

Vitrifikasi Blastosis Mencit dengan Metode Kriolup

(VITRIFICATION OF MOUSE BLASTOCYSTS USING CRYOLOOP METHOD)

I Wayan Batan¹, I Ketut Suatha², Wahono Esti Prasetyoningtyas³,
Nining Handayani², Ita Djuwita³, Arief Boediono³

¹Lab Diagnosis Veteriner

²Lab Anatomi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl. Raya Sesetan Gg. Markisa 6 Denpasar

Email : bobbatan@yahoo.com

³Lab Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Cryopreservation is an ultra rapid freezing process to preserve tissue or organ. The study was conducted to identify the effectiveness of cryoloop vitrification method and the viability of embryos following vitrification. Embryos at blastocyst stage were vitrified by placing them in equilibration medium containing 10% ethylene glycol (EG) and phosphate buffer saline (PBS) wick supplemented with 20% new born calf serum for 8-10 minutes. The blastocysts were then removed and put in vitrification medium (15% dimethyl sulfoxide, 15% EG, and 0.5M sucrose), and the process in the vitrification medium not longer than 25-30 seconds. The blastocysts were immediately transferred to the vitrification medium film in the cryoloop and plunged into 100 ml liquid nitrogen. The warming process was done by immersing the cryoloop which carried the vitrified blastocysts into PBS supplemented with 20% serum and 0.5M sucrose for 1 minute, and then removed to same solution supplemented with 0.25M sucrose and 0.1M sucrose for 2 minutes respectively. The blastocysts were washed 4 times in kalium simplex optimized medium (KSOM) and cultured in drops of KSOM in 5% CO₂ incubator at 37°C. The observations were done every 6 hours for 48 hours using inverted microscope (Olympus IX70 Japan). The viability of embryos was assessed on the basis of the intact morphology, reexpansion of the blastosul, and the development of embryos into advance stage. The results showed that 85.71% of vitrified embryos, developed into advance stages and 19% of them hatched. In conclusion the cryoloop can be used to vitrify the embryos.

Key words : vitrification, blastocyst, cryoloop

PENDAHULUAN

Pemanfaatan kultur blastosis dan transfer embrio tahap blastosis sebagai keperluan rutin pada klinik *in vitro fertilization* semakin meningkat (Lane *et al.*, 1999). Pada tahun 2002, sekitar 270.000 embrio sapi dikriopreservasi untuk tujuan komersial. (Thibier 2003). Blastosis umumnya dikriopreservasi dengan teknik *slow-freezing*, menggunakan krioprotektan berkonsentrasi rendah dan laju pendinginan yang rendah, yakni 0,1-0,3°C per menit guna memperlambat dehidrasi sel selama pembekuan dan mencegah terbentuknya kristalisasi intrasel. Kristal es menyebabkan kerusakan pada membran dan organel-organel sel sehingga menurunkan daya tahan hidup embrio yang

dibekukan (Rall, 1987). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengeluaran cairan yang seimbang dari dalam sel, jika terlalu banyak cairan yang dikeluarkan akan meningkatkan konsentrasi bahan terlarut dalam sel, dan keadaan tersebut bersifat toksik. Teknik pembekuan *slow-freezing*, harus dilaksanakan secara hati-hati, untuk menghindari terbentuknya kristal es. Terbentuknya kristal es dan kepekaan sel-sel tersebut terhadap pembekuan dapat mengakibatkan kematian embrio (Martino *et al.* 1996). Sebagai pengganti metode pembekuan *slow-freezing*, kini umum dilakukan dengan metode pembekuan sangat cepat atau *vitrification/vitrifikasi* Boediono (2003).

