PENERAPAN METODE TRANSFER LANGSUNG PADA KRIOPRESERVASI EMBRIO SAPI PERAH

THE USE OF DIRECT TRANSFER METHOD ON EMBRYO CRYOPRESERVATION IN DAIRY CATTLE

Iman Supriatna[1], Tuty Laswardi Yusuf[1], Bambang Purwantara[1], Gozali Moekti[2] dan Lies Parede Hernomoadi[2]

[1]Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Jl. Lodaya II, Bogor 16151
[2]Balai Penelitian Veteriner Departemen Pertanian RI, Jl. R.E. Martadinata No.30, Bogor 16123

ABSTRAK

Media Veteriner. 1999. 6(1): 1-5

Penelitian tentang pembekuan embrio menggunakan metode transfer langsung telah dilakukan untuk menentukan tingkat efektivitas 1,5 M ethylene glycol (EG) dan 1,5 M 1,2-propanediol (PROH) sebagai krioprotektan dan beberapa tingkat konsentrasi sukrosa (0,2 M, 0,4 M, atau 0,8 M) dalam proses pembuangan krioprotektan. Delapan puluh empat embrio stadium morula laik beku dibagi dalam dua kelompok, kelompok pertama sebanyak 42 embrio dipaparkan dengan 1,5 M EG dan sisanya dengan 1,5 M PROH. Embrio dibekukan secara bertahap. Pembilasan untuk pembuangan krioprotektan pada embrio beku dilakukan langsung pada masing-masing medium tanpa sukrosa (0 M), 0,2 M, 0,4 M dan 0,8 M sukrosa.

Hasil penelitian menujukkan bahwa morfologi kualitatif dan daya hidup embrio pascapencairan pada embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG (92,8%) lebih baik dibandingkan dengan 1,5 M PROH (78,6%) (P<0,05). Viabilitas embrio dengan krioprotektan 1,5 M EG yang dibiakkan selama 24 jam *in vitro* setelah rehidrasi dengan 0 M, 0,2 M, 0,4 M dan 0,8 M sukrosa menunjukkan angka viabilitas masing-masing 80,0%, 80,0%, 90,9% dan 81,8% yang tidak berbeda nyata (P>0,05). Pada embrio dengan krioprotektan 1,5 M PROH, perbedaan yang nyata terlihat antara embrio yang direhidrasi dengan 0,4 M dan 0,8 M sukrosa (masing-masing 83,3% dan 90,0%) dengan yang direhidrasi langsung tanpa sukrosa (22,2%) dan 0,4 M sukrosa (36,3%) (P<0,01).

Kata-kata kunci: kriopreservasi, transfer langsung, krioprotektan, ethylene glycol, propanediol, embrio

ABSTRACT

Media Veteriner. 1999. 6(1): 1-5

The experiment was carried out to study the use of direct transfer method in embryo cryopreservation by using two cryoprotectants and the effectivity of various concentrations of sucrose during cryoprotectant removal. Eighty-four morula stage embryos were divided equally into two groups and were treated by using 1.5 M ethylene glycol (EG) and 1.5 M 1,2-propanediol as cryoprotectant. The embryos were frozen using programmable embryo freezing machine on step by step decreasing temperature. Frozen embryos were thawed and cryoprotectants were removed either without sucrose (0 M) or with sucrose in concentration of 0.2 M, 0.4 M and 0.8 M.

The results showed that the quality of the thawed embryos cryopreserved using 1.5 M EG was better than that using 1.5 M PROH. The survival rate on the embryos cryopreserved with 1.5 M EG (92.8%) was higher than 1.5 M PROH (78.6%) (P<0.05). Following 24 hours *in vitro* culture, there was no significant difference on the viability of thawed embryos cryoptotected with 1.5 M EG and rehydrated using different concentration of sucrose (P>0.05). The viability of embryos exposed to 0 M, 0.2 M, 0.4 M and 0.8 M sucrose were 80.0, 80.8, 90.9 and 81.8%, respectively. In contrast, by using 1.5 M PROH, rehydration with 0.4 M (83.3%) and 0.8 M (90.0%) sucrose was significantly better compared to those without (22.2%) or with 0.2 M (36.3%) sucrose (P<0.01).

