

## **Kebuntingan Hasil Transfer Blastosis Mencit yang Dibekukan dengan Metode Vitrifikasi Kriolup**

*(THE PREGNANCY OF THE MOUSE AFTER TRANFER OF VITRIFIED BLASTOCYSTS USING CRYOLOOP METHOD)*

**I Wayan Batan<sup>1</sup>, I Ketut Suatha<sup>2</sup>, Ita Djuwita<sup>3</sup>, Nining Handhayani<sup>3</sup>,  
Wahono Esti Prasetyaningtyas<sup>3</sup>, Ketut Adnyane Mudite<sup>4</sup>,  
Bibiana W Lay<sup>5</sup>, Supar<sup>6</sup>, Arief Boediono<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Lab Diagnosis Klinik Hewan, <sup>2</sup>Lab Anatomi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,  
Jl. Raya Sesetan Gang Markisa No. 6 Denpasar  
Email : bobbatan@yahoo.com

<sup>3</sup>Lab Embriologi, <sup>4</sup>Lab Histologi, <sup>5</sup>Lab Mikrobiologi,  
FKH Institut Pertanian Bogor, Dramaga, Bogor

<sup>6</sup>Lab Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian Veteriner, Cimanggu, Bogor

### **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk menilai viabilitas embrio yang dibekukan dengan dengan vitrifikasi menggunakan kriolup sebagai karier embrio. Embrio tahap blasosis diperoleh dari mencit yang disuperovulasi. Embrio dibekukan dengan metode vitrifikasi, dan dimuat pada kriolup yang dibuat dari filamen tembaga sebelum dicemplungkan dalam nitrogen cair. Penilaian viabilitas embrio dilakukan secara *in vitro* dengan mengkultur dan secara *in vivo* dengan melakukan transfer embrio ke induk resipien. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya tahan embrio hasil vitrifikasi setelah dikultur selama 24 jam adalah sebesar 85,7%. Embrio yang berhasil lahir setelah ditrasfer ke induk resipien adalah 4 dari 63 embrio (6%) pada dua induk dari 9 induk resipien (22%). Simpulan yang dapat ditarik bahwa embrio tahap blastosis yang dibekukan dengan metode vitrifikasi menggunakan kriolup sebagai pembawa mampu bertahan hidup dan berkembang menjadi anakan setelah ditransfer.

Kata-kata kunci : transfer embrio, blastosis, vitrifikasi, kriolup

### **ABSTRACT**

The aim of the study was to assess the viability of vitrified embryo using cryoloop as a carrier of embryo. The blastocyst stage embryos were collected from superovulated mice. Embryos were frozen using vitrification method and vitrified embryos were loaded on copper filament cryoloop before dipped in liquid nitrogen. The viability of vitrified embryos was assess *in vitro* by medium cultered and *in vivo* by transfered them to recipient mice. The result shows the viability of vitrified embryos was 85,7% after 24 hours cultured and the embryos were born from two pregnant recipient mice out of nine (22%) or four offspring out of 63 trasfered embryos (6%). In conclusion, vitrified blatocyst stage embryos using cryoloop as a carrier could keep the viability of the embryos and they could be transfered to the recipient mice and were born normally.

Key words: embryo trasfer, blastocyst, vitrification, cryoloop

### **PENDAHULUAN**

Kelebihan produksi embrio, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, agar termanfaatkan, dapat diawetkan dengan pembekuan dan dimanfaatkan di kemudian hari. Berdasarkan

cara pembekuan dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan, dikenal metode pembekuan lambat dan metode pembekuan cepat (Boediono, 2003). Teknik pembekuan lambat (*slow freezing*), menggunakan krioprotektan berkonsentrasi rendah dan laju pembekuan

lambat yang dikontrol bertujuan untuk mencegah terbentuknya kristal es (Rall, 1987). Namun kerusakan karena terbentuknya kristal es baik pada membran maupun pada organel merupakan penyebab utama kematian embrio pascakriopreservasi. Pada saat embrio beku di-*thawing*, kristal es dapat kembali terbentuk. Selain itu, pemasukan air yang terlalu cepat ke dalam sel dapat membuat sel embrio membengkak. Embrio yang dibekukan dengan metode *slow freezing*, kurang mampu menimbulkan kebuntingan dan mempertahankan kebuntingan tersebut (Lane et al., 1999).

