

Kemampuan Fertilisasi Spermatozoa *Sexing* dan Perkembangan Awal Embrio Secara *In Vitro* pada Sapi

Fertilization Ability of Sexed Spermatozoa and Early Bovine Embryonic Development In Vitro

Alvien Nur Aini¹, Mohamad Agus Setiadi^{1,2}, Ni Wayan Kurniani Karja²

¹ Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

² Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680
 Email: setiadi03@yahoo.com

Abstract

The aim of the present study was to investigate the fertilization ability of bovine oocytes and early bovine embryonic development *in vitro*, fertilized by frozen X and Y sperm separated by *bovine serum albumin* (BSA) gradient column. Oocytes were collected from slaughter house ovarian by flushing and slicing technique. Oocytes were than matured in *tissue culture medium* (TCM) 199 supplemented with 10 IU/ml *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG), 10 IU/ml *human chorionic gonadotropin* (hCG) and 10% *fetal bovine serum* (FBS) for 24 h in 5% CO₂ incubator 39°C. Oocytes then fertilized with three kind of different frozen spermatozoa (X, Y and unsexing spermatozoa as control) for 14 h with final concentration 2x10⁶ spermatozoa/mL. Embryos were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with essential and non essential amino acid and 0.3% *bovine serum albumin* (BSA) for 96 h. Results of the experiments revealed that there was no significant difference (P>0.05) in the fertilization ability (49.17%; 51.40%; 53.42%) for X, Y and control group, respectively. No significant difference (P>0.05) in the number of embryos development (47.77%; 48.25%; 54.43%) for X, Y and control group, respectively. Furthermore, only small number of embryos could pass development blockade (23.80%; 26.08%; 23.61%) for X, Y and control spermatozoa with statistically no significant difference (P>0.05). It is concluded that sexed spermatozoa separated by BSA gradient column had comparable fertilization ability with unsexing spermatozoa and had ability to supported early embryonic development.

Keywords: bovine, embryo, *in vitro*, sexing, spermatozoa

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengkaji kemampuan fertilisasi dan perkembangan awal embrio sapi yang diproduksi menggunakan semen beku *sexing* X dan Y hasil pemisahan menggunakan gradien *bovine serum albumin* (BSA) secara *in vitro*. Oosit sapi dikoleksi dari ovarium yang berasal dari rumah potong hewan (RPH) menggunakan teknik pencacahan dan pembilasan (*slicing dan flushing*). Oosit dimaturasi pada medium *tissue culture medium* (TCM) 199 yang disuplementasi dengan 10 IU/ml *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG), 10 IU/ml *human chorionic gonadotropin* (hCG) dan 10% *fetal bovine serum* (FBS) selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C. Oosit selanjutnya difertilisasi menggunakan tiga jenis semen beku yang berbeda (spermatozoa *sexing* X, Y dan spermatozoa tanpa proses *sexing* (*unsexing*) sebagai Kontrol) selama 14 jam dengan konsentrasi akhir yaitu 2x10⁶ spermatozoa/mL. Kultur embrio dilakukan selama 96 jam menggunakan medium *synthetic oviductal fluid* (SOF) yang disuplementasi dengan asam amino esensial dan non esensial serta 0.3% *bovine serum albumin* (BSA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan fertilisasi pada perlakuan X dan Y tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (P>0.05) dibandingkan Kontrol dengan persentase masing-masing 49.17%; 51.40%; 53.42%. Tingkat pembelahan embrio juga tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (P>0.05) dengan persentase masing-masing 47.77%; 48.25%; 54.43% pada kelompok X, Y dan Kontrol. Lebih lanjut,

hanya sedikit embrio yang mampu melewati blokade perkembangan (23.80%; 26.08%; 23.61%) pada spermatozoa X, Y dan Kontrol yang secara statistik tidak berbeda nyata ($P>0.05$). Dapat disimpulkan bahwa spermatozoa *sexing* hasil pemisahan gradien BSA mempunyai kemampuan fertilisasi yang sama dengan spermatozoa *unsexing* serta tetap dapat mendukung perkembangan awal embrio *in vitro*.

