

## Pengaruh ukuran *Laser Assisted Hatching* terhadap viabilitas blastokista awal mencit (*Mus musculus*) pasca vitrifikasi sebagai upaya konservasi satwa langka

The effect of Laser Assisted Hatching size on mice's (*Mus musculus*) of early blastocyst viability post vitrification as a rare endangered conservation effort

MUHAMMAD GUNAWAN<sup>1,✉</sup>, EKAYANTI MULYAWATI KAIIN<sup>1</sup>, DWI SEPTY ANDINI<sup>2,✉</sup>, CLARISSA MIRAFRADITYA PUSPA ANGGRAIN<sup>2</sup>, RIMA HAIFA<sup>2</sup>, ZAHRA WIDYAWATI<sup>2</sup>, SETIORINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel./Fax. +62- 21-8754587/8754588, ✉email: muhammadgunawan@ymail.com

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Kampus UI Depok, Depok 16424, Jawa Barat, ✉email: septyandini1408@gmail.com

Manuskrip diterima: 11 Agustus 2016. Revisi disetujui: 27 September 2017.

**Abstrak.** Gunawan M, Kaiin EM, Andini DS, Anggraini CMP, Haifa R, Widyawati Z, Setiorini. 2017. Pengaruh ukuran Laser Assisted Hatching terhadap viabilitas blastokista awal mencit (*Mus musculus*) pasca vitrifikasi sebagai upaya konservasi satwa langka. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 3*: 376-380. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa ukuran penipisan zona pelusida dengan Laser Assisted Hatching dapat memengaruhi viabilitas kultur embrio pascavitrifikasi. Embrio uji yang digunakan dalam penelitian yaitu embrio blastokista awal pascavitrifikasi yang dibagi menjadi lima perlakuan (KK 1, KK 2, KP1, KP2, dan KP3) dengan lima kali ulangan. KK 1 merupakan kelompok kontrol normal yang divitrifikasi tanpa penipisan zona pelusida dan dikultur selama 72 jam, KK 2 merupakan kelompok kontrol perlakuan tanpa vitrifikasi dengan penipisan 1/2 zona pelusida dan dikultur selama 72 jam, KP1, KP2, dan KP3 merupakan kelompok perlakuan blastokista awal yang divitrifikasi dan diberikan perlakuan penipisan zona pelusida masing-masing dengan ukuran 1/4 dari keliling zona pelusida, 1/2 keliling zona pelusida dan 2/3 keliling zona pelusida secara berurutan. Berdasarkan hasil penelitian persentase viabilitas embrio setelah kultur 72 jam pada KK 1, KK 2, KP1, KP2, dan KP3 secara berturut-turut yaitu 68,33%; 80,00%; 66,67%; 78,33%; 65,00. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ukuran penipisan 1/2 keliling zona pelusida (KP2) merupakan ukuran yang paling efektif untuk membantu meningkatkan viabilitas blastokista awal karena ukuran tersebut mendekati perkembangan embrio pada KK 2.

**Kata kunci:** Blastokista awal, *Laser Assisted Hatching*, penipisan zona pelusida, vitrifikasi

**Abstrak.** Gunawan M, Kaiin EM, Andini DS, Anggraini CMP, Haifa R, Widyawati Z, Setiorini. 2017. The effect of Laser Assisted Hatching size on mice's (*Mus musculus*) of early blastocyst viability post vitrification as a rare endangered conservation effort. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 3*: 376-380. The aim of this study was to find out that the zona thinning of embryo with Laser Assisted Hatching can assist in the viability of embryo culture post vitrification. The embryo test used in the study was early blastocyst post vitrification divided into five treatments (KK 1, KK 2, KP1, KP2, and KP3) with five replications. KK 1 is a normal control group that is vitrified without thinning of the zona pellucida and cultured for 72 hours, KK 2 is a treatment control group without vitrification with zona thinning of 1/2 zona pellucida and cultured for 72 hours, KP1, KP2, and KP3 are blastocyst treatment groups a vitrified and thinning of pellucid zone treatment of each 1/4 of the of the pellucid zone, 1/2 of the pellucid zone and 2/3 of the pellucid zone in succession. Based on the results of the research, the percentage of viability KK 1, KK 2, KP1, KP2, and KP3 are respectively 68.33%; 80.00%; 66.67%; 78.33%; 65.00. The results of this study indicate that the thinning 1/2 of the zona pellucida (KP2) is the most effective measure to help improve the development of early blastocyst culture and viability as it approximates embryonic development in KK 2.