Sebagai pilihan lain, pengganti pembekuan lambat, dikembangkanlah teknik kriopreservasi atau pembekuan sangat cepat tanpa terbentuknya kristal es yang disebut vitrifikasi (Rall dan Fahy, 1985). Vitrifikasi lebih disukai dibandingkan dengan teknik pembekuan lambat, karena kristal es yang terbentuk jauh lebih sedikit di samping lebih murah dan lebih mudah dalam pelaksanaannya (Takahashi et al., 2005). Vitrifikasi menggunakan krioprotektan konsentrasi tinggi, sehingga pada saat proses pembekuan cepat, kristal es tidak terbentuk. Selain itu laju pembekuan yang sangat cepat akan mencegah kerusakan pada sel-sel yang peka terhadap pembekuan (Rall, 1987). Pada saat vitrifikasi, seluruh larutan keadaannya berubah bentuknya menjadi seperti kaca (*vitreous*). Air tidak mengalami presipitasi sehingga kristal es tidak terbentuk (Liebermann et al., 2002).

Keberhasilan metode vitrifikasi, dengan mempercepat laju pendinginan seperti penggunaan *electron microscope grid* dalam proses memvitrifikasi (Martino et al., 1996; Son et al., 2003) atau pada *straw* tipis (Vajta et al., 1998), *hemistraw* (Vanderzwalmen et al., 2003) telah dilaporkan, tetapi masalah timbul dalam hal mendapatkan kembali embrio yang divitrifikasi mau pun untuk memanipulasi embrio tersebut. Kini prosedur vitrifikasi menggunakan kriolup dilaporkan sangat memudahkan dalam melakukan manipulasi maupun *warming* (Lane et al., 1999; Mukaida et al., 2003; Takahashi et al., 2005). Penggunaan metode kriolup memungkinkan dilakukan pembekuan dengan sangat cepat dan pengurangan volume larutan vitrifikasi yang diperlukan (Takahashi et al., 2005). Pemanfaatan kriolup dilaporkan berhasil digunakan untuk membekukan embrio hamster, sapi, mencit, (Lane et al., 1999). manusia (Lane et al., 1999; Mukaida et al., 2003; Takahashi et

al., 2005). Penelitian ini bertujuan untuk membekukan embrio mencit secara vitrifikasi dengan metode kriolup, dan mengevaluasi perkembangan embrio secara *in vitro* dan secara *in vivo* dengan cara mentransfer embrio tahap blastosis ke mencit resipien hingga embrio tersebut lahir.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan Donor dan Resipien

Dalam penelitian ini dipakai mencit 12 minggu yang bebas penyakit, dirangsang folikulogenesisnya dengan menyuntikkan hormon *pregnant mare's serum gonadotropine* (PMSG: Folligon<sup>®</sup>, Intervet, Boxmeer, Holland) 5IU secara intraperitoneum, dan diikuti dengan penyuntikan hormon *human chorionic gonadotropine* (hCG: Choruon<sup>®</sup>, Intervet, Boxmeer, Holland) 5IU 48 jam pasca-penyuntikan PMSG. Segera setelah penyuntikan hCG, mencit betina tersebut dikawinkan dengan pejantan dengan perbandingan 1:1. Pagi hari berikutnya, mencit betina yang telah kawin, dicirikan dengan adanya sumbat vagina, dipisahkan dari pejantan. Pada hari teramatinya sumbat vagina ditetapkan sebagai hari pertama. Empat hari kemudian mencit betina yang bunting tersebut dikorbankan nyawanya dengan melakukan dislokasio os aksis tulang leher.

