

Ekspresi Protein Spesifik Embrio Praimplantasi Kambing Secara *In Vitro* Sebagai Sinyal Kebuntingan Dini

(SPECIFIC PROTEIN EXPRESSION OF GOAT PREIMPLANTATION EMBRYO *IN VITRO* AS AN EARLY PREGNANCY SIGNAL)

I Wayan Lanus Sumadiasa¹, Enny Yuliani¹

Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram
Jl. Majapahit No.62, Mataram, Nusa Tenggara Barat. Telp.0370-633603. Fax. 0370-640592.
Email : wlanuss@yahoo.com.id

ABSTRAK

Penelitian ini ditujukan untuk mengkaji sinyal yang disekresikan oleh embrio praimplantasi untuk kelangsungan hidupnya pada awal kebuntingan. Embrio hasil fertilisasi *in vitro* dibekukan pada tahap morula dan blastosis serta di-*thawing* untuk dikultur secara *in vitro* dalam media *tissue culture*. Pengamatan sekresi protein untuk perkembangan embrio tahap morula dilakukan 48 jam setelah *thawing* dan untuk embrio tahap blastosis dilakukan 24 jam (*re-expansion*) dan 72 jam (*hatching*) setelah *thawing*. Hasil analisis menunjukkan bahwa selama perkembangannya, embrio kambing praimplantasi mensekresikan sebanyak 3,041 µg per protein ml dan 1,992 µg protein per ml berturut-turut untuk embrio yang dikultur pada *tissue culture medium* (TCM) 199 + 0,1 % *bovine serum albumin* (BSA) dan TCM tanpa BSA. Sementara itu, embrio yang tidak berkembang (mengalami degradasi) hanya mensekresikan 0,434 µg protein per ml dan 0,417 µg protein per ml berturut-turut untuk yang dikultur pada TCM 199 + 0,1 % BSA dan tanpa BSA. Hasil analisis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) menunjukkan bahwa protein yang diekspresikan dalam medium kultur embrio sejak morula sampai *hatching blastocyst* memiliki protein dengan bobot molekul yang bervariasi mulai dari 100 , 95 , 55 , 43 , 28 dan 18 KDa. Embrio yang berkembang baik menghasilkan lebih banyak protein daripada embrio yang tidak berkembang.

Kata Kunci : Protein spesifik, embrio kambing, *in vitro*.

ABSTRACT

The aim of the experiment was to investigate the intensity of signal secreted by preimplantation embryos for their survival in the early pregnancy. Embryos at morulla and blastocyst stages generated by *in vitro* fertilization were frozen and then thawed for *in vitro* culture in tissue culture medium. The protein secreted by embryo were detected 48 hours after thawing for those frozen at morulla stage, and 24 hours and 72 hours after thawing for those frozen in the blastocyst stage. Results showed that preimplantation goat embryos secreted an average of 3,041 µg protein per ml medium for the embryo cultured in tissue culture medium (TCM) 199 + 0,1 % BSA and 1,992 µg protein per ml medium for embryo cultured in TCM without BSA. Non growing embryos secreted only a small amount protein, i.e. 0,434 µg protein per ml medium and 0,417 µg protein per ml medium respectively for embryo cultured TCM 199 with BSA and TCM without BSA. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed protein bands with many different molecular weight of 100, 95, 55, 43, 28 and 18 KD. It appeared that the growing embryos secreted more proteins as compared to those non growing embryos.

Key word : protein, goat, embryos, morulla, blastocyst, *in vitro*.