**Keyword:** Early blastocyst, laser assisted hatching, thinning zona pellucida, vitrification

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati kedua tertinggi di dunia setelah Brazil. Sejumlah besar spesies hewan dan tumbuhan di dunia ditemukan di Indonesia. Spesies tersebut tersebar di 17.000an pulau yang dimiliki Indonesia. Spesies mamalia jumlahnya mencapai 515 spesies, namun saat ini

populasinya di Indonesia mengalami kepunahan hingga 20% (Rainforest Action Network 2016). Salah satu upaya yang tepat untuk mengatasi kepunahan tersebut ialah Teknologi Reproduksi Berbantuan (*Assisted Reproduction Technology*) (Madiah et al. 2006).

Teknologi reproduksi berbantuan dapat mengatasi masalah reproduksi makhluk hidup di antaranya, untuk mengatasi infertilitas pada mamalia dan memaksimalkan

proses peningkatan mutu produksi hewan (Madihah et al. 2006). Teknologi yang biasa digunakan meliputi manipulasi embrio, pembekuan embrio, dan transfer embrio. Salah satu cara yang tepat untuk mengatasi kepunahan populasi mamalia ialah dengan penyimpanan embrio (kriopreservasi embrio) (Simione 2009).

Teknik kriopreservasi embrio, adalah teknik penyimpanan embrio pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Prinsip teknik tersebut, adalah mencegah kerusakan sel dengan cara memperlambat aktivitas metabolisme dalam sel pada suhu rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Batuhan et al. 2010). Metode tersebut dapat dibagi menjadi kriopreservasi konvensional (pembekuan secara lambat) dan vitrifikasi (pembekuan secara cepat). Krioprotektan adalah zat kimia yang dibutuhkan pada proses kriopreservasi embrio untuk mencegah terbentuknya kristal es dan melindungi sel selama proses pembekuan sehingga viabilitas dan perkembangan embrio tetap terpelihara (Amorim et al. 2011). Krioprotektan intraseluler adalah etilen glikol (EG) dan dimetil sulfoksida (DMSO) (Kasai et al. 2002). Selain itu krioprotektan ekstraseluler adalah protein, polimer, dan sukrosa (Rizal 2002). Oleh karena itu, pada penelitian ini menggunakan kombinasi EG dan DMSO sebagai krioprotektan intraseluler dan sukrosa sebagai krioprotektan ekstraseluler.

Upaya pelestarian spesies dengan teknik vitrifikasi embrio telah berkembang dengan pesat, namun masih terdapat beberapa kendala, antara lain penurunan viabilitas embrio dan pengerasan zona pelusida (Chi 2002). Zona pelusida akan mengalami pengerasan akibat proses vitrifikasi pada suhu rendah. Hal ini akan menghambat proses *hatching* pada embrio sehingga pertumbuhan embrio kurang optimal (Hsieh et al. 2002). Oleh karena itu perlu dilakukan teknik dalam mengatasi masalah pengerasan zona pelusida embrio pascavitrifikasi.

Manipulasi zona pelusida dilakukan dengan beberapa metode misalnya dengan penipisan zona pelusida. Wang et al. (2016) menyatakan bahwa teknik penipisan zona pelusida lebih mudah dilakukan dan tidak menimbulkan resiko besar. Teknik penipisan zona pelusida dilakukan dengan tiga cara yaitu secara mekanik, kimia, dan laser. Teknik penipisan zona pelusida menggunakan laser lebih aman dibandingkan teknik lainnya (Wang et al. 2016).

*Laser Assisted Hatching* (LAH) adalah teknik penembakan zona pelusida dengan menggunakan sinar *infrared*. Teknik tersebut telah diterapkan pada embrio mencit (Lee et al. 2015) dan embrio manusia (Wang et al. 2016). Viabilitas dapat diketahui dengan melakukan kultur embrio. Kultur embrio dilakukan dengan menggunakan medium yang sesuai, agar embrio dapat tumbuh dan berkembang dengan baik (Widjiati et al. 2012). Medium kultur yang digunakan adalah medium CZB (Chatot Ziomek Bavister).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi ukuran penipisan zona pelusida menggunakan laser 1/4 dari keliling zona pelusida, 1/2 dari keliling zona pelusida dan 2/3 dari keliling zona pelusida terhadap viabilitas dan proses viabilitas pada embrio pascavitrifikasi.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Salemba, Jakarta. Semua percobaan dengan mencit dilakukan sesuai dengan standar *International Conference on Harmonization Good Clinical Practice* (ICH-GCP).