Kata kunci: embrio, *in vitro*, pemisahan, spermatozoa, sapi

Pendahuluan

Spermatozoa *sexing* merupakan salah satu hasil teknologi reproduksi yang dinilai sebagai alternatif yang menjanjikan dalam upaya efisiensi reproduksi untuk menghasilkan anak dengan jenis kelamin sesuai keinginan. Spermatozoa *sexing* telah diaplikasikan untuk inseminasi buatan (IB) dan transfer embrio dengan hasil bervariasi. Mari *et al.* (2011) melaporkan bahwa persentase tingkat kebuntingan pada kuda melalui teknik IB menggunakan spermatozoa *sexing* mencapai 47.6% serta pada sapi mencapai 52% (Morotti *et al.* 2014). Lebih lanjut, Pellegrino *et al.* (2016) melaporkan bahwa keberhasilan kebuntingan melalui teknik transfer embrio sebesar 35.4%.

Teknik *sexing* spermatozoa dilakukan melalui pemisahan kromosom X dan Y berdasarkan perbedaan karakteristik morfologi, kandungan DNA, perbedaan protein makromolekul pada kedua kromosom serta perbedaan berat dan pergerakan spermatozoa (Yan *et al.* 2006). Diperkirakan kandungan DNA spermatozoa kromosom X adalah 3-5% lebih banyak dibandingkan dengan kromosom Y (Grant dan Chamley 2007; Sureka 2013). Berdasarkan kriteria tersebut, maka telah dikembangkan berbagai teknik pemisahan spermatozoa seperti metode *flow cytometer* (Blondin *et al.* 2009; Jo *et al.* 2014), metode *Gradien Percoll* (Machado *et al.* 2009; Villamil *et al.* 2012) serta metode gradient BSA. Metode *sexing* menggunakan gradien BSA dinilai efisien dan sederhana dibandingkan dengan metode-metode lainnya.

Teknik pemisahan spermatozoa dengan gradien BSA dianggap tidak memanipulasi spermatozoa secara berlebihan, selain itu spermatozoa dipaparkan pada medium BSA yang juga sering ditambahkan

pada pengencer semen, sehingga diharapkan mampu mencegah terjadinya penurunan kualitas spermatozoa setelah proses pemisahan. Afiati (2004) melaporkan bahwa persentase spermatozoa hasil *sexing* gradien albumin diprediksi membawa kromosom X sebesar 80.88% dan Y sebesar 58.82% dengan motilitas sesudah proses *sexing* mencapai 75.00%. Lebih lanjut dilaporkan oleh Kaiin *et al.* (2008) bahwa motilitas spermatozoa *sexing* gradien kolom BSA 5-10% sesudah *thawing* tidak berbeda dengan spermatozoa *unsexing* yaitu 45% serta mampu menghasilkan spermatozoa *sexing* dengan motilitas yang lebih tinggi pada gradien bawah. Persentase motilitas tersebut masih memenuhi syarat sesuai standar SNI untuk keperluan inseminasi buatan (IB).

Pembuktian lebih lanjut tentang kemampuan fertilisasi spermatozoa *sexing* dan kemampuannya dalam mendukung perkembangan embrio secara *in vitro* belum banyak dilaporkan di Indonesia. Data ini diperlukan untuk menjawab secara cepat potensi kesuburan dan keakuratan spermatozoa hasil *sexing*. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan fertilisasi spermatozoa hasil *sexing* dengan metode gradien BSA dalam mendukung kemampuan perkembangan embrio secara *in vitro*.

Materi dan Metode

Kemampuan Fertilisasi *In Vitro* Spermatozoa *Sexing*

a. Seleksi dan Maturasi Oosit *In Vitro*

Ovarium sapi diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) Bubulak Kotamadya Bogor. Ovarium ditransportasikan ke Laboratorium menggunakan larutan NaCl 0.9% yang ditambahkan 100 IU/mL

Penisilin (Sigma-Aldrich, USA) dan 0.1 mg/mL Streptomisin (Sigma-Aldrich, USA). Koleksi oosit dilakukan dengan teknik pencacahan dan pembilasan (*slicing* dan *flushing*) menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang mengandung 5% *Fetal Bovine Serum* (FBS).

