LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING IX/2 PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2002

A. Judul : **Kajian Mengenai Penggunaan Ko-kultur Sel Epitel Tuba Fallopii dan Hasil Supernatannya Terhadap Keberhasilan Maturasi Oosit dan Perkembangan Embrio pada Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)**

B. Ketua Peneliti

Nama : Dr.drh. Tuty Laswardi Yusuf, MS
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan/NIP : Pembina/IVb/130522396
Bidang Keahlian : Reproduksi Hewan
Pusat Studi : Pusat Studi Satwa Primata
Perguruan Tinggi : Institut Pertanian Bogor

C. Anggota Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dondin Sajuthi	Kedokteran Primata/Biokimia	FMIPA-PSSP/Biokimia	Institut Pertanian Bogor
2	Arief Boediono	Embriologi/Kultur Jaringan	FKH/Anatomi	Institut Pertanian Bogor
3	Iman Supriatna	Pembekuan dan Transfer Embrio	FKH/Reproduksi dan Kebidanan	Institut Pertanian Bogor
4	I Ketut Suatha	Biologi Reproduksi	FKH-PSSP	Institut Pertanian Bogor

D. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

Jangka Waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
Biaya yang diusulkan : Rp.103.455.850,-
Biaya yang disetujui tahun 2002: Rp. 35 000.000,-

Bogor, 18 Oktober 2002
Peneliti Utama

Dr.drh.Tuty Laswardi Yusuf, MS
NIP: 130 522 396

Mengetahui
Kepala Pusat Studi Satwa Primata
Institut Pertanian Bogor

Pr[illegible] MST, Ph.D
NIP 13[illegible]

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian
Institut Pertanian Bogor

[illegible] M.Sc
NIP 1[illegible]0 354 [illegible]41

RINGKASAN

KAJIAN MENGENAI PENGGUNAAN KO-KULTUR SEL EPITEL TUBA FALLOPII DAN HASIL SUPERNATANNYA TERHADAP KEBERHASILAN MATURASI OOSIT DAN PERKEMBANGAN EMBRIO PADA MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*).
(Yusuf T.L., Sajuthi D., Boediono A., Supriatna I., Suatha IK., 2002, IX + 10 halaman)

Untuk meningkatkan produksi embrio hasil teknologi fertilisasi in vitro (FIV) yang pada saat ini dinilai masih rendah, perlu dilakukan upaya pengembangan teknik ko-kultur. Teknik kultur sel adalah suatu cara untuk membiakkan sel secara *in vitro* dalam lingkungan yang terkontrol (Freshney, 1987). Kultur sel epitel tuba Falopii ini sudah banyak diteliti untuk mempelajari biologi sel tuba Falopii, mempelajari proses kapasitasi spermatozoa, menunjang proses fertilisasi *in vitro* (FIV), maupun untuk mempertahankan perkembangan embrio (Godke, 1992). Namun ko-kultur pada monyet ekor panjang belum pernah dilaporkan.

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah untuk menguasai teknik isolasi, kultur dan pembekuan sel epitel tuba fallopii pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*), dan untuk memproduksi biakan sel tuba fallopii sebagai ko-kultur serta pembuatan kultur jaringan epitel tuba Falopii untuk penelitian di bidang kesehatan reproduksi satwa primata maupun manusia.

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah meningkatkan produksi embrio baik kuantitas maupun kualitasnya melalui penambahan ko-kultur sel tuba fallopii pada medium yang digunakan dalam program FIVdan menyediakan biakan sel tuba fallopii untuk kebutuhan lainnya terutama berhubungan dengan kesehatan satwa primata/manusia, serta pengembangan teknik kultur untuk digunakan sebagai model pada satwa primata lainnya termasuk satwa yang terancam punah.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi PSSF LP-IPB, pada bulan Maret sampai Oktober 2002. Organ tuba Falopii dikoleksi dari monyet betina secara bedah laparotomi di Fasilitas Karantina Hewan PSSP LP-IPB. Penelitian ini meliputi persiapan bahan dan alat yang digunakan, pengambilan organ tuba Falopii, proses pembuatan kultur sel primer epitel tuba Falopii dan pasase menggunakan tripsin 0,25%, pembekuan sel dan pencairan kembali sel *(thawing)*.

Medium penumbuh yang digunakan adalah DMEM yang telah ditambah NaHCO, dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. Kultur sel epitel tuba Falopii ini kemudian membentuk selapis sel (monolayer). Setelah dipasase, sebagian sel disimpan dan dibekukan dalam DMSO 10% pada suhu -70°C dan setelah 24 jam dipindahkan ke suhu -196^0 C (dalam Nitrogen cair).

Pada kultur primer, jumlah sel banyak menurun. Hal ini karena ada sel-sel yang tidak mampu beradaptasi pada lingkungan yang baru atau sel-sel tersebut mati akibat

proses koleksi yang dilakukan. Setelah dipasase ternyata sel yang berasal dari sel segar menunjukkan kemampuan tumbuh yang makin meningkat pada setiap pasase.

Kontaminasi merupakan salah satu masalah yang berkaitan dengan pembuatan kultur sel. Kontaminasi dapat berasal dari alat-alat yang digunakan, bahan dan media kultur yang digunakan, jaringan yang akan dibiakkan sendiri, dan udəʍ sekitar.

Dari hasil penelitian tahap awal ini disimpulkan bahwa sel epitel tuba Falopii berhasil dikultur dengan menggunakan DMEM yang ditambahkan FBS 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% $C0_2$. Kultur sel ini berhasil dipasase sampai pasase ke-4 dengan daya pertumbuhan yang makin meningkat. Disarankan pula untuk membiakkan kultur sel ini lebih banyak lagi untuk dapat digunakan pəds penelitian lebih lanjut.

Pada penelitian selanjutnya dapat disimpulkan bahwa supernatan biakan sel tuba Fallopii dapat digunakan sebagai medium untuk maturasi oosit pada program fertilisasi in vitro pada monyet ekor panjang.

SUMMARY

Co-culture Productions of Epithelial Celts Derived from Oviduct of Cynomolgus for Improving Oocyte Maturation and Early Embryo Development Fertilised In Vitro

(Yusuf T.L., Sajuthi D., Boediono A., Supriatna L, Suatha IK., 2001, X + 11 pp)

To raising the lack production of embryos by fertilised in vitro, we need to develop co-culture technique which can produce cell by in vitro. There were more research had been done with epithelial cells to study biology and capacitation of sperm to support in vitro fertilization and maintaining the developing of embryo. Althoug the result of study in cynomolgus macaque never be reported yet.

Main objectives of this study are: to master in isolation, culture and freezing technicque of oviductal epithelial cells and to produce cell for co-culture in macaque and other species. The expected benefit the result of this study to increase the quality and quantity of embryo production, fasilitation cells for other research related *to* human and animal health and *as an* animal models for endangered species.

This work were conducted at Microbiology and Immunology laboratorium from March untill October 2002. Collection of oviduct organ from cynomolgus macaque was held in Quarantine Facility Primates Research Center Bogor Agricultural University. This work include material and toll preparation, primary culture passaged with trypsine 0,25%, freezing and thawing cells.