Vitrifikasi pada awalnya merupakan proses *cryoprotection* (krioproteksi) pada beberapa

tanaman yang bertahan hidup dalam suhu sangat dingin di kutub utara (Hirsh, 1987). Pada dasarnya vitrifikasi merupakan pematatan larutan pada suhu rendah tanpa disertai pembentukan kristal es, dengan cara meningkatkan viskositas larutan dan mempercepat laju pembekuan, yakni 15.000-24.000°C per menit (Vajta et al., 1997). Konsentrasi krioprotektan yang tinggi jika dibekukan dengan cepat menghasilkan substansi seperti jeli, sedangkan laju pendinginan yang cepat mencegah kerusakan akibat pembekuan (Vajta et al. 1998). Embrio yang dikriopreservasi dengan teknik vitrifikasi cepat, lebih baik dibandingkan dengan *slow freezing* (Mahmoudzadeh et al., 1994). Kriopreservasi dengan metode vitrifikasi, menjadi metode pilihan yang menjanjikan dalam mengawetkan oosit dan embrio mamalia di masa depan. Untuk mencapai proses pembekuan yang cepat pada proses vitrifikasi, perlu mempertimbangkan penggunaan volume larutan vitrifikasi sekecil mungkin, seperti pada *electron microscopy grid*, kapiler kaca, *open-pulled plastic straw*, dan *cryoloop*. Embrio yang ditempatkan dalam alat *carrier* tersebut dapat langsung dibekukan dengan cara dicelupkan kedalam larutan nitrogen cair (Begin et al., 2003). Penelitian ini dilaksanakan untuk menguji daya tahan (viabilitas) blastosis setelah vitrifikasi, dan menguji efektifitas metode vitrifikasi kriolup.

METODE PENELITIAN

Superovulasi dan koleksi embrio

Mencit betina berumur 12 minggu yang berasal dari koloni bebas penyakit, dirangsang folikulogenesis ovariumnya dengan menyuntikkan hormon *pregnant mare's serum gonadotropine* (PMSG) (Folligon, Intervet, Boxmeer, Holland) 5-IU secara intraperitoneum pada pukul 16.00. Setelah 48 jam penyuntikan PMSG, dilakukan penyuntikan hormon *human chorionic gonadotropin* (HCG) (Chorulon, Intervet, Boxmeer, Holland) 5-IU secara intraperitoneum. Mencit betina tersebut setelah disuntik HCG langsung dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Hari berikutnya, mencit betina yang telah kawin ditandai dengan adanya sumbat vagina (*vagina plug*) dipisahkan dari pejantan. Tiga hari setelah dipisahkan dengan pejantannya, mencit

betina bunting tersebut dikorbankan nyawanya dengan cara dislokasio *os occipitalis*. Bagian oviduk atau tuba Falopii diisolasi dan ditempatkan pada medium mPBS (Hogan et al., 1994). Oviduk tersebut dicacah dengan menggunakan jarum suntik 26G. Sambil diamati di bawah mikroskop binokuler, embrio delapan sel atau morula yang diperoleh dibilas dengan cara merendamnya berturut-turut 2-3 kali ke dalam *modified phosphate buffer saline* (mPBS) yang telah diberi *bovine serum albumin* (BSA) 3%, tanpa antibiotik (Batan et al., 2006).

Pembuatan kriolup (*cryoloop*)

Kriolup yang digunakan untuk melakukan vitrifikasi berupa jerat (*loop*) dari bahan filamen kawat tembaga, dengan ketebalan filamen 100µm, dan garis tengah jerat 1250µm. Bagian kawat tembaga yang tidak membentuk jerat dipilin sehingga membentuk tangkai jerat yang dapat dimanfaatkan sebagai pegangan saat melakukan pemuatan embrio dalam proses vitrifikasi. Kriolup sebagai wadah (*carrier*) blastosis tersebut merupakan modifikasi kriolup nilon seperti yang dipakai oleh Lane et al., (1999) dan Mukaida et al., (2001).

Vitrifikasi kriolup

Metode vitrifikasi yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan metode yang telah dilaporkan oleh Lane et al., (1999), sedangkan medium vitrifikasi dan *warming* seperti yang telah dilaporkan Madihah et al., (2006). Blastosis divitrifikasi dalam dua tahap. Embrio tersebut ditempatkan pada medium ekuilibrase yang mengandung etilen glikol (EG) 10% dengan PBS yang ditambahkan *new born calf serum* (NBCS) 20%, selama delapan sampai sepuluh menit, atau hingga batas-batas antar sel embrio menjadi jelas. Pada saat embrio stadium blastosis berada dalam medium ekuilibrase, kriolup direndam pada larutan vitrifikasi yang mengandung *dimethyl sulphoxide* (DMSO) 15% (Sigma St Louis USA), EG15%, dan sukrosa 0,5M. Blastosis dalam medium ekuilibrase dipindah-kan ke larutan vitrifikasi, selanjutnya dengan cepat embrio ditransfer ke atas permukaan lapisan larutan vitrifikasi yang terbentuk pada kriolup. Proses perlakuan blastosis pada larutan vitrifikasi tidak melampaui 25-30 detik. Segera setelah kriolup bermuatan blastosis, kriolup tersebut langsung dicelupkan ke 100 ml larutan nitrogen cair (-196°C).