Bagian kornua uteri mencit tersebut diisolasi dan ditempatkan pada medium PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline<sup>®</sup>, Gibco, Auckland, NZ), yang ditambahkan serum 3%. Kornua uteri kemudian dibilas (*flushing*) menggunakan mPBS yang disemurkan dari jarum 26G yang dihubungkan dengan spuit 1 ml. Cairan hasil bilasan ditampung dalam cawan petri dan diamati di bawah mikroskop. Embrio tahap blastosis yang ditemukan dipanen dan dicuci tiga kali dalam mPBS, dan kemudian disimpan sementara dalam larutan mPBS (Hogan et al., 1994). Induk resipien disiapkan dengan cara yang sama seperti mempersiapkan induk donor, tetapi tanpa perlakuan superovulasi, dan pejantan yang digunakan untuk mengawini betina adalah pejantan vasektomi. Perkawinan tetap terjadi, tetapi hanya menimbulkan bunting semu. Betina yang memperlihatkan sumbat vagina setelah dikawini pejantan vasektomi dijadikan sebagai induk resipien, dan siap menerima transfer embrio pada hari ke 3,5 (Mohamad et al., 1999).

### **Pembuatan Kriolup dan Teknik Vitrifikasi Kriolup**

Kriolup yang digunakan untuk melakukan vitrifikasi berupa jerat (*loop*) kawat tembaga dengan ketebalan 100 $\mu$ m, dan garis tengah jerat 1250 $\mu$ m. Metode vitrifikasi yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Lane *et al.*, (1999).

### **Warming Blastosis**

*Warming* terhadap blastosis hasil vitrifikasi dilakukan melalui beberapa tahap pengenceran sukrosa. Kriolup yang bermuatan blastosis dicepulkan langsung dan sesegera mungkin kedalam medium mPBS yang mengandung sukrosa 0,5M. Blastosis akan segera jatuh dari kriolup ke larutan tersebut. Setelah satu menit berada dalam larutan tadi, blastosis tersebut dipindahkan ke medium yang mengandung sukrosa 0,25M, kemudian 0,1M masing-masing selama dua menit. Selanjutnya blastosis tersebut dicuci empat kali dalam medium kultur kemudian dikultur dalam *kalium simplex optimized medium* (KSOM) dan diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C. Sebagian kecil dari blastosis tersebut secara acak dipilih untuk diwarnai dengan *bisbenzimid* (*Hoechts-33342*) dan *propidium iodine* (Saha *et al.*, 2000), guna melihat sel-sel embrio yang mati dan yang hidup setelah vitrifikasi. Setelah enam jam dikultur terhadap blastosis tersebut dilakukan pengamatan terhadap *reexpansion* dari blastosis hasil vitrifikasi. Waktu enam jam dipilih karena masa enam jam ini merupakan waktu yang umum dipakai dalam menilai blastosis hasil *warming* sebelum dilakukan transfer embrio (Lane *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005).

### **Penilaian Viabilitas Blastosis**

Setelah *warming*, embrio ditempatkan pada cawan petri yang telah berisi tetesan-tetesan (*drops*) dengan volume sekitar 10 $\mu$ l, ditutupi dengan minyak mineral, dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C (Lieberman dan Tucker 2002). Dalam penelitian ini medium kultur yang dipakai adalah KSOM. Pengamatan dilakukan setelah embrio dikultur 2-3 jam dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Olympus IX70 Japan). Daya tahan hidup (*viabilitas*) embrio dinilai berdasarkan keutuhan morfologi blastomer, sel induk, trofektoderm, dan *reexpansion* blastosul. Blastosis dikatakan mampu bertahan hidup jika blastosis memasuki kembali tahapan

perkembangannya dan berkembang ke tahap lebih lanjut (Mukaida *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2005). Viabilitas blastosis mencit setelah vitrifikasi diuji dengan melakukan transfer embrio ke resipien mencit yang bunting semu. Keseluruhan blastosis dalam medium yang reekspan dan berkualitas baik, dikumpulkan dan secara acak dipilih untuk ditransfer ke mencit resipien (Lane *et al.*, 1999).