Medium for growth cell are Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM) with NaHCO3 and *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. 'Freezing with DMSO 10% in –70^{O}C overnight and in liquid nitrogen for long time- In primary culture the amount of cells is decrease because a lot of cells cannot adaptation with new environment or dead due to collection process that we do. After passaged, fresh cell growth more high and higher then others. Contamination is one of the number of problem in culture cell production, due to aseptic material media and air.

Based on this finding we concluded that oviductal epithelial cells successfully cultured with DMEM with $NaHCO_3$ and FBS 10% in incubator 37^{O}C and 5% CO_2. We suggested that cell cultured more and more for further research.

And based on other work, we concluded that supernatan of epithelial cells successfully as medium for maturation oocytes in *In Vitro Fertilization* programm.

KATA PENGANTAR

Ilmu pengetahuan dan teknologi (iptek) memegang peranan yang penting dan sangat menentukan dalam mencapai kemajuan dan percepatan pembangunan. Keberhasilan pembangunan jangka panjang sangat tergantung dari kualitas sumber daya manusia Indonesia termasuk kemampuan mengadopsi dan mengembangkan iptek serta kemampuan memanfaatkan teknologi dan bioteknologi yang akan menentukan keunggulan komperatif dan kompotetif dari sistem produksi.

Salah satu tantangan yang terpampang di depan adalah peningkatan penggunaan satwa primata sebagai hewan model untuk kepentingan biomedis pada manusia seperti pengujian obat, pembuatan vaksin polio serta untuk riset penyakit AIDS menyebabkan penurunan populasi dan berkurangnya populasi harus diimbangi dengan upaya untuk menjaga kelestariannya. Salah satu upayanya adalah dengan menerapkan dan mengembangkan teknologi dan bioteknologi reproduksi seperti fertilisasi in vitro (FIV), untuk memperoleh embrio yang lebih banyak dibandingkan dengan produksi embrio secara in vivo yang jumlahnya sangat terbatas. Dengan teknik FIV dimungkinkan pengembangan biteknologi reproduksi yang lainnya.

Salah satu teknik yang mendukung keberhasilan program bioteknologi reproduksi adalah teknik pembuatan kultur jaringan atau kultur sel yang dibiakkan diluar tubuh sebagai ko-kultur. Sel epitel tuba Fallopii sering digunakan sebagai ko-kultur untuk membantu maturasi dan perkembangan embrio karena sekresi yang dihasilkannya dapat memberikan lingkungan yang optimum bagi penyatuan gamet jantan dan betina serta perkembangan embrio dini. Lingkungan tersebut berupa penyediaan makanan dan pertindungan bagi spermatozoa, sel telur dan embrio dini.

Pembiakan sel epitel tuba Fallopii secara in vitro memungkinkan penyediaan dan produksi embrio dalam jumlah banyak serta memberi kemudahan-kemudahan dalam kegiatan manipulasi embrio dan rekayasa genetik untuk pengembangan bioteknologi reproduksi yang sangat bermanfaat bagi pengembangbiakan hewan pada umumnya dan ternak pada khususnya.
Hasil penelitian ini juga akan memberikan informasi ilmiah untuk penelitian serupa pada satwa primata sehingga penambahan populasi satwa primata langka dan yang terancam punah dapat diterapkan dengan menggunakan teknik FIV pada manusia.

Laporan hasil penelitian ini merupakan kegiatan yang dilakukan pada tahun pertama dan kedua dari rangkaian penelitian yang direncanakan selama tiga tahun. Dari hasil penelitian tahun pertama kesimpulan yang dapat dikemukakan bahwa sel epitel tuba Fallopii monyet ekor panjang berhasil dikultur dalam media DMEM dengan FBS 10% pada suhu 37^0C dan 5% CO_2 dan berhasil dipasase sampai pasase keempat serta dapat disimpan dengan cara dibekukan. Dari hasil penelitian tahun kedua kesimpulan yang dapat dikemukakan bahwa supernatan biakan sel tuba Fallopii dapat digunakan untuk pematangan sel telur monyet ekor panjang.

Sehubungan dengan pelaksanaan penelitian ini, patut diucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, beserta staf, Ketua Lembaga Penelitian IPB beserta staf dan Kepala Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LP-IPB. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Laboratorium Mikrobiologi/Imunologi PSSP IPB beserta staf dan Kepala Karantina Hewan PSSP-LP IPB beserta staf. Untuk kolega Drh. Diah Pratiwi, .Drh.Suzy. T, Drh Prasodjo dan Drh Nyoman W yang telah banyak membantu dalam koleksi organ tuba Fallopii dan ovarium dan Shilmi M yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan kultur sel, tim peneliti mengucapkan terima asih.

Demikian pula diucapkan terima kasih kepada Dr. Maria Diamente, Drh. Diah Iskandriati dan Drh. Nengah Budiarsa yang telah mengijinkan dan memberikan dukungan penuh untuk pengembangan iptek dan sumber daya manusia, serta seluruh staf yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Suatu penelitian yang baru selesai dikerjakan, merupakan awal bagi penelitian lainnya . Penelitian tidak pernah akan berakhir, dan selalu menimbulkan banyak lagi pertanyaan yang memerlukan jawaban melalui penelitian lanjutannya. Begitu juga penelitian ini masih memerlukan kaji ulang agar mendapatkan hasil komperatif yang sempurna sehingga dapat bermanfaat bagi hewan maupun manusia.

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN ii
RINGKASAN DAN SUMMARY iii
KATA PENGANTAR vi
DAFTAR ISI viii
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR GAMBAR x
I. PENDAHULUAN 1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 2 1
III. TINJAUAN PUSTAKA 2
    3.1. Teknologi Ko-Kultur 2
    3.2. Isolasi dan Biakan Sel Tuba Faltopii 2
    3.3. Koleksi Sel Tuba Falopii 3
    3.4. Penggunaan Media 3
    3.5. Ko-kultur 4
    3.6. Pembekuan Biakan Sel 4
    3.7. Penyiapan Spermatozoa dan Fertilisasi Sel Telur 5
IV METODE PENELITIAN 6
    4.1. Materi dan Hewan Percobaan 6
    4.2. Persiapan Media yang Digunakan 6
        Sterilisasi 6
        Medium TCM 199 6
        Medium DMEM 7
        Medium Penumbuh 7
        Medium Transport 7
    4.3. Isolasi Sel Epitel Tuba Fallopii 7
        4.3.1. Pengambilan Organ Tuba Fallopii 7
        4.3.2. Pembuatan Kultur Sel Primer Epitel Tuba Fallopii 7
        4.3.3. Pasase Kultur Sel 8
    4.4. Pembekuan Sel Epitel Tuba Fallopii 8
    4.5. Pencairan Kembali (Thawing) 8
    4.6. Koleksi Sel Telur 9
    4.7. Pematangan Sel Telur 9
    4.8. Penyiapan Spermatozoa 10
    4.9. Fertilisasi In Vitro 10
    4.10 Pengamatan Perkembangan Embrio 10