Seleksi oosit dilakukan dibawah mikroskop stereo berdasarkan kekompakan sel kumulus dan homogenitas sitoplasma. Oosit dimatangkan menggunakan *Tissue Culture Medium* (TCM) 199 (Sigma, USA) yang disuplementasi dengan 10% FBS, 10 IU/mL *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan), 10 IU/mL *Human Chorionic Gonadotrophin* (hCG) (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) dan 50 µg/mL Gentamisin (Sigma-Aldrich, USA). Medium dibuat dalam bentuk *drop* (100 µL) yang ditutup menggunakan *mineral oil* (Sigma-Aldrich, USA) dalam *petridish* steril (Nunclon, Denmark) untuk 10 hingga 15 oosit. Pematangan oosit dilakukan dalam inkubator 5% CO₂ suhu 39 °C selama 24 jam.

b. Fertilisasi Oosit *In Vitro*

Fertilisasi *in vitro* dilakukan menggunakan spermatozoa *sexing* X dan Y sebagai perlakuan serta spermatozoa *unsexing* sebagai Kontrol. *Thawing straw* semen beku dilakukan pada air suhu 37°C selama 30 detik. Semen ditempatkan pada tabung yang berisi medium fertilisasi (Suzuki *et al.* 2000) untuk menghilangkan pengencer melalui sentrifugasi dengan kecepatan 700g selama 8 menit, selanjutnya bagian supernatan dibuang dan endapan spermatozoa diencerkan menggunakan medium fertilisasi dengan konsentrasi akhir 2x10⁶ spermatozoa/mL (Lopez *et al.* 2013; Muttaqin 2015). Medium fertilisasi yang berisi spermatozoa tersebut dibuat dalam bentuk *drop* (100 µL). Oosit yang telah dimaturasi dipindahkan ke dalam *drop* medium fertilisasi sesuai perlakuan (Spermatozoa *sexing* X, Y dan Kontrol) setelah dilakukan pencucian terlebih dahulu. Inkubasi oosit

dan spermatozoa dilakukan selama 14 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 39 °C.

c. Evaluasi Tingkat Kemampuan Fertilisasi *In Vitro*

Tingkat kemampuan fertilisasi *in vitro* dievaluasi berdasarkan pada terbentuknya dua atau lebih pronukleus (PN). Oosit hasil fertilisasi pada masing-masing perlakuan didenudasi (dihilangkan sel kumulusnya), kemudian dibuat preparat dan difiksasi dalam larutan asam asetat dan ethanol absolut (1:3) selama 48 jam, setelah itu dilakukan pewarnaan dengan 2% *aceto orcein*. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop fase kontras (Olympus IX 70, Japan) terhadap jumlah PN yang terbentuk. Oosit yang memiliki dua PN dianggap sebagai oosit yang mengalami fertilisasi normal. Persentase tingkat fertilisasi merupakan perbandingan antara jumlah oosit yang terfertilisasi dengan jumlah keseluruhan oosit yang difertilisasi.

Tingkat Perkembangan Awal Embrio *In Vitro* Menggunakan Spermatozoa *Sexing*

a. Seleksi, Maturasi dan Fertilisasi Oosit *In Vitro*

Proses seleksi, maturasi dan fertilisasi oosit *in vitro* dilakukan seperti prosedur penelitian I.

