

PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO* DENGAN MODIFIKASI WAKTU DAN HORMON GONADOTROPIN SELAMA PEMATANGAN OOSIT

ENDANG TRIWULANNINGSIH¹, M.R. TOELIHERE², J.J. RUTLEDGE³, T.L. YUSUF², B. PURWANTARA² dan K. DIWYANTO⁴

¹Balai Penelitian Ternak, P.O. Box 221, Bogor 16002

²Biologi Reproduksi Pascasarjana IPB, Darmaga, Bogor

³Dept. of Animal Science Univ. of Wisconsin, USA

⁴Puslitbang Peternakan, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 1651

(Diterima dewan redaksi 18 Oktober 2001)

ABSTRACT

TRIWULANNINGSIH, E., M.R. TOELIHERE, J.J. RUTLEDGE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA and K. DIWYANTO. 2001. *In vitro* embryo production through modification of time and gonadotropin hormone during oocytes maturation. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 171-177.

This research has been conducted at the laboratory of *in vitro* fertilization of the University of Wisconsin, USA. These embryos can be used for improving genetic value of Indonesian cattle. There is transportation constraint in importing oocytes from USA. It takes more than 24 hours to bring it to Indonesia. In fact, oocytes maturation and ready to be fertilized normally requires only 24 hours in 5% CO₂ incubator at 38.5°C. Therefore, this research is needed to study the effect of gonadotropin hormone and time for oocyte maturity and ready to be fertilized at a period more than 24 hours. If this problem could be solved then the importation of oocytes could be cheaper and easier than importation of life animals or embryos. Ovaries were collected from slaughterhouse in Wisconsin. Oocytes were matured in TCM-199 medium in 5% CO₂ incubator and at 30°C enriched with FSH 10 µl/ml, oestradiol 17 β 1µl/ml and 10 % FCS as control of gonadotropin hormone treatment (A); with FSH 10 µl/ml (B); with oestradiol 17 β 1µl/ml (C) and without gonadotropin hormone (D) for 24 hours, 30 hours and 36 hours as time of maturation treatment I, II and III respectively. The oocytes were fertilized *in vitro* with motile sperm selection by Percoll gradient and incubation between sperm and oocytes in fertilization media (TALP) for 20 hours. All zygotes were cultured in modification of KSOM medium up to blastocyst and were fed serum 5 µl/50 µl medium on day 6. Data were analyzed by SAS program. Percentage of cleavage between time of maturation were significant (p<0.01); between gonadotropin hormone treatment A vs B and A vs C and B vs C and B vs D and between A vs D were significant (p<0.01), but between treatment C vs D were not significant (p>0.05). Percentage of blastocyst between time of maturation were not significant (p>0.05), but between gonadotropin hormone treatment A vs B and A vs C and B vs D and C vs D were significant (p<0.01), but between treatment A vs D and B vs C were not significant (p>0.05). Percentage of cleavage, morula, blastocyst, expanded blastocyst and unfertilized ova on this study are 66.73%, 22.43%, 40.33%, 0.81% and 32.51% for 24 hours incubation (I); 61.55%, 25.69%, 32.69%, 0.54% and 27.61% for 30 hours incubation (II); 72.43%, 32.06%, 37.97%, 0.0% and 25.31% for 36 hours incubation (III) respectively. According to this study, *in vitro* production of embryo could be conducted at 30°C and incubation on maturation media for more than 24 hours.

Key words: Oocytes, cleavage, embryos, blastocyst

ABSTRAK

TRIWULANNINGSIH, E., M.R. TOELIHERE, J.J. RUTLEDGE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan K. DIWYANTO. 2001. Produksi embrio *in vitro* dengan modifikasi waktu dan hormon gonadotropin selama pematangan oosit. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 171-177.

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium fertilisasi *in vitro* Universitas Wisconsin, Amerika Serikat. Diharapkan embrio yang dihasilkan dapat digunakan sebagai sumber bibit untuk memperbaiki mutu genetik sapi di Indonesia. Salah satu hambatan dalam hal impor oosit dari Amerika Serikat ke Indonesia adalah diperlukan waktu lebih dari 24 jam. Pada kondisi yang normal oosit dimatangkan maksimum selama 24 jam dalam 5% CO₂ inkubator dan suhu 38,5°C. Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh antara hormon dan waktu pematangan oosit dan siap difertilisasi dan dikultur secara *in vitro*. Bila masalah ini dapat diatasi, maka impor oosit menjadi lebih mudah dan murah dibandingkan impor hewan hidup atau embrio beku. Ovari dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan di Wisconsin. Oosit dimatangkan dalam medium TCM-199 dalam 5% CO₂ inkubator dan suhu 30 °C yang diperkaya dengan FSH 10 µl/ml, oestradiol 17 β 1 µl/ml dan 10% FCS sebagai kontrol (A), penambahan FSH 10 µl/ml dan FCS 10% (B) penambahan oestradiol 17 β 1 µl/ml dan 10% FCS (C), tanpa hormon namun tetap diberi FCS 10% (D), selama 24 jam, 30 jam dan 36 jam sebagai perlakuan lama pematangan I, II dan III. Oosit difertilisasi secara *in vitro* dengan sperma motil yang telah diseleksi dengan menggunakan metode Percoll *gradient* dan inkubasi antara sperma dan oosit dalam media fertilisasi selama 20 jam. Semua zigot dikultur dalam media KSOM yang dimodifikasi sampai blastosis dan *feeding* serum pada hari ke 6. Data yang diperoleh dianalisis dengan program SAS untuk mengetahui apakah oosit dapat dikultur lebih dari 24 jam pada suhu 30 °C. Persentase *cleavage* antar perlakuan waktu pematangan berbeda sangat nyata