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN ---- ii

RINGKASAN DAN SUMMARY ---- iii

KATA PENGANTAR ---- vi

DAFTAR ISI ---- viii

DAFTAR TABEL ---- ix

DAFTAR GAMBAR ---- x

I. PENDAHULUAN ---- 1

II. TUJUAN **DAN** MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 2 ---- 1

III. TINJAUAN PUSTAKA ---- 2

- 3.1. **Teknologi** Ko-Kultur ---- *2*
- 3.2. Isolasi dan **Biakan Sel Tuba Fallopii** ---- 2
- 3.3. **Koleksi** Sel **Tuba** Falopii ---- 3
- 3.4. Penggunaan **Media** ---- *3*
- 3.5. Ko-kultur ---- 4
- 3.6. Pembekuan Biakan Sel ---- 4
- 3.7. Penyiapan **Spermatozoa** dan Fertilisasi Sel Telur ---- 5

IV. METODE PENELITIAN ---- 6

- 4.1. Materi dan Hewan Percobaan ---- *6*
- 4.2. Persiapan **Media yang** Digunakan ---- *6*
  - Sterilisasi ---- *6*
  - Medium TCM 199 ---- *6*
  - Medium DMEM ---- *7*
  - Medium Penumbuh ---- 7
  - Medium Transport ---- 7
- 4.3. Isolasi Sel Epitel Tuba Fallopii ---- 7
  - 4.3.1. Pengambilan **Organ Tuba Fallopii** ---- 7
  - 4.3.2. Pembuatan Kultur **Sel Primer** Epitel Tuba Fallopii ---- *7*
  - 4.3.3. Pasase Kultur Sel ---- 8
- 4.4. Pembekuan Sel Epitel Tuba Fallopii ---- 8
- 4.5. Pencairan Kembali (Thawing) ---- 8
- 4.6. **Koleksi** Sel Telur ---- *9*
- 4.7. Pematangan Sel Telur ---- 9
- 4.8. Penyiapan Spermatozoa ---- 10
- 4.9. Fertilisasi In Vitro ---- lo
- 4.10. Pengamatan Perkembangan Embrio ---- 10

V. HASIL DAN PEMBAHASAN 11
    5.1. Isolasi Sel Epitel Tuba Fallopii 11
    5.2. Kultur Sel 11
    5.3. Kultur sel [illegible] 11
    5.4. Pengumpulan Cairan/ Supernatan 12
    5.5. Pembuatan stok sel epitel tuba Fallopii 12
    5.6 Koleksi sel telur 12
        a. Tanpa superovulasi 12
        b. Dengan superovulasi 13
    5.7. Pematangan sel telur 13
    5.8. Fertilisasi sel telur 13
VI. KESIMPULAN DAN SARAN 13
    6.1. Kesimpulan 13
    6.2. Saran 13
VII. RENCANA PENELITIAN SELANJUTNYA 14
    Tujuan Khusus 14
    Metode 14
    Jadwal Kerja 14
DAFTAR PUSTAKA 15

DAFTAR TABEL

Nomor Teks Halaman

Lampiran

1. Prosedur isolasi kultur, kultur dan pembekuan sel epitel tuba Fallopii -------19
2. Prosedur koleksi, maturasi dan fertilisasi oosit Macaca fascicularis ----------20
3. Medium penumbuh DMEM yang digunakan untuk kultur sel epitel ----------21

DAFTAR GAMBAR

Nomor Teks Halaman

Lampiran

1. Pertumbuhan biakan sel tuba Fallopii ———————— 22
2. Spermatozoa monyet ekor panjang hail aspirasi epididimis ——— 22
3. Sel telur monyet ekor panjang pada stadium inti, GV ——— 23
4. Sel telur monyet ekor panjang pa& stadium M-I, GVBD ——— 23
5. %I telur monyet ekor panjang yang matang, stadium M-II , PB I ——— 24
6. Sel telur monyet ekor panjang yang telah dibuahi, PB II ——— 24

I. PENDAHULUAN

Monyet ekor panjang sering digunakan sebagai hewan model untuk kepentingan biomedis pada manusia seperti percobaan pengujian obat, pembuatan vaksin polio dan pada satwa primata lainnya untuk riset penyakit AIDS. Peningkatan penggunaan satwa primata menyebabkan penurunan populasi dan berkurangnya populasi harus diimbangi dengan upaya untuk dapat menjaga kelestariannya.

Salah satu upaya yang sangat penting untuk menjaga kelelestarian satwa primata adalah dengan penerapan bioteknologi reproduksi seperti fertilisasi *in vitro* (FIV), untuk memperoleh embrio yang lebih banyak dibandingkan dengan produksi embrio secara in vivo yang jumlahnya sangat terbatas. Dengan teknik FIV dimungkinkan pengembangan bioteknologi reproduksi yang lainnya. Salah satu teknik yang mendukung keberhasilan program biteknolologi reproduksi adalah teknik pembuatan kultur jaringan atau kultur sel yang akan menghasilkan sekelompok sel yang dibiakkan diluar tubuh yaitu ko-kultur.

Sel-sel epitel tuba Fallopii sering digunakan sebagai ko-kultur untuk membantu maturasi ban perkembangan embrio karena sekresi yang dihasilkannya dapat memberi lingkungan yang optimum bagi penyatuan garnet jantan dan betina serta perkembangan embno dini. Lingkungan tersebut berupa penyediaan makanan dan perlindungan bagi spermatozoa, sel telur dan embrio dini.

Pembiakan dan kultur sel-sel epitel tuba secara *in vitro* memungkinkan penyediaan dan produksi embrio dalam jumlah banyak serta memberi kemudahan-kemudahan dalam kegiatan manipulasi embrio dan rekayasa genetik untuk pengembangan bioteknologi reproduksi yang sangat bermanfaat bagi pengembangbiakan hewan pada umumnya dan ternak pada khususnya.

Hasil penelitian ini juga akan memberikan banyak informasi ilmiah untuk penelitian serupa pada satwa primata sehingga penambahan populasi satwa primata langka dan satwa yang terancam punah dapat diterapkan dengan menggunakan teknik FIV pada manusia.

II.TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 2

Pada tahun kedua ini penelitian bertujuan untuk mengkaji hasil yang diperoleh pada penelitian tahun pertama sebagai kelanjutan dari serangkaian penelitian yang mempunyai tujuan untuk: (1) mendapatkan teknik pembuatan biakan sel epitel tuba Fallopii dengan menumbuhkan sel-sel tersebut dalam medium khusus dalam inkubator C02, (2). Memperoleh sekresi sel epitel tuba Falopii yang dapat digunakan untuk perkembangan sel telur dan embrio dan (3) mendapatkan teknik pembekuan kultur sel tuba Falopii dan supernatannya.

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian ini adalah : (1) meningkatkan produksi embrio baik kuantitas maupun kualitasnya melalui penambahan ko-kultur sel tuba fallopii pada medium yang digunakan dalam program FIV, (2) menyediakan biakan sel tuba fallopii untuk kebutuhan lainnya terutama berhubungan dengan kesehatan satwa primata/manusia, (3) pengembangan teknik FIV untuk digunakan sebagai model pada satwa primata lainnya termasuk satwa yang terancam punah.

lainnya. Apabila ditinjau dari terovulasinya sel telur kedalam tuba Fallopii sampai terjadinya fertilisasi dan diteruskan dengan perkembangan embrio sebelum mencapai uterus, terlihat pentingnya peranan tuba Fallopii untuk perkembangan sel embrio.

