan embrio jantan lebih cepat dari embrio betina pada tahap morula.

Pada tahap blastula *sex ratio* embrio jantan lebih rendah dari embrio betina yaitu pada 1 blastomer 5 embrio jantan dan 6 embrio betina sementara itu untuk 2 blastomer 5 embrio jantan dan 7 embrio betina. Tetapi bila diuji dengan uji χ^2 baik pada 1 dan 2 blastomer hasilnya tidak berbeda nyata dengan nilai 0,167 pada 1 blastomer dan 0,334 pada 2 blastomer ($P>0,05$). Hal ini sesuai dengan penelitian Hasler *et al.* (2002) yang mendapatkan rasio jenis kelamin blastula secara signifikan condong betina yaitu sekitar 60,3%.

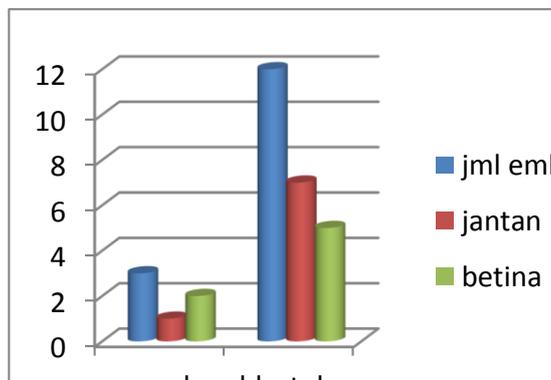
Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Shea (1999) dan Lacaze *et al.* (2008) melaporkan bahwa 44-48% adalah berjenis kelamin betina. Hasler *et al.* (2002) lebih lanjut membuktikan bahwa

secara keseluruhan persentase embrio yang diperoleh dari *in vitro* jantan secara signifikan lebih tinggi (53%) dari persentase embrio jantan yang diproduksi secara *in vivo* yaitu 49,2%. King *et al* (1992) dan Gutierrez-Adan *et al* (2001) menemukan bahwa embrio jantan lebih tahan terhadap manipulasi.

Pada Tabel 8 terlihat bahwa penentuan jenis kelamin embrio pada sapi Pesisir yaitu pada tahap morula adalah 100%, sedangkan pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel efektifitasnya hanya mencapai 91,67% sedangkan dengan menggunakan 2 sel blastomer efektifitas penentuan jenis kelamin adalah 100%. Pada tahap morula pengeluaran hanya 1 sel dari tahap perkembangan embrio 16-32 sel cukup untuk keberhasilan penentuan jenis kelamin menggunakan metode PCR. Penelitian ini sama dengan

yang dilakukan oleh Machaty *et al.*, (1993); Cherenek dan Bulla (2002). Hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Lopatarova *et al* (2008) dengan menggunakan embrio *splitt* dan mendapatkan penentuan jenis kelamin hanya 89,4 – 92%. Sementara hasil penelitian yang dilakukan oleh Thibier dan Nibart (1995); Shea (1999); Li *et al*, (2007); Yu *et al* (2007) sebesar 85 – 95%.

Jumlah embrio sapi pesisir pada tahap morula dan blastula serta *sex ratio* yang diperoleh pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Jumlah dan *sex ratio* pada embrio sapi pesisir

Lacaze *et al* (2008) mendapatkan hasil penelitian berbeda dengan penelitian ini dimana dia mendapatkan bahwa penentuan jenis kelamin embrio berbanding terbalik dengan jumlah sel embrio yang terisolasi (≤ 3 sel efisiensinya 85,5%, 4 – 6 sel efisiensinya 97,4% sedangkan dengan menggunakan ≥ 7 sel efisiensinya 100%). Terlihat bahwa *sex ratio* pada tahapan morula yang di-PCR dengan 1 sel pada embrio sapi Pesisir memperlihatkan hasil berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) walaupun dalam angka jumlah kelamin jantan lebih banyak dibandingkan embrio berkelamin betina.

Tetapi hasil penelitian pada embrio sapi Pesisir didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Lopatarova *et al.* (2010) mendapatkan hasil penelitiannya bahwa kualitas embrio yang tinggi

diperoleh dari donor disuperovulasi kemudian embrio dibiopsi dan sel-sel embrio (5-10) dianalisis dengan PCR menggunakan spesifik primer untuk penentu Y-kromosom. Penentuan jenis kelamin didapatkan 91,3% untuk embrio segar (44% betina) dan 87,5% dari embrio beku (45,9% betina).