### Metode penelitian

#### *Pemeliharaan hewan uji*

Mencit dewasa (*Mus musculus* L.) galur DDY dipelihara dalam bak kandang plastik. Bak kandang plastik tersebut berisi serbuk kayu yang berfungsi sebagai alas untuk menyerap kotoran. Mencit diberi makanan dan minuman secara *ad libitum* (tanpa batas). Berat mencit untuk perlakuan dipelihara hingga mencapai kurang lebih 35-50 gram. Kandang-kandang plastik yang berisi mencit ditempatkan di dalam rumah hewan dan diterangi lampu *tube lamp* dengan siklus terang selama 12 jam (pukul 08.00-20.00 WIB) dan siklus gelap 12 jam (pukul 20.00-08.00 WIB) setiap hari. Sirkulasi udara dibantu dengan menggunakan *exhaust fan*.

#### *Superovulasi*

Mencit betina galur DDY berumur 10-15 minggu disuperovulasi dengan penyuntikan hormon PMSG (Folligon) dengan dosis 5 IU/0,1 mL, 48 jam kemudian mencit tersebut disuntik dengan hormon hCG (Chorulon) dengan dosis 5 IU/0,1 mL secara intraperitoneal. Kemudian, mencit dikawinkan secara alami dengan mencampurkan mencit jantan galur DDY dalam satu kandang dengan perbandingan kawin 1:1. Tanda terjadinya perkawinan dilakukan dengan pemeriksaan *vaginal plug* pada pagi hari berikutnya.

#### *Koleksi embrio*

Pengambilan embrio uji dilakukan dengan cara pembedahan bagian abdomen (perut) mencit betina yang bunting hari ke 4 untuk mendapatkan embrio tahapan blastokista awal. Mencit betina yang telah dibius sebelumnya, dibedah kemudian dilakukan isolasi bagian uterusnya untuk dilakukan *flushing* uterus. *Flushing* uterus dilakukan dengan menggunakan medium CZB (Chatot Ziomek Bavister) Hepes.

#### *Vitrifikasi*

Vitrifikasi dilakukan dengan sistem *Closed Pulled Straw* menggunakan krioprotektan etilen glikol (EG) dan dimetil sulfoksida (DMSO) dengan konsentrasi 15%, serta sukrosa sebanyak 0,5 M. Vitrifikasi dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu tahapan adaptasi dengan cara menempatkan embrio dalam medium CZB + HEPES selama 5-10 menit. Selanjutnya embrio dipaparkan ke dalam medium ekuilibrasi (medium CZB Hepes + serum 20% + 10% EG + 10% DMSO) selama 3 menit, lalu embrio dipindahkan ke dalam medium vitrifikasi yaitu mCZB Hepes + serum 20% + 0,5 M sukrosa + 15% EG + 15% DMSO). Selanjutnya embrio akan dikemas didalam

*straw* ukuran 0,25 mL dengan bantuan *syringe* 2,5 mL dan disimpan dalam nitrogen cair selama 24 jam.

#### Thawing

*Thawing* (pencairan embrio) dilakukan dengan mencelupkan *straw* berisi embrio ke dalam *water bath* dengan suhu 37°C selama 30 detik, kemudian dikeringkan dan diketuk-ketuk agar medium didalam *straw* tercampur. Selanjutnya *straw* dibuka diatas kaca arloji yang berisi medium CZB. Kemudian embrio dipindahkan ke dalam medium mCZB Hepes yang ditempatkan pada kaca arloji. Embrio diamati di bawah mikroskop stereo dan selanjutnya dipindahkan ke dalam medium adaptasi (mCZB + 5% BSA) dalam bentuk spot 30 µL untuk 5-10 embrio.

#### Laser Assisted Hatching

Perlakuan *laser* dilakukan pada satu per satu embrio dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Observer. A1, Zeiss) dengan perbesaran lensa 25L melalui komputer program spesialisasi OCTAX Eyeware (2.0.0.128). Pengaturan penipisan ketebalan dan keliling zona pelusida diatur dalam komputer program spesialisasi dengan penipisan 60-80% dari keliling zona pelusida. Kontrol normal (KK1) merupakan embrio blastokista awal setelah vitrifikasi kemudian di kultur. Kontrol perlakuan (KK2) merupakan embrio blastokista awal tanpa vitrifikasi dan dilakukan penipisan dengan ukuran 1/2 keliling zona pelusida. Perlakuan *Laser Assisted Hatching* merupakan embrio blastokista awal setelah vitrifikasi kemudian dilakukan penipisan zona pelusida sesuai dengan arah jarum jam. Arah jarum 12.00-03.00 untuk ukuran penipisan 1/4 keliling zona pelusida (KP1), arah jarum jam 12.00-06.00 untuk ukuran penipisan 1/2 keliling zona pelusida (KP2) dan arah 12.00-07.00 untuk ukuran 2/3 keliling zona pelusida (KP3).