b. Kultur Embrio *In Vitro*

Oosit hasil fertilisasi didenudasi sebagian kumulusnya kemudian dipindahkan dalam *drop* medium kultur setelah dilakukan pencucian terlebih dahulu. Medium kultur yang digunakan adalah *Modified Synthetic Oviduct Fluid* (mSOF) yang disuplementasi dengan 1% *Minimum Essential Medium* (MEM) (Sigma, M-7145), 2% *Basal Medium Eagle* (BME) (Sigma, B-6766), 50 µg/mL Gentamisin (Sigma-Aldrich, USA) dan BSA 0.3%. Medium kultur dibuat dalam bentuk *drop* (100 µL) dalam *petridish* steril (Nunclon, Denmark) dan ditutup dengan *mineral oil* (Sigma-Aldrich, Inc, M-8410). Kultur dilakukan selama 96 jam dalam inkubator CO₂ 5% suhu 39 °C.

c. Evaluasi Tingkat Perkembangan Awal Embrio *In Vitro*

Pengamatan perkembangan embrio dilakukan pada hari kedua (jam ke-48) dan hari keempat (jam ke-96) kultur dibawah mikroskop stereo (Nikon MSZ800) untuk melihat stadium perkembangan embrio. Pewarnaan *aceto orcein* 2% dilakukan sebagai pembuktian jumlah sel embrio yang terbentuk, kemudian diamati di bawah mikroskop fase kontras (Olympus IX 70, Japan). Persentase tingkat pembelahan embrio merupakan perbandingan antara jumlah oosit yang membelah dengan keseluruhan jumlah oosit yang diduga telah dibuahi.

Analisis Data

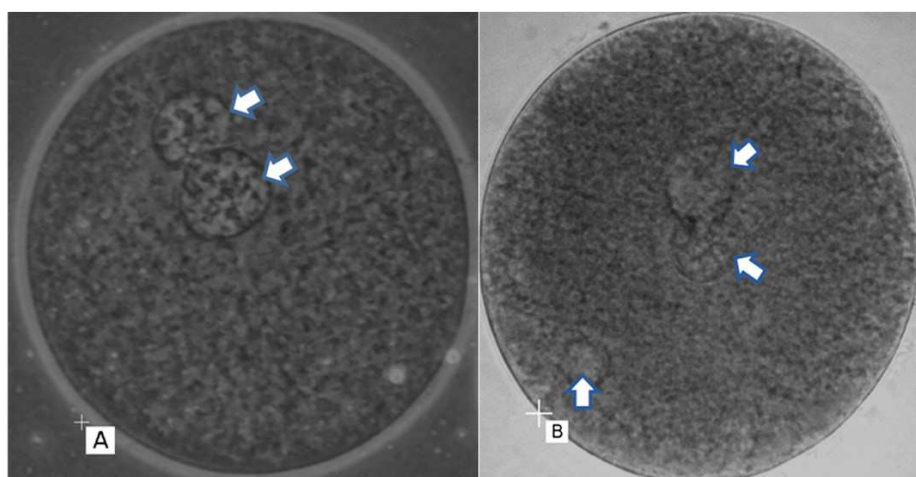
Persentase oosit yang terfertilisasi dan tingkat perkembangan embrio pada setiap hari pengamatan pada ketiga perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf nyata 95%. Perbandingan jumlah embrio yang mampu melewati blokade perkembangan (16-32 sel) pada hari keempat juga dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) pada taraf nyata 95% untuk melihat potensi oosit yang mampu berkembang. Perbedaan pada masing-masing perlakuan kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Data hasil penelitian

secara keseluruhan diolah menggunakan program SPSS versi 15.

Hasil dan Pembahasan

a. Kemampuan Tingkat Fertilisasi *In Vitro*

Kemampuan tingkat fertilisasi dihitung berdasarkan jumlah oosit yang berhasil membentuk dua pronukleus (2PN) atau lebih dari dua pronukleus (>2PN) seperti disajikan pada Gambar 1. Persentase tingkat kemampuan fertilisasi disajikan pada Tabel 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan fertilisasi spermatozoa *sexing* tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) dengan persentase 49.17% (X); 51.40% (Y) dan 53.42% (Kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa *sexing* masih memiliki kemampuan memfertilisasi oosit yang sama dengan spermatozoa *unsexing*. Spermatozoa hasil *sexing* metode gradien BSA (perlakuan X dan Y) diduga mempunyai kemampuan motilitas dan integritas membran yang tetap baik berdasarkan kemampuan fertilisasi oosit. Salah satu faktor yang mendukung keberhasilan fertilisasi dinilai berdasarkan kemampuan motilitas *post thawing* spermatozoa. Kaiin *et al.* (2008) melaporkan bahwa proses *sexing* menggunakan BSA mampu mempertahankan motilitas spermatozoa *sexing post thawing* sebesar 45%.