Dengan menggunakan jumlah sel dan DNA yang sangat kecil dalam penentuan jenis kelamin juga dilaporkan oleh Chrenek *et al* (2001); Park *et al*, (2001); Kirkegaard *et al* (2012). Klimanskaya *et al* (2006) juga mengatakan bahwa biopsi dari blastomer tunggal cukup untuk penentuan jenis kelamin dan yang menjadi masalah adalah integritas dari zona pellusida pada waktu embrio dibekukan atau dicairkan setelah biopsi.

Biopsi embrio sapi pada tahap 4-16 sel tidak memiliki efek buruk pada kemampuan perkembangan embrio secara *in vitro* dan begitu juga dengan embrio tahap 16 sel, dibiopsi pada hari ke-4 adalah tahap terbaik untuk menghilangkan blastomer. Biopsi dilakukan pada tahap 16 sel menghasilkan 94% dari embrio berkembang ke tahap blastula, yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan yang dibiopsi pada tahap 8 sel (64 %). Sedangkan embrio yang dibiopsi pada hari ke-3 yaitu pada tahap 4 sel dan 8 sel menghasilkan embrio yang berkembang ke tahap blastokia sebesar 49% dan pada tahap 46% pada dan pada hari ke yaitu pada tahap 4 dan 8 sel menghasilkan embrio berkembang ke tahap blastula setelah biopsi adalah 39% dan 33 % (Shirazi *et al.*, 2010).

Nedambale *et al* (2004) melakukan penelitian pada embrio *in vitro* yang telah dibekukan dan setelah *dithawing* dikultur selama 48 jam lalu ditentukan jenis kelamin dengan PCR didapatkan bahwa embrio yang mencapai tahap blastula sebagian besar adalah jantan yang memiliki morfologi yang lebih baik.

Penelitian ini dikuatkan oleh Tominaga (2004) bahwa penentuan jenis kelamin dengan menggunakan embrio *in vivo* yang diperoleh pada hari ke-7 mendapatkan embrio berjenis kelamin jantan dan perkembangannya lebih cepat bila dibandingkan dengan embrio betina.

Persentase penentuan jenis kelamin di tahap morula lebih tinggi karena ukuran blastomer pada morula lebih besar dan kemungkinan untuk hilangnya blastomer waktu pencucian lebih kecil bila dibandingkan dengan blastomer pada

tahap blastula sehingga penentuan jenis kelaminnya lebih efektif.

KESIMPULAN

1. Viabilitas embrio pada tahap morula dengan biopsi 1 sel dan 2 sel untuk 1 jam , 3 jam , 6 jam dan 12 jam adalah sama sedangkan viabilitas embrio dengan biopsi 1 sel dan 2 sel pada tahap blastula untuk 1 jam , 3 jam dan 12 jam adalah sama tetapi viabilitas embrio dengan biopsi 2 sel pada tahap blastula dimana 6 jam setelah biopsi perkembangan lebih baik bila dibandingkan dengan viabilitas embrio setelah biopsi baik pada tahap morula dengan biopsi 1 sel dan 2 sel maupun dengan biopsi 2 sel pada tahap blastula. Tetapi setelah

dianalisis secara statistik dengan viabilitas embrio 6 jam setelah biopsi pada tahap morula dan blastula dengan 1 sel dan 2 sel adalah berbeda tidak nyata ($P>0.05$).

2. **Efektifitas** penentuan jenis kelamin embrio tahap morula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah sama yaitu 100 %. Pada embrio tahap blastula dengan menggunakan 1 sel efektivitasnya adalah 91,67% dan dengan menggunakan 2 sel efektifitasnya adalah 100 %. Setelah dianalisis dengan statistik didapatkan bahwa efektifitas penentuan jenis kelamin pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah berbeda tidak nyata ($P>0.05$).