### **Teknik Transfer Embrio**

Mencit betina yang mengalami kebuntingan semu 3,5 hari, dibius campuran obat bius xylazine (Iliumxylazil-20® Troy Lab NSW, Australia) dengan ketamine (Ketamil® Troy Lab NSW, Australia), masing-masing campuran 0,2mg dan 1 mg untuk satu ekor mencit (Muhammad *et al.*, 1999). Setelah terbius, pembedahan dengan penyayatan kulit sepanjang 1-2 cm sejajar tulang punggung, dilakukan pada titik tengah garis maya yang menghubungkan pangkal ekor dengan bagian belakang tulang tengkorak. Lubang pada kulit akibat sayatan skalpel tersebut digeser ke kanan, sampai teramati di belakang tulang iga terakhir dan bawah dinding abdomen yang transparan, lemak putih di sekitar ovarium. Dinding abdomen tersebut dilubangi, lemak tersebut ditarik keluar, dan bersamaan dengan itu tanduk uterus kanan pun akan tertarik juga keluar abdomen. Tanduk uterus tersebut dilubangi pada bagian ujungnya dengan jarum 26G, selanjutnya 6-8 embrio tahap blastosis yang telah disiapkan dalam mikropipet ditransfer kedalam uterus melalui lubang yang dibentuk oleh jarum 26G tersebut. Tanduk uterus dikembalikan ke kedudukannya semula, dan sayatan kulit dijahit dengan jahitan sederhana dan dibubuhi bubuk antibiotik (Hogan *et al.* 1994).

### **Rancangan Percobaan**

Penelitian dilaksanakan berdasarkan rancangan acak lengkap pola *split in time*. Embrio tahap blastosis tersebut divitrifikasi, kemudian dihangatkan, dan selanjutnya dikultur *in vitro*, dan ditransfer ke induk resipien. Parameter yang diamati adalah tingkat perkembangan embrio secara *in vitro*, diamati setiap 6 jam, mulai dari tingkat (Hogan *et al.*, 1994), blastosis, blastosis ekspan, *hatching*, dan *hatched* (Gilbert 1988; Hogan *et al.* 1994). Secara *in vivo*, parameter yang diamati adalah persentase pembentukan fetus dan kelahiran anakan mencit hasil transfer blastosis.

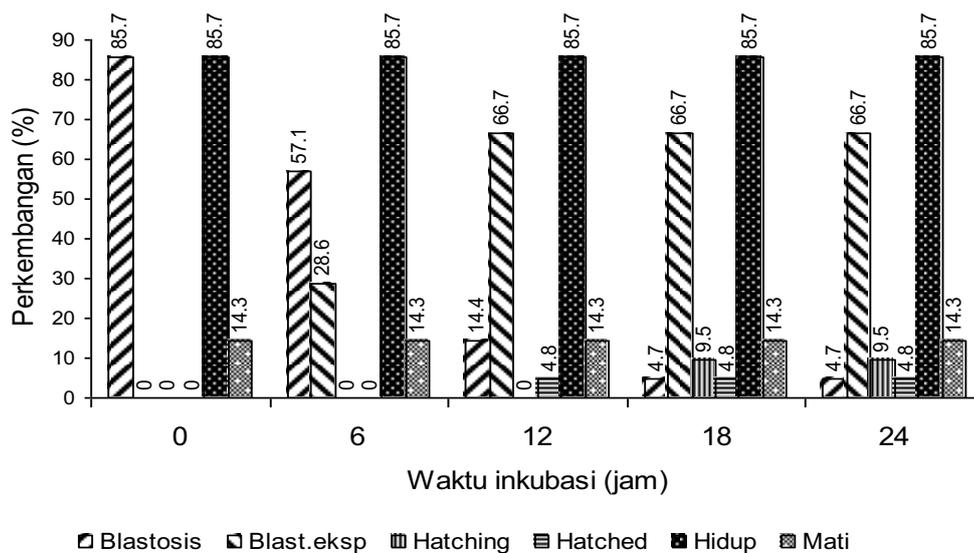
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa blastosis yang telah divitrifikasi dan *warming*, setelah dikultur selama 24 jam dalam medium KSOM menunjukkan daya tahan hidup (*survival rate*) sebesar 85,70% (Gambar 1). Perkembangan embrio pasca *warming* teramati mulai terjadi 6 jam setelah dikultur dalam KSOM. Persentase blastosis yang berkembang ke tahap lebih lanjut (blastosis ekspan, *hatching* dan *hatched*) adalah sekitar 28,6%, kemudian meningkat menjadi 71,5% pada jam ke 12, selanjutnya menurun menjadi 71,4% pada jam ke 18, dan persentase embrio yang berkembang terus menurun, sampai akhirnya yang berkembang hanya 52,3% pada jam ke 42.