Gambar 1. Pembentukan pronukleus (PN). Oosit dengan dua pronukleus (2PN) (A); Oosit dengan lebih dari dua pronukleus (>2PN) (B); Tanda panah menunjukkan pronukleus; Perbesaran 200x.

Tabel 1. Tingkat fertilisasi oosit *in vitro* menggunakan spermatozoa *sexing*

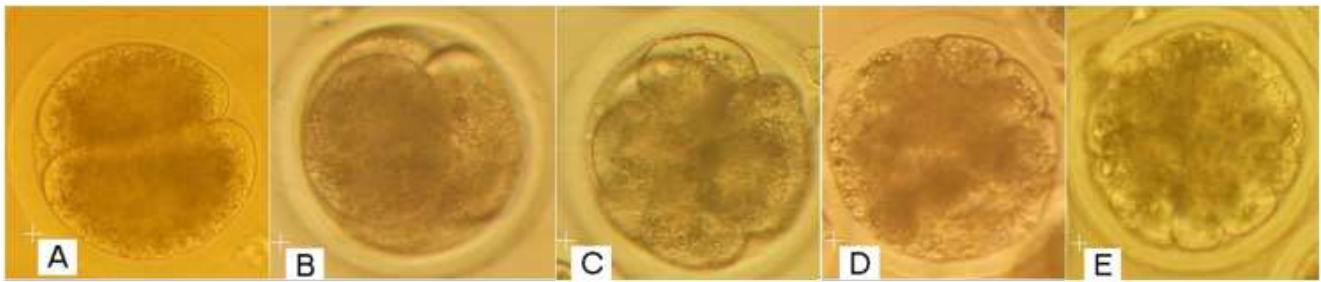
Prk	Jmlh oosit	Total terfertilisasi (% \pm SEM)	Pembentukan pronukleus (% \pm SEM)	
			Normal (2PN)	Polispermia (>2PN)
K	83	53.42 \pm 1.9	52.37 \pm 1.9	1.04 \pm 1.0
X	84	49.17 \pm 1.7	46.46 \pm 1.5	2.70 \pm 1.7
Y	84	51.40 \pm 2.4	48.07 \pm 2.9	3.33 \pm 2.1

Berdasarkan pengamatan pembentukan pronukleus (Tabel 1), tingkat fertilisasi normal yang ditandai dengan terbentuknya 2PN pada spermatozoa *sexing* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$). Hasil penelitian mengindikasikan bahwa spermatozoa *sexing* X dan Y memiliki kemampuan yang sama untuk membuahi oosit. Data ini juga menunjukkan bahwa proses *sexing* dengan gradien BSA tidak mengurangi kemampuan spermatozoa untuk melakukan pembuahan, sehingga dinilai bahwa BSA sebagai medium yang digunakan selama proses *sexing* tidak merusak spermatozoa. Proses *sexing* spermatozoa metode gradien BSA dilakukan menggunakan konsentrasi BSA yang bertingkat, kemudian spermatozoa dibiarkan bergerak menembus gradien tersebut. Mekanisme *sexing* tersebut dinilai lebih sederhana dibandingkan dengan metode lainnya seperti *flow cytometer*. Hal ini dikarenakan spermatozoa tidak terlalu banyak terpapar perlakuan selama proses *sexing* sehingga mampu mempertahankan motilitas dan mengurangi kerusakan morfologi spermatozoa. Dow dan Bavister (1989) melaporkan bahwa paparan spermatozoa pada medium yang mengandung BSA selama lebih dari empat jam dikhawatirkan menyebabkan terjadinya kapasitas dan reaksi akrosom dini. Hal ini karena protein pada serum albumin dapat mengikat kolesterol dan ion zinc pada membran plasma spermatozoa yang menyebabkan kehilangan kolesterol sehingga mengakibatkan membran menjadi tidak stabil dan meningkatkan fluiditas membran (Breitbart 2003).

