PENGARUH KADAR GLUKOSA DALAM MEDIA DENGAN DAN TANPA FOSFAT TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO PREIMPLANTASI MENCIT SECARA *in vitro*

THE EFFECT OF GLUCOSE CONCENTRATION IN MEDIUM WITH AND WITHOUT PHOSPHATE ON *in vitro* DEVELOPMENT OF MOUSE PREIMPLANTATION EMBRYOS

Ita Djuwita[1], Lia Amalia[1], Widjiati[2] dan Kusdiantoro Mohamad[1]

[1]Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151 INDONESIA
[2]Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Media Veteriner. 2000. 7(1): 9-12.

Penelitian mengenai pengaruh kadar glukosa terhadap perkembangan embrio mencit tahap preimplantasi telah dilakukan menggunakan media biakan M16 yang mengandung 3% BSA. Embrio tahap satu sel dari mencit galur CBR dibiakkan dalam media biakan M16 dengan 3% BSA yang diberi tambahan glukosa dengan berbagai kadar yaitu (1) 0 mM; (2) 2,5 mM; (3) 5,0 mM; (4) 7,5 mM dan (5) 10,0 mM dengan dan tanpa 1,19 mM fosfat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa glukosa tidak menghambat perkembangan embrio preimplantasi mencit galur CBR. Namun, kadar glukosa sangat berpengaruh terhadap tingkat perkembangan embrio. Setelah 24 jam pembiakan, tingkat pembelahan zigot ke tahap 2-sel nyata lebih tinggi (93,8-100.0%, p<0,05) pada media yang diberi tambahan glukosa dibanding yang tanpa glukosa (31,6%). Memasuki tahap 4-sel, kadar glukosa yang dibutuhkan oleh embrio adalah 2,5 mM yang ditunjukkan oleh tingkat pembelahan yang lebih tinggi (82,0%, p<0,05) dibanding kadar lainnya. Memasuki tahap 8-sel kebutuhan embrio terhadap glukosa meningkat dan tampak pada kadar glukosa 5,0 mM jumlah embrio yang mampu berkembang mencapai tahap 8-sel lebih tinggi (42,9%, p<0,05) dibanding yang 2,5 mM (29,3%). Penambahan fosfat ke media yang mengandung glukosa dengan kadar rendah (2,5 mM) dapat meningkatkan jumlah embrio yang berkembang mencapai tahap morula dan blastosis yaitu masing-masing 75,0% (p<0,05) dan 33,3% (p<0,05) dibanding media tanpa fosfat yang hanya 33,3% dan 0,0%.

Kata-kata kunci: kadar glukosa, fosfat, perkembangan *in vitro*, embrio mencit

ABSTRACT

Media Veteriner. 2000. 7(1): 9-12.

The effect of glucose concentration on *in vitro* development of preimplantation mouse embryos was investigated using M16 culture medium supplemented with 3% BSA. Mouse embryos step of one cell from CBR were cultured in M16-BSA culture medium containing glucose with concentrations of (1) 0 mM; (2) 2.5 mM; (3) 5.0 mM; (4) 7.5 mM and (5) 10.0 mM, successively without 1.19 mM phosphate. The results showed that glucose did not inhibit the development of CBR preimplantation mouse embryos, but glucose concentration did influence the development rate. After 24 hrs cultured, supplementation of glucose showed beneficial for development of 1-cell to 2-cell embryos (93.8 – 100 %, p<0,05), compared to one without (31.6%). Beyond 8-cell stage, the concentration of 2.5 mM glucose showed a high percentage of 1-cell embryos that developed to 4-cell stage (82.0%, p<0,05) compared to the concentration of 5.0 mM (46.7%), 7,5 mM (28.9%) and 10.0 mM (27.9%), respectively. In medium containing 2.5 mM glucose, 8-cell embryos that developed to CM-stages decreased (33.3%) and none developed to the blastocyst (BL) stage. Compared to one containing 5.0 mM glucose, embryos that developed to the CM- and BL-stages were (66.7%) and (50.0%), while concentration of 10.0 mM were (75.0%) and (66.7%), respectively. Addition of 1.19 mM phosphate in medium increased the percentage of embryos developed to morula and blastocyst when glucose was presence in low concentration (2,5 mM) compared to one without.

Key words: glucose concentration, phosphate, *in vitro* development, mouse embryos

PENDAHULUAN

Teknik biakan embrio merupakan salah satu penentu keberhasilan dalam usaha produksi dan rekayasa embrio secara *in vitro*. Tingkat keberhasilan embrio yang dihasilkan melalui biakan *in vitro* dalam media buatan sangat beragam. Khususnya embrio yang diperoleh melalui proses pembuahan *in vitro* atau dari satu sel (zigot), jumlah dan daya hidup embrio yang dihasilkan masih rendah. Salah satu penyebabnya adalah kondisi biakan yang suboptimum.

