

Viabilitas Demi Embrio Sapi *In Vitro* Hasil *Splitting* Embrio Segar dan Beku

M. IMRON¹, A. BOEDIONO² dan I. SUPRIATNA^{2,1}

¹Balai Embrio Ternak Cipelang, PO Box 485 Bogor 16004
Email: imron@deptan.go.id

²Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

(Diterima dewan redaksi 11 Maret 2007)

ABSTRACT

IMRON, M., A. BOEDIONO and I. SUPRIATNA. 2007. Viability of bovine demi embryo after splitting of fresh and frozen thawed embryo derived from *in vitro* embryo production. *JITV* 12(2): 118-123.

In vivo embryo production was limited by number of donor, wide variability respond due to superovulation program and also immunoactivity of superovulation hormone (FSH). *Splitting* technology could be an alternative to increase the number of transferrable embryos into recipient cows. *Splitting* is done with cutting embryo becoming two equal pieces (called demi embryo) based on ICM orientation. The objective of this research was to determine the viability of demi embryo obtained from embryo splitting of fresh and frozen thawed embryo. The results showed that demi embryos which performed blastocoel reexpansion 3 hours after embryo splitting using fresh and frozen thawed embryos were 76.9 and 76.2% respectively. Based on existence of inner cell mass (ICM), the number of demi embryos developed with ICM from fresh and frozen thawed embryos were not significantly different (90.6 and 85.7% respectively). The cell number of demi embryo from fresh embryos splitting was not different compared with those from frozen thawed embryos (36.1 and 35.9 respectively). These findings indicated that embryo splitting can be applied to frozen thawed embryos with certain conditions as well as fresh embryos.

Key Words: *In Vitro* Embryo, Splitting, Demi Embryo, Cell Number

ABSTRAK

IMRON, M., A. BOEDIONO dan I. SUPRIATNA. 2007. Viabilitas demi embrio sapi *in vitro* hasil *splitting* embrio segar dan beku. *JITV* 12(2): 118-123

Produksi embrio *in vivo* ternak sapi dipengaruhi antara lain oleh respon sapi donor terhadap program superovulasi yang sangat bervariasi, immunoaktivitas hormon superovulasi (FSH) serta keterbatasan jumlah sapi donor. Teknologi *splitting* embrio diharapkan dapat menjadi alternatif untuk optimalisasi penambahan jumlah embrio yang dapat ditransfer ke resipien per embrio utuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan viabilitas demi embrio yang dihasilkan setelah proses *splitting* menggunakan embrio *in vitro* segar dan beku. *Splitting* embrio dilakukan dengan membelah embrio menjadi dua bagian yang sama (demi embrio) dengan mempertimbangkan keberadaan ICM. Setelah dilakukan *splitting* embrio diperoleh hasil bahwa demi embrio yang menunjukkan adanya reekspansi blastosol tiga jam setelah *splitting* menggunakan embrio segar dan beku tidak berbeda nyata (76,9 dan 76,2%). Berdasarkan keberadaan inner cell mass (ICM), jumlah demi embrio yang positif memiliki ICM untuk embrio segar dan beku tidak berbeda nyata (90,6 dan 85,7%). Demikian juga dengan rata-rata jumlah sel demi embrio segar dan beku (36,1 dan 35,9) tidak berbeda nyata. Hasil ini mengindikasikan bahwa *splitting* embrio dapat dilakukan pada embrio beku yang memiliki kriteria tertentu dengan kualitas hasil setara dengan embrio segar.

