

Pengaruh Hormon E-17 β dan/atau FSH serta Lama Penyimpanan Ovarium terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi *In Vitro* Oosit Domba

Ranny Meriyana¹, Sutarman Mihardja¹, dan Baharuddin Tappa²

¹Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hormon Estradiol-17 β dan/atau *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yang ditambahkan ke dalam media penyimpanan ovarium dan lama penyimpanan terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba. Ovarium diambil dari RPH kemudian dimasukkan dalam media PBS yang ditambahkan hormon E-17 β , FSH, dan E-17 β +FSH kemudian disimpan masing-masing 4, 8, dan 12 jam pada temperatur 37°C sebelum oosit dalam folikel diaspirasi. Oosit diaspirasi dari folikel ovarium dengan jarum 18 G menggunakan media TCM-199+10% FCS dan dicuci tiga kali. Selanjutnya dimaturasi dalam media TCM-199+10% FCS+E-17 β +FSH+HCG (masing-masing 1 μ g/ml) selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38°C. Setelah maturasi, oosit diamati tingkat maturasinya yang ditandai dengan adanya polar body pertama. Tingkat fertilisasi diamati 24 jam setelah diinseminasi yang ditunjukkan dengan adanya pembelahan atau adanya polar body kedua. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat maturasi pada media yang mengandung hormon FSH lebih tinggi (53,75%) dibandingkan dengan media yang mengandung hormon E-17 β dan E-17 β +FSH (39,28 dan 36,38%). Sedangkan penyimpanan selama 12 jam berbeda nyata ($p < 0,05$) lebih rendah dibandingkan penyimpanan selama 4 dan 8 jam pada semua perlakuan hormon. Begitu juga tingkat fertilisasi, media yang mengandung FSH memberikan angka fertilisasi yang lebih tinggi (47,62%) sedangkan penyimpanan 4 jam berbeda nyata dengan 12 jam pada semua perlakuan hormon. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan hormon FSH ke dalam media penyimpanan ovarium selama 4-8 jam dapat meningkatkan angka maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba.

Kata kunci: Estradiol-17 β , FSH, penyimpanan ovarium, IVM, IVF, oosit domba.

ABSTRACT

This study was undertaken to examine the effect of ovaries storage duration in PBS medium supplemented by estradiol-17 β hormone and/or FSH on *in vitro* maturation and fertilization of ovine oocytes. Ovaries collected from local sheep at slaughter house were brought to the laboratory in PBS solution supplemented by E-17 β , FSH, and E-17 β + FSH (2 μ g/ml in each medium) at 37°C within 4, 8, and 12 hours respectively. Oosit were aspirated from the follicles of 2-5 mm in diameter using syringe 18G containing maturation medium (TCM-199 + 10% FCS + FSH 1 μ g/ml + HCG 1 μ g/ml + E-17 β 1 μ g/ml) and washed three times with the same medium. Ten to fifteen oocytes were mineral oil in each culture dish. After culture for 24 hours at 38°C in 5% CO₂ incubator the maturation oocytes was observed. At 24 hours after fertilization, the oocytes were cleavage 2 cell stage and had second polar body were considered as fertilization oocytes.

The results indicated that supplementation of FSH in PBS medium, had significant higher ($P < 0.05$) on *in vitro* maturation and fertilization rates (53.75% and 47.62%) than supplemented by E-17 β or E-17 β + FSH within 4 hours. Ovaries storage for 4 hours and 8 hours had higher significantly ($P < 0.05$) on *in vitro* maturation and fertilization rates than storage for 12 hours.

Key words: Estradiol-17 β , FSH, ovaries storage, IVM, IVF, ovine oocytes.

PENDAHULUAN

Dalam pelaksanaan fertilisasi *in vitro*, yang meliputi proses maturasi oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio, diperlukan oosit yang layak dibuahi (*fertilizable*) sehingga embrio yang dihasilkan berkualitas baik dan dapat bertahan hidup setelah ditransfer ke resipien. Untuk memperoleh oosit yang *fertilizable* secara *in vitro*, maka viabilitas oosit dalam ovarium selama pengangkutan dari Rumah Potong Hewan (RPH) ke laboratorium perlu diperhatikan.

Hasil penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* yang optimum diperoleh dari oosit sapi yang dikoleksi segera setelah pemotongan (Kaiin *et al.*, 1995). Namun demikian hal tersebut sulit dilakukan mengingat jarak antara RPH dengan laboratorium, sering tidak mendukung. Oleh karena itu, penyimpanan ovarium selama pengangkutan dari RPH ke laboratorium untuk proses lebih lanjut memerlukan waktu dan media yang tepat agar viabilitas oosit dapat dipertahankan.