Umumnya embrio yang dihasilkan melalui pembuahan *in vitro* atau mulai dibiakkan pada tahap zigot, di dalam media biakan akan mengalami hambatan perkembangan, yang dikenal dengan fenomena *cell-block*. Tahap terjadinya hambatan pada tiap spesies berbeda-beda, yaitu pada tahap 2- sampai tahap 8-sel (Miyoshi *et al.*, 1994). Sedangkan pada embrio mencit terjadi pada tahap 2-sel (*two-cell block*). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kehadiran glukosa dalam media biakan menyebabkan terjadinya hambatan perkembangan, misalnya pada mencit (Chatot *et al.*., 1990), sapi (Ellington *et al.*., 1990), dan babi (Pet-ters *et al.*., 1990). Sebaliknya, beberapa peneliti menunjuk-kan bahwa glukosa tidak menghambat perkembangan zigot secara *in vitro* baik pada tikus (Miyoshi *et al.*., 1994) mau-pun mencit (Brown dan Whittingham, 1991; Sawai *et al.*., 1994). Bahkan hasil penelitian Miyoshi *et al.* (1994) me-nunjukkan bahwa penambahan fosfat 0.4 mM dengan dan tanpa glukosa ke dalam media biakan dapat menghambat perkembangan embrio tikus.

Pengaruh glukosa dengan atau tanpa fosfat terhadap perkembangan embrio mencit secara *in vitro* masih harus dibuktikan. Atas dasar hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kadar glukosa dalam media biakan dengan dan tanpa fosfat terhadap tingkat perkembangan embrio preimplantasi mencit secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Hewan Percobaan dan Media

Hewan percobaan yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus albinus*) galur CBR betina umur 2 bulan dan jantan umur 3-4 bulan. Media yang dipakai adalah Phosphate Buffer Saline (PBS, Nissui, Jepang) dan media M16 (Whittingham, 1971) yang diimbuhi 3% Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma), penisilin G dan streptomicin sulfat masing-masing sebanyak 100 UmL^{-1} dan 50 μgml^{-1}.

Perlakuan

Mencit betina disuperovulasi dengan 5 IU *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG, Intervet) dan 5 IU *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG, Intervet) 48 jam kemudian. Masing-masing penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal (*i.p.*). Setelah disuntik hCG mencit betina langsung disatukan dengan mencit pejantan dewasa secara *mono mating*. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap terbentuknya sumbat vagina yang menandakan mencit betina telah kawin. Betina yang menunjukkan positif kemudian dipisahkan.

Pemanenan zigot dilakukan dengan menoreh kantung pembuahan pada bagian atas tuba Fallopii (Ampulla). Zigot dengan sel-sel kumulus dicuci berturut-turut di dalam media PBS dan M16 dengan ulangan 3 kali dan dievaluasi. Kemudian zigot dibiakkan dalam media M16 tetes (sebanyak 25 µl) yang telah ditutup dengan cairan parafin TM (Squibb). Biakan dilakukan di dalam inkubator CO_2 5% (modifikasi), suhu 37 °C. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam sampai embrio mencapai tahap blastosis.

Rancangan Percobaan

Percobaan dirancang dengan mengimbuhkan glukosa ke media M16 pada berbagai kadar yaitu 0,0 mM; 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM dan 10,0 mM dengan atau tanpa 1,19 mM fosfat. Masing-masing perlakuan mengalami tiga kali ulangan dengan masing-masing ulangan menggunakan 15-20 embrio (zigot). Data diperoleh menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dan dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan perbedaan yang ada diantara perlakuan dilanjutkan analisisnya dengan uji wilayah berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambahan glukosa ke media biakan dengan berbagai kadar 0,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM dan 10,0 mM tanpa fosfat menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p<0,05$) (Tabel 1). Pada Tabel 1 tampak bahwa glukosa sangat dibutuhkan untuk pembelahan pertama dari zigot ke tahap 2-sel yang ditunjukkan dari tingkat pembelahan zigot pada media yang diimbuhi glukosa nyata lebih tinggi (93,8-100,0%, $p<0,05$) dibanding yang tanpa glukosa (31,6%).