Kata Kunci: Embrio *In Vitro*, *Splitting* Embrio, Demi Embrio, Jumlah Sel

PENDAHULUAN

Aplikasi bioteknologi reproduksi pada ternak sapi di Indonesia dalam beberapa dekade terakhir telah menunjukkan perkembangan yang cukup pesat. Hal ini dimulai dengan penerapan teknologi inseminasi buatan (IB) sekitar tahun 1970-an yang ditandai dengan didirikannya Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. Aplikasi transfer embrio (TE) pada sapi mulai dilaksanakan di awal dekade 90-an yang ditandai dengan didirikannya Balai Embrio Ternak (BET) di Desa Cipelang, Bogor. Teknologi TE memberikan keunggulan lebih dibandingkan dengan IB karena peningkatan kualitas genetik dapat dideteksi baik dari

sisi pejantan maupun dari sisi betinanya sehingga percepatan mutu genetik ternak dapat dilakukan secara lebih efisien.

Produksi embrio sapi secara *in vivo* banyak menemui kendala antara lain karena respon sapi donor terhadap program superovulasi sangat bervariasi, keterbatasan jumlah sapi donor dan immunoaktivitas hormon superovulasi (FSH) yang tidak stabil sehingga jumlah produksi embrio *in vivo* sulit dibuat target yang pasti (ANONIMOUS, 2006; GONG *et al.*, 1993; KELLER dan TEEPKE, 1990; KANITZ *et al.*, 2003). Alternatif lain untuk produksi embrio yang dapat dilakukan yaitu dengan memproduksi embrio *in vitro* (IVF). Tetapi karena oosit yang digunakan untuk IVF berasal dari

Rumah Potongan Hewan yang tidak jelas tetuanya, mutu genetik embrio *in vitro* tidak dapat dipertanggungjawabkan sehingga pedet yang dihasilkan dari embrio *in vitro* tidak dapat digunakan sebagai bibit dasar.

Teknologi lain yang dapat digunakan untuk optimalisasi produksi embrio adalah dengan teknik *splitting* yaitu memotong embrio menjadi dua bagian yang sama. Potongan embrio yang dihasilkan dalam proses *splitting* selanjutnya disebut "demi embrio". Teknik *splitting* embrio dilaporkan telah dilakukan pada ternak domba (WILLADSEN, 1979), kambing (UDY, 1987; NOWSHARI dan HOLTZ, 1993; BOEDIONO *et al.*, 2005) dan ternak sapi (UTSUMI dan IRITANI, 1990; LOPEZ *et al.*, 2001; HOZUMI, 2001; NORMAN *et al.*, 2002)

Dengan melakukan *splitting* pada embrio, diharapkan akan mampu meningkatkan jumlah embrio yang dapat ditransfer kepada sapi resipien sehingga pada akhirnya akan meningkatkan persentase kebuntingan per embrio utuh yang dihasilkan. Namun karena untuk efisiensi teknis sebagian besar embrio yang diproduksi disimpan dalam bentuk embrio beku (ANONIMOUS, 2006), perlu dikaji apakah embrio beku masih memungkinkan untuk dilakukan *splitting*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan viabilitas demi embrio hasil *splitting* menggunakan embrio *in vitro* segar dan beku.

MATERI DAN METODE

Produksi embrio *in vitro*

Ovarium yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Rumah Potongan Hewan (RPH) terdekat. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam media NaCl fisiologis yang disuplementasi antibiotik pada suhu kamar. Aspirasi dilakukan pada folikel antral yang berdiameter 2-5 mm menggunakan jarum suntik 18 G. Oosit ditampung dalam cawan petri yang berisi mPBS dan kemudian dimaturasi menggunakan medium TCM 199 dalam inkubator CO₂ 5% selama 20-22 jam.

Sperma yang digunakan untuk fertilisasi adalah sperma beku yang dicairkan dalam air yang bersuhu 30-35°C. Sperma dicuci dengan medium BO dan disentrifuse dengan kecepatan 500 G selama 5 menit.

Kepadatan populasi sperma diatur pada konsentrasi 5 x 10⁶ sperma/ml. Fertilisasi dilakukan dengan mentransfer oosit yang telah dimaturasi kedalam drop sperma (50 µl) sebanyak 10 oosit per drop.