3. **Sex ratio** embrio pada tahap morula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel adalah sama yaitu untuk embrio berjenis kelamin jantan adalah 66,67% dan berjenis kelamin betina adalah 33,33% sedangkan pada tahap blastula dengan menggunakan 1 blastomer sex ratio jantan adalah 41,67% sedangkan embrio berjenis kelamin betina adalah 50 %, dan dengan menggunakan 2 blastomer sex ratio berjenis kelamin jantan adalah 41,67% dan berjenis kelamin betina adalah 58,33 %. Sex ratio embrio pada tahap blastula dengan menggunakan 1 sel dan 2 sel setelah diuji statistik hasilnya berbeda tidak nyata ($P>0.05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, S. 2013. Strategi Pemuliaan Untuk Peningkatan Produktivitas Sapi Pesisir Menuju Swasembada Daging Dan Kesejahteraan Peternak Di Sumatera Barat. Seminar Nasional Pengembangan Ternak Lokal. Padang ,20 November 2013
- Anwar, S. 2004. Kajian Keragaman Karakteristik Eksternal dan DNA Mikrosatelit Sapi Pesisir Sumatera Barat. Disertasi. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Avery, B., C. B. Jorgensen, V. Madison, and T. Greve. 1992. Morphological development and sex of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 265-270.
- Badan Pusat Statistik Kab. Pesisir Selatan. 2011. Pesisir Selatan Dalam Angka. BPS Kabupaten Pesisir Selatan. Painan.
- Badan Pusat Statistik Kab. Pesisir Selatan. 2012. Pesisir Selatan Dalam Angka. BPS Kabupaten Pesisir Selatan. Painan.
- Bamualim, A. dan Wirdahayati. 2006. Peran Teknologi dalam Pengembangan Sapi Lokal di Sumatera Barat. Prossiding. Seminar Nasional "Pengembangan Ternak di Sumbar". Badan Litbang Pertanian BBP2TP, Bogor.
- Behr, B. and Y. Shu. 2010. "Cryopreservation of Pronuclear Stage Human Embryos," in *Fertility Cryopreservation*. R. C. Chiang and P. Quinn, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Boediono, A., Y. Rusiyantono, K. Mohamad, I. Djuwita, dan Herliatien. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner*. 7(4): 11-17.
- Boediono, A. 2005. Produksi embrio kembar identik melalui bedah mikro pada embrio kambing hasil *in vitro*. *J. Vet.*6: 39-46.
- Bondioli, K. R., S. B. Ellis, J. H. Pryor, M. W. Williams, and M. M. Harpold. 1989. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 31: 95-104.
- BPS. 2012. Badan Pusat Statistik Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat.
- Bredbacka, P. 1991. Biopsy of morulae and blastocysts. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 82-84.
- Bredbacka, P., A. Kankaanpaa, and J. Peippo. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology*. 44: 167-176.
- Bredbacka, P. 2001. Progress on methods of gene detection in

- preimplantation embryos. *Theriogenology*. 55(1): 23-34.
- Carneiro, M. C., P. L. Takeuchi, A. Araujo, R. B. Lobo, F. P. Elias, R. A. Vila, C. L. Miranda-Furtado, and E. S. Ramos. 2011. Sexing single bovine blastomeres using *TSPY* gene amplification. *Genet. Mol. Res.* 10: 3937-3941.
- Cenariu, M., P. Eموke, and I. Groza. 2012. Sexing bovine pre-implantation embryos using the polymerase chain reaction: a model for human embryo sexing. *African. J. Biotech.* 11(19): 4455-4458.
- Chen, A-Q., X. Zi-rong, and Y. Song-dong. 2007. Sexing goat embryos by PCR amplification of x and y chromosome specific sequence of the amelogenin gene. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(11): 1689-1693
- Chrenek, P., L. Boulanger, Y. Heyman, P. Uhrin, J. Laurincik, J. Bulla, and J. P. Renard. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*. 55(5): 1071-1081.
- 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..
- De Vos, A. and A. Van Steirteghem. 2001. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 21: 767-80.
- Fu, Q., M. Zhang, W. S. Qin, Y. Q. Lu, H. Y. Zheng, B. Meng, S. S. Lu and K. H. Lu. 2007. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology*. 68: 1211-1218.
- Gianaroli, L. 2000. Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Hum. Reprod.* 15(4): 69-75.
- Gustafsson, H., U. Jaakma, and M. Shamsuddin. 1994. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta. Vet. Scand.* 35(3): 217-222.
- Gutierrez-Adan, A., P. Lonergan, D. Rizos, F. A. Ward, M. P. Boland, B. Pintado, and J. de la Fuente. 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 55: 1117-1126.
- Hafez, B. and E. S. E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins Press. Kiawah Island South Carolina, USA.
- Hasler, J. F., E. Cardey, J. E. Stokes, and P. Bredbacka. 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a

