PENGARUH FASE SIKLUS ESTRUS TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI HASIL PEMATANGAN DAN PEMBUAHAN *IN VITRO*

THE EFFECT OF STAGE OF ESTROUS CYCLE ON THE DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYO MATURED AND FERTILIZED *IN VITRO*

I. DJUWITA[*], B. PURWANTARA[**], Y. SUKRA[*], M. FAHRUDIN[*], A. WINARTO[*]

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fase folikel terhadap perkembangan embrio sapi hasil maturasi (pematangan) dan fertilisasi *in vitro*. Ovaria diperoleh dari rumah potong hewan setempat. Ovaria dikelompokkan berdasarkan fase siklus estrus yaitu folikuler dan luteal. Oosit diaspirasi dengan menggunakan jarum G18 yang dihubungkan dengan *spuit* 10 cc yang berisi 1 mL larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Setelah dicuci, Oosit dimatangkan dalam Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) selama 20-22 jam, pada suhu 39°C, dengan menggunakan inkubator CO_2 5%. Fertilisasi *in vitro* dilakukan dalam medium BO (Brackett dan Oliphant) dengan menggunakan sperma beku, selama 8 jam. Embrio kemudian dikultur dalam medium TCM-199 yang ditambahkan dengan 5% serum sapi superovulasi (SSS) atau medium yang mempunyai komposisi kimia tertentu tanpa serum.

Tingkat pembelahan embrio berdasarkan fase siklus estrus yaitu folikuler dan luteal, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,5$) diantara keduanya yaitu 75,0% (fase folikuler) dan 75,6% (fase luteal), namun lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak dilakukan pemisahan yaitu (83,5%). Demikian pula perkembangan mencapai tingkat blastosis tidak berbeda nyata ($p < 0,5$) diantara kedua perlakuan yaitu masing-masing 20% dan 23% untuk kelompok fase folikuler dan luteal; namun lebih baik dibandingkan kelompok tanpa pemisahan yaitu 13%. Jika dipergunakan medium yang mempunyai komposisi kimia tertentu, ternyata kedua kelompok perlakuan menunjukkan tingkat pembelahan yang berbeda yaitu masing-masing 68% dan 80% untuk kelompok fase folikuler dan luteal. Sedangkan tingkat perkembangan mencapai morula masing-masing adalah 53,6% dan 65,7%.

[*] Jurusan Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Taman Kancana 3, BOGOR 16151

[**] Jurusan Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Taman Kencana 3, BOGOR 16151

ABSTRACT

The objective of this study is to examine the effect of stage of estrous cycle on *in vitro* development of bovine embryo matured and fertilized *in vitro*. Cow ovaries were collected from slaughter house and were kept in a physiological solution. Oocytes were aspirated using G18 neddle connected to 10 mL syringe containing phosphate buffer saline (PBS). After being washed, oocytes were matured *in vitro* in Tissue Culture Medium (TCM) 199 a physiological in 5% CO_2 incubator at 39°C for 20-22 hours. *In vitro* fertilization was done in BO (Brackett and Oliphant) solution for 8 hrs, using frozen semen. Embryos were further cultured in either TCM-199 supplemented with 5% cow superovulated serum or chemically defined-serum free medium.

If ovaries were classified due to their estrous stages, i.e. luteal and follicular, both cleavage (fertilization) and development rates did not show any differences ($p < 0,5$) in both treatment. The cleavage rate of oocytes collected from the follicular and luteal stages were 75,0% and 75,6%, respectively eventhough was lower if compared to that withaout classification (83.5 %). The development rate were 20,0% and 23,0%, higher, compare to that without classification, i.e. 13,0%. Nevertheless, if chemically defined-serum free medium was used, the two treatments showed differences ($p < 0,5$) in both cleavage and development rates. The ratio between luteal and follicular stages were 68,0% : 80,0% and 53,6% : 65,7% for cleavage and development rates, respectively.

PENDAHULUAN

Maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro* (IVM/IVF/IVC) merupakan teknik alternatif untuk memproduksi embrio tanpa mempengaruhi fungsi fatal induk, dan apabila dikombinasikan dengan teknik transfer embrio (TE) dapat dipakai sebagai cara untuk meningkatkan produksi ternak. Teknik IVF juga merupakan unit dasar dari pembuatan ternak *transgenik* ataupun *kloning*, melalui transfer gen atau nuklear (inti) sebagai usaha perbaikan genetik. Disamping itu hewan transgenik yang dibuat melalui sistem IVF dapat dipergunakan sebagai alat untuk menghasilkan bahan-bahan diagnostik seperti hormon, enzim maupun protein lainnya. Dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan, melalui teknik IVF dapat dihasilkan sejumlah embrio yang seragam yang dapat digunakan baik untuk aplikasi bioteknik maupun kepentingan penelitian lainnya.