($p < 0,01$), tetapi antar perlakuan penggunaan hormon gonadotropin A vs B dan A vs C dan B vs C dan B vs D serta antara A vs D berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) tetapi antara C vs D tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Persentase blastosis antar waktu pematangan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), tetapi antar perlakuan hormon gonadotropin A vs B dan A vs C dan B vs D serta C vs D berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) tetapi antara A vs D dan B vs C tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Rataan persentase *cleavage*, morula, blastosis, *expanded blastosis* dan *unfertilized ova* pada penelitian ini masing-masing adalah sebagai berikut: 66,73%, 22,43%, 40,33%, 0,81% dan 32,51% untuk perlakuan pematangan 24 jam (I); 61,55%, 25,69%, 32,69%, 0,54%, dan 27,61% untuk perlakuan pematangan 30 jam (II); 72,43%, 32,06%, 37,97%, 0,0% dan 25,31% untuk perlakuan pematangan 36 jam (III). Berdasarkan hasil penelitian ini maka produksi embrio *in vitro* dapat dilakukan dalam suhu incubator 30°C selama lebih dari 24 jam.

Kata kunci: Oosit, *cleavage*, embrio, blastosis

PENDAHULUAN

Ternak dengan komposisi genotipe unggul yang mampu memproduksi maksimal dalam lingkungan tropis dapat direkayasa melalui teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) dengan memanfaatkan oosit sapi dari Rumah Potong Hewan (RPH) yang diketahui rata-rata produksi susunya tinggi dan difertilisasi dengan menggunakan semen pejantan unggul. Nilai ekonomis teknologi FIV perlu ditingkatkan dengan cara optimalisasi setiap tahapan proses FIV (teknik pengumpulan sel telur dari folikel <5 mm, maturasi, fertilisasi dan pembiakan/kultur). Beberapa laporan telah banyak menunjukkan keberhasilan memproduksi embrio secara FIV dengan menggunakan sel telur dari RPH akan tetapi hasil yang didapat masih sangat bervariasi antar laboratorium yang mungkin disebabkan oleh metode maupun ketrampilan yang berbeda dari setiap individu peneliti.

AZAMBUJA *et al.* (1998) melaporkan bahwa pada penelitian penurunan suhu saat maturasi dari 39°C (kontrol) dibandingkan dengan 20°C, 10°C dan 0°C kemudian difertilisasi dan dikultur secara *in vitro* selama 7 hari, menghasilkan derajat fertilisasi yang berbeda ($p < 0,05$), dimana masing-masing pada 39°C (73,2%), 20°C (58,6%), 10°C (47,3%) dan pada 0°C (36,9%); derajat *cleavage* masing-masing 58,3%, 45,3%, 15,7% dan 7,0%; persentase blastosis masing-masing 16,5%; 7,1%; 0,0% dan 0,9%. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penurunan suhu pada saat pematangan oosit sangat mempengaruhi derajat fertilisasi dan diikuti dengan penurunan derajat *cleavage* dan selanjutnya perkembangan embrio.

Pada penelitian penggunaan ko-kultur *monolayer* BOEC (*Bovine Oviduct Epithelial Cells*) dengan penggunaan *human serum* (HS) dibandingkan dengan medium Menezo B₂ telah dilaporkan oleh KATSKA *et al.* (1995) ternyata bahwa persentase blastosis hari ke 7 masing-masing 40,1% untuk perlakuan A (BOEC + B₂), 34,5% dan 12,3% masing-masing untuk perlakuan B (BOEC + B₂+HS) dan perlakuan C (B₂ +HS). PROKOFIEV *et al.* (1992) melaporkan bahwa maturasi sel telur selama 18 jam atau 24 jam tidak berbeda nyata, dimana sel telur dimaturasi dalam TCM-199 (*Tissue Culture Medium*) yang diberi 15% ECS (*estrous cow*

serum) dibandingkan dengan *reindeer serum* (umur 2-3 bulan) dan 1 mg/ml estradiol-17 β , 0,5 mM glutamine, 10 mM Hepes dan kanamycin 75 mg/ml dalam 5% inkubator CO₂ dan suhu 39°C. Fertilisasi dengan semen beku yang *dithawing* dalam air bersuhu 37 °C, dengan prosedur *swim-up* dengan media TALP (*Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*) yang diberi BSA (*Bovine Serum Albumin*) 6 mg/ml dan heparin 5 unit/ml. Persentase *cleavage* embrio antara yang dimaturasi selama 18 jam dan 24 jam masing-masing adalah 71 % dan 75,9%, sementara persentase blastosis berturut-turut adalah 25,6% dan 24,2%. Sedangkan pengaruh penggunaan *reindeer serum* terhadap perkembangan blastosis dibandingkan ECS (*Estrous Cow Serum*) adalah 16,2% dan 24,8%. Pengaruh perkembangan embrio yang dikultur dengan menggunakan *oviductal cell monolayer* kelinci dibandingkan dengan yang dikultur dalam *oviductal cell monolayer* sapi diteliti pada penelitian ini dan ternyata persentase blastosis yang berkembang pada *oviductal cell monolayer* kelinci adalah 16,3 % sementara yang pada sapi adalah 24,0%. Penggunaan serum sapi umum dipakai dalam prosedur FIV, namun selama kultur embrio tersebut mungkin dapat terinfeksi virus melalui serum yang digunakan; penggunaan *reindeer serum* dimaksudkan untuk mengeliminasi resiko infeksi virus. Penggunaan serum dari species lain (*reindeer*) membuktikan bahwa sel telur sapi dapat dikultur tidak hanya dengan serum sapi, disamping harganya yang murah di Rusia dimana penelitian ini dilakukan. Dari 93 embrio yang telah ditransfer pada resipien, 12 ekor telah berhasil lahir hidup. Sinkronisasi antara resipien dan embrio sangat mempengaruhi derajat kebuntingan.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.* (1998) membandingkan anak-anak sapi dari hasil IVP (*in vitro embryo production*) (944 ekor dari 2.228 embrio yang ditransfer atau sekitar 42,4%) dengan 2.787 ekor anak hasil inseminasi buatan (IB), ternyata bahwa anak sapi dari hasil IVP berat lahirnya 10% lebih berat dibandingkan anak sapi hasil IB dan masa kebuntingan sekitar 3 hari lebih lama. IVP berasal dari oosit yang dikoleksi dari 63 donor secara OPU (*ova pick up*) dua kali per minggu, dibawa dalam media Hepes (*N*-[2-Hydroxyethyl]piperazine-*N'*[2-ethanesulfonic acid])