Warming blastosis

Warming terhadap blastosis hasil vitrifikasi dilakukan dengan tiga tahap pengenceran sukrosa. Kriolup yang bermuatan blastosis segera dicelupkan kedalam medium mPBS yang mengandung serum 20% dan sukrosa 0,5M. Blastosis pada kriolup akan jatuh kedalam larutan tersebut. Setelah satu menit berada dalam larutan sukrosa 0,5M, blastosis tersebut dipindahkan ke medium yang mengandung sukrosa 0,25M, kemudian 0,1M masing-masing selama dua menit. Setelah perlakuan tersebut, blastosis dibilas 4 kali dengan *kalium simplex optimized medium* (KSOM), selanjutnya dikultur dalam KSOM dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Selama enam jam, perkembangannya atau *reexpansion* dari blastosis, diamati (Lane *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005).

Viabilitas (daya tahan hidup) embrio sesudah vitrifikasi

Setelah *warming*, embrio yang ditemukan ditempatkan pada cawan petri yang telah berisi *drops*/tetesan-tetesan medium KSOM dengan volume sekitar 13µl, ditutupi dengan minyak mineral, dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C (Lieberman dan Tucker, 2002). Pengamatan dilakukan setiap enam jam dalam periode 48 jam dengan mikroskop *inverted* (Olympus IX70 Japan). Daya tahan hidup embrio dinilai berdasarkan 1) keutuhan morfologi; 2) reekspansi blastosul; dan 3) perkembangan embrio ke tahap lebih lanjut (Takahashi *et al.*, 2005).

Rancangan percobaan

Penelitian dilaksanakan berdasarkan rancangan acak lengkap pola *split in time*. Perlakuan yang diberikan kepada embrio tahap blastosis ada dua yakni, (1) embrio yang divitrifikasi, (2) embrio yang tidak divitrifikasi (kontrol). Setelah *warming*, pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 48 jam. Setiap perlakuan terdiri dari 20 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari satu embrio. Parameter yang diamati adalah viabilitas dan tingkat perkembangan embrio. Tingkat perkembangan embrio dihitung dari jumlah embrio yang berkembang ke tahap lebih lanjut per jumlah yang dikultur. Perkembangan embrio yang diamati adalah mulai dari tingkat blastosis (ada rongga blastosul dalam embrio), blastosis ekspan (rongga blastosul dalam embrio sangat luas), *hatching* (embrio sedang keluar

dari zona pelusida), dan *hatched* (embrio telah berada di luar zona pelusida). Terhadap setiap tingkat perkembangan diberi skor : blastosis diberi skor 32, blastosis ekspan 64, dan *hatched* 128 (Gilbert 1988; Hogan *et al.* 1994). Data tingkat perkembangan embrio dianalisis dengan sidik ragam menggunakan program SPSS versi 10:0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan embrio perlakuan dan kontrol menunjukkan bahwa embrio tahap blastosis yang divitrifikasi dengan metode kriolup, dapat berkembang kembali pasca vitrifikasi dan *warming*. Persentase perkembangan embrio yang tidak divitrifikasi, lebih baik dibandingkan dengan blastosis yang divitrifikasi (Tabel 1). Blastosis stosis yang divitrifikasi, setelah di*warming* dan diinkubasi selama 12 jam dalam medium KSOM, menunjukkan peningkatan perkembangan. Demikian pula pada pengamatan selanjutnya sampai dengan 48 jam inkubasi, tingkat perkembangan blastosis tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Perkembangan blastosis yang vitrifikasi nyata lebih rendah pada saat *warming* atau jam ke-0 dan jam ke-6, dibandingkan blastosis kontrol. Namun, pada jam ke-12 dan 18, perkembangan blastosis yang mendapat perlakuan vitrifikasi lebih rendah dibandingkan kontrol, akan tetapi secara statistika tidak