- commercial environment. *Theriogenology*. 58: 1457-1469.
- Herr C. M dan Reed KC (1991) . Mikromanipulation bovine embryos to Sexing embryo. *Theriogenology* 35 45-54
- 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.
- Gustafsson H, U. Jaakma , dan M. Shamsuddin . 1994. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta Vet Scand* 1994;35(3):217-222.
- Imron, M. 2005. Viabilitas demi embrio *in vitro* hasil *splitting* embrio segar dan beku tahap blastosis pada sapi. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Imron . M ; A. Boediono dan I. Supriatna. 2007. Viabilitas Demi Embrio Sapi *In Vitro* Hasil *Splitting* Embrio Segar dan Beku. *Balai Embrio Ternak Cipelang, PO Box 485 Bogor 16004 .Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor*. *JITV* Vol. 12 No. 2 Th. 2007
- King, W. A., L. Picard, D. Bosquet, and A. K. Goff. 1992. Sex dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *J. Reprod. Fert.* 96: 453-459.
- Kirkegaard, K., J. J. Hindkjaer and H. J. Ingerslev. 2012. Human embryonic development 356 after blastomere removal: a time-lapse analysis. *Hum. Reprod.* 27(1): 97-105.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, S. Becker, S. J. Lu, and R. Lanza. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 444: 481-485.
- Lacaze, S., P. Humblot, and C. Ponsart. 2008. Sexing and direct transfer of bovine biopsied frozen-thawed embryos under on-farm conditions in a commercial program. *Recherches Ruminants*. 15eme Recontre, Paris, les 3 et 4 decembre. 387-390.
- Lee, J. H., J. H. Park, E. J. Choi, J. T. Yoon, C. S. Park, and S. H. Lee. 2003. Frequency of sex chromosomal mosaicism in bovine embryos and its effects on sexing using a single blastomere by PCR. *Zygote*. 11: 87-93.
- Li, S., W. Yu, J. Fu, Y. Bai, F. Jin, and B. Shangguan. 2007. Factors influencing pregnancy rates following transfer of bovine *in vivo* embryos biopsied for sex determination. *Reprod. Fert. Dev.* 19: 297.
- Lopatarova, M., S. Cech, P. Krontorad, L. Holy, J.

- Hlavicova, and R. Dolezel. 2010. Conception rate after sex determination and cryopreservation of D7 bovine embryos. *Vet. Med.* 55(1): 10-18.
- Lopes, R. F. F., F. Forell, A. T. D. Oliveira, and J. L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*. 56: 1383-1392.
- Machaty, Z., A. Paldi, T. Csaki, Z. Varga, I. Kiss, Z. Barandi, and G. Vajta. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98: 467-470.
- Manna, L., G. Neglia, M. Marino, B. Gasparrini, R. Di Palo, and L. Zicarelli. 2003. Sex determination of buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) by polymerase chain reaction. *Zygote*. 11: 17-22.
- Martojo, H. 2003. Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farm in Indonesia. The Chinese Society of Animal Science. 112 Farm Road. Hsinhua. Tainan, Taiwan
- Mitalipov, S., D. P. Wolf. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114: 185-199.
- Nainiene, R., J. Kutra, A. Urbsys, V. Pileckas, and A. Siukscius. 2007. PCR-sexing genotyping and viability of bovine preimplantation embryos after freezing-thawing and biopsy. Proceedings of the 13th Baltic Animal Breeding Conference, Parnu, Estonia, 24-25 May 2007 pp.49-53.
- Naitana, S., P. Loi, S. Ledda, P. Cappai, M. Dattena, and L. Bogliolo. 1996. Effect of biopsy and vitrification on *in vitro* survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*. 46(5): 813-824.
- Nedambale, T. L., A. Dinnyes, X. Z. Yank, and X. C. Tian. 2004. Bovine blastocysts development *in vitro*: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol. Reprod.* 71: 1671-1676.
- Park, J. H., J. H. Lee, K. M. Choi, S. Y. Joung, J. Y. Kim, G. M. Chung, D. I. Jin, and K. S. Im. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex PCR with biopsied single blastomere. *Theriogenology*. 55(9): 1843-1853.
- Pereira, R. M., I. Carvalhais, J. Pimenta, M. C. Baptista, M. I. Vasques, A. E. M. Horta, I. C. Santos, M. R. Marques, A. Reis, M. S. Pereira, and C. C. Marques. 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans 10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 322-332.

