

PENGARUH MEDIA IVM DAN IVC PADA PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI SECARA *IN VITRO*

E.T. MARGAWATI, E. M. KAIIN, K. ERIANI, N.D. YANTHI, dan INDRIAWATI

*Puslitbang Bioteknologi-LIPI,
Jalan. Raya Bogor Km 46. Cibinong*

(Diterima dewan redaksi 31 Agustus 2000)

ABSTRACT

MARGAWATI, E.T., E. M. KAIIN, K. ERIANI, N.D. YANTHI, and INDRIAWATI. 2000. The effect of IVM and IVC media on in vitro development of bovine embryos. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (4): 229-233.

The purpose of this study was to examine the effect of medium combination of IVM and IVC on the *in vitro* development of bovine embryos. The study involved 4 groups in a 2 (IVM medium) x 2 (IVC medium) factorial in a randomized block design. Each group was replicated for 5 times. The treatments were as follows: TCM-199/CR1aa (T1); TCM-199/SOF (T2); B-199/CR1aa (T3) and B-199/SOF (T4). Oocytes were aspirated from ovaries collected at local abattoirs using aspiration medium of PBS supplemented with 3% FCS and 0.1% Penicillin and Streptomycin. The oocytes were matured in medium of TCM-199 or B-199 supplemented with 10% FCS, hormones: 10µg/ml FSH+ 10µg/ml hCG+ 1µg/ml Estradiol. Maturation was maintained at 37°C for 22 hours in 5% CO₂ incubator with high humidity. A method of BRACKETT & Oliphant (BO) was used to fertilize the matured oocytes. The fertilization was incubated for 7 hours in the 5% CO₂ incubator. Two culture media of CR1aa or SOF/AA/BSA were used to develop the fertilized oocytes undergo to morula and blastocyst embryos. The findings showed that the proportion of oocytes cleaved and formation of blastocysts were affected significantly by a combination of IVM and IVC media (P<0.05). A combination of B-199/SOF (T4) resulted in a higher blastocyst rate (32%) than others (T3= 29%; T2=T1= 23%). This study suggests that either SOF/AA/BSA or CR1aa has similar competence in development of bovine embryos *in vitro*.

Key words: Bovine embryo, IVF, maturation medium, culture medium

ABSTRAK

MARGAWATI, E.T., E. M. KAIIN, K. ERIANI, N.D. YANTHI, dan INDRIAWATI. 2000. Pengaruh media IVM dan IVC pada perkembangan embrio sapi secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (4): 229-233.

Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji penggunaan kombinasi media IVM dan IVC pada perkembangan embrio sapi secara *in vitro*. Percobaan ini melibatkan 4 grup perlakuan dari 2 (media IVM) x 2 (media IVC) faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok, masing masing perlakuan diulang 5 kali. Ke-empat perlakuan adalah kombinasi TCM-199/CR1aa (T1); TCM-199/SOF (T2); B-199/CR1aa (T3) dan B-199/SOF (T4). Ovarium dari Rumah Potong Hewan diaspirasi untuk memperoleh sel telur dengan medium aspirasi PBS dengan penambahan 3% FCS dan 0,1% antibiotik (Penstrep). Maturasi (IVM) dilakukan didalam inkubator (5% CO₂) pada suhu 37°C dengan kelembaban tinggi selama 22 jam. Fertilisasi (IVF) dilakukan dengan metode BRACKETT & Oliphant (BO), selama 7 jam didalam CO₂ inkubator seperti pada maturasi *in vitro*. Pengembangan embrio (IVC) dilakukan didalam CO₂ inkubator seperti pada maturasi dan fertilisasi *in vitro*. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan pada hari ke-2, ke-6 dan ke-8 masing-masing untuk pembelahan, morula dan blastosist. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi media IVM dan IVC berpengaruh nyata (P<0.05) terhadap pembelahan sel telur dan pembentukan blastosist. Kombinasi B-199/SOF (T4) menghasilkan rata-rata blastosist lebih tinggi (32%) dari perlakuan lainnya (T3= 29%; T2=T1= 23%). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa medium kultur SOF/AA/BSA atau CR1aa mempunyai kemampuan yang serupa untuk digunakan dalam pengembangan embrio secara *in vitro*.