Gandolfi *et al*, (1989) menyatakan bahwa terdapat suatu rangsangan perkembangan embrio yang berasal dari tuba Fallopii karena sekresinya mengandung komponen glikoprotein, non-serum makro molekul, ion-ion dan faktor-faktor penggertak lainnya.Tuba Fallopii juga mempunyai pH dan tekanan osmose yang sesuai dengan perkembangan embrio. Lebih lanjut dinyatakan bahwa sel tuba Fallopii kelinci juga dapat merangsang perkembangan embrio tikus, domba, sapi, babi, kambing dan kuda.

3.3. Koleksi Sel Tuba Fallopii

Thibodeaux *et al*, (1991) mengambil saluran tuba Fallopii dari RPH sepanjang 3cm posterior bagian ampulla dan isthmus sampai 3 cm panjang uterus bagian posterior pada saat fase luteal. Di Laboratorium, pada bagian lumen dilakukan pembilasan menggunakan tripsin 0,25% + EDTA, kemudian lumen tersebut diikat pada kedua ujungnya dan sebelumnya telah diisi dengan larutan tripsin dan disimpan pada suhu 37^{0}C selama 15 menit. Jaringan dibilas kembali dengan larutan tripsin. kemudian lumen dibuka dan permukaannya diambil dengan menggunakan gelas objek steril.

Hasil bilasan sel-sel epitel tersebut disentrifusi selama 10 menit, dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan dibuang, endapan ditambah larutan TCM 199 dan disentrifusi kembali. Endapan diberi larutan TCM 199 sebanyak 1 ml dan disimpan dalam inkubator $C0_2$ dengan suhu 37° C. selanjutnya dilakukan pergantian medium setiap 48 jam. Sel-sel dievaluasi sampai bentuknya membulat dan menempel pada dasar botol. Godke dan Thibodeaux (1992) menggunakan larutan TCM 199 dengan tambahan FBS 10% dan diberikan antibiotika penisilin 100 IU/ml dan streptomisin 100 µg/ml.

Dalam pembuatan biakan sel tuba Fallopii, sel-sel hasil sentrifusi disimpan di dalam inkubator $C0_2$ dengan 95% udara. Penggantian media dilakukan setiap 48 jam dan sekaligus dilakukan evaluasi sel (Thibodeaux *et al*, 1992). Jumlah sel yang dipersiapkan sebanyak 2x 10^5 sel/ml yang ditanam dalam flask ukuran kecil (T21). Untuk pertumbuhan embrio. beberapa peneliti menggunakan sel monolayer (Bongso *et al*, 1991). Untuk pertumbuhan embrio sapi, Thibodeaux *et al* (1991) menggunakan sel monolayer epitel tuba Fallopii ataupun sel fibroblastnya. Sedangkan Wiemer *et al*, (1989) memperoleh sel monolayer setelah inokulasi sel selama 14-20 hari.

3.4. Penggunaan Media

Medium yang digunakan untuk proses pematangan sel telur dan perkembangan embrio secara in vitro tergantung pada spesies hewan. Pada sapi dapat digunakan Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) (Zhang *et al*, 1992) atau Hamster Embrio Culture Medium (HECM) (Pinyopummintr, 1991). Pada satwa primata dapat digunakan medium TALP atau CMRL 1060 (Boatman, 1987).

Namun demikian dalam teknik pelaksanaannya penggunaan medium kompleks tanpa tambahan faktor lain, memberi hasil yang kurang baik (Godke, *et al*, 1992). Dijelaskan bahwa dalam penelitiannya hanya berhasil dikembangkan 44% embrio layak setelah penyimpanan 96 jam dalam inkubator $C0_2$. Apabila dengan penambahan vesicle tropoblas kedalam medium, terjadi kenaikan sampai didapatkan 72% embrio layak.

Gandolfi et al, (1989) menyatakan bahwa dengan penambahan sel tuba Falopii, diperoleh 85,7 % embrio sampai tahap perkembngan 16 sel dibandingkan dengan tanpa penambahan sel hanya 32% yang terjadi pada kontrol.

3.5. Ko-kultur

Penambahan kultur sel ampula kedalam kultur oosit yang digunakan Bongso *et al*, (1991) ternyata menghasilkan 85% kultur yang terbuahi dibandingkan dengan kontrol yang hanya terbuahi 67%.

Dalam program FIV, penyiapan spermatozoa untuk kepentingan fertilisasi penting dilakukan untuk mempersiapkan spermatozoa dapat menembus sel telur yang sudah matang. Spermatozoa harus terlebih dahulu mengalami proses kapasitasi. Berbagai bahan kimia digunakan untuk proses kapasitasi. Ball *et al*,(1983) menggunakan heparin 10 µg/ml untuk kapasitasi spermatozoa yang disimpan dalam inkubator $C0_2$ 5% selama 6 jam. Critser *et al*, (1984) menyatakan bahwa cAMP dan caffein penting untuk kapasitasi karena akan meningkatkan respirasi dan motilitas spermatozoa. Dosis yang digunakan 1 mM cAMP dan 1 mM caffeine bersama spermatozoa disimpan dalam inkubator selama 1,5-2 jam. Sementara itu Ca $^{++}$ ionophore A23187 dapat digunakan untuk kapasitasi dan memerlukan waktu hanya 1 menit (Zhang *et al*, 1992). Konsentrasi spermatozoa yang diperlukan untuk proses kapasitasi adalah $3x10^6$ spermatozoa motil/ ml.

Sel telur yang telah matang yang telah dievaluasi digabung dengan spermatozoa hasil kapasitasi dan dimasukkan ke dalam medium Bracket-Oliphant dan BSA dalam inkubator $C0_2$ dengan kadar $C0_2$ 5% (dalam udara) dan suhu 39°C, selama 6 jam. Kemudian biakan dipindahkan kedalam medium TCM 199 + FBS 5% dan diinkubasi lagi selama 43 jam untuk dilihat perkembangan sel embrio (Zhang *et al*, 1993).

3.6. Pembekuan Biakan Sel

Beberapa peneliti telah berhasil membekukan biakan sel. Thibodeaux (1991) mengambil sel dan sub pasase ketiga, kemudian dibekukan dengan menggunakan medium TCM 199 + FBS 30% dan DMSO 10%. Penurunan suhu sebesar 5°C dilakukan sampai mencapai-20°C, diamkan pada suhu tersebut selama 5 menit kemudian diturunkan lagi sebesar 1°C/menit sampai mencapai -30°C, selanjutnya diturunkan 2°C/menit sampai mencapai -60^0C/menit.

Sel-sel epitel tuba Fallopii hasil sub-pasase ke 5 sebanyak $2x10^6$ sel /vial dibekukan dengan menggunakan mesin pembekuan. Penurunan suhu dilakukan sebagai berikut: dari 27^0C sampai -20°C sebesar 5°C/menit, kemudian sebesar 1°C sampai -30^0C.