Penelitian-penelitian terdahulu umumnya menggunakan NaCl fisiologis (0,9%) sebagai media penyimpanan ovarium selama transportasi. Akan tetapi media tersebut hanya dapat mempertahankan viabilitas oosit sekitar tiga jam (Shioya, 1988). Penyimpanan ovarium dalam media Phosphat Buffered Saline (PBS) yang mengandung antibiotika, selama 1-3 jam dapat memperbaiki hasil tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* (Madison *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 1993). Lama penyimpanan ovarium juga telah dilakukan pada oosit sapi yang disimpan dalam media PBS yang mengandung antibiotik selama empat jam pada temperatur 30-35°C dan memberikan hasil tingkat maturasi dan fertilisasi yang lebih tinggi dibanding dengan penyimpanan enam jam (Kaiin *et al.*, 1995). Selain media penyimpanan, viabilitas oosit juga dipengaruhi oleh suhu media tersebut. Nakao dan Nakatsuji (1992) melaporkan bahwa apabila ovarium disimpan pada media Ringer dengan suhu 39°C dan 4°C selama 6,5 jam, embrio 8 sel tidak mengalami perkembangan, sedangkan apabila ovarium disimpan pada 20°C dalam waktu dan media yang sama, embrio 8 sel dapat berkembang sampai tahap morula secara *in vitro*.

Dari beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan berbagai macam media dan kondisi penyimpanan, belum ada yang menambahkan hormon steroid dan gonadotropin dalam media penyimpanan ovarium yang biasanya digunakan pada proses maturasi *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hormon E-17 β dan/atau FSH yang ditambahkan ke dalam media penyimpanan ovarium serta lama penyimpanan terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba.

BAHAN DAN METODE

Koleksi dan Maturasi Oosit

Penelitian ini menggunakan ovarium domba yang diperoleh dari RPH. Ovarium dibagi dalam empat kelompok, yaitu: (1) ovarium dimasukkan ke dalam termos yang berisi media PBS+antibiotik+Estradiol-17 β (2 μ g/ml). (2) PBS+Antibiotik+FSH (2 μ g/ml). (3) PBS+antibiotik+FSH+Estradiol-17 β (masing-masing 2 μ g/ml). (4) PBS+antibiotik. Masing-masing kelompok dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Reproduksi, Puslitbang Bioteknologi-LIPI, Cibinong, dan dijaga suhunya sekitar 37°C. Oosit diaspirasi dari ovarium yang disimpan selama 4, 8, dan 12 jam setelah domba dipotong. Oosit diaspirasi dari folikel yang berukuran 1-3,5 mm dengan menggunakan syringe 10 ml dan jarum berukuran 18 G. Oosit dicuci sebanyak tiga kali dalam media TCM-199 (25 mM HEPES dengan Earle Salt, GIBCO, NY, USA)+Foetal Calf Serum 10%. Hanya oosit yang memiliki sel kumulus kompak yang dikultur dalam tetesan 100 μ l media TCM-199+antibiotik Streptomisin (50g/ml) dengan Penisilin-G (100 Unit/ml) +10% FCS (Gibco, NY, USA)+FSH (Ovagen, NZ)+HCG (Chorulon, Intervet) +Estradiol-17 β (Sigma) masing-masing 1 μ g/ml, dalam cawan petri (35 mm, Neucron, Intermed, Denmark) dan ditutup dengan minyak mineral (Sigma). Selanjutnya disimpan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C. Pengamatan tingkat maturasi berdasarkan pada terbentuknya polar body pertama setelah dikultur selama 24 jam dengan menggunakan mikroskop phase kontras (nikon) pembesaran 200 kali. Persentase tingkat maturasi adalah jumlah oosit yang maturasi dibagi jumlah oosit yang dimaturasi. Oosit yang telah matang dipindahkan ke dalam tetesan 50 μ l media fertilisasi BO (Bracket dan Oliphant, 1975) yang ditambah Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA) dengan 50 μ l Heparin (Novo, Japan) dan telah ditutup dengan minyak mineral. Kemudian oosit diinseminasi dengan spermatozoa domba segar yang telah dikapasitasi.

