

EFEKTIVITAS FAKTOR PERTUMBUHAN TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO *in vitro*

THE EFFECTIVITY OF GROWTH FACTORS ON *in vitro* EMBRYO DEVELOPMENT

Endang Tri Margawati

R&D Centre for Biotechnology LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, INDONESIA,
Telp. (021) 8754587, Faks. (021) 8754588, e-mail : endangtri@hotmail.com

ABSTRAK

Media Veteriner. 1999. 6(3): 27-34

Perkembangan embrio secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor pertumbuhan. Pada perkembangan embrio secara *in vivo*, faktor pertumbuhan berasal dari embrio preimplantasi yang berperan secara autokrin dan dari saluran telur (*oviduct*) dan uterus yang berperan secara parakrin. Pada hewan mencit, kerja *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF) akan mencapai puncaknya pada umur kebuntingan 4 hari dan menurun pada kebuntingan 5 hari bersamaan terjadinya implantasi. Selain LIF, *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor* α dan β (TGF α dan β), *Insulin-like Growth Factor-I* dan $-II$ (IGF-I dan $-II$), dan *Platelet-activating Factor* (PAF) berperan positif pada perkembangan embrio *in vitro* sampai ke tahap preimplantasi. Faktor pertumbuhan autokrin mulai diperlukan pada perkembangan embrio tahap 2-sel. Perantara parakrin diperkirakan untuk mempersiapkan lingkungan mikro yang optimal dalam perkembangan embrio preimplantasi. Beberapa faktor pertumbuhan dan Interleukin-1 β dapat meningkatkan viabilitas embrio yang dihasilkan secara *in vitro*.

Kata-kata kunci: faktor pertumbuhan, autokrin, parakrin, embrio preimplantasi *in vitro*

ABSTRACT

Media Veteriner. 1999. 6(3): 27-34

Many factors influence embryo development *in vitro*. On *in vivo* embryo development, growth factors derived from preimplantation embryos participate in an *autocrine* pathway and growth factors from the *oviduct* and uterus act in *paracrine* pathway. In mice, expression of leukemia inhibitory factor (LIF) will achieve the peak expression at day-4 and tend to decrease at day-5 of gestation when implantation has occurred. Several growth factors such as LIF, *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor*- α and $-\beta$ (TGF- α and $-\beta$), *Insulin-like Growth Factor-I* and $-II$, and *Platelet-activating Factor* (PAF) play a positive role in improving embryo development to achieve preimplantation embryos. Expression of *autocrine* growth

factors is early needed at the development of 2-cell stage. *Paracrine* mediator is presumed to provide an optimal micro-environment for the development of preimplantation embryos. Several growth factors and Interleukin-1 β can improve the viability of *in vitro* produced embryos.

Key Words: growth factors, autocrine, paracrine, *in vitro* preimplantation embryos

PENDAHULUAN

Sejak keberhasilan teknik fertilisasi *in vitro* (*in vitro fertilization*, IVF) yang disertai dengan lahirnya anak sapi jantan pada tahun 1981 (Brackett *et al.*, 1982), berbagai upaya perbaikan teknik telah dilakukan. Karena beberapa faktor pertumbuhan (*growth factors*) diperlukan untuk perkembangan embrio baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Paria dan Dey, 1990), maka beberapa faktor pertumbuhan, seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Insulin-like Growth Factor-I* (IGF-I), *Transforming Growth Factor* (TGF), *Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor* (PDGF) atau *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) telah sering diimbuhkan ke media pematangan (*maturation*) dan media pembiakan untuk meningkatkan kemampuan oosit berkembang ke tahap morula (*blastosis*). Telah dilakukan juga penggabungan faktor pertumbuhan dan hormon steroid atau gonadotropin ke dalam media pematangan untuk meningkatkan perolehan jumlah oosit masak (Downs *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988). Juga telah diketemukan faktor pertumbuhan dan 'reseptor'-nya di ovarium dan sel granulosa (Skimmer *et al.*, 1987; Roy dan Greenwald, 1990; Feng *et al.*, 1997;) dan di cairan folikel (Hofman *et al.*, 1990). Perkembangan terakhir diperoleh informasi bahwa salah satu anggota *cytokines* berperan pada perkembangan awal embrio sapi (Paula-Lopes *et al.*, 1998). Gardner *et al.* (1998) telah meneliti IGF, yang dihasilkan dari perkembangan embrionik mencit, dalam kaitannya dengan *genotyping* embrio yang mengalami mutasi terhadap komposisi konsepsi dilihat dari genotip *trophectoderm* dan *inner cell mass* (ICM) embrio mencit. Sedangkan Nowak *et al.* (1998) telah mempublikasikan tentang stimulasi TGF- β terhadap pertumbuhan blastosis mencit melalui mekanisme yang melibatkan *parathyroid hormone*

