

## PEMAKAIAN ETHYLEN GLYCOL DAN GLYCEROL UNTUK VITRIFIKASI EMBRIO KAMBING IN VITRO

Yohan Rusiyantono<sup>1,2</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>, Yuhara Sukra<sup>2</sup>, Mezes R Toelihere, Iman Supriatna<sup>3</sup> dan Bambang Purwantara<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorium Reproduksi Universitas Tadulako Palu

<sup>2</sup>Laboratorium Embriologi Bagian Anatomi FKH IPB

<sup>3</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan FKH IPB

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk melihat ketahanan hidup dan viabilitas embrio setelah vitrifikasi dalam medium yang mengandung Ethylen Glycol dan Glycerol. Embrio kambing dalam berbagai tahap perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* dipapar dalam medium vitrifikasi yang terdiri dari medium dasar Phosphat Buffer Saline (PBS) yang ditambahkan Bovine Serum Albumine (BSA) 3%, Sukrosa 0.3 M dan Ethylen Glycol (EG) 30% atau Glycerol (G) 30%. Untuk melihat ketahanan hidup embrio, terlebih dahulu embrio dipapar dalam medium vitrifikasi yang mengandung EG 10% atau G 10% selama 5 menit, dilanjutkan dengan pemaparan dalam medium vitrifikasi yang mengandung EG 30% atau G 30% selama 10, 30, dan 60 detik. Kemudian embrio dicuci untuk menghilangkan krioprotektan, evaluasi dilakukan setelah 20 menit dengan pewarnaan Hoechst (H) dan Propidium Iodine (PI). Sedangkan untuk melihat viabilitas embrio setelah dilakukan vitrifikasi, embrio yang telah dipapar dilakukan vitrifikasi dengan cara menguapkan secara langsung selama 10 detik diatas nitrogen cair kemudian dimasukkan dalam nitrogen cair. Untuk mengetahui tingkat ketahanan hidup dan viabilitas embrio setelah vitrifikasi dilakukan evaluasi menggunakan pewarna H dan PI dengan konsentrasi masing-masing 10 ug/ml (Pengamatan dibawah mikroskop fluorescens). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata tingkat ketahanan hidup embrio kambing dalam medium yang mengandung krioprotektan adalah 65, 55 dan 40 % (ethylen glycol) dan 50, 35 dan 30 % (glycerol) berturut-turut untuk 10, 30 dan 60 detik. Rataan viabilitas embrio kambing setelah divitrifikasi adalah 45% untuk ethylen glycol sedangkan untuk glycerol 24%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ethylen glycol memberikan viabilitas yang lebih tinggi dan angka kematian embrio yang lebih rendah dibandingkan dengan glycerol.

**Kata kunci:** embrio kambing, vitrifikasi, ethylen glycol, glycerol, viabilitas.

### PENDAHULUAN

Perkembangan teknik Fertilisasi *In vitro* (FIV) untuk memproduksi embrio secara komersial telah mengalami kemajuan sangat pesat (Gordon dan Lu, 1990). Perkembangan teknologi di bidang reproduksi memungkinkan penyimpanan embrio dalam waktu yang lama dan pelaksanaan transfer embrio pada lokasi

yang berlainan. Pembekuan embrio dengan metode konvensional mampu menghasilkan angka kebuntingan pada ternak sapi berkisar antara 50 – 60 % (Niemann, 1991). Vitrifikasi adalah metode pembekuan embrio dengan mencegah terbentuknya kristal es (Rall, 1992). Perlakuan dilakukan dengan cepat sehingga dibutuhkan krioprotektan dalam konsentrasi

yang tinggi. Konsekuensi dari penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi menimbulkan konsekuensi toksisitas pada embrio. Konsentrasi krioprotektan yang optimal merupakan perpaduan antara jumlah yang dibutuhkan untuk melindungi embrio dan tidak menimbulkan toksisitas pada embrio (Szell dan Windsor, 1994). Lebih lanjut dikatakan bahwa telah dilakukan penelitian mengenai konsentrasi optimum krioprotektan yang sangat bervariasi tergantung dari jenis krioprotektan yang digunakan.

Krioprotektan adalah zat yang dapat mencegah terjadinya kerusakan sel selama proses kriopreservasi (meningkatkan viabilitas sel setelah kriopreservasi). Krioprotektan dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu krioprotektan intraseluler (glycerol, DMSO, ethylen glycol, 1,2 propanediol) dan ekstraseluler (sukrose, rafinosa, protein, lipoprotein, kuning telur serum, PVP) (Scidel, 1990).