Preparasi Sperma dan Fertilisasi *In Vitro*

Spermatozoa domba segar yang ditampung dengan menggunakan vagina tiruan, diambil sebanyak 0,1 ml. Kemudian diencerkan dengan 5 ml larutan pengencer semen BO yang mengandung 10 μ M Caffein Sodium Benzoat (SIGMA). Spermatozoa dicuci dua kali dalam media BO dengan cara sentrifugasi 2.500 rpm selama lima menit. Pada akhir pencucian sperma diencerkan dengan media fertilisasi BO yang mengandung heparin 50 μ l+BSA 0,2 g untuk mencapai konsentrasi 5x10⁶ sel/ml. Sebanyak 50 μ l larutan spermatozoa dimasukkan ke dalam spot media yang berisi 10-15 oosit selanjutnya dikultur dalam inkubatur CO₂ 5% pada suhu 38,5°C.

Kultur Oosit dan Embrio *In Vitro*

Pengamatan fertilisasi dilakukan setelah 24 jam oosit dikultur bersama dengan spermatozoa. Oosit yang telah difertilisasi dicuci 3-4 kali dengan cara pipetting menggunakan TCM-199. Sebanyak 10-15 oosit yang telah dicuci ditransfer ke media bekas maturasi (co-culture) yang telah membentuk sel monolayer dari sel folikel. Pengamatan fertilisasi berdasarkan pada terbentuknya polar body kedua atau terjadi pembelahan sel, setelah dikultur selama 24 jam dengan menggunakan mikroskop phase kontras (nikon) pembesaran 200 kali. Persentase fertilisasi adalah jumlah oosit yang difertilisasi dibagi jumlah oosit yang maturasi.

Analisis Statistik

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Sidik Ragam yang dilanjutkan dengan Uji Duncan. Setiap perlakuan diulang tiga kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil persentase maturasi secara *in vitro* dari ovarium yang disimpan dalam media penyimpanan yang ditambah berbagai macam hormon dan lama penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 tersebut, tampak bahwa persentase maturasi *in vitro* oosit domba yang diaspirasi dari ovarium yang disimpan selama empat jam pada media yang mengandung FSH berbeda nyata ($p < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan ovarium yang disimpan dalam media yang mengandung Estradiol-17 β , Estradiol-17 β +FSH, dan kontrol. Sedangkan penyimpanan dalam media yang mengandung Estradiol-17 β +FSH dan disimpan selama 12 jam diperoleh persentase maturasi yang berbeda nyata ($p < 0,05$) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Penyimpanan ovarium selama empat jam pada media yang mengandung hormon Estradiol-17 β maupun kombinasi Estradiol-17 β +FSH, hasilnya lebih rendah dibandingkan kontrol (38,42%; 35,89% vs 53,38%). Sedangkan penyimpanan ovarium selama delapan jam pada media yang mengandung FSH persentase maturasi lebih tinggi (55,17%) dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Persentase maturasi lebih rendah pada semua perlakuan yang mengandung hormon estradiol dibanding dengan kontrol kecuali pada media yang mengandung FSH apabila ovarium disimpan selama 12 jam.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa oosit yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan selama 4, 8, dan 12 jam dalam media yang mengandung FSH dapat meningkatkan persentase maturasi *in vitro* oosit domba. Hormon FSH biasanya digunakan untuk memperbanyak dan mematangkan folikel secara *in vivo* pada saat superovulasi. Penambahan FSH dalam media penyimpanan secara *in vitro* dapat

menstimulasi proliferasi sel granulosa untuk memperbanyak jumlahnya dalam rangka membentuk reseptor-reseptor FSH. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Yen (1990), bahwa sel granulosa akan memproduksi reseptor FSH dengan cara meningkatkan jumlah sel granulosa. Sel granulosa pada folikel akan membentuk sel cumulus oophorus yang diperlukan dalam proses maturasi secara *in vitro* sebagai sumber nutrisi dan *growth factor*

Penambahan estradiol secara tunggal maupun yang dikombinasikan dengan FSH dalam media penyimpanan ovarium selama 4, 8, dan 12 jam, menyebabkan tingkat maturasi *in vitro* oosit domba menurun. Hal tersebut disebabkan kadar estradiol dalam folikel ovarium beberapa kali lebih banyak dibandingkan dengan penambahan estradiol atau FSH secara tunggal. Dalam hal ini FSH akan memstimulasi sel granulosa untuk merubah androgen dan testosteron yang tersisa setelah domba dipotong, menjadi estradiol melalui proses aromatase. Bersamaan dengan proses tersebut estradiol eksogen secara perlahan-lahan merusak sel granulosa dengan cara mengurangi DNA dalam sel granulosa, estradiol eksogen maupun endogen bersamaan mempengaruhi viabilitas oosit karena oosit dari folikel kecil (2-5mm) tidak menyukai suasana estradiol. Hal ini akan mempengaruhi pertumbuhan dari oosit ketika dimaturasi secara *in vitro* karena sel granulosa merupakan sumber nutrisi untuk proses pematangan oosit melalui mikrovilli pada zona pellucida (Richards, 1978).