dan dimaturasi dalam TCM-199 yang diberi 10% FCS (*Fetal Calf Serum*) dan FSH/LH (*Follicle Stimulating Hormone/Luteinizing Hormone*) dan diinkubasi di inkubator CO₂ pada suhu 38,5°C selama 22-24 jam setelah koleksi, kemudian difertilisasi dengan semen beku yang telah *dithawing* dan sperma yang baik dipisahkan dengan metode Percoll *gradient*. Inkubasi dengan sperma selama 18 jam lalu zigot ditransfer dalam 0,5 ml TCM-199 yang ditambah 10% FCS ke BRL (*Buffalo Rat Liver*) *cell monolayer*. Setelah 7 hari embrio dievaluasi dan embrio yang bagus ditempatkan dalam 0,25 ml minisraw dalam medium TCM-199 (suhu 25°C) atau dalam *Emcare* (suhu 15°C) dan ditransfer segar pada resipien yang mempunyai siklus estrus normal dan sebagian embrio (*expanded* blastosis) dibekukan secara konvensional dengan 10% gliserol sebagai krioprotektan. Konfirmasi kebuntingan pada hari ke 90 dan 180 dilakukan secara palpasi rektal. Berat lahir anak sapi hasil IVP sangat ditentukan pada metode kultur zigot, umumnya anak sapi yang berasal dari embrio yang dikultur dengan SOF (*Synthetic Oviduct Fluids*) mempunyai berat lahir lebih besar dibandingkan dengan yang dikultur dalam CR_{1aa}, demikian pula yang dikultur dalam BRL *cell monolayer*. Hal ini mungkin pada media SOF dan BRL kandungan nutrisinya lebih bagus karena setiap 48 jam dilakukan penggantian media kultur, sedangkan pada media CR_{1aa} tidak dilakukan penggantian media kultur dan hanya pada hari ke 6 ditambahkan FCS. Jadi bila sejak awal perkembangan embrio tersebut mendapat nutrisi yang terlalu bagus dapat menyebabkan distokia yang tidak hanya disebabkan oleh faktor genetik saja.

MATERI DAN METODE

Pematangan Oosit Secara *in vitro*

Ovaria dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan di Milwaukee, Green Bay dan Madison, Negara Bagian Wisconsin, USA segera setelah sapi FH betina dipotong. Sebelum dipotong sapi-sapi tersebut telah diperiksa oleh tim kesehatan veteriner (USDA) secara intensif. Jadi sapi yang dipotong adalah hanya sapi yang betul-betul sehat. Hal ini dapat diamati dari ovaria yang terkumpul yang langsung diambil dari abdomen sapi lalu ditempatkan dalam termos air panas tanpa medium fisiologis. Ovaria yang terkumpul segera dibawa ke Laboratorium fertilisasi *in vitro* Department of Animal Science, University of Wisconsin. Ovaria dicuci dengan air suam-suam kuku dan ditempatkan dalam gelas piala di dalam penangas air bersuhu 37°C. Oosit diaspirasi dengan menggunakan pompa vakum yang bertekanan 5-7 *psi* dengan jarum suntik berukuran 18 G dan tabung kerucut bervolume 50 ml langsung dari folikel berdiameter sekitar 2-5 mm tanpa menggunakan

medium dan folikel yang besar serta *bloody follicles* harus dihindari agar tidak mempengaruhi saat pengumpulan oosit. Oosit dan cairan folikel di pindahkan ke cawan peitri bergaris yang berdiameter 10 cm dengan menggunakan pipet Pasteur yang panjang. Oosit dicuci tiga kali dalam medium TL Hepes steril. Setelah pencucian, 10 oosit ditempatkan dalam setiap drop (50 µl) medium pematangan yang terdiri atas TCM-199 yang diperkaya dengan FSH 10 µl/ml, estradiol 17 β 1 µl/ml dan 10% FCS (perlakuan A), dibandingkan dengan TCM-199 + FSH 10 µl/ml + 10 % FCS (B), TCM-199+ estradiol 17 β 1 µl/ml + 10% FCS (C) dan D tanpa hormon gonadotropin namun tetap diberi 10% FCS dan disimpan di dalam 5% inkubator bersuhu CO₂ bersuhu 30°C selama 24 jam, 30 jam dan 36 jam masing-masing sebagai perlakuan I, II dan III.