Key words: cryopreservation, direct transfer, cryoprotectant, ethylene glycol, propanediol, embryo

PENDAHULUAN

Peningkatan hasil panen embrio harus disertai dengan cukupnya persediaan resipien. Sampai saat ini masih selalu dijumpai masalah dalam penyediaan resipien di lapangan, karena kurangnya atau tidak ada resipien yang bermutu atau yang berkondisi sama dengan donor (Mahon dan Rawle, 1987; Supriatna *et al.*, 1997). Embrio-embrio hasil panen yang tidak ditransfer karena tidak tersedianya resipien harus segera dikriopreservasi dalam bentuk embrio beku yang sewaktu-waktu dapat dicairkan dan ditransfer ke resipien sesuai dengan jumlah yang tesedia (Rall 1992). Untuk mengatasi hal ini embrio yang tidak dapat ditransfer langsung, harus disimpan dalam jangka waktu yang lama pada suhu minus 196 °C dalam nitrogen cair melalui metode kriopreservasi yang sederhana dan praktis.

Penelitian-penelitian di bidang kriopreservasi ditujukan untuk menentukan penyebab kerusakan sel yang timbul karena proses pembekuan dan menemukan metode-metode yang dapat mencegah kerusakan sel tersebut sehingga embrio yang dikriopreservasi mampu berkembang normal dengan baik dan disimpan dalam kurun waktu tidak terbatas (Leibo dan Loskutoff, 1993; Kasai, 1996). Program kriopreservasi memberikan kebebasan untuk memilih saat mentransfer embrio beku, pemanenan pedet dan penyediaan resipien yang tidak tergantung dari status reproduksi donor. Kriopreservasi embrio sapi dapat menggunakan metode konvensional (bertahap dan transfer langsung), metode ultra cepat dan vitrifikasi (Niemann, 1993). Sampai saat ini *survival rate* dan angka kebuntingan tertinggi hanya dicapai oleh embrio yang dikriopreservasi melalui metode bertahap. Namun, metode bertahap memerlukan peralatan yang memadai seperti mesin pembeku embrio, mikroskop diseksi, teknisi terampil, waktu pelaksanaan yang lama dan biaya pelaksanaan yang mahal. Walaupun demikian, kriopreservasi masih menjadi tumpuan harapan karena angka kebuntingan dapat mencapai 75%-85% dibandingkan angka kebuntingan yang dicapai oleh hasil transfer embrio segar atau embrio yang tidak dibekukan (Seidel dan Seidel 1991).

Metode transfer langsung dapat dipakai pada kondisi lapangan karena praktis dan tidak memerlukan mikroskop, tidak memerlukan peralatan pendukung evaluasi embrio, sederhana dan ekonomis (Voelkel dan Hu 1992; Niemann 1993). Hanya saja sampai saat ini masih diperlukan krioprotektan dan larutan pembilas yang sesuai untuk keperluan kriopreservasi menggunakan metode transfer langsung.

Tujuan dari penelitian ini adalah menilai aplikasi metode transfer langsung untuk kriopreservasi untuk penyimpanan embrio beku berjangka waktu lama.

BAHAN DAN METODE

Sebanyak 84 embrio sapi perah Fries Holland (FH) bermutu laik beku (Gambar 1) digunakan dalam penelitian ini. Dengan menggunakan kemasan plastik berbentuk jerami, 42 morula dibekukan dalam krioprotektan 1,5 M ethylene glycol (EG, Merck, Germany) dan 42 morula lainnya dalam 1,5 M 1,2-propanediol (PROH, Merck, Germany). Pembekuan embrio dilakukan menggunakan pembeku embrio (CryoLogic CL5000, Australia) dengan tahapan: *start*, *seeding* dan *holding temperature* pada suhu minus 6 °C, dengan laju kecepatan pembekuan -0,3 °C per menit dan suhu *plunging* -35 °C. Penyimpanan dalam nitrogen cair -196 °C berlangsung selama dua minggu dan setelah itu dievaluasi.

Pencairan embrio untuk evaluasi dilakukan dengan memasukkan sampel ke *automatic thawer* 34 °C selama 15 detik menggunakan suatu alat pencair otomatis atau *automatic thawer* (Cassou, Perancis) dengan kecepatan 350-400 °C per menit (Shaw dan Trounson 1994). Setelah mencair, contoh dikeringkan dengan kertas pembersih dan embrio dikeluarkan untuk dievaluasi.