Fertilisasi *in vitro* oosit yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan dalam media penyimpanan yang ditambah berbagai macam hormon dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh berbagai macam hormon dan lama penyimpanan terhadap persentase maturasi *in vitro* oosit domba.

| Penambahan Hormon (%) | Lama penyimpanan ovarium | | | Rata-rata (%) |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| | 4 Jam | 8 Jam | 12 Jam | |
| Kel I (E2) | 21/54 (38,42) ^{bc} | 43/93 (42,97) ^{ac} | 30/86 (36,46) ^{ac} | 39,28 |
| Kel II (FSH) | 38/53 (57,51) ^{ac} | 22/33 (55,17) ^{bc} | 24/42 (48,58) ^{bc} | 53,75 |
| Kel III (E2 + FSH) | 38/111 (35,89) ^{bc} | 27/69 (38,71) ^{ac} | 26/75 (34,59) ^{ac} | 36,38 |
| Kel IV (Tanpa hormon) | 46/70 (53,38) ^{ac} | 24/45 (47,81) ^{ac} | 16/45 (36,69) ^{ad} | 45,96 |
| Rata-rata (%) | 46,30 | 46,16 | 39,08 | |

Keterangan: ^{a,b} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

^{c,d} Nilai dengan huruf berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 2. Pengaruh berbagai macam hormon dan lama penyimpanan terhadap persentase fertilisasi *in vitro* oosit domba.

| Penambahan hormon (%) | Lama penyimpanan ovarium | | | Rata-rata (%) |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| | 4 Jam | 8 Jam | 12 Jam | |
| Kel I | 8/21 (36,72) ^{ac} | 15/43 (35,05) ^{ac} | 11/30(36,71) ^{ac} | 36,16 |
| Kel II | 26/38 (55,67) ^{bc} | 14/22(51,23) ^{bc} | 9/24 (35,96) ^{ad} | 47,62 |
| Kel III | 25/38 (46,78) ^{abc} | 10/27 (36,00) ^{ac} | 13/26 (42,37) ^{ac} | 41,72 |
| Kel IV | 27/46 (50,55) ^{bc} | 8/24 (35,17) ^{ad} | 5/16 (33,68) ^{ad} | 39,80 |
| Rata-rata (%) | 47,43 | 39,36 | 37,18 | |

Keterangan: ^{a,b} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

^{c,d} Nilai dengan huruf berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$)

Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa persentase *in vitro* oosit domba dari ovarium yang disimpan selama empat dan delapan jam pada media yang mengandung FSH berbeda nyata lebih tinggi dibandingkan dengan ovarium yang disimpan dalam media yang mengandung Estradiol-17 β , Estradiol-17 β +FSH, dan kontrol (yang disimpan selama delapan jam). Sedangkan penyimpanan ovarium selama 12 jam dalam media tanpa atau dengan penambahan hormon memberikan hasil yang tidak berbeda nyata ($p < 0,05$). Hasil tersebut didukung oleh hasil penelitian Kaiin *et al.* (1995), bahwa tingkat fertilisasi dan pembelahan embrio sapi tertinggi diperoleh dari oosit yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan kurang dari empat jam dalam media PBS, dengan demikian untuk memperoleh tingkat fertilisasi *in vitro* yang optimal, diperlukan oosit yang belum mengalami kerusakan pada sitoplasmanya atau derajat kerusakannya masih rendah (Shioya *et al.*, 1988; Kaiin *et al.*, 1995).