Fertilisasi *in vitro*

Sperma beku yang digunakan dicairkan terlebih dahulu dalam penangas air 35°C, kemudian diletakkan di atas lapisan larutan Percoll 45% (500 µl) dan 90% (500 µl) dalam tabung kerucut bervolume 2 ml dan di centrifuge 2.200 rpm (700 G) selama 7 menit, lalu supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml TL Hepes dan di-centrifuge lagi selama 2 menit, supernatan dibuang sebanyak 900 µl kemudian filtrat dihitung konsentrasinya dengan menggunakan haemocytometer, untuk penelitian ini diperlukan konsentrasi 1-2.5 x 10⁶ spermatozoa/ ml guna menghindari polyspermia (TRIWULANNINGSIH *et al.* (2001).

Oosit yang sudah dimatangkan sesuai perlakuan, dicuci sebanyak dua kali dengan larutan TL Hepes dan 10 oosit ditempatkan dalam setiap 44 µl drop medium fertilisasi yang berupa modifikasi TALP (*Tyrod Albumin Lactate Pyruvate*) kemudian ditambahkan 2 µl sperma, ditambahkan 2µl heparin dan 2µl phe (*penicillamine hypotaurine epinephrine*), kemudian disimpan dalam 5% CO₂ inkubator yang bersuhu 39°C selama 24 jam.

Kultur zigot

Setelah 24 jam oosit diinkubasi dengan spermatozoa, zigot dicuci dengan TL Hepes, di *vortex* selama 3 menit dan dicuci kembali dengan medium TL Hepes sebelum masuk ke dalam drop kultur medium KSOM (*Commercial Synthetic Oviduct Medium*) (20-25 zigot/50 µl medium) selama 8 hari dalam 5% inkubator CO₂ dan suhu 39°C. Pada hari ke 6 diberi serum 5 µl/50 µl medium KSOM. Pada hari ke 7 dikoleksi *expanded* blastosis yang bagus untuk dibekukan dengan menggunakan 1,5 M etilen glikol (untuk *direct transfer*) dan dengan 1,5 M gliserol (untuk *indirect transfer*) sebagai krioprotektan. Zigot masih diamati terus sampai

hari ke 9 untuk melihat yang berhasil *hatched* dan tidak semua blastosis dapat dibekukan. Hanya *expanded* blastosit yang berkualitas bagus akan dibekukan, dengan harapan persentase kebuntingan menjadi tinggi. Semua data yang terkumpul kemudian dianalisis statistik dengan program SAS untuk mengetahui metode pematangan oosit terbaik, seandainya akan dilakukan impor oosit dari luar negeri yang sudah diketahui kualitas produksi susunya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian pengaruh pemberian FSH 10 μ l/ml, estradiol 17 β 1 μ l/ml dan 10% FCS (perlakuan A), penambahan FSH 10 μ l/ml dan 10% FCS (perlakuan B), penambahan estradiol 17 β 1 μ l/ml dan 10% FCS (perlakuan C) serta perlakuan D (tanpa penambahan gonadotropin hormon) namun tetap diberi 10% FCS di dalam media TCM-199 yang dikultur dalam 5% CO₂ inkubator yang bersuhu 30°C selama 24 jam dan 30 jam serta 36 jam (Tabel 1) telah menggunakan masing-masing 483 zigot, 495 zigot dan 397 zigot untuk perlakuan 24 jam, 30 jam dan 36 jam.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase *cleavage* embrio antar perlakuan lama waktu pematangan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$), juga antar perlakuan hormon gonadotropin (Tabel 1) A vs B dan A vs C dan B vs C dan B vs D serta antara A vs D berbeda sangat nyata ($p < 0,01$), tetapi antara C vs D tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Embrio yang membelah dua antara perlakuan hormon gonadotropin dan antara perlakuan waktu maturasi 24 jam vs 30 jam vs 36 jam tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), berarti embrio masih layak untuk difertilisasi setelah 24 jam didalam media pematangan pada suhu 30°C dan bahkan fertilisasi masih dapat ditunda sampai 36 jam kemudian. MONAGHAN (1993) dalam GORDON (1994) memperoleh persentase metaphase II untuk yang dimatangkan selama 18 jam vs 24 jam adalah 81,3% dan 79,7%. Pada perkembangan embrio yang membelah empat, dimana perlakuan gonadotropin hormon maupun perlakuan lama waktu pematangan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hal ini terjadi karena zigot yang bagus terus berkembang menjadi morula dan blastosis, sedangkan embrio yang kurang bagus tetap pada pembelahan dua dan empat sel. Berarti membuktikan bahwa embrio tetap mampu berkembang terus sampai dengan mencapai blastosis walaupun dimatangkan selama 36 jam pada suhu 30°C. Morula yang diperoleh antara perlakuan hormon gonadotropin maupun antara waktu pematangan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa oosit tetap dapat berkembang pada suhu incubator 30°C selama 36 jam. Sedangkan blastosis yang diperoleh dalam penelitian ini antara perlakuan waktu pematangan 24 jam vs 30 jam dan 30 jam vs 36 jam berbeda sangat nyata ($p < 0,01$), tetapi