related protein (PTHrP). Interaksi antara konsep-si dan saluran reproduksi memberikan dukungan penting bagi perkembangan dan preimplantasi embrio (Paula-Lopes *et al.*, 1998). Ketika terjadi konsepsi (awal kebuntingan), pada saat tersebut mulai terjadi hubungan kerjasama antara embrio dan saluran reproduksi yang mengikutkan peran faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan diwujudkan dengan dua cara, yaitu secara autokrin (berasal dari embrio sendiri) dan parakrine (berasal dari oviduct dan uterus). Pada hewan mencit, pengeluaran LIF akan mencapai puncaknya sebanyak dua kali, pertama pada waktu ovulasi dan kedua pada waktu umur kebuntingan 4 hari dan kemudian menurun pada umur kebuntingan 5 hari bersamaan dengan terjadinya implantasi embrio (Stewart, 1994). Studi tentang sistem pembiakan oosit setelah fertilisasi (*fertilized oocytes*) memberi gambaran bahwa pembiakan dalam kelompok menunjukkan perkembangan embrio ke tahap blastosist yang lebih banyak dibandingkan dengan pembiakan embrio secara tunggal. Tulisan ini membahas hubungan antara embrio dengan peran faktor pertumbuhan pada perkembangan embrio preimplantasi.

TAHAPAN FERTILISASI

Penyatuan antara spermatozoa dan oosit umumnya terjadi ketika spermatozoa telah mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom, dan oosit telah memasuki tahap metafase II. Proses fertilisasi Parrish dan First (1993) melibatkan tahap-tahap perlekatan dan pengikatan, penembusan *zona pellucida*, penyatuan spermatozoa dan oosit, aktivasi oosit, pembentukan *pronuclei* dan terakhir terjadi *syngamy*. Perkembangan awal embrio segera dimulai setelah fertilisasi. Pembelahan dimulai dari inti yang kemudian diikuti dengan sitoplasma. Pembelahan seragam terjadi sampai dengan tahap 4-sel dan sesudah itu pembelahan terjadi tidak seragam (*asynchronous cleavage*). Kejadian *early developmental block* sering terjadi pada tahap 4-sel yang ketika itu embrio tidak mampu melanjutkan perkembangannya ke tahap 8-sel, 16-sel dan seterusnya. Hal ini terjadi diduga karena adanya perubahan sintesis protein yang mulai nampak pada tahap 4-sel. Menjelang hari ke-7 setelah fertilisasi, mulai terbentuk *blastocoel* dan perkembangan telah memasuki tahap blastosist. Pada tahap ini, mulai terlihat *inner cell mass* yang akan membentuk badan embrio dan selaput tipis *trophectoderm* yang mengelilingi bagian luar blastosist berfungsi memberi makan embrio.

INTERAKSI FAKTOR PERTUMBUHAN DAN PREIMPLANTASI EMBRIO

Studi tentang embrio preimplantasi dan oviduct menunjukkan adanya beberapa faktor yang terlibat dalam interaksi antara embrio dan faktor pertumbuhan. Gandolfi (1994) membaginya menjadi 3 faktor, yaitu autokrin, parakrin dan lingkungan. Faktor pertumbuhan yang berasal dari embrio terlibat dengan cara autokrin sedangkan yang berasal dari oviduct dan uterus terlibat secara paracrin. Interaksi yang lebih rumit dapat saja terjadi, misalnya keterlibatan autokrin dan parakrin dari IGFs yang diatur di lingkungan mikro uterus oleh reseptor IGF-I dan protein pengikat IGF yang akan dikendalikan secara lokal di uterus dan embrio itu sendiri.

Perkembangan Preimplantasi Embrio

Ketika konsepsi terjadi, faktor pertumbuhan baik yang berasal dari embrio maupun saluran reproduksi mulai bekerja. Pada manusia terdapat beberapa faktor pertumbuhan dan *cytokine* yang dianggap berperan selama proses kehamilan, misalnya EGF dan TGF α yang berpengaruh luas pada sel-sel endometrium dan mesenkhim (Smith, 1994). *Fibroblast Growth Factor* (FGF) berperan hanya pada mesenkhim dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor* (PDEGF) berperan hanya terbatas pada sel endothelial. Berbagai macam *cytokine* berperan lebih banyak secara tidak langsung dibandingkan secara langsung pada sel endothelial. Misalnya, Interleukin- β 1 (IL-1 β) merupakan salah satu *cytokines* bersifat *agonist* (Tabibzadeh, 1991) yang berperan pada tahap awal perkembangan embrio sapi (Paula-Lopes *et al.*, 1998).

Faktor pertumbuhan yang diperlihatkan pada perkembangan embrionik terjadi pada saat embrio melewati saluran reproduksi. Sekresi faktor pertumbuhan dari uterus berperan mengatur pelekatan, implantasi, pemberian makanan dan pertumbuhan embrio (Biggers, 1988; Robert dan Bazer, 1988). Perkembangan embrionik sapi dapat dipicu dengan penambahan 1 ng/ml IL-1 β pada media biakan yang dapat meningkatkan proporsi perkembangan embrio 9-sel ke tahap 16-sel (\pm 40%) walaupun tidak berpengaruh pada perkembangan sel kumulus selama maturasi *in vitro*, laju pembelahan oosit dan selanjutnya perkembangan oosit ke tahap blastosist (Paula-Lopes *et al.*, 1998).