b. Tingkat Perkembangan Awal Embrio *In Vitro*

Keberhasilan perkembangan embrio secara *in vitro* menggunakan spermatozoa *sexing* X dan Y hasil pemisahan gradien BSA ditentukan berdasarkan persentase embrio yang membelah. Stadium pembelahan embrio mulai dari 2 hingga 32 sel hasil produksi secara *in vitro* disajikan dalam Gambar 2. Persentase tingkat pembelahan dan stadium perkembangan awal embrio selama 96 jam disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan perkembangan dan stadium pembelahan embrio yang diproduksi secara *in vitro* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) dengan persentase 47.77% (X); 48.25% (Y) serta 54.43% (Kontrol). Hasil penelitian ini didukung oleh laporan Underwood *et al.* (2010a) bahwa proses *sexing* spermatozoa secara umum tidak menyebabkan terjadinya penurunan perkembangan embrio. Kemampuan perkembangan embrio tersebut mengindikasikan bahwa spermatozoa *sexing* yang digunakan mempunyai daya fertilisasi yang baik.

Keberhasilan perkembangan oosit yang telah difertilisasi ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk membelah dan melanjutkan perkembangan. Inisiasi perkembangan awal embrio didukung oleh ketersediaan mRNA dan aktivitas transkripsi oleh maternal sebelum aktivasi genom dimulai. Graf *et al.* (2014b) menyatakan bahwa aktivasi genom pada embrio sapi dimulai pada stadium pembelahan 8 hingga 16 sel. Sintesis protein baru sebagai penanda dimulainya aktivasi genom pada embrio sapi mulai terjadi pada stadium pembelahan 4 hingga 8 sel.



Gambar 2. Embrio sapi tahap 2-32 sel yang diproduksi secara in vitro; tahap pembelahan 2 sel (A); 4 sel (B); 8 sel (C); 16 sel (D) dan 32 sel (E); perbesaran 200x.

Tabel 2. Tingkat pembelahan dan perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi pada hari kedua kultur in vitro

Prk	Jmlh embrio	Tingkat pembelahan (rata-rata% ±SEM)	Perkembangan awal embrio n (% ± SEM)		
			Pengamatan hari kedua		
			2 sel	4 sel	8 sel
K	86	47(54.43 ± 2.3)	16(36.30±12.5)	24(49.10 ±6.7)	7(14.58 ±8.1)
X	88	42(47.77 ± 1.6)	17(37.18 ±5.3)	22(54.76 ±6.1)	3(8.05 ±4.0)
Y	87	41(48.25 ± 2.8)	14(32.60 ±10.1)	20(49.36 ±8.6)	7(18.03±6.7)

Tabel 3. Tingkat perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi dan pewarnaan pada hari keempat kultur in vitro

Prk	Perkembangan awal embrio n (% ± SEM)				
	Pengamatan hari keempat				
	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel	32 sel
K	2(4.76 ±4.7)	17(38.39 ±7.8)	17(33.23 ±8.8)	8(17.36 ±6.8)	3(6.25±2.9)
X	2(6.11 ±3.8)	18(37.22 ±10.2)	14(32.85 ±8.7)	8(23.80 ±11.0)	0(0.00 ±0.0)
Y	0(0.00 ±0.0)	16(35.77 ±12.0)	15(38.14 ±11.5)	9(22.75 ±3.6)	1(3.33 ±3.3)