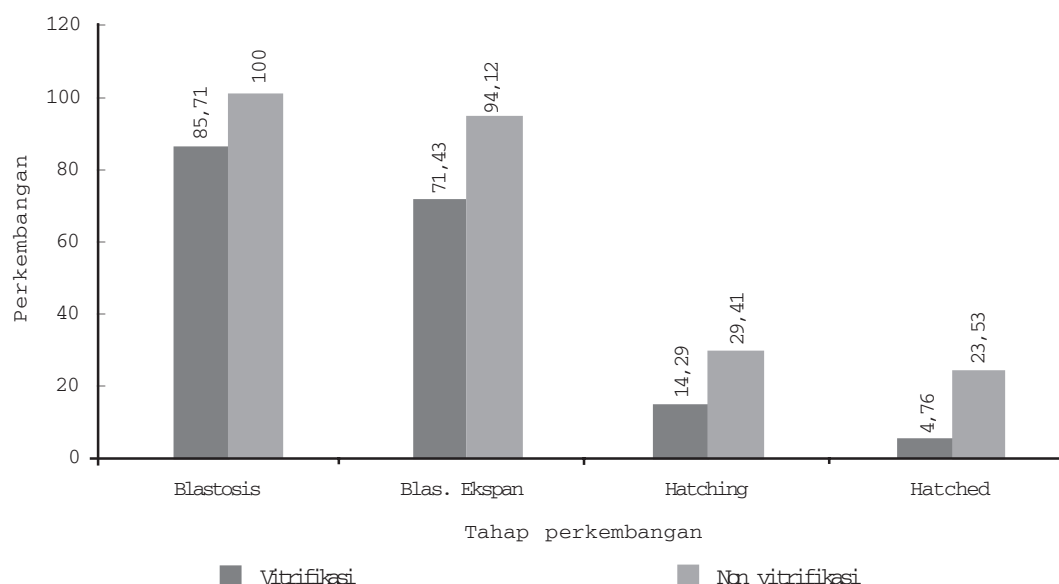
Tabel 1 Skor perkembangan embrio tahap blastosis yang divitrifikasi setelah *warming*.

Pasca- <i>warming</i> (jam)	Skor rata-rata pada perlakuan	
	vitrifikasi	tanpa vitrifikasi
0	64,00 ^{aa}	64,00 ^{aA}
6	82,29 ^{aa}	124,24 ^{bb}
12	112,67 ^{ab}	138,94 ^{bBC}
18	121,81 ^{ab}	142,71 ^{bc}
24	121,81 ^{ab}	144,47 ^{ac}
30	123,24 ^{ab}	146,24 ^{ac}
36	126,19 ^{ab}	146,24 ^{ac}
42	127,62 ^{ab}	146,24 ^{ac}
48	130,67 ^{ab}	146,24 ^{ac}

Keterangan: huruf kecil *superscript* sama ke arah baris atau huruf besar *superscript* sama ke arah kolom, tidak berbeda nyata.

Tabel 1 Persentase blastosis vitrifikasi yang berkembang ke tahap perkembangan lebih lanjut (n=21)

Lama waktu kultur (jam)	Persentase tahapan perkembangan embrio (%)				Embrio hidup (%)	Embrio mati (%)
	Blastosis	Blastosis ekspan	Hatching	Hatched		
0	85.7	0.0	0.0	0.0	85.7	14.3
6	57.1	28.6	0.0	0.0	85.7	14.3
12	14.5	66.7	0.0	4.8	85.7	14.3
18	4.7	66.7	9.5	4.8	85.7	14.3
24	4.7	66.7	9.5	4.8	85.7	14.3
30	4.7	57.1	4.8	9.5	76.2	23.8
36	4.7	42.9	4.8	14.3	66.7	33.3
42	4.7	33.3	0.0	19.0	57.1	42.9
48	0.0	38.0	0.0	19.0	57.1	42.9



Gambar 1 Tahap perkembangan embrio tercemar *E.coli* K99 setelah divitrifikasi dan diikultur *in vitro* selama 24 jam.

berbeda nyata. Memasuki jam ke-24 pasca *warming* hingga jam ke 48 di dalam kultur, tingkat perkembangan embrio yang mendapat perlakuan vitrifikasi mau pun kontrol secara statistika tidak berbeda nyata (Tabel 1).