Pada perkembangan *in vivo*, keberadaan faktor pertumbuhan diperlukan untuk perkembangan awal embrio dan embrio preimplantasi karena faktor pertumbuhan yang berasal dari oviduct dan uterus memacu proliferasi seluler dan diferensiasi selama preimplantasi embrio (Heyner *et al.*, 1993). Sedangkan secara *in vitro* mampu meningkatkan jumlah oosit yang dibuahi untuk berkembang ke tahap blastosist.

LIF yang diimbuhkan ke media biakan *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) dengan konsentrasi 1000 unit/ml dapat meningkatkan blastosist secara nyata dibandingkan kontrol setelah dieramkan selama 48 jam (Fry *et al.*, 1992). Fukui dan Matsuyama (1994). Pengimbuhan LIF sebanyak 2000 unit/ml pada media SOF mampu mempercepat perkembangan embrio sapi sampai tahap *hatched blastocyst* pada hari ke-7 sesudah fertilisasi *in vitro* (Margawati *et al.*, 1997). Fukui dan Matsuyama (1994) mendapatkan bahwa pengimbuhan LIF sebanyak 2000 dan 6000 unit/ml masing-masing mampu mempercepat perkembangan embrio sampai tahap 8-sel dan blastosist awal ke tahap *hatched blastocyst*. Sedangkan konsentrasi 5000 unit/ml dapat meningkatkan perkembangan embrio sapi tahap morula dan blastosist awal pada hari ke-5 ke tahap *hatched blastocyst* dan konsentrasi yang sama juga mampu mengembangkan blastosist setelah *thawing* ke tahap *hatched blastocyst* (Han *et al.*, 1995).

Dari hasil tersebut diduga bahwa LIF berperan memperbaiki kesehatan embrio *in vitro* dan memungkinkan em-

brío berkembang ke tahap *hatching*, walaupun keterlibatannya dalam pengaturan implantasi embrio belum jelas. Kemungkinan LIF berperan pada uterus untuk mempersiapkan penerimaan blastosist atau berperan pada perkembangan blastosistnya sendiri atau pada keduanya (Stewart, 1994). LIF berperan pada lima hari pertama kebuntingan mencit dan mencapai puncaknya pada hari ke 4 kebuntingan yang kemudian menurun pada hari ke-5 mengikuti implantasi. Bukti lain memperlihatkan bahwa LIF lebih berperan pada endo-metrium uterus wanita sesudah ovulasi pada siklus mensturasinya dibandingkan sebelum ovulasi (Stewart, 1994).

Penambahan EGF sebanyak 10 ng/ml pada media biakan berisi embrio mencit menunjukkan bahwa embrio 8-sel yang dieramkan selama 72 jam baik secara tunggal maupun kelompok akan mengalami peningkatan jumlah embrio yang berkembang ke tahap *hatched blastocyst* (Tabel 2). Perkembangan embrio 2-sel ke tahap blastosist yang dieramkan selama 72 jam akan meningkatkan dua kali bila media biakan diimbui EGF (49%) dibandingkan tanpa penambahan EGF (28%) dan peningkatan akan lebih tinggi lagi bila diimbui dengan kombinasi EGF dan TGF β -1 (87%). Sedangkan embrio 8-sel yang dieramkan tunggal selama 32 jam akan mengalami peningkatan perkembangannya ke tahap blastosist pada media yang diimbui EGF (95%) dibandingkan tanpa pengimbuhan EGF (86%).

Tabel 1. Perkembangan blastosist dari oosit hasil pematangan *in vitro* (in vitro maturation) 20 jam dan dibiakkan pada media yang diimbui LIF dengan dosis yang berbeda (Margawati *et al.*, 1997).

Faktor Pertumbuhan (U/ml)	Jumlah Blastosist	Tahap blastosist		
		Awal (%)	Expanded (%)	Hatched (%)
0	56	35,54±4,03 ^a	56,25±4,24 ^c	12,54±4,43 ^c
500	57	44,74±4,03 ^a	36,16±4,24 ^d	48,63±4,43 ^{ef}
1000	61	46,22±4,03 ^a	29,81±4,24 ^d	28,00±4,43 ^c
2000	63	11,50±4,03 ^b	31,67±4,24 ^d	60,41±4,43 ^f

Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Tabel 2. Pengaruh EGF pada perkembangan 8-sel ke tahap *hatched blastocyst* secara *in vitro* yang dibiakkan pada 25 μ l media selama 72 jam (Paria dan Dey, 1990).