Pembiakan sel dilakukan pada incubator $C0_2$ dengan kadar $C0_2$ 5%, 0_2 5% dan N_2 5% dalam suhu 37^0C (Wiemer, 1989). Zhang *et al* (1992) melakukan modifikasi lain dengan menggunakan $C0_2$ 5% dalam udara dengan suhu 39°C. Pada tahun yang sama Thibodeaux menggunakan $C0_2$ 5% dan udara 95% dengan suhu 37°C.

Sel telur yang berhasil dibuahi dipindahkan kedalam medium yang sesuai. Pada sapi dan domba pada umumnya digunakan TCM 199 dan dapat ditambahkan pada sel hasil biakan. Medium yang digunakan pada umumnya sebanyak 100 µl yang dimasukkan ke dalam cawan petri dan dilapisi minyak mineral Zhang *et al* (1992), sementara Thibodeaux menggunakan sel fibroblas dengan konsentrasi $1x10^5$ sel/ml yang dipersiapkan 48-72 jam sebelum digunakan.

3.7. Penyiapan Spermatozoa dan Fertilisasi Sel Telur

Teknik FIV memerlukan suatu rangkaian kegiatan yang meliputi:

1. Koleksi sel telur dari ovarium yang dapat dilakukan secara endoskopi/pembedahan.
2. Pematangan sel telur dengan medium tertentu.
3. Fertilisasi sel telur dengan spermatozoa yang telah mengalami proses kapasitasi secara in vitro.
4. Perkembangan embrio dalam inkubator $C0_2$ sampai stadium tertentu (Rutledge *et al*,1985).

Di dalam tubuh jumlah sel telur dalam kedua ovaria dapat bervariasi antara 60.000 sampai 100.000 tergantung dari spesies hewan, walaupun tidak semuanya berhasil menjadi matang (Hafez, 1987). Sebagian besar dari jumlah ini dapat dimanfaatkan dan dimatangkan secara in vitro. Dalam perkembangannya sel telur dapat dibedakan menjadi stadium inti (germinal vesicle, GV), metafase I(M-I) dan metafase II(M-II). Pada stadium inti terlihat inti dan sel dikelilingi oleh lapisan korona pekat, pada M-I terjadi peleburan inti sehingga tidak terlihat adanya inti di dalam sel dan pada M-II yang merupakan tahap sel telur matang, terlihat adanya benda kutub (Lanzendorf, *et al*, 1990).

Medium yang digunakan untuk proses pematangan sel telur dan perkembangan embrio secara in vitro tergantung pada spesies hewan. Pada sapi dapat digunakan Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) (Zhang *et al*, 1992) atau Hamster Embrio Culture Medium (HECM) (Pinyopummintr, 1991). Pada satwa primata dapat digunakan medium TALP atau CMRL 1066 (Boatman, 1987).

Namun demikian dalam teknik pelaksanaannya penggunaan medium kompleks tanpa tambahan faktor lain, memberi hasil yang kurang baik (Godke, *et al*, 1992). Dijelaskan bahwa dalam penelitiannya hanya berhasil dikembangkan 44% embrio layak setelah penyimpanan 96 jam dalam inkubator C02. Apabila dengan penambahan vesicle tropoblas kedalam medium, terjadi kenaikan sampai didapatkan 72% embrio layak. Gandolfi *et al*, (1989) menyatakan bahwa dengan penambahan sel tuba Falopii, diperoleh 85,7 % embrio sampai tahap perkembngan 16 sel dibandingkan dengan tanpa penambahan sel hanya 32% yang terjadi pada kontrol.

Penambahan kultur sel ampula kedalam kultur oosit yang digunakan Bongso *et al*, (1991) ternyata menghasilkan 85% kultur yang terbuahi dibandingkan dengan kontrol yang hanya terbuahi 67%. Dalam program FIV, penyiapan spermatozoa untuk kepentingan fertilisasi penting dilakukan untuk mempersiapkan spermatozoa dapat menembus sel telur yang sudah matang. Spermatozoa harus terlebih dahulu mengalami proses kapasitasi. Berbagai bahan kimia digunakan untuk proses kapasitasi.

Ball *et al*,(1983) menggunakan heparin 10 ug/ml untuk kapasitasi spermatozoa yang disimpan dalam inkubator C02 5% selama 6 jam. Critser *et al*, (1984) menyatakan bahwa cAMP dan caffein penting untuk kapasitasi karena akan meningkatkan respirasi dan motilitas spermatozoa. Dosis yang digunakan 1 mM cAMP dan 1 mM caffeine bersama spermatozoa disimpan dalam inkubator selama 1,5-2 jam. Sementara itu Ca^{++}

III.TINJAUAN PUSTAKA

Satwa primata adalah salah satu jenis hewan coba yang paling penting dibandingkan hewan coba lainnya seperti tikus putih kecil mencit, tikus putih besar, hamster dan kelinci karena secara anatomis maupun fisiologis satwa primata mempunyai kemiripan dengan manusia. Sebagai contoh dapat dilihat bahwa efek obat penenang thalidomide tidak nampak pada tikus melainkan tertihat pada satwa primata khususnya pada monyet rhesus. Untuk percobaan pengujian obat-obatan manusia dan percobaan penyakit AIDS membutuhkan satwa primata (Sajuthi, 1997).

Kebutuhan akan satwa primata sebagai hewan coba sangat besar, sebagai contoh dalam periode 1983-1990 USA membutuhkan 80.000 ekor monyet ekor panjang. Pada periode 1987-1990 Indonesia mengekspor satwa primata ke Amerika diperkirakan 24.000 ekor. Negara-negara pemakai satwa primata seperti Amerika dan Rusia tidak mempunyai satwa primata yang cukup untuk kepentingan riset di negaranya. Dari 185 jenis satwa primata yang ada di dunia, 34 jenis diantaranya terdapat di Indonesia dan beberapa diantaranya hanya ditemukan di Indonesia seperti kukang, binatang hantu, takasi, beruk, monyet, kera, lutung, bekantan, simakobu, siamang, bilou, ungko, wau-wau, owa-owa,wa-wa dan orangutan (Ungerer, 1997).

Oleh karena itu untuk menjaga dan melestarikan serta memanfaatkan satwa primata ini kesejahteraan umat manusia dibutuhkan adanya pengetahuan yang memadai mengenai primatologinya. Beberapa aspek penting dari primatologi khususnya bioteknologi reproduksinya akan dikaji pada kesempatan ini.

3.1. Teknologi Ko-kultur

Pengembangan teknologi trensfer embrio (TE) di Indonesia walaupun telah dimulai sejak tahun 1984, namun keberhasilannya masih belum memadai. Keberhasilan dalam mematangkan sel telur dan meningkatkan perkembangan embrio dinilai masih rendah. Untuk itu diperlukan suatu teknologi yang dapat mendukung daya hidup sel telur dan embrio. Teknologi ko-kultur yang mengambil biakan dan organ atau jaringan tertentu yang diketahui menghasilkan zat atau bahan penting dalam menunjang kehidupan sel telur dan embrio perlu dikembangkan. Sel-sel tuba Fallopii menghasilkan suatu produk seperti protein yang diasosiasikan dengan estrus yang bersifat embriotrofik (Bavister, 1992).