Setelah campuran sperma-oosit diinkubasi sekitar 5 jam dalam inkubator CO₂ 5%, oosit dicuci dan dikultur lebih lanjut menggunakan medium CR1aa (10 embrio per 50 µL drop) dalam inkubator CO₂ pada suhu 38,5°C. Embrio yang digunakan lebih lanjut dalam penelitian ini adalah embrio yang mencapai tahap blastosis lanjut pada hari ke- 7, 8 atau 9, dan mempunyai bentuk morfologi yang baik dengan ciri-ciri: 1). Bentuk bulat oval (*spherical*); 2). Rongga blastosol terbentuk dengan baik, jelas dan menempati lebih dari 60% volume total blastosis; 3). Sel-sel blastosis berkembang baik dengan jumlah sel degenerasi maksimal 10%; 4). Bentuk dan posisi *inner cell mass* (ICM) jelas, normal dan berkembang baik (LINARES dan KING, 1980).

Pembekuan dan pencairan embrio

Pembekuan embrio dilakukan dengan menggunakan prosedur vitrifikasi standar Balai Embrio Ternak. Embrio diekuilibrasi dalam 3 macam media vitrifikasi (Tabel 1). Equilibrasi dilakukan pada suhu ruang (22°C) masing-masing selama lima menit dalam media pembekuan VS 1 dan VS 2. Setelah itu embrio diekuilibrasi dalam VS 3 dan dimasukkan dalam straw yang sebelumnya telah diisi dengan media mPBS yang mengandung sukrose 0,5 M. Proses equilibrasi dalam VS 3 sampai ke tahap pencelupan straw kedalam nitrogen cair dilakukan dalam waktu kurang dari satu menit.

Pencairan (*warming*) embrio dilakukan dengan cara mengeluarkan straw dari dalam nitrogen cair, dibiarkan dalam udara terbuka selama 5-6 detik dan kemudian dicelupkan kedalam air pada suhu ruang (22°C). Isi straw ditampung dalam cawan petri, kemudian dilakukan pencarian embrio dibawah mikroskop. Embrio segera dipindahkan ke media mPBS yang mengandung berturut-turut 0,5 M dan 0,25 M sukrose masing-masing selama 5 menit. Setelah itu embrio dicuci menggunakan mPBS dan media kultur CR1aa. Akhirnya embrio dikultur lebih lanjut dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C.

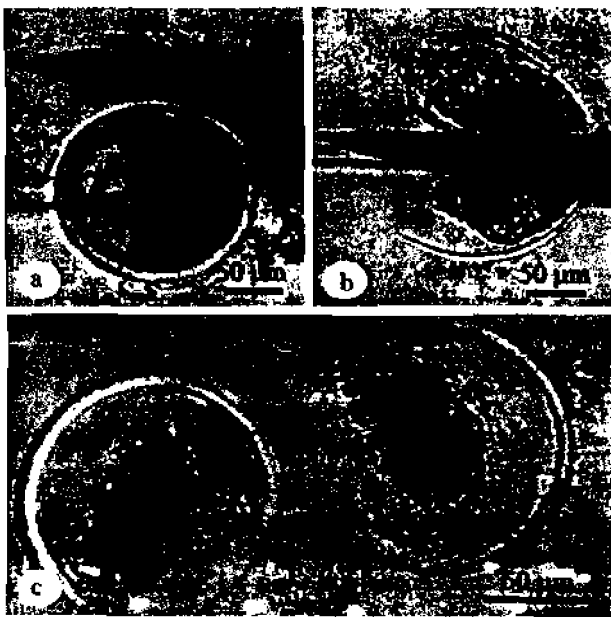
Tabel 1. Komposisi media vitrifikasi yang digunakan untuk pembekuan embrio

Media	Glycerol (%)	Etilen glikol (%)	Sucrose (M)	Xylose (M)	Poly etilen glikol (%)
VS 1	10	-	0.1	0.1	1
VS 2	10	10	0.2	0.2	2
VS 3	10	30	0.3	0.3	3

Embrio beku yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut: 1) terdapat pertambahan ukuran diameter embrio; 2) terjadi reekspansi blastosol; 3) terbentuknya kembali ICM dan trofoblas.