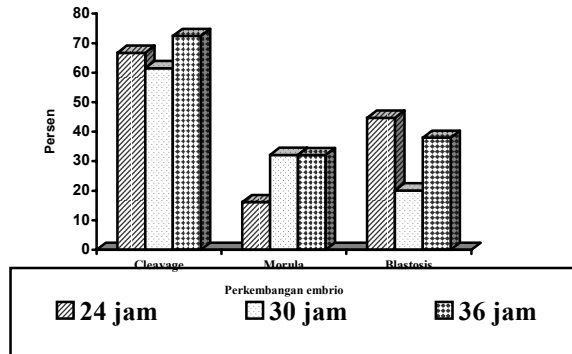
antar waktu 24 jam vs 36 jam tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), sedangkan antar perlakuan hormon gonadotropin A (pemberian FSH dan estradiol 17 β) vs B (pemberian FSH) dan A vs C (pemberian estradiol 17 β) dan B vs D (tanpa hormon) serta C vs D berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) tetapi antara A vs D dan B vs C tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Kemampuan zigot untuk dapat berkembang hingga blastosis sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit, spermatozoa dan media kultur yang digunakan. Urutan rata-rata yang terbesar persentase blastosis yang diperoleh adalah perlakuan A, D, C dan B berturut-turut 43,95%; 43,66%; 31,24% dan 27,31%. Pada penelitian ini terlihat bahwa penambahan FSH dan estrogen pada media pematangan sangat berpengaruh pada perkembangan embrio, sesuai dengan yang telah dinyatakan oleh RUTLEDGE *et al.* (1997), bahwa gonadotropin hormon menginduksi pematangan sel kumulus, selanjutnya penambahan hormon dapat meningkatkan derajat fertilisasi dan perkembangan embrio sampai blastosis. CHIAN *et al.* (1994) menyatakan bahwa sel kumulus sangat penting fungsinya untuk pematangan *cytoplasmic* secara normal pada proses maturasi sel telur *in vitro*. Pada perlakuan lama maturasi 24 jam vs 30 jam vs 36 jam tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). MONAGHAN (1993) dalam GORDON (1994) mendapatkan persentase blastosis pada hari ke7, ke 8 sampai ke 9 pada pematangan selama 18 jam pada suhu 39°C berturut-turut adalah 8,9%; 16,1% dan 18,8% sedangkan persentase *cleavage* 73,6%, tetapi bila lama maturasi 24 jam rata-rata blastosis dan *cleavage* masing-masing 25,9% dan 76,0%. Hasil penelitian ini (37,02 %) lebih tinggi dengan yang telah diperoleh peneliti sebelumnya. TROUNSON *et al.* (1994) menghasilkan persentase blastosis 39% dan blastosis yang terpilih telah ditransfer pada resipien dengan keberhasilan bunting 50%, tetapi disini menggunakan SOF (*Synthetic Oviduct Fluids*) sebagai media kultur, dimana penggantian media kultur dilakukan setiap 48 jam. Berarti keberhasilan produksi embrio sangat tergantung pada penggunaan media kultur dan juga pada keadaan ovarium dan oosit sebelum dilakukan proses FIV, kualitas spermatozoa serta metoda fertilisasi sendiri. *Expanded* blastosis yang diperoleh antara perlakuan hormon gonadotropin maupun perlakuan lama pematangan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), dimana pada perlakuan maturasi 36 jam tidak satupun yang mampu mencapai *expanded* blastosis, walaupun rata-rata blastosisnya lebih besar dibandingkan dengan perlakuan maturasi 30 jam. Persentase ova yang tidak terbuahi pada perlakuan tanpa hormon maupun lama maturasi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), berarti pada penelitian ini terbukti bahwa penambahan hormon sangat mempengaruhi pematangan oosit sesuai dengan yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, seperti halnya yang telah dilakukan oleh IM *et al.* (1995) bahwa persentase sel telur yang mengalami metaphase II

Tabel 1. Pengaruh pemberian hormon gonadotropin dalam media TCM-199 selama 24 jam vs 30 jam vs 36 jam pada suhu 30 °C pada rata-rata persentase perkembangan embrio secara *in vitro* .