Faktor Pertumbuhan (ng/ml)	Jumlah Blastosist	Persentase blastosist (n)	Persentase <i>hatched blastosist</i> (n)
<u>Pembiakan Tunggal</u>			
0	32	87,5 (28)	10,7 (3)
4	28	85,7 (24)	37,5 (9) ^a
10	33	93,9 (31)	64,5 (20) ^b
<u>Pembiakan Kelompok (5-14)</u>			
0	85	88,2 (75)	52,0 (39) ^b
10	73	90,4 (66)	63,6 (42) ^b

^a P<0,05 dibandingkan dengan pembiakan tunggal tanpa EGF; ^b P<0,0001 dibandingkan dengan pembiakan tunggal tanpa EGF

Transforming growth factor-β (TGF-β) adalah faktor pertumbuhan yang mengatur proliferasi sel, produksi matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*, ECM), perlekatan dan migrasi embrio (Massague, 1990) dan embriogenesis (Heine *et al.*, 1987; Rappolee *et al.*, 1988). Nowak *et al.* (1999) memperlihatkan TGF-β dan PTHrP berperan penting pada proses preimplantasi embrio mencit. Namun, dari penelitian yang sama tidak terlihat adanya pengaruh PTHrP terhadap pembentukan blastosist dan jumlah sel ICM dan trophoctoderm, dan jumlah total pembelahan sel dibandingkan kelompok kontrol. PTHrP diketahui meningkatkan pertumbuhan trophoblast yang kuat.

IGF merupakan senyawa peptida dan diduga menjadi perantara hormon pertumbuhan pada uterus di bawah kontrol hormon steroid. IGF berperan untuk implantasi embrio pada manusia (Murphy, 1994). IGF-2 memperlihatkan peranannya dalam pengaturan komposisi fetus, jaringan embrionik bagian luar, dan bersama trophoctoderm dan ICM mengendalikan volume cairan ekstraseluler fetus (Gardner *et al.*, 1999). IGF-2 dari embrio yang mengalami mutasi bersifat *heterogen* asal induk jantan tikus yang disebut dengan *Igf2 ko*. Munculnya *Igf2 ko* pada fetus dan kantung kuning telur (*yolk sac*) diakibatkan rendahnya IGF-2 yang berasal dari derivat ICM dengan penurunan berat basah lebih dari 25%, sedangkan yang dari trophoctoderm menyebabkan penurunan berat basah kurang dari 12% (Tabel 3).

Keterlibatan Autokrin dan Parakrin

Beberapa studi terakhir memperlihatkan peran autokrin terhadap percepatan laju kepadatan embrio yang dibiakkan pada volume rendah lebih baik daripada volume yang lebih besar (Paria & Dey, 1990; Lane dan Gardner, 1992), sintesis faktor per-tumbuhan dan reseptornya oleh ligand (Rappolee *et al.*, 1988), peningkatan metabolisme embrio dan siklus sel *in vitro* (Kaye *et al.*, 1992). Selain itu, terdapat bukti-bukti yang mengatur pertumbuhan embrio untuk melakukan pre-implantasi *in vitro* bersamaan dengan derivat yang dihasilkan oleh embrio (Wiley *et al.*, 1986; Paria dan Dey, 1990; Roberts *et al.*, 1993; O'Neil, 1997). Autokrin meliputi IGF-I, IGF-II dan *Placental-activating factor* (PAF). O'Neil (1997) memperlihatkan bahwa PAF, IGF-I dan IGF-II menunjang perkembangan embrio dan membuktikan bahwa faktor tersebut bertindak sebagai *autocrine embryotrophic factor* (Tabel 4). PAF yang dihasilkan oleh embrio (O'Neil, 1985), juga dapat meningkatkan perkembangan zigot yang dibiakkan dalam jumlah padat ke tahap blastosist (Tabel 5). Pengaruh yang sama dari IGF-I dan IGF-II terhadap perkembangan zigot tersajikan dalam Tabel 6 dan Tabel 7. Sedangkan EGF tidak berpengaruh nyata pada perkembangan zigot sampai kadar 2000 ng/ml (kepadatan 1 per 10 μl). O'Neil (1998) mendapati bahwa autokrin diperlukan dalam perkembangan embrio mulai tahap 2-sel ke tahap blastosist.

Tabel 3. Komposisi berat basah konsepsi mencit dari kombinasi genotip *Igf2* yang berbeda* (Gardner *et al.*, 1999)

Seri	N	Berat (g)		
		Plasenta Fetus	Kantung kuning telur	Fetus
ICM				
Normal	16	0,056 ± 0,008	0,038 ± 0,006	0,607 ± 0,137
<i>Igf2 ko</i>	18	0,048 ± 0,010 ^a	0,028 ± 0,006 ^b	0,445 ± 0,050 ^c
% normal (CL)		86%	74%	73%
Trophoctoderm				
Normal	9	0,053 ± 0,005	0,043 ± 0,006	0,672 ± 0,073
<i>Igf2 ko</i>	15	0,042 ± 0,005 ^e	0,038 ± 0,005 ^d	0,038 ± 0,070 ^e
% normal (CL)		79%	88%	88%