Perkembangan blastosis 24 jam pasca *warming*, viabilitas embrio yang divitrifikasi 87,1% secara statistika viabilitasnya tidak berbeda nyata dengan viabilitas (94,11%) embrio tidak divitrifikasi (Tabel 2). Tingkat embrio *hatched* yang teramati pada blastosis yang divitrifikasi adalah 19%, dan blastosis kontrol 29,4% (Gambar 1). Blastosis yang divitrifikasi

tingkat kematiannya setelah 48 jam pasca *warming*, lebih tinggi dibandingkan dengan blastosis kontrol. Setelah 48 jam dalam kultur KSOM, viabilitasnya 57,14% untuk yang divitrifikasi, dan 82,35% untuk embrio yang tidak divitrifikasi. Sedangkan kematian embrio teramati 42,9% pada blastosis yang divitrifikasi (Gambar 2).

Blastosis mencit yang divitrifikasi menggunakan kriolup nilon menurut laporan Reed *et al.*, (2002). viabilitasnya 100%, namun setelah dikultur selama 24 jam yang terus berkembang sebanyak 90,5%. Pada penelitian

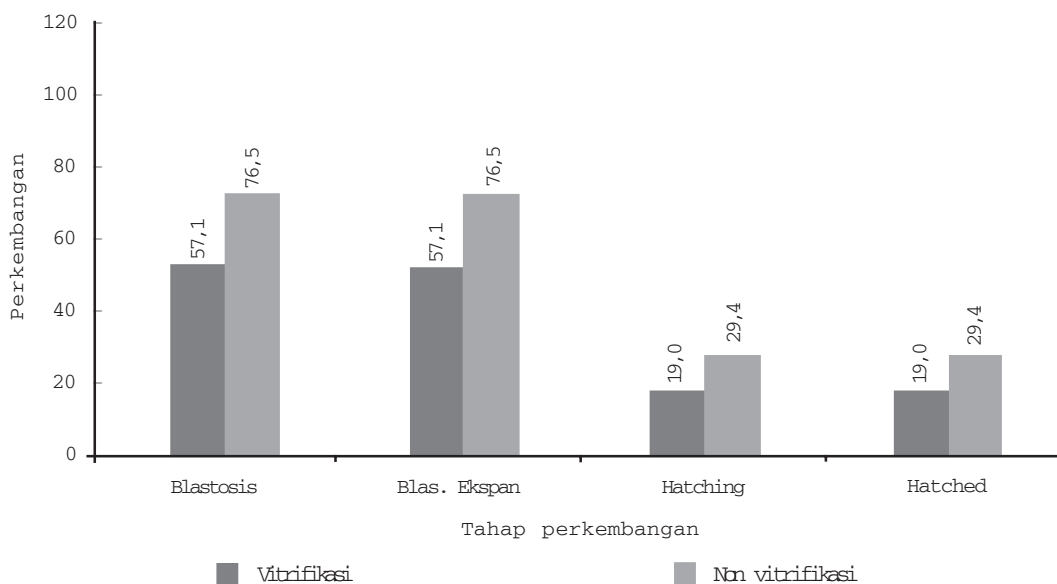
ini, viabilitasnya pun 100%, namun yang berkembang setelah dikultur 24 jam sebanyak 85,7% (Gambar 1). Perbedaan tersebut kemungkinan karena perbedaan dalam hal kriolup, medium kultur, dan kandungan krioprotektan dalam larutan vitrifikasi