Tuba Fallopii mempunyai fungsi yang unik sebagai pembawa sel telur dan spermatozoa dalam arah yang berlawanan secara simultan, fimbrie membawa sel telur yang diovulasikan dari permukaan ovarium menuju infundibulum. Sel telur dibawa oleh lipatan mukosa menuju ampulla yang merupakan tempat terjadinya fertilisasi dan pembelahan dini embrio. Embrio tinggal didalam tuba Fallopii selama 3 hari sebelum dibawa ke uterus. Mesosalpinx dan otot-otot tuba Fallopii dikoordinasi oleh hormon estrogen dan progesteron, sementara itu pengaruh uterotubal junction menyebabkan sperma dibawa dari uterus ke tuba Fallopii. Beberapa komponen protein umumnya terdapat pada cairan tuba Fallopii antara lain transferrin dan albumin (Hafez, 1987).

3.2. Isolasi dan Biakan Sel Tuba Fallopii

Beberapa peneliti telah mencoba menggunakan sel hasil biakan dari berbagai sel antara lain sel epitel tuba Fallopii, sel fibroblas uterus, sel granulosa, sel kumulus dan ionophore A23187 dapat digunakan untuk kapasitasi dan memerlukan waktu hanya 1 menit (Zhang *et al*, 1992) Konsentrasi spermatozoa yang diperlukan untuk proses kapasitasi adalah $3x10^6$ spermatozoa motil/ ml.

Sel telur yang telah matang yang telah dievaluasi digabung dengan spermatozoa hasil kapasitasi dan dimasukkan dalam medium Bracket-Oliphant dan BSA dalam inkubator C02 dengan kadar C02 5% (dalam udara) dan suhu 39°C, selama 6 jam. Kemudian biakan dipindahkan kedalam medium TCM 199 + FBS 5% dan diinkubasi lagi selama 43 jam untuk dilihat perkembangan sel embrio (Zhang *et al*, 1993).

IV.METODE PENELITIAN

4.1. Materi dan Hewan Percobaan

Bahan yang digunakan untuk membuat ko-kultur sel epitel tuba Fallopii ini adalah organ tuba Fallopii monyet ekor panjang *(Macaca fascicularis)* sebanyak 20 buah yang diperoleh dari 10 ekor monyet yang dibedah secara laparotomi di fasilitas karantina Pusat Studi Satwa Primata LP-IPB Darmaga Bogor.

Media yang digunakan untuk membuat ko-kultur ini adalah : medium PBS (*Phosphat Buffered Saline*), Tripsin (Difco USA) 1:250, Fungizone, Penisilin-Streptomisin, Media Dasar *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199) (Gibco, New York), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *dimethyl sulphoxide* (DMSO) 10% dalam FBS dan air bebas mineral (*deionized water*) steril.

Alat-alat yang digunakan adalah gunting, pinset, skalpel, cawan petri, gelas piala, botol bermulut lebar, filter steril 0,2 µm (Nalgene, New York), pipet plastik steril(ukuran 1 ml, 5 ml, 10 ml), pipet pasteur plastik steril, mikro pipet, *parafilm*, pompa vakum, pH meter, inkubator CO_2, botol kultur plastik T 25 cm^2 , thermos, lemari es, freezer, kontainer berisi N_2 cair, pengaduk magnet, vial 2 ml steril, kotak aliran udara(*Class II microbial safety cabinet type A/B3*), kamar hitung dan mikroskop.

4.2. Persiapan media yang digunakan

Sterilisasi. Media dan bahan yang diperlukan untuk kultur, yaitu medium PBS, Trypsin, dan Fungizone, masing- masing disterilisasi menggunakan filter 0,2 µm. Selanjutnya dimasukkan kedalam botol steril dan disimpan didalam lemari es. Botol dan alat-alat bedah disterilisasi di dalam autoclave.

Medium TCM 199. Tcm 199 dilarutkan dalam deionized water steril didalam gelas piala sampai volumenya 1000 ml. Kedalamnya ditambahkan $NaHCO_3$ 0,35 g dan dihomogenkan dengan pengaduk magnet. Selanjutnya larutan ini disaring secara steril menggunakan filter 0,2 µm dan dimasukkan kedalam botol steril 1000 ml, simpan dalam lemari es.

Medium DMEM. DMEM dilarutkan dalam deionized water steril didalam gelas piala sampai volumenya 1000 ml. Kedalamnya ditambahkan $NaHCO_3$ 0,37 g dan dihomogenkan dengan pengaduk magnet. Selanjutnya larutan ini disaring secara steril menggunakan filter 0,2 µm dan dimasukkan kedalam botol steril 1000 ml, simpan dalam lemari es.

Medium Penumbuh (Growth Medium), Medium penumbuh adalah medium yang digunakan untuk menginkubasi sel. Kedalam botol steril 1000 ml, dimasukkan 890 ml medium TCM 199 yang telah ditambah $NaHCO_3$ dan disaring dengan filter 0,2 µm. Kemudian dengan pipet plastik steril ditambahkan 100 ml FBS dan 10 ml antibiotika Penisilin 100.000 IU/ml dan Streptomisin 100.000 ug/ml).Dengan pH meter larutan ini diukur pHnya, diusahakan pHnya berkisar antara 7,2-7,4. Bila terlalu asam tambahkan NaOH steril dan bila terlalu basa tambahkan HCl steril ke dalam larutan. Botol berisi media ditutup rapat dan disimpan didalam lemari es.

Medium Transport. Medium transport dipersiapkan untuk membawa organ tuba Fallopii dari Fasilitas Karantina Hewan PSSP LP-IPB Darmaga ke laboratorium Kultur Jaringan/ Lab. Mikrobiologi dan Imunologi PSSP LP-IPB. Medium ini terdiri dari 95 ml PBS steril, Fungizone (20 IU/ml) 2 ml, Penisilin 100.000 IU/ml dan Streptomisin 100.000 µg/ml 3 ml yang dicampurkan dalam botol steril 100 ml. Larutan ini kemudian diukur pHnya. Bila terlalu asam tambabkan NaOH steril dan bila terlalu basa tambahkan HCl steril ke dalam larutan. Untuk keperluan transportasi ke dan dari Fasilitas Karantina PSSP LP-IPB, larutan ini disimpan dalam thermos yang berisi es.

4.3. Isolasi Sel Epitel Tuba Fallopii.

4.3.1. Pengambilan Organ Tuba Fallopii.

Pengambilan organ tuba Fallopii ini dilaksanakan di fasilitas karantina hewan Pusat Studi Satwa Primata IPB Darmaga Bogor, dan dilakukan seaseptis mungkin. Hindari kontaminasi yang terjadi akibat kesalahan operator dan jaringan sekitar organ tuba Fallopii. Tuba Fallopii diperoleh dari monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) yang telah dibius sebelumnya dengan ketamin HCl. Melalui bedah laparotomi sepanjang linea alba dengan gunting steril organ tuba Fallopii dipotong diantara corpus uteri dan ovarium kemudian dimasukkan ke dalam medium transport dan disimpan di dalam thermos es. Selanjutnya tuba Fallopii dikirim ke Laboratorium Kultur Jaringan / Mikrobiologi dan Imunologi PSSP LP-IPB Lodaya Bogor dan segera diproses setibanya di laboratorium.