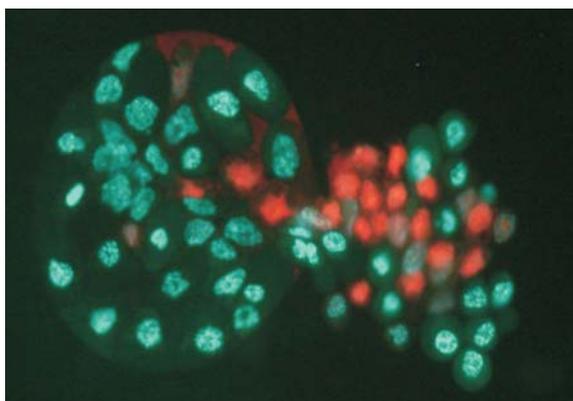
Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan laporan Lane *et al.*, (1999), dalam laporan tersebut blastosis menciit yang divitrifikasi dengan *carrier* kriolup mampu berkembang kembali sebesar 100%. Takahashi *et al.*, (2005) yang melakukan penelitian sejenis pada blastosis manusia melaporkan *survival ratenya* adalah 85,5%. Hasil penelitian ini setara dengan yang dilaporkan oleh Ali dan Shelton (1993) yang melakukan vitrifikasi blastosis menggunakan *straw* inseminasi berbahan plastik 0,25 ml sebagai *carrier*. Tingkat daya tahan hidup yang lebih rendah dalam penelitian ini, kemungkinan disebabkan oleh volume krioprotektan yang terbawa dalam kriolup dalam penelitian ini (0.115  $\mu$ l) masih terlalu besar jika dibandingkan dengan kriolup nilon yang dipakai Lane *et al.*, (1999), Mukaida *et al.*, (2001), dan Takahashi *et al.*, (2005) menggunakan kriolup yang memiliki volume sekitar 0.05  $\mu$ l. Pemanfaatan kriolup bervolume sangat kecil tersebut memungkinkan krioprotektan berkonsentrasi tinggi didinginkan dengan sangat cepat. Pendinginan dari 25°C ke -196°C, berkecepatan 221°C/0,5 detik atau 26.520°C/menit (Liebermann *et al.*, 2002). Pendinginan yang sangat cepat tersebut membuat krioprotektan memadat tetapi tidak membeku dan tidak membentuk kristal es yang mematikan sel-sel embrio (Mukaida *et al.*, 2001). Pada penelitian ini, begitu pula pada vitrifikasi menggunakan *straw* sebagai *carrier* seperti yang dilakukan Ali dan Shelton (1993), volume larutan krioprotektannya relatif besar, akibatnya percepatan pendinginan tidak sepenuhnya tercapai sesuai harapan, sehingga kristal es sangat mungkin terbentuk dan mematikan sebagian atau keseluruhan sel-sel embrio.

Tingkat kematian embrio vitrifikasi mencapai 14,30% sesaat setelah dilakukan penghangatan (*warming*) hingga 24 jam kultur (Gambar 1). Kematian embrio pascavitrifikasi terutama disebabkan oleh keracunan akibat terlalu lama bersinggungan dengan krioprotektan berkonsentrasi tinggi dan terbentuknya kristal es. Dalam penelitian ini seperti telah dikemukakan di atas, akibat volume krioprotektan yang lebih besar, mengakibatkan laju percepatan pendinginan menjadi lebih lambat. Kelambatan tersebut, di samping membuat persinggungan embrio dengan krioprotektan menjadi lebih lama, juga memungkinkan terbentuknya kristal es yang merusak membran dan organel sel. Setelah vitrifikasi dengan kriolup sel-sel embrio (kuda) tahap blastosis yang bertahan hidup sekitar 48% dan hampir 30% embrio yang divitrifikasi zona pelusidanya mengalami keretakan (Oberstein *et al.* 2001). Sisa-sisa sel embrio yang bertahan hidup dapat mempertahankan diri untuk selanjutnya berkembang ke tahap lebih lanjut. Tetapi jika disertai dengan keretakan-keretakan (*fracture*) pada zona pelusida, hal tersebut akan membuat sel-sel embrio yang bertahan hidup akan semakin sulit untuk mempertahankan dirinya, karena pelindung embrio dari gangguan lingkungan yang ekstrim tidak lagi berperan.