Seluruh embrio beku pascapencairan dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing embrio beku dibilas, untuk membebaskan embrio dari krioprotektan. Pembagian kelompok didasarkan atas perlakuan pembilasan yakni dibilas langsung dengan media pemupukan *modified Dulbecco's phosphate buffered saline* (MPBS, Nissui, Japan) 10% *fetal bovine serum* (FBS, Nissui, Japan) tanpa sukrosa (0 M sukrosa) dan yang dibilas dengan larutan sukrosa berkonsentrasi 0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M. Parameter yang diamati dan diukur adalah:

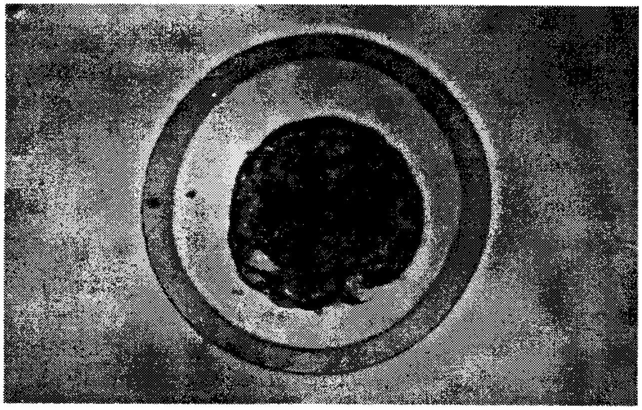
Gambar 1. Embrio sapi perah FH stadium morula bermutu A laik beku dalam keadaan segar prapembekuan (foto mikroskopis 15x40)

a) Proporsi peringkat mutu embrio beku pascapencairan. Penentuan kriteria ini dilakukan berdasarkan pemeriksaan mikroskopis. Evaluasi peringkat mutu menggunakan sistem pembobotan dengan selang nilai 1-5. Embrio dengan morfologi sangat baik dikategorikan bermutu 1, morfologi baik bermutu 2, cukup bermutu 3, buruk bermutu 4 dan mati bermutu 5.
b) *Survival rate*. Embrio bermutu 1-3 dikatakan *survive* dan dapat dibiakkan atau ditransfer. Mutu 4 dan 5 embrio telah rusak atau mati.
c) Viabilitas. Embrio dikategorikan viabel, jika dalam 24 jam pembiakan *in vitro* dalam inkubator 5% CO_2 bersuhu 37 °C dengan kelembaban relatif jenuh 95-100% dapat berkembang ke stadium lebih lanjut.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan teknik Ki-Kuadrat untuk menentukan perbedaan jenis krioprotektan dan konsentrasi sukrosa (Gomez dan Gomez 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mutu embrio beku pascapencairan tersaji pada Tabel 1. Perbandingan mutu embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG dan 1,5 M PROH menunjukan tingkat efektifitas diantara kedua krioprotektan dalam melindungi atau menekan kerusakan sel embrionik selama proses pembekuan. Dari Tabel 1, terlihat bahwa peringkat embrio beku pascapencairan dalam 1,5 M EG dengan mutu satu (Gambar 2) secara nyata lebih tinggi dibandingkan dengan embrio yang dibekukan dengan 1,5 M PROH (P<0,05). Sedangkan proporsi embrio mutu dua dan tiga tidak berbeda nyata antara kedua kripprotektan tersebut. Pembekuan embrio menggunakan



Gambar 2. Embrio beku pascapencairan stadium morula mutu 1 hasil kriopreservasi dalam 1,5 M EG (foto mikroskopis 10x40)

1,5 M PROH selain menghasilkan embrio mutu satu lebih rendah juga masih menimbulkan degenerasi sel embrionik (mutu 4) yang lebih banyak (P<0,01).

Tabel 1. Perbandingan mutu pascapencairan embrio beku dalam krioprotektan 1,5 M EG dan 1,5 M PROH

Peringkat mutu	Jumlah embrio beku pascapencairan dalam	
	1,5 M EG[1]	1,5 M PROH
1	18 (42,9)[a]	12 (28,6)[b]
2	14 (33,3)[a]	13 (31,0)[a]
3	7 (16,6)[a]	8 (19,0)[a]
4	2 (4,8)[c]	7 (16,6)[d]
5	1 (2,4)[a]	2 (4,8)[a]

[1]Angka dalam tanda kurung adalah persentase. Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam baris yang sama berbeda nyata, [a,b] Berbeda nyata (P<0.05). [c,d] Berbeda nyata (P<0.01)

Kemampuan masing-masing krioprotektan dalam melindungi embrio selama proses pembekuan dapat dilihat dari data yang tersaji dalam Tabel 2. Krioprotektan 1,5 M EG lebih efektif melindungi embrio dibandingkan 1,5 M PROH *survival rate* yang berbeda nyata (P<0,05). Dari Tabel 2 juga terlihat bahwa terjadi penurunan mutu embrio setelah dibekukan. Proporsi embrio beku yang mengalami degenerasi atau rusak berat/mati dari 1,5 M EG lebih sedikit dibandingkan 1,5 M PROH.