- Peura, T., J. M. Hyttinen, M. Turunen, and J. Janne. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*. 35(3): 547-555.
- Sharma. S, A. Bhardwaj, S. Jain and H. Yadav. 2005. Animal Genetics and Breeding Division, Animal Biochemistry Division, National Dairy Research Institute, Karnal-132001, Haryana, India. [§]College of Applied Education and Health Sciences, Meerut, U.P.
- [Sato, T.](#), [K. Nakada](#), [Y. Uchiyama](#), [Y. Kimura](#), [N. Fujiwara](#), [Y. Sato](#), [M. Umeda](#), and [T. Furukawa](#). 2005. The effect of pretreatment with different doses of GnRh to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle. *J. Reprod. Dev.* 51(5): 573-578.
- Salisbury, G. W., dan N. L. Vandemark. 1985. *Fisiologi Reproduksi Dan Inseminasi Buatan Pada Sapi*. Terjemaham R. Janur. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Schenk, J. L., T. K. Suh, and G. E. Seidel. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*. 65: 299-307.
- Schenk, J. L., D. G. Cran, R. W. Everett, and G. E. Seidel. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers perinseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*. 71: 717-728.
- Schöler.H.R. (2007). "The Potential of Stem Cells: An Inventory". In Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski, and Stefan Lorenz Sorgner. *Human biotechnology as Social Challenge*. Ashgate Publishing, Ltd. p. 28. [ISBN 978-0-7546-5755-2](#)
- Schroeder, V. 1941. Physico-chemical methods of sex regulation of the progeny of mammals. Russian contributions 1939 Genetics Congr, Am. Documentations Inst, Doc, 1565. Abstr. In *j. Hered.* 32; 248. 1941
- Shea, B. F. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*. 51(4): 841-854.
- Shirazi, A. S., E. Borjian, Ahmadi, H. Nazari, and B. Heidari. 2010. The effect of biopsy during precompacted morula stage on post vitrification development of blastocyst derived bovine embryos. *J. Avicenna. Med. Biotech.* 2(2): 107-11.

- Sugimoto, K., S. P. Gordon, and E. M. Meyerowitz. 2011. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation". *Trend. Cell. Biol.* 21(4): 212-218.
- Thibier, M. and M. Nibart. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology.* 43(1): 71-80.
- Tominaga, K. 2004. Cryopreservation and sexing of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use. *J. Reprod. Dev.* 50: 29-38.
- Tominaga, K. and Y. Hamada. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in-vitro* produced blastocysts. *Theriogenology.* 61(6): 1181-1191.
- Udin, Z. 2012. *Teknologi Inseminasi Buatan dan Transfer Embrio pada Sapi.* Penerbit Sukabina Press, Padang.
- Udy, G. B. 1987. Commercial splitting of goat embryos. *Theriogenology.* 28: 837-842.
- Urszula, B., K. J. Lutjen, C. O'Neill. 1990. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum. Reprod.* 5(2): 203-208.
- Windhorst, U., M. D. Binder, and N. Hirokawa. 2009. *Encyclopedia of Neuroscience.* Berlin, Springer.
- Wu, B. 1993. Amplification of the SRY gene allows identification of the sex of mouse preimplantation embryos. *Theriogenology.* 40: 441.
- Yamamoto, M., M. Ooe, M. Kawaguchi, and T. Suzuki. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology.* 41: 747-755.
- Yu, W., S. Li, J. Fang, X. Sun, L. Cui, J. Fu, Y. Bai, Y. Fang, and B. Shanguan. 2007. Field studies on the effectiveness of the YCD embryo sexing technique in bovine. *Reprod. Fert. Dev.* 19: 299-300.
- Zhang, M., K. H. Lu, and G. E. Seidel Jr. 2005. Blastocyst development of male and female bovine embryos produced by IVF with flow cytometrically sorted sperm. *Reprod. Fert. Dev.* 17: 306-307.
- Zoheir, K. M. A. and A. A. Allam. 2011. A rapid improved method for sexing embryo of water buffalo. *Theriogenology.* 76: 83-87