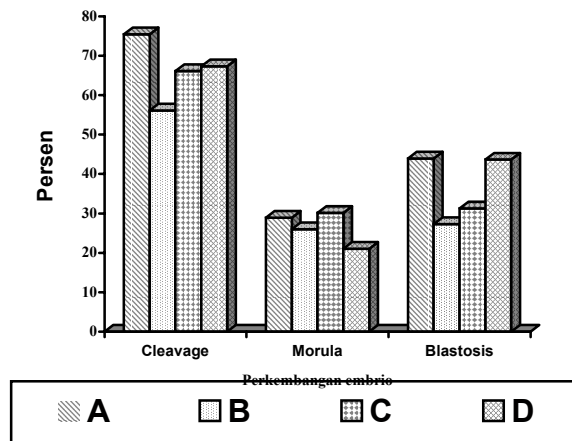
Perkembangan embrio	Rataan 24 jam	Rataan 30 jam	Rataan 36 jam	Rataan
Cleavage A	73.2934	77.4735	75.5989	75.462 a
B	62.1053	35.2193	73.9020	56.086 b
C	59.9206	68.3253	70.2711	66.079 a b
D	71.2563	61.4284	69.8485	67.299 a b
Rata-rata	66.728 a b	61.548 b	72.428 a	66.8333
2 Cells A	1.5038	0.7143	2.1285	2.4556 a
B	3.3772	0.0	3.2468	1.8248 a
C	5.1091	5.8851	0.0	4.0561 a
D	1.8750	2.7915	0.8333	1.5469 a
Rata-rata	2.988 a	2.447 a	1.4171 a	2.303
4 Cells A	40.6064	32.0645	17.6296	29.533 a
B	37.8947	22.2807	28.4992	29.621 a
C	46.0218	26.7603	30.2005	34.657 a
D	29.9468	39.1660	39.1919	35.821 a
Rata-rata	38.599 a	30.671 a	28.159 a	32.6004
Morula A	18.7039	36.2876	31.4691	28.941 a
B	26.8421	27.3684	23.4406	26.027 a
C	21.4881	21.7272	46.0686	30.111 a
D	23.3207	18.5989	21.3384	21.063 a
Rata-rata	16.1457 b	32.1300 a	32.0568 a	26.6082
Blastosis A	50.3307	39.7914	42.0014	43.948 a
B	31.8860	6.1404	47.2147	27.308 b
C	33.3234	40.7130	20.8692	31.241 b
D	44.9242	39.3802	47.6768	43.659 a
Rata-rata	44.7183 a	20.0814 b	37.9666 a	37.0253
Exp.blast A	2.0408	0.6803	0.0	1.2571 a
B	0.0	1.7105	0.0	1.3026 a
C	0.0	0.0	0.0	2.1922 a
D	1.1364	0.0	0.0	1.0638 a
Rata-rata	2.4112 a	1.6743 a	0.0 b	1.4690
Unfertilized A	25.1144	21.1318	18.7193	21.522 a
B	37.8947	22.0614	24.9869	28.510 a
C	38.6905	25.5787	28.4789	31.148 a
D	28.7437	39.2295	30.1515	32.941 a
Rata-rata	32.505 a	27.6135 a	25.3122 a	28.5625
Degenerated A	0.8403	1.3946	0.0	0.7111 b
B	0.0	6.9298	1.1111	2.7726 a
C	1.3889	2.9832	0.0	1.3910 ab
D	0.0	0.0	0.0	0.0000 b
Rata-rata	0.5860 b	2.5794 a	0.2058 b	1.5891

Keterangan: Angka dengan huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

berturut-turut 86,4% untuk yang dikultur dengan TCM-199 yang mengandung 25mM Hepes dan FCS, 011 mg/ml NaPyruvat, 1 µg/ml FSH, 2IU/ml LH, 1 µg/ml E₂ dibandingkan yang tanpa hormon (53,3%) dan yang hanya mengandung FSH (73,3%)



Gambar 1. Pengaruh lama pematangan oosit terhadap perkembangan embrio FIV



Gambar 2. Pengaruh hormon gonadotropin terhadap perkembangan embrio

Pada penelitian ini penundaan waktu maturasi dengan menurunkan suhu CO₂ inkubator bertujuan menghambat metabolisme sel dalam oosit untuk menunda saat metaphase II dimana oosit sudah cukup matang untuk difertilisasi secara *in vitro*, sehingga seandainya dilakukan impor oosit dari negara penghasil sapi yang sudah diketahui mutu genetiknya bagus dapat meningkatkan produksi embrio dan anak sapi secara massal. Dengan teknik FIV dapat juga digunakan untuk melestarikan plasma nutfah yang ada pada suatu negara/daerah tertentu seperti halnya sapi Bali, Anoa (RUTLEDGE, 1996), dapat pula diciptakan suatu individu hibrida yang mempunyai *hybrid vigour* tinggi dan beradaptasi baik dilingkungannya serta berproduksi tinggi. Penambahan serum sangat berpengaruh pada perkembangan embrio sampai blastosis dimana pada penelitian ini telah dilakukan penambahan serum pada

hari ke-6 (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2001) dengan tujuan memberi nutrisi pada embrio yang sedang berkembang agar diperoleh blastosis yang berkualitas pada hari ke 7 dan 8. THOMPSON *et al.*(1998) melaporkan tentang penggunaan SOF medium yang diberi BSA lebih baik dibandingkan dengan FCS atau CT-FCS (*charcoal-treated* FCS).

Embrio yang mengalami degenerasi pada perlakuan hormon antara perlakuan A (pemberian FSH dan estradiol 17 β) dan B (pemberian FSH) dan antara A dan C berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) masing-masing 0,7% vs 2,8% vs 1,4% untuk perlakuan A, B dan C, tetapi antara perlakuan C dan D tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), sedangkan antara perlakuan lama maturasi 24 jam vs 30 jam dan antara 30 jam vs 36 jam berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) tetapi antara lama maturasi 24 jam dan 36 jam tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Pada kelompok oosit yang dimatangkan selama 30 jam lebih banyak embrio mengalami degerasi, hal yang sama pada kelompok yang hanya diberi FSH (B) dan estrogen (C). Hal ini terjadi mungkin pada kelompok oosit ini belum mencapai tahap metaphase II, sehingga belum siap untuk difertilisasi karena setiap individu oosit mempunyai kemampuan sendiri untuk terus berkembang jadi blastosis bila lingkungan mendukung. GORDON (1994) menyatakan bahwa selama maturasi *in vitro*, GVBD (*Germinal Vesicle Break Down*) terjadi dari 3 jam sampai 12 jam dalam media kultur. Sedangkan SIRARD *et al* (1989) yang dikutip oleh GORDON (1994) dalam penelitiannya telah melaporkan bahwa selama maturasi *in vitro*, GV (*Germinal Vesicle*) terjadi dari 0-6,6 jam, GVBD terjadi pada 6,6 – 8,0 jam, kondensasi chromatin pada 8-10,3 jam, metaphase I pada 10,3-15,4 jam, anaphase I pada 15,4– 16,6 jam, telophase I pada 16,6-18,0 jam dan metaphase II pada 18,0-24,0 jam dalam media kultur. Pada penelitian ini telah dilakukan pematangan antara 24 jam sampai 36 jam pada suhu 30°C, berarti sudah pada masa metaphase II. SITUMORANG *et al.* (1998) melaporkan bahwa penambahan hormon gonadotropin ataupun steroid dapat meningkatkan produksi embrio *in vitro* baik secara kuantitas maupun kualitas, tetapi penambahan hormon tunggal tidak mempengaruhi produksi embrio dimana pada penelitian tersebut telah diperoleh rataan pembuahan (60,4%), morula (45,3%) dan blastosis (5,7%). Ternyata hasil yang diperoleh pada penelitian ini lebih baik dibandingkan penelitian sebelumnya, hal ini mungkin disebabkan oleh kualitas ovaria dan oosit serta metode kapasitasi sperma dan fertilisasi dimana pada penelitian terdahulu dilakukan kapasitasi sperma dengan menggunakan 3 lapisan Percoll (30%, 70% dan 90%) masing-masing 1 ml yang dicentrifuge selama 20 menit dengan kecepatan 600 G, setelah supernatan dibuang, pellet sperma dicuci dengan 5 ml TALP medium, dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 300 G.