Splitting embrio

Embrio yang digunakan untuk *splitting* yaitu: 1) embrio sapi *in vitro* segar; 2) embrio *in vitro* beku yang telah dicairkan, dikultur selama 24 jam dan hanya embrio-embrio viable yang digunakan sebagai materi penelitian. *Splitting* embrio dilakukan sesuai dengan metode yang telah dilaporkan oleh BOEDIONO (2005) (Gambar 1). Demi embrio hasil *splitting* dicuci dengan media kultur CR1aa dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C. Pengamatan dilakukan terhadap morfologi demi embrio yaitu bentuk embrio, keberadaan ICM, trofoblas, reekspansi blastosol dan jumlah sel hidup selama 3 jam setelah proses *splitting*.



Gambar 1 Tahapan proses *splitting* embrio. a) Goresan kecil pada dasar cawan petri (tanda panah); b) *Splitting* embrio; c) Demi embrio sesaat setelah *splitting*

Analisa statistik

Data dianalisa dengan menggunakan dasar rancangan acak lengkap (RAL). Perbedaan hasil antar perlakuan diuji secara deskriptif (HOSHMAND, 1998) menggunakan software statistika MinitabTM Release 13.20.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan *splitting* embrio dengan menggunakan embrio segar dan beku disajikan pada Tabel 2. Dari 23 embrio beku dan 23 embrio segar yang di-*splitting*, jumlah demi embrio yang dihasilkan berturut-turut adalah 43 (93,5%) dan 39 (92,5%). Jumlah demi embrio beku yang berkembang dan mengalami reekspansi blastosol tiga jam setelah *splitting* adalah 35 buah (76,1%). Hasil *splitting* ini hampir sama dibandingkan dengan jika *splitting* menggunakan embrio segar yang menghasilkan demi embrio sebanyak 32 (76,2%) buah (Tabel 2).

Perbandingan morfologis demi embrio sesaat setelah *splitting* dan 3 jam setelah *splitting* dapat dilihat pada Gambar 2. Demi embrio sesaat setelah *splitting* bentuknya lonjong karena pengaruh tekanan pisau mikro pada saat memotong embrio (Gambar 2 bagian a). Tiga jam setelah proses *splitting*, demi embrio telah mengalami perkembangan secara morfologis yaitu terjadi reekspansi ICM dengan membentuk kembali ICM dan trofoblas. Selain itu bentuk demi embrio menjadi bulat kembali dan tidak lonjong (Gambar 2 bagian b). Demi embrio yang mengalami degenerasi atau rusak dapat dibedakan secara jelas dibandingkan demi embrio yang hidup tiga jam setelah *splitting* karena sel-sel pada demi embrio yang rusak akan saling terlepas dan menyebar di dasar cawan petri.

Morfologi demi embrio setelah tiga jam tidak banyak mengalami perubahan jika kultur dilanjutkan 3 sampai 24 jam. Jika kultur dilanjutkan lebih dari 24 jam, sel-sel demi embrio akan menempel pada dasar cawan petri kultur dan menyatu dengan lapisan sel-sel kumulus yang digunakan sebagai kokultur dalam media kultur sehingga menyulitkan dalam proses pemindahan demi embrio. Hasil ini menyarankan bahwa kultur selama 3 jam dianggap cukup untuk memastikan bahwa demi embrio telah berkembang secara normal, viable dan siap untuk ditransfer ke sapi resipien. BOEDIONO (2005) melaporkan bahwa demi embrio yang dihasilkan dalam *splitting* pada embrio kambing setelah kultur selama 3-24 jam menunjukkan terbentuknya ICM dan trofoblas yang secara jelas dapat dibedakan.