#### Kultur in vitro embrio

Embrio dipindahkan kembali ke medium adaptasi (mCZB Hepes + 10% BSA) dan selanjutnya dipindahkan

kedalam medium CZB kultur dalam bentuk spot 50 µL untuk 5-10 embrio. Embrio dikultur dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub> dengan suhu 37,5°C. Setelah itu, dilakukan pewarnaan dengan pewarna Hoechst/PI untuk melihat morfologi normal dan degenerasi.

#### Analisis data

Data dianalisis secara statistik menggunakan program komputer *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 16.00. Data diuji normalitasnya dengan uji Saphiro-Wilk dan diuji homogenitasnya dengan uji Levene. Data yang normal dan homogen tersebut kemudian diuji dengan uji parametrik analisis variansi (ANAVA). Data selanjutnya diuji dengan uji perbandingan berganda *Least Significance Difference* (LSD).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Hasil

Persentase viabilitas embrio 72 jam pada kelompok perlakuan KK1, KK2, KP1, KP2, dan KP3 secara berturut-turut yaitu 68,33%; 80,00%; 66,67%; 78,33%; 65,00% (Table 1). Gambar 1 menunjukkan embrio yang terbentuk.

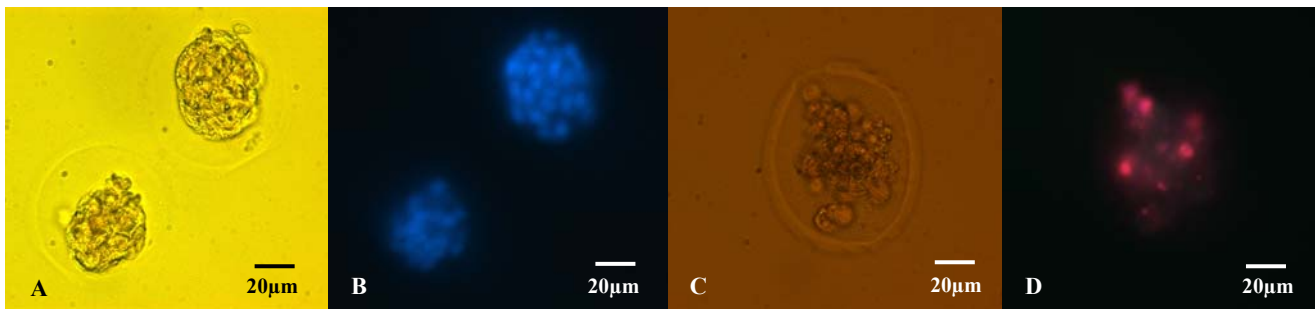
#### Pembahasan

Persentase viabilitas embrio mencit setelah kultur 72 jam yang diperoleh masing-masing kelompok secara deskriptif cukup beragam (Tabel 1). Hasil yang beragam kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya vitrifikasi dan ukuran penipisan zona pelusida (Wang et al. 2016). Hasil statistik menunjukkan bahwa viabilitas embrio bersifat normal dan homogen, sehingga keberagaman viabilitas yang diperoleh tidak signifikan secara statistik. Hasil rerata viabilitas embrio setelah kultur 72 jam berdasarkan uji ANAVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada setiap kelompok perlakuan.

**Tabel 1.** Persentase viabilitas embrio hasil kultur 72 jam

Ulangan	Jumlah embrio	KK 1		KK 2		Perlakuan KP1		KP2		KP3	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	50	6	60	8	80	6	60	9	90	8	80
2	50	7	70	8	80	6	60	8	80	6	60
3	50	6	60	8	80	7	70	7	70	7	70
4	50	7	70	7	70	8	80	8	80	7	70
5	50	7	70	8	80	6	60	8	80	5	50
6	50	8	80	9	90	7	70	7	70	6	60
	Rata-rata		68,33 <sup>a</sup>		80,00 <sup>b</sup>		66,67 <sup>a</sup>		78,33 <sup>ab</sup>		65,00 <sup>a</sup>
	SD		7,53		6,32		8,16		7,53		10,49