*Normal pada seri ICM berbeda dengan normal pada seri trophoctoderm; ^a p<0.034; ^b p<0,0001; ^c p<0,008; ^d p<0,039;

^e p<0,003

Tabel 4. Kadar PAF (dalam ng) yang disekresikan ke dalam media: median (first quartile-third quartile)^a (O'Neil, 1997)

Asal embrio	Kandungan PAF (ng)	
	Dalam Media (per ml media)	Dalam Embrio (per 30 embrio)
2-sel (<i>in vivo</i>)	4,1 (2,1-7,1)	3,3 (1,0-7,6)
ISF	1,4 (0,1-3,2) ^b	3,5 (1,9-12,6) ^c
IVF	0,2 (0,0-0,8) ^d	3,0 (1,3-3,8) ^e

^a Berdasarkan uji Wilcoxon-rank Sum Test; ISF=in situ Fertilization; IVF=in vitro Fertilization; 2-sel = dikumpulkan dari saluran reproduksi. Sebanyak 30 embrio dibiakkan di dalam 1 ml media Human Tubal Fluid (HTF) selama 24 jam; ^bp<0,01 dan ^cp>0,05 dibandingkan dengan 2-sel embrio; ^dp<0,05; ^ep>0,44 dibandingkan dengan zigot ISF.

ngan upaya memperoleh jumlah anak (*litter sizes*) yang banyak. Green *et al.* (1998) telah memeriksa sejumlah faktor pertumbuhan dalam bentuk peptida dan pengaturan molekul di lingkungan uterus pada awal kebuntingan babi.

Jumlah Sel per Blastosist

Pengaruh faktor pertumbuhan juga dipelajari terhadap abnormalitas embrio *in vitro* dengan menghitung jumlah sel per blastosist setelah diwarnai dengan pewarnaan Giem-sa. Sistem biakan tunggal (1 embrio dalam 25 atau 50 µl) akan menurunkan perolehan jumlah sel per blastosist dibandingkan pada sistem biakan kelompok (5 atau 10 per 50 µl). Jumlah sel per blastosist yang dibiakkan secara tunggal dari 8-sel selama 32 jam mengalami peningkatan yang nyata (p<0,05) bila dibiakkan dengan pengimbuhan EGF (41,1±1,7). Pengimbuhan IL-1β sebanyak 1 ng/ml setelah

Tabel 5. Pengaruh PAF pada perkembangan zigot hasil IVF ke tahap blastosist (O'Neil, 1997)

	Jumlah PAF (ng/ml) dalam media HTF					
	0	0,1	1	10	100	1000
<u>1 zigot/10 µl</u>						
% Blastosist	35,4	44,6	50,0	49,2	46,2	50,1
Nilai p, Chi square		0,13	0,02	0,02	0,08	0,01
<u>1 zigot/100 µl</u>						
% Blastosist	18,7	22,3	27,0	27,5	30,4	TD
Nilai p, Chi square		0,48	0,12	0,10	0,04	

Berbeda nyata (p<0,05) terlihat pada penambahan 1 ng/ml PAF; TD = tidak ditemukan adanya perkembangan

Tabel 6. Pengaruh IGF-I pada perkembangan zigot hasil IVF (1 embrio/10 µl) ke tahap blastosist (O'Neil, 1997)

	Jumlah IGF-I (ng/ml) didalam media HTF					
	0	0,3	3	30	300	3000
% Blastosist	36,8	43,0	47,1	59,8	62,1	50,6
Nilai p, Chi square		0,40	0,17	0,003	0,001	0,07

Laju perkembangan untuk masing-masing dosis dibandingkan terhadap laju perkembangan pada media kontrol berdasarkan analisis Chi-square

Tabel 7. Pengaruh IGF-II pada perkembangan zigot hasil IVF (1/10 µl) ke tahap blastosist (O'Neil, 1997)

	Jumlah IGF-II (ng/ml) didalam media HTF				
	0	0,1	1	10	100
% Blastosist	36,4	42,4	51,5	47,5	58,6
Nilai p, Chi square		0,38	0,03	0,11	0,002

Laju perkembangan untuk masing-masing dosis dibandingkan terhadap laju perkembangan pada media control berdasarkan analisis Chi-square

Faktor parakrin berkaitan dengan peran lingkungan mikro uterus untuk menunjang perkembangan embrio. Terdapat mekanisme rumpil untuk mempersiapkan persyaratan lingkungan yang optimal untuk keberhasilan implantasi (Simmen dan Simmen, 1990). Banyak penelitian tentang peranan faktor parakrin pada ternak babi yang dikaitkan de-

dibiakkan selama 8 sampai 10 jam inseminasi (dalam media biakan) mengalami peningkatan yang nyata (p<0,05) atas jumlah sel embrio sapi umur 5 hari (Paula-Lopes *et al.*, 1998). Penurunan jumlah sel per blastosist nyata (p<0,001) terjadi bila tidak dilakukan pengimbuhan PAF ke media HTF yang berisi embrio berkepadatan tinggi (Tabel 8).