Transisi dari maternal ke embrio ditandai dengan aktifnya transkripsi oleh genom embrio karena mRNA maternal dan protein yang tersimpan pada oosit mengalami degradasi (Graf *et al.* 2014a). Apabila terjadi kegagalan proses tersebut maka menyebabkan hambatan ekspresi gen sehingga embrio tidak mampu mengalami pembelahan lebih lanjut. Selama masa transisi tersebut, nukleus memprogram aktivasi proses transkripsi oleh genom embrio yang sebelumnya mengalami inaktivasi. Keberhasilan aktivasi genom ditandai dengan kemampuan

embrio melakukan transkripsi mRNA serta tidak lagi bergantung pada *maternal* genom (Graf *et al.* 2014a). Mengacu pada uraian diatas, hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase embrio yang mampu melewati blokade perkembangan (stadium pembelahan 16 hingga 32 sel) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0.05$) (Tabel 4) pada ketiga perlakuan. Data tersebut menunjukkan hanya sekitar 23-26% embrio yang mampu melewati blokade perkembangan dari keseluruhan embrio yang berhasil membelah sehingga diharapkan mampu berkembang ke tahap blastosis.

Tabel 4. Rekapitulasi persentase embrio yang berhasil melewati blokade perkembangan

Prk	Tingkat pembelahan embrio 8 s/d 32 sel (% ± SEM)
K	23.61 ± 9.2
X	23.80 ± 11.0
Y	26.08 ± 4.5

Keterangan:

Prk : Perlakuan

K : Kontrol (Spermatozoa unsexing)

X : Spermatozoa sexing X

Y : Spermatozoa sexing Y

Rendahnya angka perkembangan embrio yang diperoleh disebabkan oleh beberapa faktor antara lain kualitas oosit (Lonergan dan Fair 2008) serta sistem kultur yang digunakan (Nedambale *et al.* 2006; Underwood *et al.* 2010b; Setiadi dan Karja 2013). Lebih lanjut, Meirelles *et al.* (2004) melaporkan bahwa rata-rata laboratorium kehilangan 60-70% kemampuan oosit yang berhasil difertilisasi untuk berkembang menjadi embrio. Hal ini karena oosit yang digunakan untuk produksi embrio secara *in vitro* dikoleksi dari ovarium yang pada umumnya berasal dari individu yang berbeda, sehingga terjadi variasi kemampuan untuk berkembang menjadi embrio lebih lanjut. Oleh karena itu diperlukan kemampuan teknik pemilihan oosit yang lebih cermat sehingga mampu menghasilkan embrio dengan kualitas baik supaya mampu melakukan aktivasi genom untuk mendukung perkembangan dan kelangsungan hidupnya (Meirelles *et al.* 2004).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa spermatozoa *sexing* metode gradien BSA mempunyai kemampuan fertilisasi dan mendukung perkembangan embrio yang sama dengan spermatozoa *unsexing*. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi ketepatan jenis kelamin embrio yang diproduksi secara *in vitro* menggunakan spermatozoa *sexing* X dan Y.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan Terima Kasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan Beasiswa Program *Fresh Graduate* Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPP-DN) Tahun 2014 serta kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah memberikan dukungan dana penelitian pada Program Beasiswa Pendidikan Tesis dan Disertasi Periode II Tahun 2016.

Daftar Pustaka

- Afiati F. (2004). Proporsi dan karakteristik spermatozoa X dan Y hasil separasi kolom albumin. *Media petern* 27(1):16-20.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, M., Crawford, L., Madan, P and King, W.A.. (2009). Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71:30-38.
- Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol* . 49(3):1-7.
- Dow MP, Bavister BD. 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Res.* 23:171-180.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H. and Wolf, E. (2014a). Genom activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiment. *Anim Reprod Sci* 149:46-58.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H. and Wolf, E. (2014b). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Dev Biol* 111 (11): 4139-4144.
- Grant, V.J. and Chamley, L.W. (2007). Sex sorted sperm and fertility: An alternative view. *Biol reprod* 76:184-188.
- Jo, H.T., Bang, J.I., Kim, S.S., Choi, B.H., Jin, J.I., Kim, H.L., Jung, I.S., Suh, T.K., Ghanem, N., Wang, Z. and Kong, I.K. (2014). Production

of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and *in vitro* developmental competence. *Theriogenology* 81:675-682.