PENDAHULUAN

Pada awal kebuntingan, embrio hasil fertilisasi *in vitro* yang ditranfer ke inang umumnya tidak berkembang sebgus embrio hasil pembuahan *in vivo*. Faktor yang

mempengaruhi perkembangan embrio adalah umur embrio (Kassai *et al.*, 2000, Leibo, 1999), kualitas embrio (Miyamoto, 1999; Pollard and Leibo, 1994); krioprotektan (Szell and Shelton, 1996; Takahashi and Kanagawa, 1999); pH medium, dan proses pembekuan (Leibo, 1999;

Mazur, 2000). Secara *in vivo*, perkembangan awal embrio dipacu oleh sekresi saluran reproduksi, seperti berbagai molekul biologi, ion inorganic, dan sumber energi. Secara *in vitro*, perkembangan embrio harus didukung oleh lingkungan yang baik agar bisa berlanjut sampai pada tahap blastosis. Setelah embrio ditransfer ke inang alaminya, terjadinya kebuntingan belum dapat dipastikan karena fenomena *developmental block* selalu terjadi pada transfer embrio.

Developmental block umumnya bersifat genetik yang dapat menghambat embrio muda untuk berkembang menjadi stadium morula maupun stadium blastosis (Eyeston dan First, 1992; Bavister 1996) sehingga tingkat keberhasilan transfer embrio menjadi rendah (Swanson *et al.*, 1996). Namun, *Developmental block* dapat juga disebabkan oleh lingkungan embrio yang tidak serasi dan adanya faktor tertentu dalam saluran reproduksi (Parrish dan First, 1994).

Kelangsungan hidup (*life indurance*) dan perkembangan embrio *in vivo* terjadi karena adanya interaksi antara embrio dengan lingkungan uteromaternalnya. Interaksi ini merupakan ekspresi atau sinyal adanya sekreta yang terbentuk, seperti protein tertentu, prostaglandin maupun berbagai hormon steroid, dan berbagai zat yang diperlukan untuk mempertahankan eksistensi korpus luteum serta pertumbuhan embrio (Humblot *et al.* 1998). Sebagai contoh, sel-sel tropoblast blastosis sapi menghasilkan *bovine interferontau* (bINF-t⁺), sejenis protein yang berfungsi untuk menghambat regulasi intrasel dan menekan sekresi PGF_{2α} oleh sel-sel endometrium. Pada kambing telah diidentifikasi sejenis protein, yaitu *ovine trophoblast-1* dengan bobot molekul 37 KDa dan titik isoelektrik sebesar 5,4 – 5,7 (Godkin *et al.* 2001).

Lingkungan juga sangat menentukan kelangsungan hidup embrio. Secara *in vivo* jaringan maternal amat berperan dalam perkembangan embrio selama kebuntingan. Secara *in vitro*, media kultur merupakan lingkungan yang sangat menentukan perkembangan embrio. Kondisi media kultur yang menyerupai kondisi *in vivo* akan sangat mendukung perkembangan embrio. Karena itu, pemanfaatan sekresi tuba fallopii (oviduk) sebagai suplemen media kultur embrio mempunyai prospek yang baik karena memiliki metabolit yang diperlukan pada perkembangan

embrio dini. Sel-sel granulosa (kumulus) juga merupakan media embriotropik yang lengkap karena menghasilkan penghambat metalloproteinase (TIMP-1) yang sama dengan TGF-beta, dan dapat memperbaiki perkembangan embrio *in vitro* (Mulheron dan Schomberg, 1992; Satoh *et al.* 1994). Secara struktur TGF analog dengan *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang mampu mempercepat perkembangan *blastocoel* sapi (Dardik dan Schultz, 1991).