Dalam penelitian ini kriolup yang digunakan bukan kriolup nilon komersial, melainkan kriolup yang diupayakan sendiri dari filamen kawat tembaga. Hasil percobaan menunjukkan bahwa blastosis mencit berhasil divitrifikasi dengan larutan vitrifikasi yang dimuat pada kriolup filamen kawat tembaga, kemudian dibekukan dengan cara dicelupkan langsung ke dalam nitrogen cair, dan didapat hasil yang cukup memuaskan, walau pun tidak sebaik hasil yang diperoleh Reed *et al.*, (2002). Peneliti tersebut melaporkan, 10% blastosis yang divitrifikasi tidak berkembang lebih lanjut setelah dikultur selama 24 jam, sedangkan dalam penelitian ini yang tidak berkembang lebih besar, yakni 15% (Gambar 1). Begitu pula hasil yang diperoleh Lane *et al.* (1999), 95,5% blastosis pasca vitrifikasi berhasil *hatching*, sedangkan pada penelitian ini yang berhasil *hatched* adalah 19% untuk blastosis yang divitrifikasi, dan 35,7% untuk blastosis yang dicemari bakteri kemudian divitrifikasi (Gambar 1). Hasil yang berbeda ini, kalau dipandang dari kriolup yang digunakan, terdapat perbedaan dalam hal volume yang mengisi kriolup tersebut. Pada penelitian ini volume yang mengisi kriolup sekitar 0.113 mm³ sedangkan

pada Lane *et al.*,(1999), pada peneliti-peneliti lainnya kriolupnya bervolume dibawah 1µl (Menezo *et al.* 1992).

Vitrifikasi embrio menggunakan kriolup memiliki kelebihan dibandingkan cara vitrifikasi yang biasa dilakukan dalam *straw*. Pada sistem terbuka seperti kriolup tidak diperlukan pelapis termoinsulasi dan volume larutan vitrifikasi yang dibutuhkan sangat sedikit, dengan demikian memungkinkan terjadinya pertukaran panas yang cepat dan merata (Menezo *et al.*, 1992). Pembekuan dengan laju sangat cepat yang dicapai kriolup akan mencegah kerusakan akibat pembekuan pada sel-sel yang peka pembekuan (Martino *et al.*, 1996). Dalam vitrifikasi kecepatan laju pembekuan, konsentrasi krioprotektan dan volume krioprotektan sangat penting. Laju pembekuan yang cepat akan memperkecil volume krioprotektan yang diperlukan sehingga dapat mengurangi efek toksik mau pun osmotiknya. Guna mempercepat laju pembekuan, maka volume larutan vitrifikasi yang dipakai ditekan sekecil mungkin, untuk itu diciptakan wadah-wadah pembawa embrio bervolume sekecil mungkin, seperti kriolup (Mukaida *et al.* 2003).

Kriolup yang digunakan dalam penelitian ini memuat volume krioprotektan lebih banyak, sehingga relatif lebih toksik dan laju pembekuannya pun menjadi lebih lamban. Hal tersebut membuat efektivitasnya lebih rendah dibandingkan kriolup berbahan nilon seperti



Gambar 2 Tahap perkembangan embrio tercemar *E.coli* K99 setelah divitrifikasi dan diikultur *in vitro* selama 48 jam.

yang dipakai peneliti-peneliti tersebut. Tetapi jika dapat diupayakan kriolup dengan volume sebanding dengan volume kriolup nilon, niscaya hasil yang didapat akan membaik. Hal tersebut bukanlah tidak mungkin karena evaluasi morfologi pasca-*warming* terhadap blastosis yang divitrifikasi menunjukkan hasil yang memuaskan. Blastosis pasca-*warming*, secara morfologi tampak memiliki susunan sel embrio yang rapi, antar sel bersinggungan secara kohesif, permukaan sel embrio cerah, dan blastosul terbentuk kembali. Sangat sedikit ditemukan adanya tanda-tanda degenerasi seluler yang dicirikan dengan suramnya sitoplasma sel, atau adanya reruntuhan di seputar masa embrio.