Secara alamiah, suatu sel di dalam tubuh akan mengalami kerusakan bila terjadi perubahan lingkungan yaitu dari lingkungan tubuh ke lingkungan di luar tubuh. Hal tersebut diakibatkan oleh perbedaan konsentrasi cairan di dalam sel (intraseluler) dengan cairan di luar sel (ekstraseluler) sehingga terjadi perpindahan cairan dari dan keluar sel yang disebut plasmolisis (Harper, 1981). Demikian pula halnya dengan penyimpanan ovarium selama 12 jam dalam media PBS yang mengandung hormon maupun kontrol, di mana persentase fertilisasi *in vitro* oosit domba rendah. Hal tersebut disebabkan kemampuan larutan untuk menjaga tekanan osmosis, telah menurun, sehingga terjadi kerusakan dalam sitoplasma oosit. Hasil tersebut sejalan dengan pendapat Shioya *et al.* (1988), bahwa semakin lama penyimpanan ovarium sapi dalam NaCl fisiologis 0,9% pada temperatur 38°C akan menurunkan angka fertilitas dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis akibat kerusakan dalam sitoplasma oosit.

Penambahan hormon estradiol-17 β secara tunggal maupun kombinasi dengan FSH tidak berpengaruh nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan atau tanpa penambahan hormon ke dalam media penyimpanan ovarium tidak mempengaruhi

tingkat fertilisasi *in vitro* oosit domba. Hal tersebut dikarenakan pada saat proses fertilisasi, pengaruh hormon yang berada dalam media penyimpanan ovarium sudah berkurang. Tingkat fertilisasi *in vitro* tergantung pada derajat kesempurnaan maturasi oosit termasuk sel cumulus, zona pellucida dan membran vitellin (Shamsuddin *et al.*, 1993)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Lama penyimpanan ovarium selama empat jam dalam media penyimpanan memberikan tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba yang paling baik.
2. Penambahan FSH dalam media penyimpanan ovarium memberikan hasil tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba yang paling tinggi.
3. Penambahan hormon estradiol-17 β dan/atau FSH dalam media penyimpanan tidak memberikan pengaruh pada tingkat fertilisasi *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Kaiin, E.M., S. Said, dan B. Tappa. 1995.** Maturasi dan fertilisasi *in vitro* sapi perah: pengaruh media dan waktu antara pematangan dengan aspirasi Folikel. Seminar Nasional Sain dan Teknologi Peternakan. Bogor. 40-44.
- Lim, J.M., J.H. Kim, K. Okuda, and K. Niwa. 1993.** Effect of the presence glucose during fertilized *in vitro*. J. Reprod. Dev., 39: 237-242.
- Madison, V., B. Avery, and T. Greve. 1992.** Selection of immature bovine oocytes for developmental potention *in vitro*. J. Anim. Reprod. Sci., 27:1-9.
- Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1992.** Effect of storage conditions of bovine oocytes on the success rate of *in vitro* fertilization and culture. J. Reprod. Dev.,38: 11-13.
- Richards, J. 1978.** Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals. In R.E. Jones (Ed.). The Vertebrata Ovary Comparative Biology and Evolution. Plenum Press. New York. London. 331-360.
- Shamsuddin, M., B. Larsson, and H. Rodriguez-Martinez. 1993.** Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. J. Anim. Reprod. Sci., 31: 49-58.

- Shioya, Y., M. Kuwayama, S. Ueda, S. Saitou, H. Oota, and A. Hanada. 1988.** Effect of the time between slaughter and aspiration of follicles on the developmental capability of bovine oocyte matured and fertilized *in vitro*. Japan. J. Anim. Reprod., 34: 39-43 (In Japanese).
- Yen, S. 1990.** Clinical endocrinologi of reproduction. *In* E.E. Baulieu and A.K. Paul (Eds.). Hormone From Molekules To Disease. Herman Publishers In Arts and Science, Chapman and Hall. New York and London. 452 pp.