Embrio pasca penghangatan (*warming*) pada penelitian ini teramati mulai *hatching* setelah 12 jam dikultur dalam KSOM. Persentase embrio yang *hatching* sebanyak 4,8% (Gambar 1) dan persentasenya terus meningkat sampai sekitar 19% setelah 42 jam dalam kultur. Lane *et al.*, (1999) melaporkan 95,5% embrio yang divitrifikasi berhasil *hatching* setelah dikultur selama 48 jam. Adanya perbedaan hasil yang diperoleh kemungkinan karena adanya perbedaan dalam hal volume larutan vitrifikasi dalam kriolup seperti telah dikemukakan sebelumnya dan medium kultur yang dipakai. Lane *et al.*, (1999) dalam penelitian tersebut menggunakan larutan vitrifikasi dengan volume yang sangat sedikit, dengan demikian kecepatan pendinginannya menjadi sangat cepat. Pendinginan dan penghangatan yang dilakukan sesingkat mungkin akan mencegah kerusakan sel embrio akibat terbentuknya kristal es dalam sel (Takahashi *et al.*, 2005), di samping karena volume krioprotektan, rendahnya *hatching rate* kemungkinan juga karena medium kultur yang dipakai. Menurut Lane *et al.*, (1998a; 1998b) medium bufer yang dipakai dalam vitrifikasi hendaknya



Gambar 1. Blastosis vitrifikasi yang berkembang ke tahap selanjutnya (n=21)



Gambar 2. Pewarnaan vital embrio setelah vitrifikasi dengan metode kriolup. Sel-sel embrio yang bertahan hidup (biru) dan mati (merah)

medium yang mampu mencegah perubahan pH intraseluler yang terjadi saat vitrifikasi. Perubahan yang sangat kecil sekali pun dalam sel embrio akan membuat embrio tersebut kehilangan kemampuannya untuk berkembang. Vitrifikasi kini diketahui mengakibatkan pH dalam sel menurun, dan menurut Lane *et al.*, (1999), medium bufer HEPES memiliki kelebihan dalam menstabilkan pH, dibandingkan medium sejenis yang lainnya.

Pemeriksaan terhadap viabilitas embrio setelah kriopreservasi adalah menguji kemampuan embrio tersebut untuk menimbulkan dan mempertahankan kebuntingan, dilanjutkan dengan lahirnya anak yang fertil

(Lane *et al.*, 1999). Pada penelitian ini dipilih secara acak 63 embrio tahap blastosis vitrifikasi yang berkualitas baik. Embrio tersebut ditransfer ke sembilan resipien, masing-masing ditransfer tujuh embrio ke dalam tanduk rahim kanan. Fetus yang berkembang ditemukan pada tanduk kanan rahim dua dari sembilan induk resipien (22%). Anak yang lahir adalah empat ekor dari 63 embrio hasil vitrifikasi yang ditransfer (6,3%), yaitu tiga dari induk pertama dan satu dari induk kedua.

Keberhasilan blastosis vitrifikasi menimbulkan kebuntingan dan kemudian lahir, membuktikan metode vitrifikasi kriolup dapat diandalkan untuk mengawetbekukan (kriopreservasi) embrio. Keberhasilan tersebut selaras dengan yang dilaporkan oleh Hredzak *et al.*, (2005), yang menunjukkan keberhasilan tingkat implantasi (11,1%) embrio pasca vitrifikasi dengan metode *straw*. Penelitian serupa yang dilakukan Ali dan Shelton (1993), melaporkan bahwa jumlah embrio pasca vitrifikasi yang berhasil implantasi sebanyak 25,4%, tetapi yang mati dan kemudian diserap sebesar 13%, dan sisanya berkembang menjadi fetus sebanyak 12,4%. Lebih jauh Hredzak *et al* (2005), melaporkan bahwa tingkat implantasi blastosis vitrifikasi nyata lebih rendah jika dibandingkan dengan embrio segar mau pun embrio hasil pembekuan *slow freezing*. Hasil ini memperlihatkan bahwa pembekuan embrio memberi efek buruk terhadap perkembangan embrio, dan vitrifikasi efeknya jauh lebih buruk

Embrio tersebut kualitasnya lebih rendah dan kemampuannya untuk implantasi juga menurun, walau pun secara morfologi identik dengan embrio yang tidak divitrifikasi.