Pada penelitian ini diusahakan lingkungan dapat mendukung untuk oosit terus berkembang dan kumulus oophorus terus berkembang dalam media pematangan yang diperkaya dengan FSH dan estrogen dimana oosit primer dengan kumulus oophorus terus berkembang, berubah bentuk seperti lapisan ephitelial dan membentuk jaringan yang makin renggang dan bersifat seperti lengket (*sticky matrix*). RUTLEDGE *et al.*, (1997) menyatakan bahwa gonadotropin menginduksi pematangan kumulus dengan cAMP sebagai *second messenger* dan peningkatan level cAMP yang mungkin sebagai penyebab penghambat oosit sehingga *meiotic resumption* tertunda. Namun demikian penambahan hormon pada media pematangan, mengakibatkan derajat fertilisasi dan blastosis meningkat. Selanjutnya GANDOLFI (1994) mengatakan bahwa faktor autokrin yang umumnya berasal dari embrio sendiri yang memungkinkan embrio untuk berkembang dan faktor parakrin yang antara lain adalah faktor pertumbuhan (*growth factors*) dan protein spesifik yang berasal dari embrio yang bersama-sama dikultur dalam satu drop media ikut berperan dalam perkembangan embrio *in vitro*. Pada akhir-akhir ini penelitian pengaruh penambahan *growth factors* dalam media kultur pada berbagai variasi status embrio mulai dari pematangan oosit telah banyak dilakukan. Sementara itu penambahan mineral oil dapat mengurangi penguapan dan terutama memproteksi terjadinya kontaminasi mikroba, mempertahankan temperatur dan fluktuasi gas dan juga memudahkan pengamatan.

KESIMPULAN

Oosit dapat dikultur dalam media TCM-199 dengan suhu 30°C, sampai selama 36 jam dan setelah difertilisasi dapat terus berkembang hingga blastosis.

Penggunaan hormon gonadotropin boleh tidak diberikan pada media pematangan oosit sampai 36 jam, guna menghambat metabolisme sel oosit.

Kemampuan oosit yang mengalami *cleavage* memperlihatkan keadaan oosit tersebut telah cukup matang untuk difertilisasi, namun kemampuan untuk mencapai blastosis dan bahkan *expanded* blastosis sangat dipengaruhi oleh media kultur disamping oleh kualitas oosit dan spermatozoa sendiri.

DAFTAR PUSTAKA

AZAMBUJA, R.M., D.C. KRAEMER and M.E. WESTHUSIN. 1998. Effect of low temperatures on *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology* 49: 115-1164.

CHIAN, R.C., K. NIWA and M.A. SIRARD. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1449-1508.

GANDOLFI, F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41.

GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International.

IM, K.S., H.J. KIM, K.M. CHUNG, H.S. KIM and K.W. PARK. 1995. Effects of ovary tipe, oocytes grade, hormone, sperm concentration and fertilization medium on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *AJAS* 8:123-127.

KATSKA, L., B.RYN'SKA and Z.SMORAG. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology* 43:859-870.

PROKOFIEV, M.I., L. K.ERNST, N. M.SURAEVA, I.S. LAGUTINA, N.N. UDAVLENNIKOVA, A. Z.KESYAN and A.I. DOLGOHATSKY. 1992. Bovine oocytes maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology* 38:461-469.

RUTLEDGE, J.J. 1996. Cattle production systems based on *in vitro* embryo production. *Journal of Reproduction and Development*. Vol.42.Suppl.

RUTLEDGE, M.L.L., T.DOMINKO, E.S. CRITSER and J.K. CRITSER. 1997. *Tissue Maturation In Vivo and In Vitro: Gamete and Early Embryo Ontogeny*. Reproductive Tissue Banking.Academic Press.

SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, A. LUBIS, N. HIDAYATI dan T SUGIARTI. 1998. Pengaruh penambahan hormon pada medium pematangan terhadap produksi embrio secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. Vol.3:22-26.