Memasuki tahap 4-sel, kadar glukosa yang dibutuhkan

Tabel 1. Pengaruh kadar glukosa dalam media biakan tanpa fosfat terhadap rata-rata perkembangan embrio preimplantasi mencit secara *in vitro*

Kadar glukosa (mM)	Jumlah embrio yang dibiakkan	Jumlah (%) embrio yang berkembang				
		2-sel (24 jam)*	4-sel (48 jam)*	8-sel (72 jam)*	Morula (96 jam)*	Blastosis (120 jam)*
0.0	57	18 (31.6) b	5 (27.8) c	1 (20.0) a	0 (0.0) b	0 (0.0) b
2.5	50	50 (100.0) a	41 (82.0) a	12 (29.3) a	4 (33.3)ab	0 (0.0) b
5.0	48	45 (93.8) a	21 (46.7) b	9 (42.9) a	6 (66.7) a	3 (50.0) a
7.5	48	45 (93.8) a	13 (28.9)bc	5 (38.5) a	3 (60.0)ab	3 (100.0) a
10.0	44	43 (98.0) a	12 (27.9) c	4 (33.3) a	3 (75.0) a	2 (66.7)ab

Keterangan: *Jumlah yang diamati setelah dibiakkan (jam), a-c Huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada setiap kolom ($p<0,05$).

oleh embrio adalah 2,5 mM dengan tingkat pembelahan yang lebih tinggi (82,0%, p<0,05). Hal ini menunjukkan bahwa kadar glukosa yang tinggi merupakan salah satu faktor terjadinya hambatan perkembangan (*cell-block*) pada mencit. Hasil yang sama diperoleh Kim *et al.*. (1993) dan Thompson *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa embrio sapi membutuhkan glukosa rendah selama awal pembelahan dan akan meningkat setelah melewati fase *cell block*. Kadar glukosa yang tinggi akan menghambat perkembangan embrio tahap 2-sel (Rieger, 1992). Diduga bahwa metabolisme glukosa yang tinggi akan menghasilkan oksigen radikal bebas yang lebih banyak dibandingkan jumlah piruvat yang dapat mengikatnya sehingga mengakibatkan gangguan pada perkembangan dini. Memasuki tahap 8-sel kebutuhan embrio terhadap glukosa tampak mulai meningkat. Pada kadar glukosa 5,0 mM jumlah embrio yang mampu berkembang mencapai tahap 8-sel lebih tinggi (42,9%) dibanding yang 2,5 mM (29,3%). Begitu pula pada saat memasuki tahap morula dan blastosis, kebutuhan embrio terhadap glukosa semakin meningkat. Meningkatnya kebutuhan glukosa pada tahap 4-sel diduga erat berkaitan dengan mulai aktifnya genom embrio mensintesis rRNA yang memerlukan energi tinggi, diantaranya diperoleh dari metabolisme glukosa (Hogan *et al.*, 1986). Sedangkan memasuki tahap morula dan blastosis, meningkatnya kebutuhan glukosa diduga berkaitan dengan mulainya diferensiasi sel untuk membentuk *inner cell mass* (ICM), trofoblas dan blastosul yang juga membutuhkan energi tinggi (Brison dan Leese, 1994; Hewitson *et al.*, 1996).

Pada media tanpa glukosa tampak bahwa tidak ada embrio yang mampu berkembang mencapai tahap diatas 8-sel. Hal ini diduga karena pada awal pembelahan embrio telah memakai habis cadangan glikogen yang disintesis selama masa oogenesis, sehingga tanpa sumber energi yang cukup (glukosa) embrio tidak mampu mencapai tahap yang lebih lanjut.

Penambahan fosfat 1,19 mM dalam media biakan dengan berbagai kadar glukosa memberikan pengaruh positif terhadap perkembangan embrio pada berbagai tahap perkembangan . Khususnya pada media dengan kadar glukosa rendah (2,5 mM) ataupun tanpa glukosa penambahan fosfat dapat meningkatkan jumlah dan daya hidup embrio yang berkembang serta mencapai tahap morula dan blastosis yaitu masing-masing 75,0% (p<0,05) dan 33,3% (p<0,05) dibanding media tanpa fosfat yaitu 33,3% dan 0,0% (Tabel 1 dan 2). Dalam hal ini peranan fosfat sangat dibutuhkan untuk membantu memecah cadangan glikogen menjadi glukosa-6-fosfat jika tidak ada glukosa (Schini *et al.*, 1989). Tetapi dalam kadar glukosa tinggi penambahan fosfat menimbulkan pengaruh negatif terhadap perkembangan embrio. Jumlah embrio yang mampu berkembang mencapai blastosis nyata lebih tinggi pada media dengan glukosa 7,5 mM dan 10,0 mM tanpa fosfat yaitu masing-masing 100,0% (p<0,05) dan 66,7% (p<0,05) dibanding dengan media yang diimbuhi fosfat yaitu sebesar 60,0% dan 33,3%. Kombinasi glukosa berkadar tinggi dengan fosfat diduga dapat menimbulkan pengaruh *Crabtree* yang menyebabkan hambatan proses fosforilasi oksidasi dan respirasi di mitokondria sehingga pembentukan energi terhambat seperti yang telah dilaporkan oleh Schini *et al.* (1989) dan Seshagiri dan Bavister (1991).