Dalam berbagai metode vitrifikasi ada beberapa cara bagaimana embrio yang ada dalam larutan vitrifikasi dimuat ke dalam suatu wadah pembawa embrio, seperti *open pulled straw*, *electron microscopic copper grid*, *hemistraw*, dan *cryoloop* (Hredzak et al., 2005). Sebelum metode vitrifikasi berkembang seperti sekarang, pada pertengahan tahun 1980-an, blastosis dibekukan dengan teknik *slow-freezing*, dan krioprotektan yang digunakan adalah gliserol. Namun, teknik tersebut kini dipandang kurang memuaskan karena blastosis yang berhasil hidup setelah *thawing* sekitar 50% (Menezo et al., 1992). Di samping itu kriopreservasi cepat seperti vitrifikasi, lebih disukai karena selama proses pembekuan, tidak terbentuk kristal es yang dapat mematikan embrio (Takahashi et al., 2005).

Blastosis bersifat kurang permeabel terhadap air dan krioprotektan di samping itu respon blastosis terhadap larutan hipertonik lebih lamban dibandingkan dengan embrio tahap *cleavage* (tahap yang lebih dini), kemungkinan hal inilah yang mendorong terbentuknya kristal es secara intraseluler selama blastosis mengalami kriopreservasi (Mukaida et al., 2003). Vitrifikasi dengan metode kriolup membuat viabilitas blastosis menciut sedikit menurun setelah *warming* (85-90%). Hal senada telah dilaporkan oleh Lane et al., (1999). Tetapi kemampuan *hatching* pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan yang dilaporkan peneliti tersebut. Medium yang digunakan Lane et al., (1999), dan Mukaida et al. (2003), adalah HEPES yang dimodifikasi. Modifikasi pada medium Lane et al., (1999) adalah dengan mengganti senyawa natrium bikarbonat (NaHCO_3) dengan HEPES.

Medium *buffer* HEPES dapat digunakan untuk mencegah adanya gangguan pH intrasel embrio selama vitrifikasi kriolup, karena sedikit saja gangguan tingkat keasaman terjadi, blastosis tersebut akan kehilangan kemampuannya untuk berkembang (Lane et al. 1998a; 1998b), karena kriopreservasi menyebabkan penurunan sistem transport pH pada embrio (Lane et al. 1999). Dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat diduga bahwa HEPES berperan lebih baik dalam mengendalikan pH dalam sel embrio selama vitrifikasi dibandingkan dengan medium buffer mPBS 20%, seperti yang digunakan dalam penelitian ini.

Dalam penelitian ini dipakai dua larutan, pertama adalah medium ekuilibrasi, yang dipakai adalah EG10%. Peneliti sebelumnya yang memakai larutan serupa di antaranya Lane et al., (1999), Mukaida et al., (2003), dan Madihah et al., (2006). Tetapi oleh Lane et al., (1999) EG 10% dikombinasikan dengan DMSO 10% dengan waktu pemaparan yang lebih singkat, yakni dua menit, sedangkan pada penelitian ini diperlukan waktu 8-10 menit untuk mengeluarkan sedikit air dari sel-sel embrio. Mukaida et al., (2003), memakai medium ekuilibrasi namun peneliti tersebut mengistilahkan dengan larutan vitrifikasi I, sangat mirip dengan Lane et al., (1999), tetapi kadarnya 7,5%. Larutan vitrifikasi yang digunakan dalam penelitian tersebut untuk mengeluarkan lebih banyak air dari dalam sel embrio, adalah krioprotektan EG 15% dan DMSO 15%. Larutan tersebut mirip dengan yang dipakai oleh Lane et al., (1999), Mukaida et al., (2003), dan Madihah et al., (2006), hanya saja pada Mukaida et al., (2003), dan Lane et al., (1999) ditambahkan 10mg/ml Ficoll-70, begitu pula sukrosanya lebih pekat yakni 0,65 M. Mukaida et al., (2003) beranggapan bahwa kadar etilen glikol 15% dan dimetil sulfoksida 15% pada larutan vitrifikasi, atau peneliti tersebut mengistilahkan dengan larutan vitrifikasi II mengandung kadar krioprotektan relatif rendah dan tidak efektif dalam mencegah terbentuknya kristal es di dalam sel embrio. Efektivitas larutan vitrifikasi tersebut dapat ditingkatkan tanpa perlu meningkatkan toksisitasnya dengan cara memperlakukan blastosis dengan larutan tersebut tidak pada suhu ruang, seperti yang dilakukan pada penelitian ini, melainkan pada suhu 35°C. Disamping itu, laju pembekuan yang sangat cepat dengan menggunakan kriolup sebagai

wadah pembawa embrio, akan mengurangi waktu pemaparan embrio terhadap krioprotektan, dengan demikian sitotoksitasnya pun berkurang (Lane *et al.*, 1999).