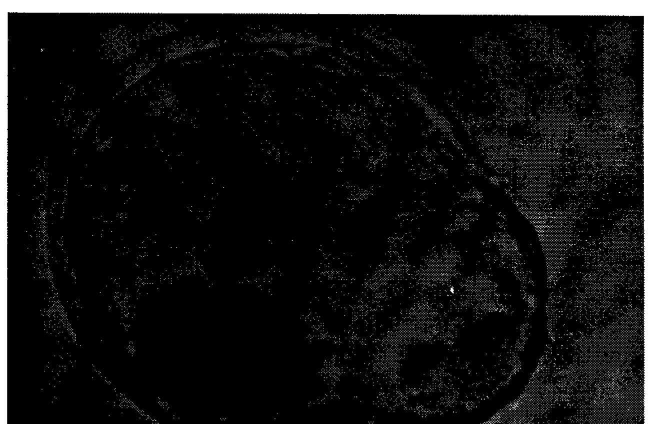
Perbedaan permeabilitas sel-sel embrionik terhadap krioprotektan dan air, menentukan metode yang harus dipakai dalam pembilasan krioprotektan dari embrio beku yang telah dicairkan. Pembilasan krioprotektan dengan metode pengenceran bertahap, akan memberikan kesempatan krioprotektan keluar dari embrio pada setiap tahap. Akan tetapi metode ini masih memberikan cekaman fisik berupa keluar masuknya air sehingga terjadi penggembungan sel secara berulang di setiap tahap equilibrasi pascapencairan yang berdampak negatif terhadap viabilitas embrio. Sukrosa mampu bertindak sebagai penyangga osmotik yang mempertahankan keseimbangan osmotik diantara sel-sel embrionik dengan lingkungan ekstraselular ketika krioprotektan keluar dari embrio (Saito *et al.*, 1994; Hochi *et al.*, 1996).

Tabel 2. Pengaruh 1,5 M EG dan 1,5 M 1,2-propanediol (PROH) sebagai krioprotektan terhadap *survival rate* embrio beku pascapencairan

Krioprotektan	Jumlah embrio beku (n)	Jumlah embrio rusak/mati (n)	*Survival rate* n (%)
1,5 M EG	42	3	39 (92,8)[a]
1,5 M PROH	42	9	33 (78,6)[b]

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom sama berbeda nyata (P<0.05)

Untuk menentukan efektivitas rehidrasi langsung tanpa sukrosa dan melalui medium sukrosa tersaji pada Tabel 3. Viabilitas biakan embrio umur 24 jam yang direhidrasi tanpa sukrosa dan 0,2 M sukrosa secara nyata lebih baik (Gambar 3) pada embrio yang dibekukan dalam 1,5 M EG dibandingkan dengan yang dibekukan dalam 1,5 M PROH (P<0,01). Sedangkan kelompok embrio yang direhidrasi dengan 0,4 M dan 0,8 M sukrosa memperlihatkan viabilitas yang tidak berbeda nyata antara kedua protektan tersebut (P>0,05). Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Suzuki *et al.* (1990) yang mendapatkan viabilitas yang cukup tinggi pada embrio beku dalam 1,5 M PROH yang direhidrasi dengan 0 M dan 0,2 M sukrosa. Viabilitas embrio beku dalam 1,5 M EG tidak terpengaruhi oleh konsentrasi sukrosa ketika direhidrasi. Sedangkan, viabilitas embrio dalam 1,5 M PROH hanya baik ketika direhidrasi dengan 0,4 M dan 0,8 M sukrosa.



Gambar 3. *Hatching blastocyst* yang berasal dari morula beku dalam krioprotektan 1,5 M ethylene glycol hasil kultur in vitro selama 24 jam (foto mikroskopis 10x40)

Tabel 3. Viabilitas embrio beku pascapencairan (pascapembilasan) setelah dibiakkan *in vitro* selama 24 jam

Sukrosa (M)	Jumlah dan viabilitas embrio dalam krioprotektan			
	1,5 M EG		1,5 M PROH	
	Embrio Beku (n)	Embrio viabel n(%)	Embrio beku (n)	Embrio viabel n(%)
0,0	10	8 (80,0)[a]	9	2 (22,2)[b]
0,2	10	8 (80,0)[a]	11	4 (36,3)[b]
0,4	11	10 (90,9)[a]	12	10 (83,3)[a]
0,8	11	9 (81,8)[a]	10	9 (90,0)[a]