Kata kunci: Embrio sapi, IVF, media maturasi dan media kultur

PENDAHULUAN

Krisis ekonomi yang dialami bangsa Indonesia sejak tahun 1997 telah berdampak negatif pada penurunan drastis terhadap pemasokan komoditi daging atau ternak potong dari luar negeri. Sudah waktunya kita tidak bisa tergantung terhadap pemasokan komoditi

dari luar negeri. Dengan memanfaatkan teknologi yang kita kuasai, kita akan menjadi bangsa Indonesia yang mandiri. Teknik *in vitro* fertilization (IVF) telah dibuktikan kemampuannya dalam menghasilkan anak sari jantan (BRACKETT *et al.*, 1982). Embrio basil *in vitro* tidak hanya dimanfaatkan untuk tujuan komersialisasi dalam meningkatkan populasi ternak secara cepat. Namun akhir akhir ini embrio basil IVF sering digunakan untuk tujuan penelitian yang lebih

maju, seperti: cloning, transfer gene atau manipulasi embrio lainnya.

Teknologi IVF dengan materi utamanya limbah indung telur (Ovary) yang dikoleksi dari RPH dapat diubah menjadi nilai produk yang sangat berguna dalam penyediaan bibit embrio secara massal (GORDON, 1990). Teknik produksi embrio secara *in vitro* ini disebut dengan "in vitro embryo production" atau IVP. Dilaporkan bahwa IVP dapat meningkatkan 22% tambahan perbaikan mutu genetik temak (LOHUIS, 1995). Meskipun keuntungan dari aplikasi IVF telah dibuktikan, namun masih ada kendala terbatasnya memperoleh ovarium dari RPH. Oleh karenanya berbagai studi IVF perlu dilakukan untuk meningkatkan perbaikan ke arah pencapaian proporsi embrio yang lebih tinggi. Studi pematangan sel telur tanpa CO₂ sebagai penanggulangan kemungkinan dilakukan pematangan (IVM) sel telur selama perjalanan jauh telah dilakukan (MARGAWATI, *et al.*, 1997). Perbaikan lainnya dalam IVF seperti penambahan faktor penumbuh (growth factor), misalnya Epidermal Growth Factor (EGF) dari Insuline-like Growth Factor (IGF) telah dilaporkan (HERRLER *et al.*, 1992 dan HEYNER *et al.*, 1993). Dilaporkan bahwa penambahan hormon gonadotropin selama pemasakan sel telur dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah sel telur yang masak (GREVE 1995). Untuk mengefisienkan dan mengurangi biaya produksi embrio *in vitro* perlu juga dipelajari terhadap pemasakan sel telur tanpa penambahan hormon.

Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji penggunaan kombinasi pasangan medium maturasi (media IVM: TCM-199 dan B-199) dan medium kultur (media IVC: CRLaa dan SOF/AA/BSA) terhadap pengembangan embrio sapi secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Aspirasi dan Maturasi Oosit *in vitro* (IVM)

Sel telur (oocyte) diaspirasi (disedot) dari limbah indung telur (ovarium) yang diperoleh dari Rumah Pematangan Hewan (RPH). Medium aspirasi yang digunakan yaitu Phosphate Buffer Saline (PBS) dengan penambahan 3% Fetal Calf Serum (FCS) dan 0,1% antibiotik Penicilin dan Streptomycin. Setelah dikoleksi dengan medium aspirasi, sel telur dicuci dengan medium pencuci sesuai dengan perlakuan yang digunakan (Tabel I). Sebelum dikultur dalam medium aspirasi, sel telur dicuci ke dalam medium maturasi sesuai dengan perlakuan yang digunakan. Maturasi dilakukan didalam inkubator 5% CO₂ selama 22 jam, pada suhu 37°C dengan kelembaban tinggi.

Tabel 1. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian

Perlakuan	Ulangan (kali)	Medium yang digunakan	
		Maturasi (IVM)	Kultur (IVe)
T1	5	TCM-199	CR1aa
T2	5	TCM-199	SOF/AA/BSA
T3	5	B-199 + hormon	CRLaa
T4	5	B-199 + hormon	SOF/AA/BSA

Keterangan :

Setiap ulangan berisi 10 sel telur

Hormon : 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml hCG + 1 µg/ml Estradiol (E₂)

Fertilisasi *in vitro* (IVF)

Fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan metode BRACKETT & OLIPHANT (BO), menggunakan sperma beku Simmental. Fertilisasi dilakukan selama 7 jam didalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 37°C dengan kelembaban tinggi didalam udara, seperti pada maturasi.