Jaringan uterus secara teratur menghasilkan faktor pertumbuhan dan protein yang dibutuhkan untuk perkembangan embrio pada masa kritis dan pada masa konseptus praimplantasi. Misalnya, uterus mensekresi *histotrophe* yang berfungsi untuk mengatur proses implantasi, nutrisi dan pertumbuhan konseptus (Biggers, 1998; Roberts dan Bazer, 1999). Proliferasi dan deferensiasi sel embrio praimplantasi dikontrol oleh peptida dan polipeptida (Heyner *et al.*, 1993; Brigstock *et al.*, 1999). Embrio sapi praimplantasi juga menghasilkan berbagai faktor embrio-tropik, seperti *platelet-activating factor* (PAF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), insuline-like growth factor I dan II (IGF-I dan IGF-II), *transforming growth factor alpha* (TGF-α), TGF-β dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Oleh karena itu, secara fisiologis eksistensi oviduk, sel-sel granulosa dan uterus sangat menentukan kelangsungan kebuntingan sejak fertilisasi hingga menjelang kelahiran (Walton *et al.*, 1997). Untuk mengetahui kondisi terbaik bagi perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro*, dilakukan penelitian untuk mengkultur embrio *in vitro* yang menyerupai kondisi *in vivo* dan mengkaji ekspresi protein spesifik dari embrio kambing yang dibekukan pada tahap morula dan blastosis

METODE PENELITIAN

Produksi Embrio Secara *in vitro*

Penelitian menggunakan embrio kambing hasil fertilisasi *in vitro*. Sel telur dikoleksi dari organ reproduksi yang didapat dari rumah potong hewan dan sperma kambing dikoleksi dengan vagina buatan. Sel telur (ovum) kambing diaspirasi dari folikel ovarium, kemudian diseleksi dan diinkubasi selama 24 jam untuk maturasi. Spermatozoa hasil koleksi yang kualitasnya baik dipakai untuk membuahi (fertilisasi) sel telur) secara *in vitro*, kemudian dimasukkan dan diinkubasi dalam inkubator

CO₂ selama 24 jam. Setelah 24 jam perkembangan embrionya diamati. Embrio yang berkembang dibekukan masing-masing pada tahap morula dan blastosis, serta kemudian disimpan dalam kontainer nitrogen cair.

Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam eksperimen laboratorium adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan medium kultur TCM 199 + 0,1% BSA dan TCM 199 tanpa BSA masing-masing mengandung sel-sel jaringan oviduct. Setiap perlakuan dilakukan ulangan 10 kali.

Thawing Embrio Beku

Sample *straw* embrio beku dari masing-masing perlakuan ditempatkan pada suhu kamar selama 10 detik, dan selanjutnya dilakukan *thawing* dalam *water bath* suhu 30 °C selama 10 detik. Embrio langsung ditransfer dalam PBS + 20 % FCS pada suhu 38,5°C. Setelah inkubasi di dalam medium kultur selama 24 jam tampilan morfologi embrio diamati. Blastosis dengan morfologi normal memiliki rongga blastocoel. Kelangsungan hidup dan perkembangan embrio diamati berdasarkan kemampuannya untuk berkembang sampai pada tahap blastosis (48 jam), *re-expansion* (24 jam) dan *hatching* (72 jam) setelah *thawing*. Setelah dikultur selama beberapa hari, sekresi protein diamati dari cairan supernatan medium kultur embrio 48 jam setelah *thawing* untuk embrio tahap morula, sedangkan embrio tahap blastosis diamati 24 jam (*re-expansion*) dan 72 jam (*hatching*) setelah *thawing*. Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali.

Penyiapan Sample (*loading sample*)

Media kultur embrio diambil pada setiap tahap perkembangan embrio, yaitu tahap blastosis (48 jam), *re-expansion* (24 jam) dan *hatching* (72 jam). Media yang sudah dikoleksi disimpan pada suhu - 20° C. Sebanyak 20 µl sampel media kultur embrio dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung 0,5 ml Tris HCL pH 6,8; 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS); gliserol; 2-mercaptoetanol, 0,25 % *bromophenol blue* dan campuran dipanaskan pada suhu mendidih selama 10 menit. Sampel kemudian dianalisis dengan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) menggunakan *loading gel* dan *separating gel*

yang telah disiapkan sebelumnya. Sebanyak 10 µl sampel dimasukkan ke dalam setiap sumuran gel *polyacrylamid*. Elektroforesis dilakukan dengan buffer elektroforesis (25 mM tris; 250 mM glycine pH 8,3 dan 0,1 % SDS) dengan arus listrik sebesar 50 mA dan 100 volt pada 10 menit pertama, dan dengan 50 mA 150 V selama 45 menit berikutnya.