- Kaiin, E.M., Said, S. dan Tappa, B. (2008). Kelahiran anak sapi hasil fertilisasi secara *in vitro* dengan sperma hasil pemisahan. *Media Petern* 31(1):22-28.
- Lonergan, P. and Fair, T. (2008). *In vitro* produced bovine embryos- Dealing with the warts. *Theriogenology* 69:17-22.
- Lopez, S.R., Souza, J.Cd., Gonzalez, J.Z., Sanchez, A.D.O., Aguirregomezorta, J.R., Carvalho, R.R.de. and Rath, D. (2013). Use of sex sorted and unsorted frozen/thawed sperm and *in vitro* fertilization events in bovine oocytes derived from ultrasound-guided aspiration. *J R Bras Zootec* 42(10):721-727.
- Machado, G.M., Carvalho, J.O., Filho, E.S., Caixeta, E.S., Franco, M.M., Rumpf, R. and Dode, M.A.N. (2009). Effect of percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71:1289-1297.
- Mari, G., Catagnetti, C., Rizzato, G., Mislei, B., Lacono, E and Merio, B. (2011). Density gradient centrifugation of sperm from subfertile stallion and effect on seminal plasma addition on fertility. *Anim Reprod Sci* 126: 96-100.
- Meirelles, F.V., Caetano, A.R., Watanabe, Y.F., Ripamonte, P., Carambula, S.F., Merighe, G.K. and Garcia, S.M. (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 82-83:13-20.
- Morotti, F., Sanches, B.V., Pontes, J.H.F., Basso, A.C., Siqueira, E.R. and Lisboa, L.A. (2014). Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus* and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81: 696:701.
- Muttaqin, Z., Karja, N.W.K. dan Setiadi, M.A. (2015). Kemampuan maturasi dan fertilisasi oosit sapi yang diseleksi menggunakan teknik pewarnaan *Brilliant Cresyl Blue*. *J Veteriner* 16(2):242-248.
- Nedambale, T.L., Du, F., Yang, X. and Tian, X.C. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Anim Reprod Sci* 93:61-75.
- Pellegrino, C.A.G., Morotti, F., Untura, R.M., Pontes, J.H.F., Pellegrino, M.F.O., Campolina, J.P., Seneda, M.M., Barsosa, F.A. and Henry, M. (2016). Use of sexed sorted semen for fixed time artificial insemination or fixed time embryo transfer of *in vitro* produced embryos in cattle. *Theriogenology* xxx: 1-6.
- Setiadi, M.A. dan Karja, N.W.K. (2013). Tingkat perkembangan awal embrio sapi *in vitro* menggunakan media tunggal berbasal dasar tissue culture medium (TCM) 1999. *J Ked Hewan* 7(2):150-154.
- Sureka, P., Nilani, K., Eswaramohan, T. and Balasubramaniam, K. (2013). Sex pre-selection by quantification of Y chromosome bearing spermatozoa in goat species. *International Journal of Scientific and Research Publications* 3(1):1-4.
- Suzuki, K., Eriksson B., Shimizu H., Nagai T. and Rodriguez-Martinez H (2000). Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int J Androl* 23: 13-21.
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (2010a). Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen thawed, sex sorted, refrozen thawed bull sperm. *Anim Reprod Sci* 118:171-175.
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Pereira, D.C., Castro, A., Thomson, P.C., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (2010b). Embryos production after *in vitro* fertilization with frozen thawed, sex sorted, re frozen thawed bull sperm. *Theriogenology* 73:97-102.
- Villamil, P.R., Wei, H., Moreira, G., Caccia, M., Taranco, M.F. and Bo, G.A. (2012). Fertilization rate and *in vitro* embryo production using sexed or non sexed semen selected with silane-coated silica colloid or percoll. *Theriogenology* 78:165-171.
- Yan, J., Feng, H.L., Chen, Z.J., Jingmei, H., Xuan, G. and Yingying, Q. (2006). Influence of swim-up on the ratio of X and Y bearing spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 129: 150-154.