Kultur *in vitro* (IVC)

Setelah fertilisasi *in vitro*, sebagian sel telur dikultur di dalam media CRLaa dan sebagian di dalam SOF/AA/BSA sesuai dengan perlakuan penelitian (Tabel 1). Pada pengkulturan dengan CRLaa, media tidak perlu diganti sedangkan dengan SOF/AA/BSA media perlu diganti setiap 48 jam sekali dengan medium segar. Pengamatan dilakukan pada hari ke dua, ke enam dan ke tujuh atau delapan setelah fertilisasi, masing-masing untuk pengamatan, pembelahan (cleavage), tahap morula dan tahap blastosist.

Variabel yang diukur

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu persentase pembelahan, morula dan blastosist. Masing-masing data tersebut dihitung persentase dan rataannya (rate) untuk memudahkan dalam analisa statistiknya.

$$\text{Persentase pembelahan} = (E \text{ Oosit membelah} : \text{Oosit}) \times 100\%$$

$$\text{Persentase blastosist} = (E \text{ blastosist} : E \text{ Oosit}) \times 100\%$$

$$\text{Rataan (rate) blastosist} = (E \text{ blastosist} : E \text{ Oosit membelah}) \times 100\%$$

Analisa statistik

Penelitian dirancang dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial 2X2 dengan faktor pertama yaitu media maturasi (IVM) dan faktor kedua media kultur(IVC), dengan demikian terdapat 4 grup. Masing-masing grup diulang 5 kali, setiap ulangan berisi 10 oosit. Data di analisa dengan program SAS (Statistical Analysis System), 1987 untuk memperoleh rata-ratanya (Means) dan simpangan bakunya terhadap rata-ratanya (SEM = standard error for the means). Beda antar

perlakuan terhadap variabel yang diamati diuji dengan 'Duncan test' pada taraf beda 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Oosit

Nampak terdapat perbedaan secara morfologis terhadap perkembangan oosit hasil maturasi secara *in vitro* (Tabel 2). Pada oosit yang dimatursikan (IVM) didalam medium TCM-199 pada T1 dan T2, sel kumulus yang melingkari oosit tidak berkembang secara maksimal dan oosit satu dengan lainnya tidak saling bergabung. Dengan demikian, oosit basil maturasi dengan medium TCM-199 terlihat berkembang individual atau mudah dipisahkan satu oosit dengan oosit lainnya. Berbeda dengan oosit yang dimatursikan (IVM) didalam medium B-199 dengan penambahan hormon gonadotropin: FSH, hCG dan estradiol, oosit nampak diselimuti secara penuh oleh perkembangan sel kumulus atau sel kumulus berkembang secara maksimal. Oleh karenanya oosit basil maturasi didalam B-199 sulit dipisahkan secara individu karena menempel (lengket) satu oosit dengan oosit lainnya. Perbaikan dalam maturasi *in vitro* ini seperti telah dikemukakan oleh BAKER *et al* (1977) bahwa LH, FSH dan Estradiol, semuanya adalah efektif untuk memicu pembelahan meotik (meotic division) dan perkembangan ke tahap Metaphase II. Pendapat tersebut juga didukung oleh TSAFRIRI (1978) bahwa pematangan oosit dipicu oleh hentakan preovulasi gonadotropin sebelum ovulasi.

Perkembangan blastosist

Data perkembangan oosit setelah fertilisasi *in vitro* (IVF) diamati mulai dari pembelahan (cleavage), tahap morula dan tahap blastosist. Namun data yang dibahas

dalam diskusi ini hanya data persentase pembelahan, persentase dan rataan blastosist. Setelah melalui analisa dengan fasilitas program SAS, hasilnya dapat dilihat seperti pada Tabel3.

Hasil penampilan data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa kombinasi pasangan media maturasi (media IVM) dan media kultur (media IVC) berpengaruh nyata terhadap persentase pembelahan, persentase blastosist dan rataan blastosist, masing-masing berbeda pada taraf 5% ($p < 0,05$). Meskipun kedua media maturasi: TCM-199 dan B-199 nampak menunjukkan basil pembelahan oosit yang serupa jumlahnya, namun medium B-199 nampak masih lebih baik dalam pencapaian perkembangan oosit ke tahap blastosist setelah dikultur kedalam medium CR1aa.