4.3.2. Pembuatan Kultur Sel Primer Epitel Tuba Fallopii.

Organ tuba Fallopii diletakkan diatas cawan petri steril dan direndam dengan PBS steril.Dengan menggunakan pinset, skalpel dan gunting, singkirkan jaringan ikat yang mengelilinginya sehingga yang didapat hanya bagian tuba Fallopiinya. Setelah itu lumen tuba Fallopii dibilas dan diisi dengan tripsin 1:250. Tuba Fallopii yang berisi tripsin diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Cairan hasil bilasan lumen tuba

Fallopii ditampung dalam tabung untuk memperoleh sel epitel yang lepas dan selanjutnya disentrifusi dengan kecepatan 1500 RPM selama 5 menit. Setelah supernatannya dibuang, endapan sel ditambah dengan medium penumbuh kemudian dihomogenkan. Banyaknya sel dihitung dengan menggunakan hemositometer. Ke dalam 10 ml medium penumbuh didalam medium kultur dimasukkan sebanyak minimal 10^5 sel. Sel dalam botol kultur tersebut diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37^0C dengan kadar CO_2 5%. Pertumbuhan sel dievaluasi setiap hari sampai minimal 7 hari.

4.3.3. Pasase Kultur Sel.

Hasil inkubasi sel kultur tuba Fallopii setelah mencapai satu lapisan sel atau monolayer pada substrat, dilakukan pasase. Pasase sel kultur ini dilakukan untuk mendapatkan sel yang lebib banyak, lebih seragam dan memiliki daya tumbuh yang tinggi. Medium lama yang terdapat di dalam botol kultur dibuang dan monolayer yang melekat pada botol kultur dibilas dengan larutan PBS sebanyak dua kali. Setelah itu diinkubasi dengan tripsin 1:125 selama 10-15 menit pada suhu 37°C. Cairan beserta sel-sel yang terlepas dari perlekatan dengan substrat disentrifusi selama 5 menit dengan kecepatan 1500 RPM, sedangkan botol kulturnya dibilas dengan larutan PBS. Setelah supernatannya dibuang, selnya kemudian dicampurkan dengan media penumbuh. Selanjutnya dengan hemositometer dilakukan pengbitungan jumlah sel. Masukkan sebanyak minimal 10^5 sel ke dalam botol kultur yang berisi 10 ml media penumbuh untuk diinkubasikan. Botol ini kemudian simasukkan ke datam inkubator bersuhu 37°C berkadar 5% CO_2. Sebagian dari suspensi sel yang tidak dikultur disimpan dalam keadaan beku.

4.4. Pembekuan Sel Epitel Tuba Fallopii

Bila sel yang dihasilkan dari kultur cukup banyak, dapat dilakukan pembekuan untuk penyimpanan yang lama. Pada kondisi beku, proses metabolisme sel terhambat tetapi sel tetap hidup.

Suspensi sel yang akan dibekukan, dihitung terlebih dahulu menggunakan hemositometer, disentrifusi dengan kecepatan 1500 RPM selama 5 menit, buang supernatannya dan ditambahkan DMSO 10% sampai 2ml. Sel dihomogenkan dengan pipet transfer dan kemudian dimasukkan ke dalam vial, bagian leher vial dibalut dengan *parafilm* dan langsung dimasukkan ke dalam freezer -70°C, selama satu hari kemudian dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi N_2 cair dengan suhu -196°C.

4.5. Pencairan Kembali *(Thawing)*

Sel epitel yang telah dibekukan di dalam vial dapat dicairkan kembali, untuk digunakan sesuai keperluannya atau sel tersebut dapat diperbanyak untuk kemudian dapat kembali dibekukan. Bekuan sel di dalam vial diambil dari N_2 cair, dan dimasukkan kedalam penangas air 37°C beberapa saat. Setelah mencair seluruhnya, bekuan yang telah mencair tersebut kemudian dipindahkan kedalam botol kultur yang sudah diisi medium penumbuh sebelumnya sehingga mencapai volume 10 ml. Botol kultur ini disimpan semalam (24jam) didalam inkubator. Kemudian sel hasil inkubasi disentrifusi lagi dengan kecepatan 1500 RPM selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan endapan sel ditambah dengan medium penumbuh TCM 199 sebanyak 2 ml serta dihomogenkan. Sel yang berada didalam medium penumbuh ini kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur yang sudah diisi dengan medium penumbuh sebanyak 8 ml. Masukkan botol kultur ini di dalam inkubator pada suhu 37°C berkadar 5% CO_2.

Beberapa peneliti telah berhasil membekukan biakan sel. Thibodeaux (1991) mengambil sel dari sub pasase ketiga, kemudian dibekukan dengan menggunakan medium TCM 199 + FBS 30% dan DMSO 10%. Penurunan suhu sebesar 5°C dilakukan sampai mencapai-20°C, diamkan pada suhu tersebut selama 5 menit kemudian diturunkan lagi sebesar 1°C/menit sampai mencapai -30°C, selanjutnya diturunkan 2°C/menit sampai mencapai -60°C menit. Sel-sel epitel tuba Fallopii hasil sub-pasase ke 5 sebanyak $2x10^6$ sel/vial dibekukan dengan menggunakan mesin pembekuan. Penurunan suhu dilakukan sebagai berikut: dari 27°C sampai -20°C sebesar 5^OC/menit, kemudian sebesar 1°C sampai - 30°C.

Pembiakan sel dilakukan pada inkubator C02 dengan kadar C02 5%, 02 5% dan N2 5% dalam suhu 37^0C (Wiemer, 1989). Zhang *et al* (1992) melakukan modifikasi lain dengan menggunakan C02 5% dalam udara dengan suhu 39°C. Pada tahun yang sama Thibodeaux menggunakan C02 5% dan udara 95% dengan suhu 37^0C. Sel telur yang berhasil dibuahi dipindahkan kedalam medium yang sesuai. Pada sapi dan domba pada umumnya digunakan TCM 199 dan dapat ditambahkan pada sel hasil biakan. Medium yang digunakan pada umumnya sebanyak 100 µl yang dimasukkan ke dalam cawan petri dan dilapisi minyak mineral Zhang *et al* (1992), sementara Thibodeaux menggunakan sel fibroblas dengan konsentrasi $1x10^5$ sel/ml yang dipersiapkan 48-72 jam sebelum digunakan.

4.6. Koleksi Sel Telur

Koleksi sel telur melalui bedah laparotomi dilakukan dengan cara aspirasi folikel secara langsung dari ovarium monyet yang telah menerima hormon hFSH selama 12 hari dan hCG 29-33 jam sebelumnya. Folikel yang berdiameter 3-8mm diaspirasi menggunakan spuit 5 ml dengan ukuran jarum 21 G. Hasil aspirasi dimasukkan kedalam medium flushing. Sel telur dievaluasi dengan melihat sel kumulus yang masih mengelilinginya. Sel telur ini selanjutnya dimasukkan kedalam medium maturasi untuk pematangan lebih lanjut.