Hasil tersebut memperlihatkan bahwa sel-sel di dalam blastosist memerlukan autokrin dan parakrin untuk mempertahankan daya hidup embrio (Ishizaki *et al.*, 1995).

mal Growth Factor: Evidence for a Positive Stimulus of Somatic Cell Origin. *Journal of Experimental Zoology*, 245: 86-96.

Tabel 8. Pengaruh kepadatan embrio terhadap viabilitas embrio setelah dibiakkan 96 jam didalam media HTF (O'Neil, 1998)

Jumlah embrio per μ l	Hasil statistik	Total sel/embrio	Jumlah Sel mati/ embrio	Persentase embrio dengan sel mati ≥ 1	Sel apoptosis per embrio	% Embrio dg ≥ 1 sel apoptosis
1	Rataan \pm sb	17,5 \pm 1,57	1,14 \pm 0,30	35,7	1,19 \pm 0,28	42,9
	Nilai tengah	19,0	0		0	
10	Rataan \pm sb	14,7 \pm 1,41	1,29 \pm 0,30	52,4	1,10 \pm 0,22	52,4
	Nilai tengah	15,0	1		1	
100	Rataan \pm sb	10,3 \pm 0,78	1,67 \pm 0,22	81,0	2,17 \pm 0,33	71,4
	Nilai tengah	10	1		2	

Sb=simbangan baku

KESIMPULAN

Keberadaan faktor pertumbuhan, seperti LIF, EGF, IGF, TGF dan PAF, diperlukan pada perkembangan embrio *in vitro* dan sebagai faktor pemicu bagi perkembangan zigot ke tahap preimplantasi embrio. Faktor pertumbuhan autokrin berperan pada perkembangan embrio *in vitro* dan parakrin berhubungan dengan kondisi lingkungan mikro dari uterus untuk perkembangan embrio ke tahap preimplantasi embrio. Pengimbuhan PAF, IGF-I, IGF-II pada media pembiakkan embrio berkepadatan rendah dapat meningkatkan persentase perolehan blastosist, sedangkan pengimbuhan EGF, TGF atau kombinasinya pada biakan tunggal dapat meningkatkan perkembangan embrio ke tahap embrio preimplantasi. IGF dan TGF diketahui berpengaruh terhadap jumlah sel dari ICM dan trophoctoderm pada embrio preimplantasi dan berat basah konsepsi. Pengimbuhan IL-1 β pada media biakan dapat meningkatkan jumlah sel embrio sapi.

DAFTAR PUSTAKA

- Biggers, J. 1988. Introductory Remarks on the Milieu of the Egg and The Early Embryo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82: 809-811.
- Brackett, B.G., D. Bousquet, M.L. Boice, W.J. Donawick, J.F. Evans and M.A. Dressel. 1982. Normal Development Following *in vitro* Fertilization in the Cow. *Biology of Reproduction*, 27: 147-158.
- Downs, S.M., S.A.J. Daniel and J.J. Eppig. 1988. Induction of Maturation in Cumulus Cell-Enclosed Mouse Oocytes by Follicle Stimulating Hormone and Epider-

- Feng, P., K.J. Catt and M. Knecht. 1988. Transforming Growth Factor - β Stimulates Meiotic Maturation of The Rat Oocyte. *Endocrinology*, 122: 181-186.
- Feng, P., M. Knecht and K.J. Catt. 1997. Hormonal Control of Epidermal Growth Factor Receptor by Gonadotropins during Granulosa Cell Differentiation. *Endocrinology*, 120: 1121-1126.
- Fry, R.C., P.A. Batt, R.J. Fairclough and R.A. Parr. 1992. Human Leukemia Inhibitory Factor Improves the Viability of Cultured Ovine Embryos. *Biology of Reproduction*, 46: 470-474.
- Fukui, Y. And K. Matsuyama. 1994. Development of *in vitro* Matured and Fertilized Bovine Cultured in Media Containing Human Leukemia Inhibitory Factor. *Theriogenology*, 42: 663-673.
- Gandolfi, F. 1994. Autocrine, Paracrine and Environmental Factors Influencing Embryonic Development From Zygote to Blastocyst. *Theriogenology*, 41: 95-100.
- Gardner, R.L., S. Squire, S. Zaina, S. Hills and C.F. Graham. 1999. Insulin-like Growth Factor-2 Regulation of Conceptus Composition: Effects of the Trophoctoderm and Inner Cell Mass Genotypes in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 60: 190-195.
- Han, Y.M., E.S. Lee, T. Mogoe, K.K. Lee and Y. Fukui. 1995. Effect of Human Leukemia Inhibitory Factor on *in vitro* Development of IVF-Derived Bovine Morulae and Blastocysts. *Theriogenology*, 44: 507-516.
- Heine, U.I., K.C. Flanders, A.B. Roberts, E.F. Minoz and M.B. Sporn. 1987. Role of Transforming Growth Fac-