Daftar Peserta

| No. | Nama | Instansi |
|-----|---------------------|--|
| 1. | A. Ghozi Mansuri | Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Ubi-ubian (Balitkabi), Malang |
| 2. | A. Harris | PT. Nursapto Sembada Murti, Surabaya |
| 3. | Adam | - |
| 4. | Ade Rosmana | Universitas Hasanuddin (UNHAS), Ujung Pandang |
| 5. | Adriana Lubis | Balai Penelitian Temak (Balitnak), Ciawi |
| 6. | Adriani | Universitas Wijaya Kusuma (UWK), Surabaya |
| 7. | Agus Susanto | Universitas Gajah Mada (UGM), Yogyakarta |
| 8. | Ali Husni | Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan (Balitbio), Bogor |
| 9. | Andi A. Ranang | Perak Timur 18, Surabaya |
| 10. | Andreas Bohnieger | Universitas Bangkalan (UNIBANG), Madura |
| 11. | Andriani Eko P. | UWK, Surabaya |
| 12. | Andry Royanto | UWK, Surabaya |
| 13. | Aniversari Apriana | Balitbio, Bogor |
| 14. | Ardi Wijaya | UGM, Yogyakarta |
| 15. | Arika Purnawati | UPN Veteran Jatim |
| 16. | Aryuni Widyaningsih | FTI/TP LIPN Veteran Jatim |
| 17. | Asril Darussamin | Pusat Penelitian Karet, Sungai Putih, Medan |
| 18. | Atmitri Sisharmini | Balitbio, Bogor |
| 19. | B.H. Proso | PT. H.M. Sampoema |
| 20. | Baharuddin | UNHAS, Ujung Pandang |
| 21. | Baharuddin Tappa | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 22. | Bambang G. | Universitas Airlangga (UNAIR), Surabaya |
| 23. | Bambang H. | Universitas Tujuh Belas Agustus (UNTAG), Surabaya |
| 24. | Bambang Priyanto | UNAIR, Surabaya |
| 25. | Bambang Purwantara | FKH – Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor |
| 26. | Bambang S. Purwoko | IPB, Bogor |
| 27. | Bambang Sugiharto | Universitas Jember (UNEJ) |
| 28. | Barep Sutiyono | Fak. Pertanian Universitas Diponegoro (UNDIP), Semarang |
| 29. | Basofi Soedirman | Gubernur Jawa Timur |
| 30. | Benny S.W. | Biro Humas Pemda Jatim |
| 31. | Budhi Priyanto | BPP Teknologi, Jakarta |
| 32. | Budi Rianto | Polda Jatim |
| 33. | Budi Santosa | Balitbio, Bogor |
| 34. | Budi Tri Akoso | PUSVETMA, Surabaya |

| No. | Nama | Instansi |
|-----|--------------------------|--|
| 35. | Clive James | Chair, International Service for the Acquisition for Agri-biotech Application Board of Director, PO. Box 427 |
| 36. | Darmono T.W. | Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan (UPBP), Bogor |
| 37. | Diah Purbaningtyas | Fakultas Pertanian, UWK, Surabaya |
| 38. | Diani Damayanti | Balitbio, Bogor |
| 39. | Didi Suardi | Balitbio, Bogor |
| 40. | Didiek H. Goenadi | UPBP, Bogor |
| 41. | Didik W. Widjajanto | Fak. Pertanian, UNDIP, Semarang |
| 42. | Djoko Santoso | UPBP, Bogor |
| 43. | Djoko S. Damardjati | Balitbio, Bogor |
| 44. | Dwi Poliwati | Fakultas Pertanian, UWK, Surabaya |
| 45. | Dwi Retno Lukiwati | Fak. Pertanian, UNDIP, Semarang |
| 46. | Dwi Retno Untari | Balitbio, Bogor |
| 47. | Dwi Teguh | Suara Karya |
| 48. | Edy Listanto | Balitbio, Bogor |
| 49. | Endah Wahyuni | Kebun Binatang, Surabaya |
| 50. | Endang B. Tri Susilowati | Fak. Pertanian UNEJ, Jember |
| 51. | Endang Kusumanti | Lembaga Penelitian UNDIP, Semarang |
| 52. | Endang T. Margawati | Puslitbang Bioteknologi, LIPI, Cibinong |
| 53. | Eni Widiastuti | FTI/TP LIPN Veteran Jatim |
| 54. | F. Hartono | PT. Ajinex International |
| 55. | Fahmi | PPS-UB-PIT |
| 56. | Faisal Kasryno | Badan Litbang Pertanian, Jakarta |
| 57. | Fathoni | Republika |
| 58. | Fathuddin | Kedaulatan Rakyat |
| 59. | Giyanto | UGM, Yogyakarta |
| 60. | Gusti Sarbini | UNHAS, Ujung Pandang |
| 61. | H.S. Hasyim | UNIBANG, Madura |
| 62. | Hari Purnomo | Fak. Pertanian UNEJ, Jember |
| 63. | Hendryk M. | Kebun Binatang, Surabaya |
| 64. | Herman S. | UNPAD, Bandung |
| 65. | Hemowo H.S | Dinas Peternakan Tk I Jatim |
| 66. | Herry Karsono | Puslitbang Bioteknologi - LIPI, Cibinong |
| 67. | Husni Kasim | Balitbio, Bogor |
| 68. | I Komang W. Sarjana | UNAIR, Surabaya |
| 69. | I Nyoman Buana | PT. Monagro Kimia, Jakarta |
| 70. | I Wayan T. Wibawan | UNAIR, Surabaya |
| 71. | Ibrahim Manwan | Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor |
| 72. | Ida Hanarida Somantri | Balitbio, Bogor |