SIMPULAN

Simpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah, metode vitrifikasi kriolup dapat digunakan secara efektif untuk kriopreservasi blastosis mencit dan cemaran bakteri *E.coli* K99 pada blastosis yang divitrifikasi, tidak mempengaruhi tingkat perkembangannya ke tahap lebih lanjut.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* terhadap embrio yang telah divitrifikasi melalui transfer embrio ke induk resipien untuk mengevaluasi viabilitas embrio tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui dana Fundamental 2008, juga kepada berbagai pihak yang telah memberi kemudahan sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Batan IW, Boediono A, Djuwita I, Lay BW, Supar. 2006. Pelacakan perlekatan bakteri *Echerichia coli* K99 pada zona pelusida embrio mencit dengan metode *enzym linked immunosorbent assay* (elisa) dan *scanning electron microscope* (SEM). *J Veteriner*. 2006 (7): 29-38.
- Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.
- Boediono A. 2003. *Vitrifikasi vs pendinginan lambat pada pembekuan embrio*. Denpasar. Kongres I PATRI, 3-4 Oktober.
- Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, Cappai P. 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology* 62: 481-493.
- Djuwita I, Boediono A, Agungpriyono S, Supriatna I, Toelihere M, Sukra Y. 2005. In-vitro fertilization and embryo development of vitrified ovine oocytes stressed in sucrose. *Hayati* 12(2): 73-76.
- Gilbert FS. 1988. *Development biology*. Massachusetts: Sinauer Assoc. Inc. Pub. Pp. 82-92.
- Hirsh AG. 1987. Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* 24: 214-228.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo a laboratory manual*. 2nd Ed. Danvers: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 49.
- Hredzak R, Ostro A, Maracek I, Kacmarik J, Zdilova V, Vesela J. 2005. Influence of slow rate freezing and vitrification on mouse embryos. *Acta Vet Brno* 74: 23-27.
- Lane M, Baltz JM, Bavister BD. 1998a. Bicarbonate/chloride exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of hamster. *Biol Reprod* 61: 452-457.
- Lane M, Baltz JM, Bavister BD. 1998b. Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the Na⁺/H⁺ antiporter. *Biol Reprod* 59: 1483-1490
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. 1999. *Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique*. *Fertil Steril* 72(5): 1073-1078.
- Liebermann J, Tucker MJ. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and development potential after vitrification. *Reproduction* 124: 483-489.
- Madihah, Kusumaningtyas H, Boediono A, Sumarsono SH. 2006. Kualitas, kemampuan, implantasi, dan viabilitas *in-vivo* embrio mencit (*Mus musculus*) galur swiss webster setelah pembekuan dengan metode vitrifikasi. *Biota* 11(2): 72-79.
- Mahmoudzadeh AR, VanSoom A, Ysebaert MT, de Kruif A. 1994. A comparison of two vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology* 42:1389-1399.

- Martino A, Pollard JW, Leibo SP. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their development competence. *Mol Reprod Dev* 45:503-512.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. 1992. Freezing cocultured human blastocysts in in vitro fertilization. *Hum Reprod* 13: 3434-3440.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. 2001. Successful birth of transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 76(1): 618-620.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 18(2): 384-391.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Reed LR, Lane M, Gardner DK, Jensen NL, Thompson J. 2002. Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method successful clinical application and birth offspring. *J Assist Reprod Genet* 19(6): 304-306.
- Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. 2000. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 63: 27-39.
- Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. 2005. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-years follow-up study. *Fertil Steril* 84(1): 88-92.
- Thibier M. 2003. Statistics of the embryo transfer industry around the world. *Embryo Transfer Newsletter* 12: 16-17.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greeve T, Callesen H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryo with the open pull straw method (ops). *Cryoletter* 18:191-195.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greeve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryo injuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58.