- tor- β in the Development of the Mouse Embryo. *Journal of Cell Biology*, 105: 2861-2876.
- Heyner, S., N. Shah, R.M. Smith, A.J. Watson and G.A. Schultz. 1993. The Role of Growth Factors in Embryo Production. *Theriogenology*, 39: 151-161.
- Hofman, G.E., R.T. Scott, R.G. Brzyski and H.W. Jone. 1990. Immunoreactive Epidermal Growth Factor Concentrations in Follicular Fluid Obtained from *in vitro* Fertilization. *Fertility and Sterility*, 54: 303-307.
- Ishizaki, Y., L. Cheng, A.W. Mudge and M.C. Raff. 1995. Programmed Cell Death by Default in Embryonic Cells, Fibroblast, and Cancer Cells. *Molecular Biology Cell*, 6: 1443-1458.
- Kaye, P.L., K.L. Bell, L.F.S. Beebe, G.F. Dungleison, H.G. Gardner and M.B. Harvey. 1992. Insulin and the Insulin-like Growth Factors (Igf) in Preimplantation Development. *Reproduction Fertility and Development*, 4: 373-386.
- Lane, M. and D.K. Gardner. 1992. Effect of Incubation Volume and Embryo Density on the Development and Viability of Mouse Embryos *in vitro*. *Human Reproduction*, 7: 558-562.
- Margawati, E.T., A. Pugh, M.F. McDonald and H.R. Tervit. 1997. Effect of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) during Maturation and Culture *in vitro* on the Proportion of Early, Expanded and Hatched Blastocysts. *The Indonesian Biotechnology Conference*: 203-21.
- Massague, J. 1990. The Transforming Growth Factor β Family. *Annual Review Cell Biology*, 6: 597-641.
- Murphy, L.J. 1994. Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins in the Endometrium. In: S.R. Glasser, J. Mulholland and A. Psychoyos (Ed). *Endocrinology Of Embryo-Endometrium*. Plenum Press. New York. pp. 229-244.
- Nowak, R.A., F. Haimovici, J.D. Biggers and G.T. Erbach. 1999. Transforming Growth Factor- β Stimulates Mouse Blastocyst Outgrowth through a Mechanism Involving Parathyroid Hormone-Related Protein. *Biology of Reproduction*, 60: 85-93.
- O'Neil, C. 1985. Partial Characterization of The Embryo-Derived Platelet Activating Factor in Mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75: 375-380.
- O'Neil, C. 1997. Evidence for the Requirement of Autocrine Growth Factor for Development of Mouse Preimplantation Embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 56: 229-237.
- O'Neil, C. 1998. Autocrine Mediators are Required to Act on the Embryo by the 2-Cell Stage to Promote Normal Development and Survival of Mouse Preimplantation Embryos *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 58: 1303-1309.
- Paria, B.C. and S.K. Dey. 1990. Preimplantation Embryo Development *in vitro*: Cooperative Interactions among Embryos and Role of Growth Factors. *Proceedings National Academy of Sciences, U.S.A.*, 87: 4756-4760.
- Parrish, J.J. and N.L. First. 1993. Fertilization. In G.J. King (Ed). *Reproduction In Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. pp. 195-227.
- Paula-Lopes, F.F., A.A.S. De Moraes, J.L. Edwards, J.E. Justice and P.J. Hansen. 1998. Regulation of Preimplantation Development of Bovine Embryos by Interleukin-1 β . *Biology of Reproduction*, 59: 1406-1412.
- Rappolee, D.A., C.A. Brenner, R. Schultz, D. Mark and Z. Werb. 1988. Developmental Expression of PDGF, TGF α and TGF β Genes in Preimplantation Mouse Embryos. *Science*, 242: 1823-1825.
- Robert, R.M. and F.W. Bazer. 1988. The Functions of Uterine Secretions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82: 875-892.
- Roberts, C., C. O'Neil and L. Wright. 1993. Platelet Activating Factor (PAF) Enhances Mitosis in Preimplantation Mouse Embryos. *Reproduction Fertility and Development*, 5: 271-279.
- Roy, S.K. and G.S. Greenwald. 1990. Immunohistochemical Localization of Epidermal Growth Factor-like Activity in the Hamster Ovary with a Polyclonal Antibody. *Endocrinology*, 126:1309-1317.
- Simmen, R.C.M. and F.A. Simmen. 1990. Regulation of Uterine and Conceptus Secretory Activity in the Pig. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplementation)*, 40: 279-292.
- Skimmer, M.K., D. Loob and J.H. Dorrington. 1987. Ovarian Theca/Interstitial Cells Produce an Epidermal Growth Factor-like Substance. *Endocrinology*, 121: 1892-1899.
- Smith, S.K. 1994. Embryo-Endometrial Interactions. Angiogenic Growth Factor Expression and Human Implantation. In: S.R. Glasser, J. Mulholland and A. Psychoyos (Ed). *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions*. Plenum Press. New York. Pp. 223-244.
- Stewart, C.L. 1994. Leukemia Inhibitory Factor and the Regulation of Blastocyst Implantation. In: S.R. Glasser, J. Mulholland and A. Psychoyos (Ed). *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions*. Plenum Press. New York. pp. 269-278.