Angka dengan huruf superskrip berbeda dalam kolom yang sama berbeda sangat nyata ($P<0.01$)

Efektivitas krioprotektan EG telah diuji oleh beberapa peneliti dengan membandingkannya terhadap krioprotektan lain pada embrio berbagai jenis hewan. Miyamoto dan Ishibashi (1979) mengungkapkan bahwa efektivitas EG sebagai krioprotektan untuk embrio murine pada suhu –60 °C dibandingkan dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany) dan gliserol. EG juga memperlihatkan efektivitasnya sebagai krioprotektan untuk embrio domba dan sapi dibandingkan dengan PROH dan gliserol (Heyman *et al.*, 1987; Szell *et al.*, 1989; Nibart dan Humblot, 1997; Ullah *et al.*, 1997).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa krioprotektan 1,5 M EG lebih baik dibandingkan 1,5 M PROH untuk embrio sapi yang membuktikan tingkat ketinggian viabilitas embrio ketika direhidrasi langsung baik ke dalam larutan pembilas tanpa penambahan sukrosa maupun yang mengandung 0,2 M, 0,4 M atau 0,8 M sukrosa. Sedangkan viabilitas embrio sapi yang dibekukan dalam 1,5 M PROH hanya baik jika direhidrasi dengan larutan pembilas 0,4 M dan 0,8 M sukrosa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberi dukungan dana untuk melakukan riset ini dengan Kontrak No.: 03/P2 IPT/DPPM/97/PHB II/5/V/97, tanggal 20 Mei 1997. Ucapan yang sama juga disampaikan kepada Bapak Prof. DR. Mozes R. Toelihere, MSc. atas izin penggunaan mesin pembeku embrio CryoLogic CL5000.

DAFTAR PUSTAKA

Gomez, K.A. & A.A. Gomez. 1995. Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian. Ed. Ke-2. Terjemahan Endang Sjamsuddin dan Justika S. Baharsjah. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Heyman, Y., C. Vincent, V. Garnier and Y. Cognie. 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.*, 120: 83-85.

Hochi, S., Maruyama and N. Oguri. 1996. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology*, 46: 1217-1224.

Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mamalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 4: 47-75.

Leibo, S.P. and N.M. Loskutoff. 1993. Cryobiology non in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 81-94.

Mahon, G.D. and J.E. Rawle. 1987. The export of deep-frozen bovine embryos. *Theriogenology*, 27 (1): 21-35.

Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1979. Effects of low suhues on survival of frozen-thawed mouse embryos. *Experentia*, 35: 1505-1506.

Nibart, M, and P. Humblot. 1997. Ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* 47(1): 371 (abstract).

Niemann, H. 1993. In Vitro Befruchtung und Weiterentwicklung von tiefgefrorenen Bovineembryonen. *Dtsch. Tieraztl. Wschr.*, 98: 21-29.

Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28: 237-245.

Saito, N., K. Imai and M. Tomizawa. 1994. Effect of sugar addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41: 1053-1064.

Seidel, G.E. Yr. and S.M. Seidel. 1991. Training Manual of Embryo Transfer in Cattle. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University. Fort Collins, USA.

Shaw, J.M. and A.O. Trounson. 1994. Effect of warning procedures on slowly cooled mouse blastocysts. *Theriogenology*, 41: 292 (abstract)

Supriatna, I., T.L. Yusuf, B. Purwantara, G. Moekti and L.P. Hernomoadi. 1997. Kajian mengenai waktu aplikasi MoAb Anti PMSG terhadap peningkatan hasil panen embrio sapi perah yang disuperovulasi dengan PMSG. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/4. Perguruan Tinggi. Bagian Reproduksi dan Kebidanan, FKH-IPB.

Suzuki, T., Z. Guo, J. Chen and T. Kuo. 1990. Removal examination of cryoprotectants from frozen-thawed bovine embryos with glycerol and 1,2-propanediol. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 36: 105-109.

Szell, A., J.N. Shelton and K. Szell. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 26: 297-301.

Ullah, N., M. Shimizu, Y. Izaike and M. Anwar. 1997. Survival of bovine oocytes after exposure to ethylene glycol. *Theriogenology*, 47(1): 357 (abstract).

Voelkel, S.A. and Y.X. Hu. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37: 687-697.