Staining dan Destaining Gel Elektroforesis

Visualisasi protein dalam gel setelah elektroforesis dilakukan dengan merendam gel (*staining*) ke dalam campuran 0,25% *Coomassie Brilliant Blue* (R250) di dalam 90 ml metanol dan air (1 : 1) dan 10 ml asam asetat glasial selama 8 jam. Gel dicuci kembali (*destaining*) dengan cara merendam gel dalam metanol yang ditambah asam asetat glasial dan air (50 : 10 : 40).

Penentuan Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein dalam kultur embrio ditentukan dengan membandingkannya dengan kurva standar protein *bovine serum albumen* (BSA). Larutan BSA dengan konsentrasi 0,1 mg/ml; 0,09 mg/ml; 0,07 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,009 mg/ml; 0,008 mg/ml; 0,007 mg/ml dan 0,005 mg/ml dibuat dalam larutan NaCl fisiologis. Ke dalam setiap larutan BSA ditambahkan 5,0 ml reagen Bradford (*Coomassie G-Briliant blue* dalam 85 % asam phosphoric; Bio-Rad), dan dicampur rata dengan membolak-balikan tabung. Campuran kemudian dibiarkan selama 5 menit, dan sebanyak 3 ml campuran dimasukkan ke dalam kuvet. Sampel media kultur embrio juga dilarutkan dalam reagen Bradford dengan cara yang sama. Absorban larutan BSA dan sampel media kultur embrio dibaca dengan spektrofotometer (Shimadzu) pada panjang gelombang 595 nm (Burden dan Whytney, 1995). Kurva konsentrasi BSA vs nilai absorbannya dibuat dalam kertas grafik. Konsentrasi protein dalam setiap sampel media kultur embrio ditentukan dengan cara ekstrapolasi nilai absorbannya dengan kurva dari nilai absorban protein standar (BSA) yang konsentrasinya telah diketahui.

Analisis Data

Data yang terkumpul dari penelitian ini dianalisis dengan *t-student*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Konsentrasi Protein dalam Media Kultur Embrio

Analisis protein dalam media kultur embrio dilakukan pada setiap tahap perkembangan embrio, yaitu yaitu tahap blastosis (48 jam), *re-expansion* (24 jam) dan *hatching* (72 jam). Pengamatan sekresi protein dilakukan pada embrio yang berkembang dengan baik dan yang tidak berkembang (embrio mati = degenerasi). Hasil pengukuran rata-rata konsentrasi protein pada supernatan medium kultur embrio dari TCM199 + 0,1% BSA dan TCM 199 tanpa BSA dapat dilihat pada Tabel 1.

Rataan konsentrasi protein yang disekresikan oleh embrio yang berkembang pada tahap morula setelah dikultur selama 48 jam (*hatching blastosis*) sangat nyata tinggi jika dibandingkan dengan embrio yang tidak berkembang. Konsentrasi protein pada media kultur embrio yang mengandung BSA nyata lebih tinggi dibandingkan tanpa BSA. Hal ini menunjukkan, bahwa embrio pada tahap preimplantasi mensekresikan sejumlah protein yang diduga merupakan sinyal atau ekspresi keberadaan embrio tersebut di dalam lingkungan maternalnya. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa selama perkembangannya, embrio mensekresikan senyawa-senyawa protein, walaupun jumlahnya relatif kecil. Protein ini tampaknya berperan sebagai sinyal seberapa banyak protein yang dibutuhkan oleh maternal untuk membangkitkan reaksi pengenalan. Pada embrio yang tidak berkembang, reaksi penolakan mungkin terjadi sehingga menyebabkan kematian embrio. Sekresi protein selama perkembangan embrio

tahap blastosis (dari tahap morula hingga *hatching blastocyst*) adalah sebesar 1,992 µg/ml (Tabel 1). Protein tersebut diduga berperan sebagai sinyal substansial, dengan aktivitas yang memadai agar tumbuh respon terhadap reseptor uteromaternalnya.