Kerusakan embrio akibat vitrifikasi mengakibatkan kematian 50% lebih sel-sel embrio (kuda) telah ditunjukkan oleh Oberstein *et al.*, (2001). Begitu pula dalam penelitian ini tampak embrio yang divitrifikasi, sebagian sel-selnya ada yang mati (Gambar 2). Sebelumnya dilaporkan oleh Lane *et al.*, (1999), bahwa embrio mencit hasil vitrifikasi dengan metode kriolup yang berhasil implantasi 78% dan sekitar 55% berkembang menjadi fetus. Angka tersebut tidak berbeda jika yang ditransfer embrio segar. Lane *et al.*, (1998, 1999) seperti telah dikemukakan di atas memakai medium yang lebih efisien untuk mengatasi perubahan pH intraseluler, sehingga perkembangan embrio tidak terganggu. Kriolup bervolume sangat kecil, membuat laju pembekuannya menjadi sangat cepat dan kristal es yang mematikan tidak terbentuk.

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa, blastosis vitrifikasi yang dapat kembali berkembang (*reexpand*) sebanyak 85,7% dan dari blastosis tersebut yang berkembang ke tahap lebih lanjut secara *in vitro*, persentasenya berbeda-beda pada pengamatan yang dilakukan setiap 6 jam. Blastosis vitrifikasi yang mati pasca *warming* sekitar 14,3% hingga jam ke 24, dan kematian menjadi tiga kali lipat pada saat jam ke 48. Blastosis mulai *hatching* setelah 12 jam dikultur dan setelah 48 jam, sebanyak 19% blastosis tersebut *hatching*. Secara *in vivo*, blastosis vitrifikasi tersebut berhasil berkembang menjadi fetus dan lahir tanpa menunjukkan tanda-tanda cacat.

## SIMPULAN

Simpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah: Vitrifikasi dengan metode kriolup dapat dipakai untuk kriopreservasi embrio tanpa membuat embrio tersebut kehilangan viabilitasnya; Embrio setelah vitrifikasi, viabilitasnya sedikit menurun; Transfer embrio yang telah divitrifikasi ke resipien, berhasil berkembang menjadi fetus dan lahir menjadi mencit normal.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian untuk meningkatkan *calving rate* blastosis setelah vitrifikasi, dan dicobakan pula pada hewan lainnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti yang telah memberikan beasiswa dan dana hibah fundamental sehingga penelitian ini bisa terlaksana.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali J, Shelton JN. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 98: 459-465.
- Boediono A. 2003. *Vitrifikasi vs pendinginan lambat pada pembekuan embrio*. Denpasar. Kongres I PATRI, 3-4 Oktober.
- Gilbert FS. 1988. *Development Biology*. Massachusetts: Sinauer Assoc. Inc. Pub. Pp. 82-92.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biol Reprod* 59: 1483-1490.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 72(5): 1073-1078.
- Lieberman J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67: 167-168.

- 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.
- Martino A, Pollard JW, Leibo SP. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their development competence. *Mol Reprod Dev* 45:503-512.
- Muhamad K, Eriani K, Djuwita I, Boediono A. 1999. Perkembangan in-vitro dan in-vivo embrio mencit tanpa zona pelusida. *Media Veteriner* 6(3): 1-4.
- 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.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Carnavale EM, Squires EL. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55: 607-613.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. 2003. Pregnancy outcome following transfer of blastocysts vitrification on electron microscopy grids after induced collapse on the blastocoele. *Human Reprod* 18: 137-139.
- 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.
- 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.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, VanRoosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech N. 2003. Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Human Reprod* 17: 744-751.