Nampak bahwa media kultur CR,aa dan SOF/AA/BSA tidak memberikan perbedaan perkembangan oosit yang sebelumnya dimatursikan dengan B-199 ke tahap blastosist. Kedua grup (T3 dan T4) menunjukkan basil pembentukan blastosist yang sama yaitu sebesar 24%. Setelah dilihat terhadap basil rataannya (blastosist : pembelahan), nampak bahwa kombinasi B-199 dengan SOF/AA/BSA (T4) menunjukkan bahwa proporsi blastosist nampak paling banyak (32%). Secara keseluruhan nampak bahwa terdapat kesinambungan perkembangan embrio mulai dari pembelahan sampai pembentukan blastosist, terutama pada T3 dan T4. Dengan demikian dapat diambil kesepakatan bahwa oosit yang dimatursikan pada B-199 nampak memberikan kelanjutan perkembangan sampai ke tahap blastosist yang lebih baik dari pada oosit yang matursikan kedalam medium TCM-199. Sedangkan pengaruh media kultur baik CR1aa maupun SOF/AA/BSA, nampak tidak memberikan pengaruh pada pembentukan blastosist. Melihat kembali pada komposisi medium maturasi B-199, bahwa medium maturasi ini mengandung penambahan hormon gonadotropin (FSH, hCG, Estradiol) sedangkan TCM-199

Tabel 2. Perkembangan gel kumulus basil maturasi *in vitro* dengan media berbeda

Media IVM	Jumlah Oosit	Perkembangan sel kumulus (%)	Keterangan
TCM-199	50	32 (64%)	Tidak maksimal, individu oosit
B-199+hormon	50	47 (94%)	Maksimal, sulit dipisahkan

Tabel3. Pengaruh media IVM dan media IVC terhadap perkembangan blastosist *in vitro*

Media (IVM/IVC)	Jumlah Oosit	% Perkembangan (Mean ± SEM)		
		Pembelahan (dari oosit)	Blastosist (dari oosit)	Rataan Blast (dari pembelahan)
TCM-199/CR1aa (T1)	50	78,00 ± 3,74 ^a	18,00 ± 2,00 ^{cd}	23,02 ± 2,40 ^f
TCM-199/SOF (T2)	50	68,00 ± 2,00 ^b	16,00 ± 2,45 ^d	23,33 ± 2,00 ^f
B-199/CR1aa (T3)	50	82,00 ± 3,74 ^a	24,00 ± 2,45 ^c	29,33 ± 2,00 ^{ef}
B-199/SOF (T4)	50	74,00 ± 2,45 ^{ab}	24,00 ± 2,45 ^c	32,14 ± 2,00 ^e

^{a,b,c,d,e,f} Nilai dengan superskrip berbeda didalam satu kolom, berbeda nyata ($p < 0,05$)

tidak disuplementasi dengan hormon gonadotropin. Seperti diketahui bahwa 'preovulatory gonadotropin' ternyata memang diperlukan untuk meningkatkan perkembangan oosit yang masak atau oosit mencapai tahap Metaphase II (BAKER *et al.*, 1977; TSAFRIRI, 1978 dan GREVE, 1995). Pengamatan perkembangan oosit (Tabel 2) juga menunjukkan bahwa perkembangan sel kumulus pada oosit yang dimaturasi dengan B-199 nampak berkembang maksimal dibanding dengan oosit dimaturasi dengan TCM-199. Diperkirakan sel kumulus yang berkembang mampu menyediakan 'autocrine growth factor' yang dapat memicu perkembangan oosit menjadi masak atau mencapai tahap Metaphase II. Dimungkinkan adanya kerjasama antara hormon gonadotropin dengan faktor penumbuh selama proses maturasi (HARPER and BRACKETT, 1993). Bukti lain menunjukkan bahwa oosit yang dikultur dalam grup selama maturasi *in vitro* menunjukkan jumlah oosit matang lebih banyak dibanding oosit yang dikultur tunggal (MARGAWATI, 1998). Hal ini diperkirakan bahwa adanya peran faktor penumbuh pada oosit yang dikultur dalam bentuk grup lebih berpengaruh terhadap pemasakan oosit dibanding kultur tunggal (PARIA dan DEY, 1990). Meskipun suplementasi sel kumulus selama maturasi *in vitro* tidak mengubah frekuensi maturasi sempurna inti sel (nucleus), namun dibandingkan dengan oosit yang gundul (tanpa sel kumulus = nude oocyte), maturasi *in vitro* oosit sapi dengan sel kumulus menghasilkan proporsi blastosist nyata lebih tinggi setelah IVF (CRISTER *et al.*, 1986).