Satu hal yang menarik untuk dicermati adalah bahwa embrio yang dibekukan pada tahap morula maupun blastosis mempunyai kemampuan yang sama dalam mensekresikan protein spesifik dalam medium kultur. Penelitian sebelumnya (tahun pertama) menunjukkan, bahwa perkembangan embrio kambing *in vitro* setelah dibekukan pada tahap 2 sel, 4 sel 8 sel dan blastosis lanjut memperlihatkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) antara pembekuan tahap morula dan blastosis awal. Sementara, pada tahap morula dan blastosis lanjut tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Kondisi tersebut diduga karena adanya permeabilitas membran blastomer yang meningkat sesuai dengan tahap perkembangan zigot sampai blastosis awal.

Medium kultur sebagai lingkungan *in vitro* sangat berperan dalam mendukung perkembangan embrio. Selama perkembangan embrio terjadi pertumbuhan mikrovili di permukaan membran dan perubahan positif rasio luas permukaan membran terhadap volume blastomer, sehingga ekuilibriasi kimiawi akan lebih cepat dicapai oleh blastosis atau morula daripada zigot. Perkembangan morula dan blastosis awal pada proses pembekuan sangat responsif terhadap *ethylene glycol* dan gliserol. Krioprotektan *ethylene glycol* dan gliserol dapat menghambat aktivitas ion Na^+ , K^+ -ATP-ase, walaupun pengaruh negatif yang ditimbulkan masih dalam skala kecil. Krioprotektan

Tabel 1. Konsentrasi protein pada medium kultur embrio stadium morula dan blastosis

Perkembangan Embrio	Konsentrasi protein pada media	
	TCM 199 + BSA (µg/ml)	TCM 199 (µg/ml)
A. Tidak berkembang		
Morula	0,433	0,429
Blastosis	0,435	0,415
Rata-rata	0,434	0,424
B. Berkembang		
Morula	3,025	1,995
Blastosis	3,041	1,989
Rata-rata	3,041	1,992

Keterangan : TCM :tissue culture media, BSA : bovine serum albumin

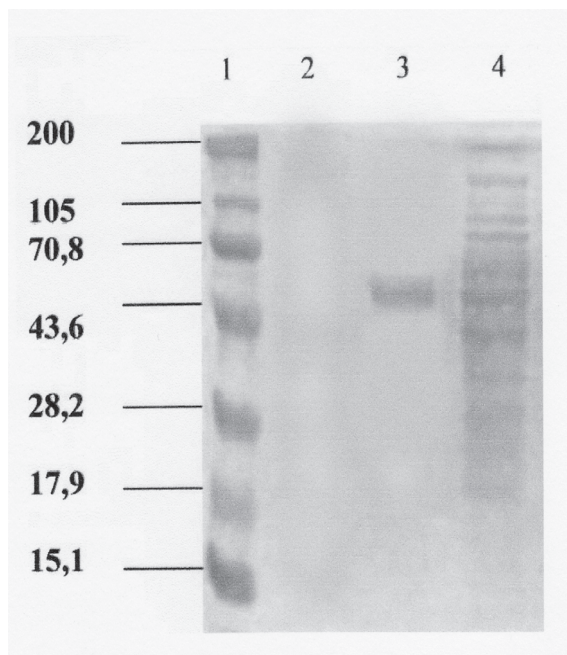
intraseluler ini meningkatkan tekanan hipertonik pada sel yang dibekukan. Sebagai akibatnya, pada *warming rate* yang tinggi, sel dapat mengalami syok osmosis sehingga ukurannya akan membesar. Komplikasi dapat pula timbul melalui mekanisme yang sama pada saat pencucian untuk menghilangkan krioprotektan atau pada saat pemindahan sel ke medium pupukan.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa protein spesifik berfungsi sebagai faktor penting dari kebuntingan dini (*early pregnancy factor*). Protein ini disekresikan beberapa saat setelah terjadinya fertilisasi dan dapat diisolasi dari media kultur ovum beberapa saat setelah fertilisasi (Smart, 1991). Konsentrasi protein ini berbeda di dalam cairan uterus mencit bunting dan tidak bunting pada hari ke-3. Pada tikus, protein ini telah terdeteksi pada hari ke-4 kebuntingan (Ikemizu *et al.* 1994).