Keberhasilan *splitting* embrio dengan ICM sebagai orientasi menggunakan embrio beku dan embrio segar berturut-turut adalah 30 (85,7%) dan 29 (90,6%) (Tabel 3). Terlihat bahwa keberhasilan *splitting* menggunakan embrio beku adalah hampir sama dibandingkan dengan embrio segar. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh NOWSHARI dan HOLTZ (1995) yang menyatakan bahwa viabilitas demi embrio segar pada kambing nyata lebih tinggi dibandingkan dengan demi embrio beku. Perbedaan hasil ini kemungkinan diakibatkan oleh perbedaan perlakuan dimana

sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.

MCEVOY, T.G., J. JOHN, ROBINSON and D.S. KEVIN. 2001. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction* 122: 507-518.

NORMAN, H.D., T.J. LAWLOR and J.R. WRIGHT. 2002. Performance of holstein clones in the United States. Board on Agriculture and Natural Resources. National Research Council Online: http://www.nationalacademies.org/banr/Animal_biotechnology.html. (5 Juni 2004)

NOWSHARI, M.A. and W. HOLTZ. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *J. Anim Sci* 71: 3403-3408.

SUZUKI, T., C. SUMANTRI, KHAN NHA, M. MURAKAMI and S. SAHA. 1999. Development of simple portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 54: 149-157.

UDY, G.B. 1987. Commercial splitting of goat embryos *Theriogenology* 28: 837-842.

UTSUMI, K. dan A. IRITANI. 1990. Production of cattle identical twins by splitting blastocysts using a metal microblade. *Theriogenology* 33: 341.

WILLADSEN, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins *Nature* 277 298-300

DAFTAR ISI

	Halaman
Peningkatan Nilai Gizi <i>Solid Heavy Phase</i> dalam Ransum Unggas sebagai Pengganti Jagung <i>A.P. Simurat, T. Purwadaria, I.A.K. Bintang dan T. Pasaribu</i>	87
Comparison Fermentation Kinetics (<i>In Vitro</i>) of Grass and Shrub Legume Leaves: The Pattern of VFA Concentration, Estimated CH ₄ and Microbial Biomass Production <i>Y. Widiawati and A. Thalib</i>	96
Penggunaan Mikrobial Selulolitik Campuran dari Ekstrak Rayap, Larutan Feses Gajah dan Cairan Rumen Kerbau untuk Meningkatkan Kecernaan <i>In vitro</i> Rumput Raja <i>Agung Prabowo, Soemitro Padmowijoto, Zaenol Bachruddin dan Abdul Syukur</i>	105
The Effects of Microwave Radiation on Rumen Degradation Characteristics of Barley Straw Cut at Two Different Stages of Maturity Asmuddin Nalsir	112
Viabilitas Demi Embrio Sapi <i>In Vitro</i> Hasil <i>Splitting Embrio</i> Segar dan Beku <i>M. Imron, A. Boediono dan I. Supriatna</i>	118
Keragaman Mikrosatelit DNA Sapi Perah Friesian-Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Baturraden <i>C. Sumantri, A. Anggraeni, A. Farajallah dan D. Perwitasari</i>	124
Kualitas Spermatozoa Epididimis Anjing selama Penyimpanan pada Suhu 4°C <i>M.A. Setiadi, Yulnawati dan A. Suprayogi</i>	134
Kriopreservasi Semen Kuda Menggunakan Berbagai Krioprotektan pada Pengencer Susu Skim <i>R.I. Arifiantini dan I. Supriatna</i>	139
Rescuing Genetic Material of Unexpectedly Die Animal <i>Syahrudin Said and Takdir Saili</i>	147
Karakterisasi Aktivitas Enzimatik Neuraminidase Virus Influenza H5N1 <i>Simson Tarigan, Risa Indriani dan Darminto</i>	153
Waterfowl Potential as Reservoirs of High Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses <i>R. Susanti, R.D. Soejoedono, I.G.N.K. Mahardika, I.W.T. Wibawan dan M.T. Suhartono</i>	160