Keterangan: <sup>a, b, c</sup> Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0.05) dengan uji ANAVA



**Gambar 1.** Embrio dengan morfologi normal dan degenerasi melalui pewarnaan Hoechst/PI. Keterangan: A. Blastokista awal morfologi normal, B. Blastokista awal normal hasil pewarnaan, C. Blastokista awal degenerasi, D. Blastokista awal degenerasi hasil pewarnaan

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan nyata antar kelompok. Hasil persentase terbesar terdapat pada kelompok perlakuan 2 (KP2) yaitu kelompok embrio pascavitrifikasi dengan LAH penipisan 1/2 keliling zona pelusida sebesar 78,33% dan hasil terkecil terdapat pada kelompok perlakuan 3 (KP3) yaitu kelompok embrio pascavitrifikasi dengan LAH penipisan 2/3 keliling zona pelusida sebesar 65%. Hal tersebut disebabkan oleh perlakuan vitrifikasi pada embrio sehingga embrio mengalami pengerasan zona pelusida dan mengganggu perkembangan embrio serta menyebabkan viabilitas embrio menurun. Pengerasan ini diakibatkan adanya pendinginan pada tahapan vitrifikasi yang dapat menghambat metabolisme embrio hingga mengalami kematian (Boediono et al 2005; Lee et al. 2015). Namun dengan adanya teknologi penipisan zona pelusida dapat membantu meningkatkan viabilitas embrio. Teknologi mikromanipulasi embrio dengan laser (LAH) dapat dilakukan dengan penipisan (Rink 1996). Pada penelitian ini ukuran penipisan dapat memengaruhi keadaan embrio pascavitrifikasi. Kelompok perlakuan 2 (KP2) adalah perlakuan LAH yang paling efektif, karena penipisan dilakukan di area alami *hatching* sehingga embrio dapat melakukan *hatching* secara sempurna (Sung et al 2014; Hammadeh et al 2011). Sebaliknya embrio yang mengalami penipisan 1/4 dan 2/3 mengalami pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan 1/2. Hal tersebut dikarenakan pada penipisan 1/4 embrio masih terhalang oleh zona pelusida yang mengeras, sehingga perkembangan terjadi tidak sempurna. Sedangkan penipisan 2/3 dianggap dapat merusak embrio karena blastosol yang ada didalam embrio akan terkena radiasi akibat dari paparan laser (Popula 2004). Zona pelusida sendiri juga memiliki fungsi yang penting bagi embrio selama masa perkembangannya yaitu untuk melindungi embrio secara mekanik dan sebagai perantara transportasi zat selama perjalanannya di dalam uterus pada proses in vivo dan di dalam medium pada proses in vivo (Sadler 2012).

Pewarnaan embrio dilakukan untuk dapat melihat ciri-ciri morfologi embrio yang normal dan degenerasi. Pewarnaan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan pewarna Hoechst dan PI (Propidium-Iodida). Penggunaan pewarna tersebut untuk mewarnai embrio setelah kultur 72 jam. Pewarna Hoechst mudah berikatan

dengan inti blastomer dibandingkan dengan pewarna lain. Hal ini dikarenakan pewarna Hoechst memiliki permeabilitas yang tinggi terhadap sel sehingga mudah masuk ke dalam inti blastomer (Hawes et al. 2000). Pewarna hoechst akan memendarkan cahaya warna biru pada mikroskop fluorescense dengan panjang gelombang cahaya 330-380 nm (Joung et al. 2012).

Embrio yang hidup akan menunjukkan fluoresensi yang maksimal yang disebabkan oleh ikatan senyawa pewarna tersebut dengan daerah pada rantai DNA blastomer yang banyak mengandung pasangan basa A-T (Hawes et al. 2000). Pewarna PI juga digunakan untuk melihat embrio dengan morfologi embrio degenerasi. Pewarna PI berfungsi untuk mewarnai embrio yang mati dengan memendarkan warna merah. Embrio yang mengalami kematian akan mengalami kerusakan, yaitu ditandai dengan berkurangnya kemampuan permeabilitas embrio (Triwulanningsih et al. 2002). Hal ini menyebabkan pewarna Hoechst tidak dapat berpenetrasi dengan inti blastomer, sebaliknya pewarna PI akan mudah terserap ke dalam membran blastomer dan kemudian memendarkan warna merah pada mikroskop fluoresense yang diamati. Pewarna ini yang menjadi indikator bahwa embrio mengalami degenerasi atau kematian blastomer (Triwulanningsih et al. 2002).