Analisis Protein dengan SDS-PAGE

Analisis protein yang terdapat dalam media kultur embrio dilakukan dengan SDS-PAGE. Hasil analisis memperlihatkan bahwa embrio dari tahap morula hingga *hatching blastocyst* mensekresikan enam jenis protein dengan bobot molekul 100 kD, 95 kD, 55 kD, 43 kD, 28 kD dan 18 kD (Gambar 1)

Protein yang disekresikan oleh embrio yang tidak mengalami perkembangan (degenerasi) hanya memiliki satu pita protein dengan bobot molekul 55 kD. Sampel tersebut diambil 48 jam setelah inkubasi (kultur) dan tidak diketahui kapan terjadinya degenerasi sehingga sebelum degenerasi sangat mungkin embrio masih mensekresikan protein. Dari jenis pita proteinnya, sangat mungkin bahwa protein tersebut disekresikan dari trophoblast karena pada tahapan tersebut sel-sel trophoblast telah terbentuk. Protein tersebut diduga bertanggung jawab atas induksi reseptor metabolisme dalam sel untuk menekan pembentukan jalur metabolik PGF2 α dan sekaligus merupakan protein yang dapat terdeteksi di dalam serum sebagai *early pregnancy factor*. Ikemizu *et al.* (1994) mengisolasi *EPF-like substance* dan menganalisa media kultur ovum sapi yang telah mengalami fertilisasi dengan SDS-PAGE dengan gel bertingkat 10-20%. Hasil analisis menunjukkan adanya protein dengan bobot molekul sebesar 16 dan 37 kD.



Gambar 1. Hasil analisis protein dalam media kultur embrio dengan SDS-PAGE. Marker standar (1). Medium TCM199 tanpa BSA pada embrio tidak berkembang (2).TCM199 +0,1% BSA (3) TCM199 tanpa BSA , embrio berkembang dari morula hingga *hatching blastocyst* (4)

Isolasi protein dari serum sapi bunting menghasilkan polipeptida dengan bobot molekul 21,5 kD dan titik isoelektrik mendekati 5,0. Molekul ini tidak ditemukan pada serum sapi tidak bunting. Molekul EPF tersebut diduga merupakan peptida monomer. Karakterisasi senyawa biokimianya dipelajari dengan pemurnian kembali pada titik isoelektrik 6,3 dan analisis dengan SDS-PAGE dua dimensi yang tidak direduksi (Ito dan Yasuda 1993 ; Ikemizu *et al.* 1994). Sementara pada ovum manusia yang telah mengalami fertilisasi protein dengan BM 14 KDa juga terdeteksi (Brigstock *et al.* 1999)..

Sekresi embrio tahap blastosis seperti digambarkan di atas merupakan protein spesifik dengan bobot molekul relatif kecil. Pada kondisi *in vivo*, protein dengan bobot yang kecil memungkinkan terserap ke dalam aliran darah atau urine. Sesuai pendapat Ikemizu *et al.* (1994), bahwa protein tersebut diduga sebagai *like early pregnancy factor*. Hasil penelitian ini merupakan temuan awal untuk penelitian selanjutnya guna melacak

eksistensi dan spesifikasi protein ini di dalam darah dan urine.