Pemilihan krioprotektan untuk proses pembekuan tergantung pada spesies dan tahap perkembangan embrio. Pada embrio domba dan sapi, penggunaan ethylen glycol mempunyai permiabilitas lebih baik dibandingkan dengan glycerol (Voekel dan Hu, 1992), (Saha, 1996). Masih sedikit informasi yang diperoleh mengenai pembekuan embrio kambing hasil fertilisasi *in vitro*. Tujuan penelitian ini: a) adalah untuk mengetahui tingkat ketahanan hidup embrio kambing dalam medium vitrifikasi yang mengandung krioprotektan dalam waktu pemaparan yang berbeda, b) melihat viabilitas embrio kambing setelah proses pembekuan dengan metode vitrifikasi.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Fertilisasi *In Vitro* Kambing**

Ovari kambing diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) dengan menggunakan medium NaCl fisiologis pada suhu 30-35 °C. Koleksi oosit dilakukan dengan metode aspirasi pada folikel yang berukuran 2-5 mm dengan

menggunakan jarum 20 G yang dihubungkan dengan spuit berukuran 5 ml yang sebelumnya diisi medium modifikasi fosfat buffer saline (mPBS, Gibco BRL USA). Oosit yang diperoleh kemudian dicuci dua kali dalam medium pematangan oosit yang meliputi CR1aa yang ditambahkan Newborn Calf Serum (NCS) 5%, Follicle Stimulating Hormone (FSH, Sigma USA) 0.01 mg/ml dan gentamicin sulfat 50ml/ml (Gibco USA). Pematangan oosit dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 38.5 °C selama 24 jam. Setelah pematangan oosit, dilakukan fertilisasi menggunakan sperma segar kambing yang berasal dari ejakulat pejantan. Pencucian dilakukan dengan cara sentrifugasi sebanyak dua kali dengan kecepatan 500 G selama 5 menit dalam medium CR1aa yang ditambah caffeine (Sigma, USA) 2.5nM, BSA 0.3% dan heparin (Sigma, USA) 20 ml/ml. Oosit yang sudah matang, dicuci dengan menggunakan medium fertilisasi sebanyak 2 kali kemudian dilakukan fertilisasi dalam medium drop sebanyak 100 ml (5.10<sup>6</sup> spermatozoa/ml) yang berisi 20-30 oosit per drop. Fertilisasi dilakukan selama 8 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 38.5°C. Sigot hasil fertilisasi *in vitro* dicuci dalam medium kultur (CR1aa) yang ditambah insulin 5 mg/ml, gentamicin sulfat 50 mg/ml dan NCS 10%. Kultur *in vitro* dilakukan dengan sistem ko-kultur menggunakan. Perkembangan embrio mencapai tahap morula (hari kelima setelah fertilisasi) digunakan sebagai sampel embrio.

### **Percobaan I**

Embrio yang diperoleh dari hasil kultur *in vitro* dipaparkan dalam medium yang mengandung krioprotektan Ethylen Glycol 10% atau Glycraol 10% dalam waktu 5 menit, kemudian embrio dipapar dalam medium yang mengandung krioprotektan (30 % gliserol atau 30 % etilen Glikol) selama 10, 30 dan 60 detik. Setelah dilakukan pemaparan embrio dicuci dalam medium mPBS dan dilanjutkan dengan evaluasi terhadap ketahanan embrio, tan

prosedur pembekuan (vitrikikasi).

#### Percobaan II

Embrio yang diperoleh dari hasil kultur in vitro dipisahkan untuk dilakukan pembekuan dengan menggunakan metode vitrikikasi. Embrio dipapar dalam medium V-I (mPBS + 0.3% BSA + 10% G atau 10% EG) selama 5 menit, kemudian embrio dipindahkan ke dalam medium V-II (mPBS + 0.3% BSA + 0.3 M Sukrosa + 10% G atau 10% EG) selama 5 menit vitrikikasi dilakukan dalam medium V-III (mPBS + 0.3% BSA + 0.3 M Sukrosa + 30% G atau 30% EG), dengan cara menguapkan dalam uap nitrogen cair selama 10 detik, kemudian dimasukkan dalam nitrogen cair.

#### Evaluasi Embrio

Untuk melihat ketahanan hidup embrio dalam medium vitrikikasi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Hoechst yang terdiri dari propidium iodine (PI, 10 mg/ml) dan bis benzimide (10 mg/ml) untuk melihat prosentase hidup dan mati. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop fluorescens.

Viabilitas embrio setelah vitrikikasi dilihat dengan menggunakan pewarnaan Hoechst yang terdiri dari propidium iodine (PI, 10 mg/ml) dan bis benzimide (10 mg/ml) untuk melihat

prosentase hidup dan mati. Pengamatan menggunakan mikroskop fluorescens.

#### HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketahanan hidup embrio dalam medium yang mengandung 30% Ethylen glycol adalah 65%, 55% dan 40% berturut-turut untuk paparan dalam waktu 10 detik, 30 detik dan 30 detik. Sedangkan ketahanan hidup embrio dalam 30% Glycerol adalah 50%, 35% dan 30% berturut-turut untuk paparan 10, 30 dan 60 detik (Tabel 1).

Viabilitas embrio kambing setelah proses pembekuan vitrikikasi adalah 45% dan 24%, berturut-turut untuk ethylen glycol dan glycerol (Tabel 2).

#### PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini Ethylen glycol memberikan ketahanan hidup embrio yang lebih tinggi dibandingkan dengan glycerol. Hasil ini sesuai dengan yang dipaparkan Kasai (1996) bahwa embrio yang dipapar dalam medium yang mengandung krioprotektan ethylen glycol memberikan ketahanan hidup yang lebih baik dibandingkan dengan krioprotektan Glycerol dan DMSO. Sebagai konsekuensi penggunaan

Tabel 1. Paparan Embrio Kambing dalam Krioprotektan pada Waktu yang Berbeda

Jenis Krioprotektan	Waktu Paparan (dt)	Jumlah Embrio	Evaluasi Embrio	
			Hidup	Mati
30% Ethylen Glycol	10	30	19(65%)	11(35%)
	30	22	13(55%)	13(45%)
	60	26	11(40%)	15(60%)
30% Glycerol	10	18	9(50%)	9(50%)
	30	29	8(35%)	11(65%)
	60	20	6(30%)	14(70%)

Tabel 2. Viabilitas Embrio Kambing Setelah Pembekuan dengan Metode Vitrifikasi

Medium Vitrifikasi	Jumlah Embrio	Evaluasi Embrio	
		Hidup	Mati
PBS + EG (30%)	58	26 (45%)	32 (55%)
PBS + Glis (30%)	37	9 (24%)	28 (76%)

krioprotektan dengan konsentrasi tinggi mengakibatkan embrio tidak mampu bertahan hidup. Disamping itu dari hasil penelitian menunjukkan bahwa lamanya waktu paparan embrio dalam medium yang mengandung krioprotektan akan mempengaruhi ketahanan hidup embrio. Apabila krioprotektan mempunyai kemampuan menembus dinding sel secara cepat akan mengakibatkan pencegahan terhadap perubahan osmotik yang besar. Strategi untuk menghindari toksisitas dari larutan vitrifikasi adalah dengan mempercepat waktu paparan embrio dalam larutan vitrifikasi. Jika waktu paparan terlalu cepat, maka tidak cukup krioprotektan yang masuk menggantikan air sehingga dapat terbentuk kristal es intraseluler. Oleh karena itu dibutuhkan waktu paparan yang tepat untuk keberhasilan vitrifikasi. Dari hasil penelitian dengan menggunakan etilen glikol, embrio dipaparkan pada suhu 20°C, memberikan survival yang tinggi setelah dipaparkan dalam waktu yang singkat (30 detik sampai 5 menit). Penggunaan DMSO, acetamida dan propilen glikol sebagai krioprotektan menunjukkan toksisitas yang cukup tinggi dengan waktu paparnya 10 detik (Nakagata, 1989).

Pemakaian krioprotektan yang tinggi dalam medium vitrifikasi mempengaruhi viabilitas embrio setelah thawing. Etylen glycol mempunyai kemampuan masuk dan keluar sel yang lebih cepat dibandingkan dengan glycerol. Hal ini disebabkan oleh berat molekul etilen glikol lebih kecil dibandingkan dengan gliserol. Kemampuan etilen glikol untuk menembus

masuk dan keluar sel dalam waktu yang lebih singkat mempengaruhi viabilitas embrio. Disamping itu dari uji toksisitas yang telah dilakukan menunjukkan etilen glikol mempunyai toksisitas yang lebih kecil dibandingkan dengan gliserol sehingga memberikan viabilitas embrio yang lebih tinggi.

#### KESIMPULAN

1. Ketahanan hidup embrio kambing dalam medium vitrifikasi lebih tinggi dalam waktu paparan lebih cepat (10 detik).
2. Ketahanan embrio kambing dalam medium vitrifikasi yang mengandung ethylen glycol sebagai krioprotektan lebih tinggi dibandingkan dengan glycerol.
3. Etylen Glycol sebagai krioprotektan memberikan viabilitas yang lebih tinggi pada embrio kambing setelah vitrifikasi dibandingkan dengan glycerol.

#### PENGHARGAAN

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat kontrak nomor: 011/P21PT/DPPM/20/PHB/VII/3/V/2000, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Dirjen Dikti DIKNAS.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Gordon I and Lu KH. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 33: 77-87.

- Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci.* 42: 67-75.
- Nakagata, N. 1989. Survival of mouse embryo derived from *in vitro* fertilization after ultrarapid freezing and thawing. *dalam* Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci.* 42: 67-75.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35: 109-124.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos. Methods and applications. *Anim Reprod Sci.* 28: 237-245.
- Seidel, G.E. 1990. Principles of cryopreservation of cells. *Short Course Procc. Colorado.*
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C and T. Suzuki 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology.* 33: 291-299.
- Szell, A.Z. and D.P. Windsor. 1994. Survival of vitrified sheep embryos *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology.* 42: 881-889.
- Vockel, S.A. and Hu, Y.X. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to females. *Theriogenology.* 37: 687-697.