Dpat disimpulkan bahwa variasi ukuran penipisan zona pelusida menggunakan 1/4 dari keliling zona pelusida, 1/2 dari keliling zona pelusida, dan 2/3 dari keliling zona pelusida berpengaruh terhadap viabilitas blastokista awal pascavitrifikasi; dengan ukuran yang paling efektif yaitu penipisan 1/2 dari keliling zona pelusida.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amorim CA, Curaba M, Langendonck AV, Dolmans M, Donnez J. 2011. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarians tissue. *Reprod BioMed Online* 23: 160-186.
- Batuhan O, Hassani A, Saffa. 2010. Techniques for ovarian tissue, whole ovary, oocyte, and embryo cryopreservation. *J Reprod Infert* 11: 3-15.
- Boediono A. 2005. Vitrifikasi vs pendinginan lambat pada pembekuan embrio. Kongres I PATRI, Denpasar, 3-4 Oktober.
- Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS. 2002. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Human Reprod* 17: 2146-2151.
- Hammadeh MI, Hammadeh CF, Ali KR. 2011. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. University of Saarland. *J Assist Reprod Genet* 28: 119-128.

- Hawes SM, Latham KE. 2000. Effect of paternal genotype on embryo fragmentation at the 2 cell stage of mouse embryogenesis. *Theriogenology* 4: 45-54.
- Hsieh Y. 2002. Laser assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in woman with advanced age. *Fertil Steril* 78: 179-182.
- Joung J, Park, Yun H, Hye C, Choon P, Booh Y. 2012. Cryopreservation of embryo by concentration of ethylene glycol and day 6,7,8,9, embryo in Korea Native Cattle (Hanwo). *J Embryo Transf* 27: 253-258.
- Kasai M, Ito, Edashige K. 2002. Morphological appearance of cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of crioinjury. *Human Reproduction* 17: 1863-1874.
- Lee YS, Park MJ, Park SH, Koo JS, Moon HS, Joo BS. 2015. Effect of laser-assisted hatching multi-point zona thinning on development and hatching of cleavage embryos in mice. *Clin Exp Reprod Med* 42: 51-57.
- Madihah, Kusumaningtyas H, Boediono A, Sumarsono SH. 2006. The quality, implantation rate and in-vivo viability of the swiss webster mouse (*Mus musculus albinus*) embryo after vitrification. *Biota* 11: 72-79. [Indonesian]
- Popula RD, Vijayalaxmi C, Charulata, Rajyalakshmi. 2004. Laser assisted hatching a treatment of choice for poor prognosis in in vitro fertilization women. *International Congress Series* 1271: 151-154.
- Rainforest Action Network. 2016. Indonesia's Rainforests: Biodiversity and Endangered Species. [http://www.ran.org/indonesia\\_s\\_rainforests\\_biodiversity\\_and\\_endangered\\_species](http://www.ran.org/indonesia_s_rainforests_biodiversity_and_endangered_species).
- Rink K. 1996. Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida using a 1,48  $\mu\text{m}$  diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 64: 604-611.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2002. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 7: 194-199. [Indonesian]
- Sadler TW. 2012. *Langman's Medical Embriology* Langman's Medical Embriology. Williams & Wilkins, Maryland.
- Simione FP. 2009. Thermo scientific nalgene and nunc cryopreservation guide. Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham.
- Sung BP, Kim JH, Young BC, Hwa KA, Hwan KL, Bo JY, Seok CY, Boo BS. 2014. The effect of various assisted hatching techniques on the mouse early embryo development. *Clin Exp Reprod Med* 41: 68-74.
- Triwulanningsih E, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Diwyanto K, Rutledge JJ. 2002. Seleksi dan kapasitas spermatozoa dengan metode percoll gradient vkyuk fertilisasi oosit dan produk embrio in vitro pada sapi. *Berita Biologi* 6: 423-430. [Indonesian]
- Wang, Hua E, Wang A, Wang B, Li B. 2016. Outcomes of vitrified-warmed cleavage-stage embryo hatching after *in vitro* laser-assisted zona pellucida thinning in patients. *Biomed Rep* 5: 376-382.
- Widjiati, Pusporini SE, Arifin MZ. 2012. Perbandingan angka fertilitas dan hambatan perkembangan embrio mencit yang dikultur dalam medium M16 dan *Human Tubal Fluid*. *Jurnal Veteriner* 13: 227-234.