| No. | Nama | Instansi |
|------|-----------------------|---|
| 73. | Ida Retno M. | UNIBANG, Madura |
| 74. | Ida Setyawati | UPB, Surabaya |
| 75. | Ika Krishnayanti | Konphalindo, Jakarta |
| 76. | Ika Mariska | Balitbio, Bogor |
| 77. | Imam Sudjono | UNPAD, Bandung |
| 78. | Iman Setyabudi | UPB, Surabaya |
| 79. | Indarwati | UWK, Surabaya |
| 80. | Irawadi Jamaran | BPP Teknologi, Jakarta |
| 81. | Iswari S. Dewi | Balitbio, Bogor |
| 82. | J. Panggeso | UGM, Yogyakarta |
| 83. | Jojob Sujanto | STKIP PGRI, Sampang |
| 84. | Joko Prasetyono | Balitbio, Bogor |
| 85. | K. Agus Wahjudi | P3GI, Pasuruan |
| 86. | Karuniawan | PPS-UB-PIT |
| 87. | Ketty Karyati | Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor |
| 88. | Komang Rustini | Balitbio, Bogor |
| 89. | Kurniawan Puji W. | PS. UB |
| 90. | Kuswanto | Fakultas Pertanian UNIBRAW, Malang |
| 91. | La Ode Santiaji Bande | UGM, Yogyakarta |
| 92. | Latifah | UPN Veteran Jatim |
| 93. | Liang Kaspe | Kebun Binatang, Surabaya |
| 94. | Lilieek Sulistyowati | Fak. Pertanian UNIBRAW, Malang |
| 95. | Lisye | Mahasiswa, |
| 96. | M. Fatchurochim M. | Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi), Jakarta |
| 97. | M. Febriani | R. Dukuh Pakis 15, Surabaya |
| 98. | M. Hadad E.A. | Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor |
| 99. | M. Herman | Balitbio, Bogor |
| 100. | M. Muchlish Adie | Balitkabi, Malang |
| 101. | Maftuchah | Universitas Muhammadiyah, Malang |
| 102. | Mahmud Tantowi | PT. Ajinomoto Indonesia |
| 103. | Masdiar Bustamam | Balitbio, Bogor |
| 104. | Mashadi Sapuan | UNTAG, Surabaya |
| 105. | Mia Kosmiatin | Balitbio, Bogor |
| 106. | Minantyorini | Balitbio, Bogor |
| 107. | Mirida F. | Universitas Hang Tuah |
| 108. | Mohamad Sigit | PT. Petrokimia Gresik |
| 109. | Muhammad Noer | Jln. Ir. Amsir 11, Surabaya |
| 110. | Muhzyi | Fak. Pertanian UNITOMO, Surabaya |

| No. | Nama | Instansi |
|------|---------------------|---|
| 111. | Narta | Balai Penelitian Tanaman Padi (Balitpa), Sukamandi |
| 112. | Nasib W.W. | PT. BISI, Kediri |
| 113. | Nita R. Prayitno | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 114. | Novianti Sunarlim | Balitbio, Bogor |
| 115. | Nur Amin | UNHAS, Ujung Pandang |
| 116. | Nur Fahmi | PS. UB |
| 117. | Nuraida Syam Djafar | Balai Penelitian Tanaman Jagung dan Serealia Lain (Balitjas), Maros |
| 118. | Nurita L.T. Mathius | UPBP, Bogor |
| 119. | Praptiningsih GA | Faperta UNMER, Madiun |
| 120. | Puguh Darmadi | PUSVETMA, Surabaya |
| 121. | R.A. Sony Wibisono | Balitbio, Bogor |
| 122. | R.P. Adi Oetojo | Berita Buana |
| 123. | Rachmi Masnilah | Fak. Pertanian UNEJ, Jember |
| 124. | Rancy | PPS-UB-PIT |
| 125. | Ranny Meriyana | UNPAD, Bandung |
| 126. | Ratnasari Dahlan | Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor |
| 127. | Ria | RRI Surabaya |
| 128. | Rini Soehartojo | UNAIR, Surabaya |
| 129. | Riva Tri Wuryandari | FTI/TP LIPN Veteran Jatim |
| 130. | Rudy Hermanto | PT. BISI, Kediri |
| 131. | Samsul B. | PT. Ajinex International |
| 132. | Saptowo J. Pardal | Balitbio, Bogor |
| 133. | Satria G. Pinandita | PT. Ajinomoto Indonesia |
| 134. | Setyo Dwi Utomo | Fak. Pertanian UNILA, Lampung |
| 135. | Siti Fatimah | PF – UNIBANG Bangkalan |
| 136. | Soehartojo H. | FKH – UNAIR, Surabaya |
| 137. | Soeprajitno Lamadji | P3GI, Pasuruan |
| 138. | Solikhin | Balitikabi, Malang |
| 139. | Sondang Hutajulu | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 140. | Sri Hardaningsih | Balitikabi, Malang |
| 141. | Sri Hartati | FKH UGM, Yogyakarta |
| 142. | Sri Hartati | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 143. | Sri Hutami | Balitbio, Bogor |
| 144. | Sri Rahayuningtyas | UPN Veteran Jatim |
| 145. | Sri Riahna | PT. Petrokimia Gresik |
| 146. | Sri Rianawati | Balitbio, Bogor |
| 147. | Sri Wiyatiningsih | UPN Veteran Jatim |
| 148. | Sriharti | P3FI – LIPI Subang |