Tabibzadeh, S. 1991. Human Endometrium: an Active of Cytokine Production and Action. *Endocrinology Review*, 12: 272-290.

Park, B.C. and S.K. Dey. 1990. Preimplantation Embryo Development in vitro: Cooperative Interactions among Embryos and Role of Growth Factor Processing. *National Academy of Sciences USA*, 87:4750-4754.

Ueda, J., and N. Ueda. 1997. Follicular Development, (Ed). *Reproduction in Domestic Animals*, Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, pp. 192-222.

Edwards, R.G., and N. De Zeeuw, J.E. Edwards, J.E. Justice and E.L. Hansen. 1988. Regulation of Perinatal Development of Bovine Embryo of Interspecific Hybridization. *Development* 100:1409-1415.

Kemper, D.A., C.A. Binner, R. Schultz, D. Mark and X. Werb. 1988. Developmental Expression of PDGF, TGF- α and TGF- β Genes in Preimplantation Mouse Embryos. *Development* 102: 1823-1827.

Robert, R.M., and F.W. Hayer. 1988. The Function of Pituitary Secretions. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 2-8-9.

Kellogg, G., G. O'Brien and L. Wright. 1997. Transfer of Growth Factor (PAG) Through Mouse Embryo with the development of *in vitro* culture. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 287-290.

Roy, S.K. and G. Greenwald. 1990. Immunohistochemical Localization of Epidermal Growth Factor-Like Activity in the Hamster Ovary with a Polyclonal Antibody. *Endocrinology* 126: 1309-1317.

Simmons, R.L.M. and S.A. Simental. 1990. Regulation of Follicular and Oocyte Development. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 229-232.

Stewart, M.K., D. L. and J.H. Dorsett. 1997. Growth Factor and Signaling Molecules in Embryonic Development. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 1809-1813.

Smith, S.K. 1994. Embryonic-Endometrial Interactions. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 229-232.

Stewart, C.L. 1994. Embryonic Inhibitory Factors and the Regulation of Blastocyst Implantation. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 229-232.

J. Mullolland and A. Fehly. (Ed). *Endocrinology of Embryonic Development*. Plenum Press, New York, 1987. pp. 229-232.

Wiley, L.M., S. Yamami and D. Van Muyden. 1986. Effect of Potassium Concentration, Type of Protein Supplement, and Embryo Density on Mouse Preimplantation *in vitro*. *Fertility and Sterility*, 45: 111-119.

Schultz, D.M. 1990. The Role of Growth Factors in Embryo Development. *Reproductive Biology* 30: 151-161.

Holman, G., R.T. Scott, K.G. Pixley and H.W. Jones. 1990. Immunoreactive Epidermal Growth Factor Concentration in Follicular Fluid Obtained from *in vivo* Perigonial Follicles and Oocytes. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 54: 307-310.

Ishikawa, Y., J. Cheng, A.W. Mudge and M.G. Kamb. 1992. Programmed Cell Death by Death in Embryonic Cells: Fibroblasts and Cancer Cells. *Molecular Biology Cell* 3: 1443-1452.

Kaye, P.L., K.L. Bell, L.S. Hsieh, G. Gungl, and H.G. Gardner and M.B. Haver. 1992. Insulin and the Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in Preimplantation Development. *Reproductive Biology and Development* 4: 375-386.

Ishikawa, M. and D.K. Gardner. 1992. Effect of Insulin on Volume and Embryo Density on the Development and Viability of Mouse Embryos *in vitro*. *Human Reproduction* 7: 228-230.

Mullolland, J.T., A. Fehly, M.L. Mullolland and H.R. Tervil. 1997. Effect of Insulin on Embryo Development. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 52: 287-290.

Mullolland, J.T. 1994. Insulin-like Growth Factor and Their Binding Proteins in the Endometrium. In: S.R. Glasser, J. Mullolland and A. Fehly (Ed). *Endocrinology of Embryo Development*. Plenum Press, New York, pp. 229-244.

Nowak, R., F. Hanrahan, J.D. Biggers and G.T. Tschopp. 1990. Transferring Growth Factor- β Stimulates Mouse Blastocyst Outgrowth through a Mechanism Involving Transformed Heterologous Protein Biology of Reproduction 60: 2302-2309.

O'Neil, C. 1982. Partial Characterization of The Embryonic Growth Factor for Development of Mouse Blastocyst. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 35: 315-320.

O'Neil, C. 1997. Evidence for the Requirement of Anabolic Growth Factor for Development of Mouse Blastocyst. *Journal of Reproductive and Fertiliy*, 50: 229-237.

O'Neil, C. 1998. Anabolic Mediators are Required to Act on the Embryo by the 2-Cell Stage to Promote Normal