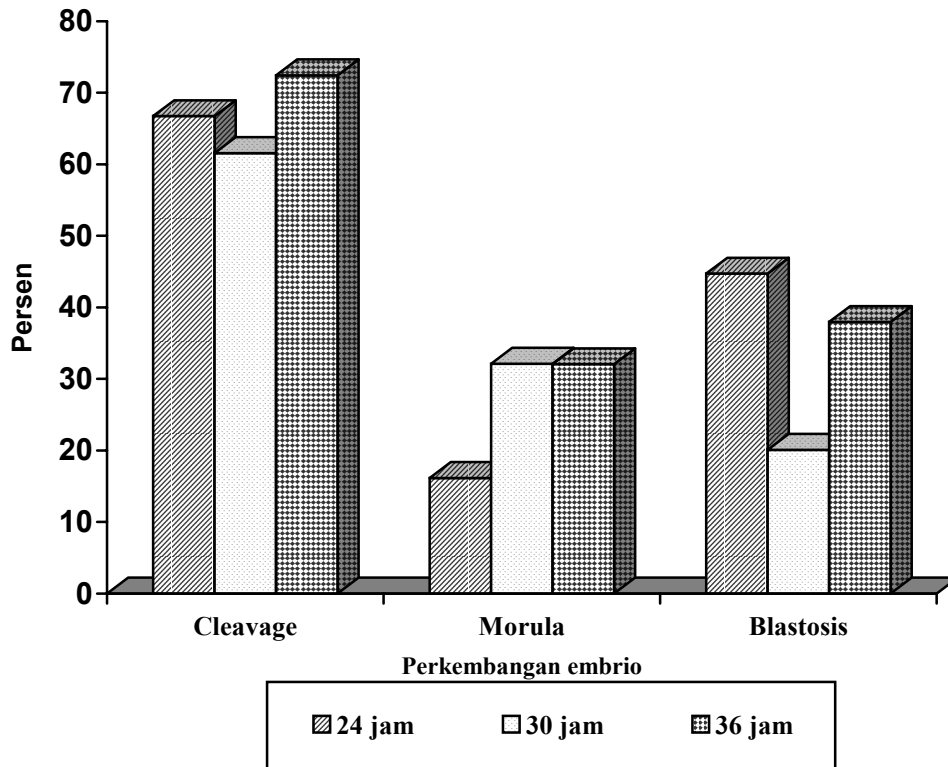
TROUNSON, A., D. PUSHETT, I.J. MACLELLAN, I.N. LEWIS and D.K. GARDNER. 1994. Current status of *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (FIV) and embryo culture in human and farm animal. *Theriogenology* 41:51-66

THOMPSON, J.G., N.W. ALLEN, L.T. MCGOWAN, A.C.S. BELL, M.G. LAMBERT and H.R. TERVIT. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 49: 1239-1249.

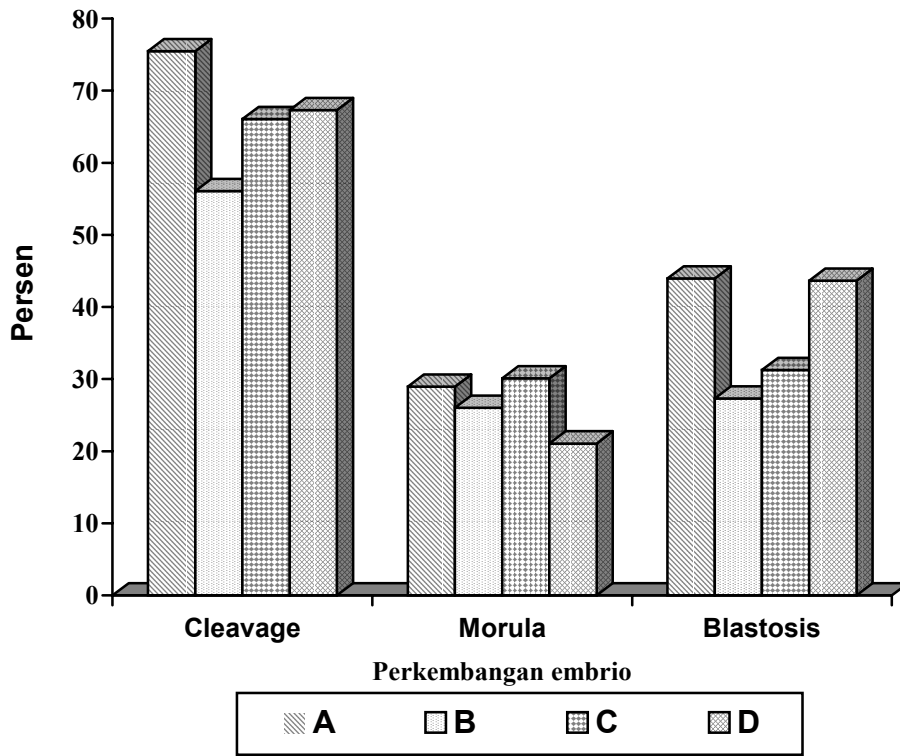
TRIWULANNINGSIH, E., M. R.TOELIHIERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan K. DIWYANTO. 2001. Seleksi dan kapasitas spermatozoa dengan metode *Percoll gradient* untuk fertilisasi oosit dan produksi embrio *in vitro* pada sapi. (*Unpublished*).

TRIWULANNINGSIH, E., M.R.TOELIHIERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan K. DIWYANTO. 2001. Peningkatan persentase blastosis melalui berbagai metode *feeding* serum dalam produksi embrio sapi *in vitro*. (*Unpublished*).

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M., B.J.G. AERTS and J.H. G.DEN DAAS. 1998. Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49; 883-894.



Gambar 1. Pengaruh lama pematangan oosit terhadap perkembangan embrio FIV



Gambar 2: Pengaruh hormon gonadotropin terhadap perkembangan embrio