Umumnya ovarium diambil dari rumah potong hewan tanpa memperhatikan fase siklus estrusnya (Greve, *et al.*, 1984). Oosit hasil pematangan dan fertilisasi *in vitro* mampu berkembang dan lahir setelah ditransfer ke penerima (*recipient*). Namun demikian, prosentase keberhasilannya masih sangat rendah (Newcomb *et al.*, 1978). Hal ini menunjukkan adanya berbagai faktor yang belum diketahui yang berperan dalam sistem baik pematangan, fertilisasi maupun perkembangan embrio *in vitro*. Di dalam sistem pematangan Oosit, diketahui bahwa suatu zat *inhibin* dapat menghambat pematangan Oosit.

Zat ini dihasilkan oleh sel-sel granulosa dan jumlahnya meningkat terutama pada fase folikuler dari siklus estrus (Campbell, *et al.*, 1990; Findlay, *et al.*, 1990).

Proses pematangan dapat dilakukan dalam medium kultur seperti TCM-199 (Moor dan Trounson, 1977) atau medium dengan komposisi kimia tertentu (*chemically defined medium*) (Bavister, *et al.*, 1992; Kim, *et al.*, 1993). Tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio secara *in vitro* dapat dirangsang oleh penambahan sera sapi-proestrus (Younis, *et al.*, 1989), -estrus (Schellander, *et al.*, 1989) atau -superovulasi (Boediono *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fase siklus estrus yaitu pada fase folikuler dan luteal terhadap perkembangan embrio hasil pematangan dan fertilisasi *in vitro* baik dalam medium TCM-199 maupun medium dengan komposisi kimia tertentu tanpa serum.

BAHAN DAN METODE

Medium pematangan Oosit dipergunakan TCM-199 yang mengandung garam Earle, 2200 mg/mL^{-1} sodium bikarbonat dan 25 mM Hepes; ditambah dengan 5% FCS (Gibco) yang telah diinaktifkan, Penicillin-G (100 IU/mL^{-1}) dan Streptomycin sulfat (0,2 μg mL^{-1}). Sedangkan media perkembangan dipergunakan 2 macam yaitu (1) TCM-199 yang disuplementasi dengan serum SSS dan (2) medium modifikasi Tyrode (mTLP-PVA) yang mengandung 110,0 mM NaCl, 3,2 mM KCL, 2,0 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 25,0 mM $NaHCO_3$, 10,0 mM sodium laktat, 0,5 mM sodium pyruvate dan 1 mg polyvinyl alkohol (PVA) mL^{-1}.

Ovaria diambil dari rumah potong hewan dalam waktu 2 di dalam medium NaCl 0,9% suhu 30-35^{0}C. Folikel-folikel yang diameter antara 2-5 mm tindakan diaspirasi memakai jarum No. 18G yang dihubungan dengan spuit 10 cc berisi 1 mL cairan Phosphate Buffer Saline (PBS). Hanya Oosit yang mempunyai sel-sel kumulus komplit yang dipakai dalam penelitian ini. Oosit dikelompokkan berdasarkan fase estrus. Setelah dicuci berturut-turut dalam cairan PBS dan TCM-199, Oosit dikultur dalam 100 μL medium tetes TCM-199 modifikasi yang ditutupi dengan cairan parafin (*mineral oil*). Kultur dilakukan dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 38,5-39,0 ^{0}C selama 20-22 jam.

Untuk fertilisasi *in vitro* digunakan semen beku yang dilarutkan di dalam 8 mL larutan BO (Brackett dan Oliphant, 1975) yang diberi kafein (C). Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 G selama 10 menit, dan diulangi sebanyak dua kali. Terakhir sperma diencerkan dengan larutan BO-C sehingga mencapai konsentrasi 2 x 106/mL.

Oosit yang telah dimatangkan, dicuci dalam medium BO-Heparin yang diberi suplementasi Bovine Serum Albumine (BSA) 20mg/mL (BO-BSA-H) sebanyak 3 kali, kemudian dimasukkan ke dalam medium tetes 50 μL BO-BSA-H. Tiap tetes mengandung 10-15 Oosit. Ke dalam medium yang mengandung Oosit ditambahkan larutan sperma sebanyak 50 μL, kemudian dikultur selama 8 jam. Setelah 8 jam embrio dengan sel-sel kumulus dipindahkan ke dalam 100 ul medium tetes TCM-199 yang dilapisi dengan parafin cair. Perkembangan dilanjutkan sampai embrio mencapai tahap blastosis dalam inkubator CO_2 5%, suhu 39 °C. Jika perkembangan dilakukan didalam medium mTLP-PVA, embrio terlebih dahulu dibebaskan dari sel-sel kumulusnya.