SIMPULAN

Rataan konsentrasi protein dalam media kultur embrio kambing yang berkembang lebih tinggi dibandingkan dengan yang berdegenerasi. Medium kultur embrio mempengaruhi nilai rata-rata konsentrasi protein yang disekresikan oleh embrio. Protein yang disekresikan oleh embrio memiliki pita protein dengan berbagai bobot molekul, yaitu 100 kD, 95 kD, 55 kD, 43 kD, 28 kD dan 18 kD.

SARAN

Kultur embrio dalam media TCM 199 + 0,1% BSA dan tanpa BSA yang berturut-turut menghasilkan konsentrasi protein 3,41 µg/ml dan 1,992 µg/ml dapat dipakai sebagai pijakan awal untuk pelaksanaan transfer embrio. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan, terutama tentang efektivitas konsentrasi protein terhadap laju perkembangan embrio dan identifikasi jenis protein yang ditemukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Program Penelitian Hibah Fundamental, Direktorat Pengabdian Pada Masyarakat (DP2M) < Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Depdiknas dan karena itu penulis mengucapkan terima kasih. Ucapan terimakasih juga kepada Kepala Unit Pelaksana Tehnis (UPT) MIPA yang telah membrikan ijin penggunaan laboratorium dan semua tehni Laboratorium Imunobiologi UPT MIPA yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abas Mazni O, Takahashi Y, Valdez CA, Hishinuma. 1999. Effect of various cryoprotectants on the survival of mouse embryos cryo-preserved by the quick freezing method. *Jpn J Vet Res* 37:29-40.
- Bavister BD. 1996. Culture of pre-implantation embryo. Fact and artifacts *J Hum Reprod*, Update 1; 91-148.
- Biggers J 1998. Introductory remark on the milieu of the egg and the early embryo. *J Reprod Fertil* 82:809-811.
- Brigstock DR, Heap RB, Bown KD. 1999. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J Reprod Fertil* 85:747-758.
- Burden DW, Whitney DB. 1995. Biotechnology protein to PCR. A course strategy and lab technique
- Cseh S, Kreysing U, Lucas-Han Andrea, Niemann H. 1995. Direct re-hydration of IVM, IVF and IVC bovine embryos using ethylene glycol with lactose or sucrose. *Theriogenology* 44:190 abstr.
- Cseh S, Rall WF, Meyer TK, Leibo SP. 2000. Effect warning conditions on the survival of mouse embryos cryopreserved by a one step straw procedure. *Theriogenology* 37 595-603
- Dardik A, Schultz RM. 1991. Blastocoele expansion in the preimplantation mouse embryo; stimulatory effect of TGF alfa and EGF. *Development* 113:919-930.
- David W, Whitney DB. 1995. Biotechnology proteins to PCR at course in strategy and lab techniques. Berkhauser Boston
- Eyeston WH, First NL. 1992. A Study of the 8 to 16- cell developmental block in bovine Embryos cultured in vitro. *Journal. Theriogenology* 25 ;152 (Abstract).
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA., 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cell: amino acids, vitamins, and culturing embryos in group stimulate development. *Biol Reprod* 50:390-400.
- Godkin JD, Bazer FW; Moffatt J, Session F, Roberts RM.. 2001. Purification and properties of a mayor low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocyst at day 13-21. *J Reprod Fertil* 65 : 141-150.
- Hafez ESE. 1997. Techniques for Improving Reproduction Efficiency : semen evaluation. *In.: Reproduction in Farm Animal*. Hafez, E.S.E. (ed) sixth Ed. Lea & Febiger. Philadelphia .
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, Schultz GA. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* 39:151-161.
- Humblot P, Camous S, Martal J, Cherley J, Jeannnguyot N, Thibier M, Sasser RG. 1998. Pregnancy specific protein B, progesteron concen-tration and embryoic mortality during early pregnancy in dairy cow. *J Reprod Fertil* 62: 215-223.