| No. | Nama | Instansi |
|------|-----------------------|--|
| 149. | Subur Q.W. | Fak. Pertanian UNIBRAW, Malang |
| 150. | Suci Rahayu | Balitbio, Bogor |
| 151. | Sugiono Moeljopawiro | Balitbio, Bogor |
| 152. | Suharjono | PTP Nusantara XI |
| 153. | Suharyanto | UPBP, Bogor |
| 154. | Sumardi | FTP UNIKA Soegijapranata, Semarang |
| 155. | Sumartini | Bal itkabi, Malang |
| 156. | Sunarti | UGM, Yogyakarta |
| 157. | Suprihanto | Faperta UGM, Yogyakarta |
| 158. | Suryahadi | IPB, Bogor |
| 159. | Suryanti | UGM, Yogyakarta |
| 160. | Suryanto | |
| 161. | Susono Saono | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 162. | Sustiprijatno | Balitbio |
| 163. | Sutisna | |
| 164. | Sutrisno | Balitbio, Bogor |
| 165. | Syahnovi Manius | PT. Tanindo Subur Prima, Surabaya |
| 166. | Syamsidah Rahmawati | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 167. | Syarif Husen | Universitas Muhammadiyah, Malang |
| 168. | Syarifudin Baharsyah | Menteri Pertanian Republik Indonesia |
| 169. | Sylvia J.R.L | Mahasiswa |
| 170. | Tintin Suhartini | Balitbio, Bogor |
| 171. | Tommy Maryanto | Fak. Pertanian UWK, Surabaya |
| 172. | Tri Astuti | P3FT UPI, Bandung |
| 173. | Tri Esti Prasetyorini | FTI/TP LIPN Veteran, Jatim |
| 174. | Tri Joko Santosa | Balitbio |
| 175. | Tri Mulyani | UPN, Surabaya |
| 176. | Tri Panji | Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor |
| 177. | Tri Yogo Wibowo | BPP Teknologi, Jakarta |
| 178. | Umri Nur | PT. Monagro Kimia, Jakarta |
| 179. | V.S. Andrijany | UBAYA, Surabaya |
| 180. | Wagiyano | Fak. Pertanian UNEJ, Jember |
| 181. | Wahyu Widoretno | UNIBRAW, Malang |
| 182. | Widyasari | UGM, Yogyakarta |
| 183. | Wikoe Priatmadi | UWK, Surabaya |
| 184. | Winye Ria | UNMER, Madiun |
| 185. | Wiranda G. Piliang | IPB, Bogor |
| 186. | Wiwiek Eko Widayati | P3GI, Pasuruan |
| 187. | Wiwiek Sri Wahyuni | Fak. Pertanian UNEJ |

| No. | Nama | Instansi |
|------|----------------------|--|
| 188. | Wiwit Budi Widyasari | P3GI, Pasuruan |
| 189. | Wuryan Rahayu | Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong |
| 190. | Wuye | UNMER, Madiun |
| 191. | Yadi Rusyadi | Balitbio, Bogor |
| 192. | Yanuarso Eddy H. | BPP Teknologi, Jakarta |
| 193. | Yati Supriati | Balitbio, Bogor |
| 194. | Yenny Wuryandari | UPN Veteran, Jatim |
| 195. | Yufnal Away | UPBP, Bogor |
| 196. | Yunik Istikorini | Fak. Pertanian UNEJ, Jember |