Pengamatan dilakukan secara *descriptive-laboratories*, yaitu suatu pengamatan deskriptif dalam lingkungan laboratorium (lingkungan yang dikontrol). Pada perlakuan pertama dipakai medium TCM-199 dan Oosit terdiri atas 3 kelompok yaitu kelompok yang berasal dari fase folikuler, kelompok dari fase luteal dan kelompok yang tidak dilakukan pemisahan berdasarkan fase estrus, sebagai kontrol. Sedangkan pada perlakukan kedua dipakai medium mTLP-PVA terdapat dua kelompok Oosit yaitu kelompok fase-folikuler dan -luteal, tanpa kontrol. Untuk setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan masing-masing kelompok mempergunakan 20-30 Oosit. Data dianalisis dengan menggunakan statistik sederhana.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa tingkat pembelahan embrio berdasarkan pengelompokan fase folikuler dan luteal, tidak menunjukkan adanya perbedaan ($p < 0,5$) yaitu masing-masing 75,0% dan 75,6%, namun lebih rendah ($p < 0,5$) dibandingkan dengan kontrol (tanpa dilakukan pemisahan) yaitu 83,5%. Demikian pula perkembangan mencapai tingkat blastosis tidak menunjukkan perbedaan ($p < 0,5$) yaitu masing-masing 20,0% dan 23,0% untuk fase folikuler dan luteal, namun lebih baik ($p < 0,5$) dibandingkan dengan kontrol (13,0%). Jika dipergunakan medium kultur mTLP-PVA (Tabel 2), ternyata kedua kelompok perlakuan menunjukkan tingkat pembelahan yang berbeda ($p < 0,5$) yaitu 68% dan 80% masing-masing untuk kelompok folikuler dan luteal. Sedangkan tingkat perkembangan mencapai morula masing-masing adalah 53,6% dan 65,7% untuk fase folikuler dan luteal.

Perbedaan tingkat baik pembelahan maupun perkembangan pada kedua macam media yang dipergunakan, diperkirakan didalam medium kultur TCM-199 yang disuplementasi dengan SSS terkandung unsur-unsur yang mampu mendukung perkembangan embrio baik pada tingkat pembelahan maupun sampai tahap blastosis. Sedangkan pada medium mTLP-PVA, perbedaan kemungkinan disebabkan tingginya faktor inhibin pada fase folikuler dibandingkan fase luteal, namun hal ini perlu diteliti lebih lanjut.

Tabel 1. Pengaruh Fase Folikel Terhadap Perkembangan Embrio Hasil Pematangan, Pembuahan Dan Kultur *In Vitro* Dalam Medium Yang Disuplementasi Dengan Serum Sapi Superovulasi (SSS)

Fase folikel	**Jumlah Oosit**	**Jumlah embrio yang membelah**				**Jumlah blastosis**
		2-sel	**4-sel**	**8-sel**	**Total**	
Kontrol	91	11	16	49	76 (83.5%)	12 (13%)
Folikuler	64	6	8	34	48 (75.0%)	13 (20%)
Luteal	78	4	9	46	59 (75.6%)	18 (23%)

Tabel 2. Pengaruh Fase Ovarium Terhadap Perkembangan Embrio Yang Dimatangkan Dan Dikultur Secara *In Vitro* Dalam Medium Dengan Komposisi Kimia Tertentu

Fase folikel	**Jumlah Oosit**	**Jumlah embrio yang membelah**				**Jumlah morula**
		2-sel	**4-sel**	**8-sel**	**Total**	
Folikuler	28	4	9	6	19 (68%)	15 (53.6%)
Luteal	35	7	13	8	28 (80%)	23 (65.7%)

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PAU-Ilmu Hayati IPB yang telah membiayai penelitian ini dalam kontrak loan No. 007/P4M/DPPM/L.3311/PAU /1993.

DAFTAR PUSTAKA

Bavister, B.D., T. Rose-Hellekant dan T. Pinyopummirntr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenelogy*. 37:127.

Boediono, A., M. Takagi, S. Saha dan T. Suzuki. 1994. Influence of day-0 and day-7 superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:261-264.

Brackett, B.G. dan G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.

Campbell, B.K, G.E. Mann, A.S. McNeilly, and D.T. Baird 1990. Changes in plasma concentrations of inhibin throughout the normal sheep oestrous cycle and after infusion of FSH. *J. Endocrinology* 1990; 127:227-235.

Findlay, J.K., I.J. Clarke, and D.M. Robertson. 1990. Inhibin concentration in ovarian and jugular venous plasma and the relationship of inhibin with follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the ovine estrous cycle. *J. Endocrinology*; 126:526-535.

Greve, T., D. Bonsquet, W.A. King dan K.J. Betteridge. 1984. *In vitro* fertilization and cleavage of *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 222, 151-165.

Kim, J.H., K. Niwa, J.H. Lim dan K. Okuda. 1993. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes in a chemically defined protein free culture medium. *Biol. of Reprod.* 48:1320-1325.

Moor, R.M. dan A.O. Trounson. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fert.* 49:101-109.

Newcomb, R., W.B. Christie and L.E. Rowson. 1978. Birth of calves after *in vitro* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vitro*. *Vet. Res.* 102, 461-462.

Schellander, K., F. Fuhrer, B.G. Brackett, H. Korb dan W. Echleger. 1989. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*.. 33:476-85.

Younis, A.I., B.G. Brackett dan R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 23:189-201.