- Ikemizu, Y, Ito K, Kawahata K, Goto T, Takahashi J, Yusada Y. 1994. Study of EPF-like substances detected in fertilized bovine ovum culture Medium. *J Reprod Dev* 40: 7 – 11.
- Ito K, Yasuda Y. 1993. Bovine early pregnancy factor; Its characterization and an attempt to produce anti-bovine EPF antibody. *J Reprod Dev* 39: 309-317.
- Kassai M, Komi A, Takakamo, Tsudera. 2000. A method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89:91-97.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM. 1999. Effect of Follicle Stimulating Hormon and Luteinizing Hormone during bovine In Vitro Maturation on Development Following in vitro fertilization and nuclear transfer, *J Mol Reprod Dev* 36 : 469-474.
- Leibo SP. 1999. Cryobiology : Preservation of mammalian embryos. In : Evans JW, Hollander A (eds), Genetic Engineering of Animals, New york : Plenum Press. 251-272.
- Margawati ET. 1996. Effect Maturation Periods and Leukaemia inhibitory Factor (LIF) on Bovine Oocyte Matured *in vitro*. *Annales Bogorienses*, 4:19-25.
- Mazur P. 2000. Equilibrium, quasi-equilibrium and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 17: 53-92
- Mc Ginnis LK. 1993. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim Reprod Sci.* 30 : 273-280
- Miyamoto H. 1999. Factors affecting the survival of embryos during freezing and thawing. *J. Trans.* 30 :373-380.
- Mulheron GW, and Schomberg DW. 1992. Effect of diethylstilbestrol on rat granulosa cell and thecal/interstitial cell transforming growth factor-beta 2 mRNA expression in vivo : analysis by reverse transcription – polymerase chain reaction. *J Biol Reprod* 46:546-550.
- Natsuyama S, Noda Y, Narimoto K, Umaoko Y, Mori T. 2000. Release of two-cell block by reduction of protein disulfide with thioredoxin from *Escherichia coli* in mice. *J Reprod Fertil* 95 :649-565.
- Nieman N, and Voelkel SA, Hu YX. 1997. Use ethylene glycol as a cryo-protectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37 :687-697.
- Parrish JJ, First NL, 1994. Fertilization, In : G. J. King (Ed). *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. pp 195-227.
- Pollard J, Leibo SPO. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41:101-106.
- Rayos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. 1998. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol plus sucrose or thalose. *J Reprod Fertil* 100: 123-129.
- Renard JP. 1995. The cryopreservation of mammalian embryos. In Testart J, Frydman R (eds), *Human in vitro fertilization actual problem and prospects*. Amsterdam : Elsevier science publisher, INSERM Symposium 24 :201.
- Roberts RM, Bazer FW. 1999. The function of uterine secretion. *J Reprod Fertil* 82:387-397.
- Satoh T, Kobayashi K, Yamadhita S, Kikuchi M, Sendai Y, Hoshi H. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances *in vitro* development of bovine embryo. *J Biol Reprod* 50:835-844.
- Smart YC, 1991. Detection of an immunosuppressive factor in human preimplantation embryo culture. *Ied J Aust* pp 78-79.
- Swanson WF, Roth TL, Godke RA. 1996. Persistence of developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. *J Mol Reprod Dev.* 3: 297-305.
- Szell A, Shelton JN. 1996. Role of equilibration before rapid freezing of embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *J Reprod Fertil* 78:699-703.
- Szell A. 1999. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 26 : 279-301.
- Takahashi Y, Kanagawa H. 1999. Effect of equilibration period on viability of frozen-thawed goat morula after rapid freezing. *J Mol Reprod Dev* 26 ;105-110.

- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A; K.E. Wiemer KE, Schultz. 1997. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *J Mol Reprod Dev.* 31 : 287-295.
- Yuliani E 2000. Produksi Anak Sapi Secara Masal Melalui Seleksi Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y Serta Aplikasi Fertilisasi *In Vitro*. *Majalah Oryza*, 1 : without pages
- Yuliani E 2003. Pengaruh pembekuan terhadap kelangsungan hidup perkembangan embrio kambing *in vitro* pada tahap yang berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan (JITP)* 2