Dilihat dari media kultur yang digunakan untuk mengembangkan oosit yang telah difertilisasi *in vitro*, yaitu CR1aa dan SOF/AA/BSA, keduanya mempunyai kelebihan dan kekurangan (personal communication, Anne PUGH, New Zealand) pada hasil anak sapi yang dilahirkan. Dengan demikian akan terlihat efeknya setelah ditransfer. Penggunaan semi-defined medium CR1aa, akan menghasilkan pedet basil *in vitro* lebih besar dari pada normal atau hasil *in vitro* dengan medium kultur lainnya. Walaupun diketahui bahwa hampir semua basil *in vitro* akan menghasilkan pedet yang sedikit lebih besar dari pada hasil *in vivo*. Pada CR1aa, ada kelebihan penambahan serum, hal ini yang diperkirakan penyebab terjadinya pertumbuhan lebih besar. Pada medium kultur SOF/ AA/BSA telah dibuktikan keberhasilannya untuk menghasilkan anak domba basil perkembangan embrio *in vitro* (TERVIT *et al.*, 1972). Penggunaan medium SOF/AA/BSA dilaporkan aman untuk kultur *in vitro* dengan konsentrasi oxygen yang rendah (<10%), (THOMPSON *et al.*, 1990).

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa medium maturasi yang digunakan berpengaruh terhadap

perkembangan lebih lanjut ke tahap blastosist. Baik medium CR1aa maupun SOF/AA/BSA berpengaruh baik terhadap pembentukan blastosist *in vitro*. Kombinasi pasangan medium maturasi B-199 dan medium kultur SOF/AA/BSA menghasilkan proporsi pembentukan blastosist yang paling tinggi (32%). Disarankan untuk menggunakan medium maturasi dengan penambahan hormon gonadotropin selama berlangsungnya maturasi *in vitro* untuk memperoleh proporsi blastosist yang lebih banyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih tak terhingga kepada Dr. Gono Semiadi yang telah membantu dalam analisa data. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Sdr. Agus Istiarto yang telah membantu dalam memperoleh materi ovarium dari Rumah Pematangan Hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- BAKER, T.G., J.S.G. BIGGS AND R.H.F. HUNTER. 1977. Control of oocyte maturation in mammals. In: V.H.T. James (Ed.). *Endocrinology*. Excerpta Medica, Amsterdam. I: 351-361.
- BRACKETT, B.G., D. BASQUET, H.L. BOICE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS AND M.A. DRESSSEL. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27: 147-158.
- CRISTER, E.S., M.L. LEIBFRIEDD-RUTLEDGE, W.H. EYESTONE, D.L. NORTHLEY AND N.L. FIRST. 1986. Acquisition of development competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25: 150 (Abstract).
- GORDON, I. 1990. Laboratory production of cattle embryos. *Proceedings of 3rd! symposium on Advance Tropics in Animal Reproduction*. 63-87.
- GREVE, T. 1995. Effects of gonadotropins on oocyte and embryo. *Embryo Transfer Newsletter* 12 (3): 7.
- HARPER, K.M. AND B.G. BRACKETT. 1993. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. *Zygote* 1: 27-34.
- HERRLER, A, A LUCAS-HAHN, AND H. NIEMANN. 1992. Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 37: 1213-1224.
- HEYNER, S., N. SHAH, RM. SMITH, AJ. WATSON AND G.A. SCHULTZ. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* 39: 151-161.
- LOHUIS, M.M. 1995. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60.

- MARGAWATI, E.T.1998. Maturing singly versus in groups of ovine oocytes on meiosis. *Media Veteriner* 5 (3): 7-10.
- MARGAWATI, E.T., I. SUPRIATNA, T.L. YUSUF AND Y. SUPRIONDHO. 1997. Development of ovine embryos derived from oocytes matured in vitro in the absence of CO₂, *Proceedings of the Indonesian Biotechnology Conference*. Jakarta: 211-217.
- PARIA, B.C. and Dey, S.K.]990. Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings National Academy of Sciences. U.S.A.* 87: 4753-4760.
- Tervit, H.R., D.G. WHITTINGHAM and E.A. ROWSON. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493-497.
- THOMPSON, J.G.E., A.C. SIMPSON, PA PUGH, P.E. DONELLY AND H. R. TERVIT. 1990. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 573-578.
- TSAFRIRI, A.] 978. Oocyte maturation in mammals. ill: R.E. Jones (Ed.). *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press. New York.. hal 409-442.