Tabel 2. Pengaruh kadar glukosa dalam media biakan dengan fosfat 1,19 mM terhadap rata-rata perkembangan embrio preimplantasi mencit secara *in vitro*

Kadar glukosa (mM)	Jumlah embrio yang dibiakkan	Jumlah (%) embrio yang berkembang				
		2-sel (24 jam)*	4-sel (48 jam)*	8-sel (72 jam)*	Morula (96 jam)*	Blastosis (120 jam)*
0.0	47	15 (31,9) b	6 (40,0) b	2 (33,3) b	1 (50,0)bc	0 (0,0) a
2,5	48	48 (100,0) a	41 (85,4) a	16 (39,0)ab	12 (75,0)ab	4 (33,3) a
5,0	55	53 (96,4) a	30 (56,6) b	20 (66,7) a	19 (95,0) a	8 (42,1) a
7,5	50	47 (94,0) a	16 (34,0) b	9 (56,3)ab	5 (55,5) b	3 (60,0) a
10,0	57	49 (86,0) a	26 (53,1) b	8 (30,8)ab	6 (75,0)ab	2 (33,3) a

Keterangan: *Jumlah yang diamati setelah dibiakkan (jam) ; a-c Huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada setiap kolom (p<0,05)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa glukosa dengan kadar 2,5 mM dapat mendukung perkembangan embrio sampai mencapai tahap 4-sel dan meningkat mencapai 5,0 mM-10,0 mM untuk mendukung perkembangan embrio sampai mencapai tahap 8-sel dan blastosis. Fosfat berkadar 1,19 mM dapat meningkatkan jumlah embrio yang berkembang dalam keadaan tidak ada atau kadar glukosa rendah. Penelitian selanjutnya diarahkan untuk menguji penambahan glukosa pada setiap tahap perkembangan dengan kadar sesuai hasil penelitian diatas.

DAFTAR PUSTAKA

Brison, D.R. and H.J. Leese. 1994. The role of exogenous energy substrat in blastocoele fluid accumulation in the rat. *J. Zygote,* 2: 547-553.

Brown, J.G. and D.G. Whitingham. 1991. The role of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice *in vitro*. *J. Mol. Reprod. and Develop.,* 112: 99-105.

Chatot, C.L., J.L., I. Torres and C.A. Ziomek. 1990. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in C2B medium. *J. Biol. of Reprod.*, 42: 432-440.

Ellington, J.E., E.W. Carney, P.B.Farrel, M.F.Simkin, and R.H. Foote. 1990. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43: 97-104.

Hewitson, L.C., K.L. Martin and H.J. Leese. 1996. Effect of metabolic inhibitors on mouse preimplantation embryos development and the energy metabolism of the isolated inner cell masses. *J. Mol. Reprod. and Develop.*, 43: 323-330.

Hogan, B, F. Constantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.

Kim, J.H., H. Funahashi, K. Niwa and K. Okuda. 1993. Glucose requirement at different development stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, 34: 879-886.

Miyoshi, K., H. Funahashi, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J. Reprod. and Fertil.*, 100: 21-26.

Petters, R.M., B.H. Johnson, M.L. Reed and A.E. Archilog. 1990. Glucose, glutamine and anorganic phosphate in early development of the pig embryos *in vitro*. *J. Reprod. and Fertil.*, 89: 269-275.

Rieger, D. 1992. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology,* 37: 75-87.

Sawai, K., J.M. Kim, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Effect of glucose in a semi-defined culture medium on development of mouse 1-cell embryos. *J. Mamm. Ova Res.*, 11: 8-16.

Schini, S.A., and B.D. Bavister. 1989. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *J. Biol. of Reprod.*, 39: 1183-1192.

Seshagiri, P.B. and B.D. Bavister. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree effect". *J. Molec. Reprod. Develop.*, 30: 105-111.

Thompson, Z. G., R.Z. Partridge, F.D. Haugton, C.I. Cox and H.J. Leese. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J. Reprod. and Fertil.*, 106: 299-306.

Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. and Fert.* , 14(Suppl.): 7-21.