4.7 Pematangan Sel Telur

Untuk pematangan dibutuhkan sel telur dalam stadium M-I dan dimasukkan kedalam medium maturasi yang diisi 10 sel telur per drop, selanjutnya disimpan dalam inkubator berkadar 5% C02 dengan suhu 37°C selama 24jam.

4.8 Penyiapan Spermatozoa

Spermatozoa monyet ditampung dengan metode aspirasi langsung kesaluran epididimis menggunakan spuit 5 ml dengan jarum ukuran 21 G, selanjutnya segera dievaluasi motilitas serta konsentrasinya. Evaluasi dilakukan secara mikroskopis untuk menentukan motilitas dan konsentrasi spermatozoa serta kelayakan penggunaannya. Evaluasi dilakukan segera setelah aspirasi epididimis, dan selanjutnya setelah disentrifusi dan terakhir setelah diaktivasi dengan kafein dan dbcAMP.

Tahap penyiapan spermatozoa:

1. Penentuan konsentrasi dan motilitas spermatozoa

100 µl semen + 3ml TALP Hepes disentrifusi (360 g) selama 7 menit sebanyak dua kali. Supernatan dibuang dan endapan spermatozoa ditambah dengan 1 ml TALP +BSA 0,3%. Penentuan konsentrasi spermatozoa dihitung dengan Haemocytometer dan persentase motilitas spermatozoa dihitung berdasarkan spermatozoa motil dan yang non motil.

2. Kapasitasi Spermatozoa

Digunakan dbcAMP 5% dan kafein 2% dalam NaCl fisiologis yang ditambahkan pada spermatozoa dan disimpan dalam inkubator C02 selama 4 jam, suhu 37°C.

4.9. Fertilisasi In Vitro

Siapkan medium untuk FIV (TALP + BSA 0,3%) sebanyak 100 µl dan lapisi dengan 2,5 ml minyak parafin. Sel telur yang telah matang (stadium M-II) dipindahkan kedalam medium FIV, kemudian ditambahkan spermatozoa 1,5 x 10^6 spermatozoa/ml sebanyak 50 µl untuk setiap tetes medium yang berisi 10 sel telur. Diamnkan selama 5 jam dalam inkubator C02, pada suhu 39°C.

4.10. Pengamatan Perkembangan Embrio

Terjadinya fertilisasi dapat dilihat dengan adanya pronukleus di dalam sel telur.

1. Sel telur yang memiliki pronukleus, dipindahkan kedalam cawan petri yang berisi TALP dengan FBS 5%, yang telah dilapisi dengan minyak parafin, simpan dalam inkubator C02 dalam suhu 39°C.

2. Evaluasi perkembangan embrio dilakukan setiap 24 jam dan penggantian medium dan sel biakan dilakukan setiap 48 jam. Perkembangan embrio diamati sampai tahap morula.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi Sel Tuba Fallopii

Untuk memperoleh sel epitel tuba fallopii pada monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis)* telah dilakukan isolasi sel epitel tuba Fallopii dengan cara tripsinasi dengan berbagai kombinasi dengan pengurutan, pengerokan dan pencacahan baik dengan pisau maupun gunting. Dari percobaan ini menunjukkan tripsinasi dikombinasi dengan pencacahan memakai gunting menghasilkan sel yang lebih banyak dibandingkan dengan kombinasi yang lainnya.

2. Kultur Sel

Hasil tripsinasi pada lumen tuba Fallopii diperoleh cairan yang mengandung sel kurang dari 1x 10^6 sel epitel / ml. Sedangkan tripsinasi dikombinasi pencacahan organ tuba Fallopii didapatkan 9 ml cairan yang mengandung 2 x 10^6 sel epitel / ml. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan beberapa faktor antara lain saat isolasi dilakukan tuba Fallopii berada pada fase folikuler atau fase luteal.

Pada umumnya tuba fallopii pada fase folikuler menghasilkan sel epitel yang lebih banyak dibandingkan dengan sel epitel tuba Fallopii yang berada pada fase luteal. Disamping itu perbedaan lamanya tripsinasi pada suhu 37^0C dengan tripsin 0,25% perlu diperhatikan. Pada percobaan ini lama waktu yang terbaik untuk tripsinasi dengan tripsin 0,25% untuk kultur primer adalah 20-25 menit, sedangkan untuk sel monolayer dengan dosis tripsin yang sama waktu yang diperlukan adalah 3-5 menit.

Pada saat penanaman (hari ke-O) (Gambar 1) sel terlihat mengapung dalam media penumbuh. Pada hari pertama, tampak beberapa sel mulai menempel pada permukaan substrat dan membentuk koloni yang terdiri dari beberapa sel. Pada hari kedua terlihat lebih banyak koloni koloni kecil yang menempel pada substrat. Pada hari ketiga tampak koloni koloni tersebut mulai membesar dan terlihat juga ada sel yang mati. Pada hari keempat koloni-koloni semakin membesar dan pada hari kelima koloni semakin meluas dan sudah mulai ada pertautan antara koloni yang satu dengan yang lainnya. Setelah hari ketujuh sel mencapai tingkat kepadatan yang hampir merata pada seluruh permukaan substrat.

3. Kultur Sel Segar

Kultur sel segar ini adalah kultur sel epitel tuba Fallopii yang tidak mengalami pembekuan sejak pertama dikoleksi. Pasase pertama dilakukan pada hari ketujuh sampai hari ke 14 tergantung pekat tidaknya atau persentase sel yang melekat pada substrat. Pada percobaan ini pasase pertama dilakukan setelah sel yang tumbuh pada substrat lebih dari 60% . Hasil kultur setelah pasase pertama disebut sel lestari. Pasase ini dilakukan agar sel epitel tuba Fallopii ini menjadi lebih seragam dan memiliki daya pertumbuhan yang lebih tinggi.

Hasil perkembangan sel epitel pada hari kesepuluh diperoleh 6×10^4 sel/ml dari 2×10^6 sel/ml pada percobaan menggunakan medium dasar TCM 199 maupun DMEM. Hal ini berarti banyak sel yang mati dalam proses pembuatan kultur primer, yang dapat terjadi mulai saat koleksi sampai sel perlu beradaptasi dengan medium kultur. Kematian sel ini bisa terjadi akibat adanya perbedaan keadaan lingkungan dari kondisi internal di dalam tubuh ke kondisi buatan di luar tubuh serta factor mekanis yang dapat merusak sel.

Walaupun keadaan lingkungan yang baru tersebut telah dibuat sedemikian rupa seperti di dalam tubuh, namun kondisi medium tidak mungkin sama seperti kondisi in vivo. Sel yang mampu beradaptasi adalah sel yang masih baik kualitasnya, baik morfologis maupun fisiologisnya dan umumnya merupakan sel-sel yang masih muda umumnya.

Waktu yang diperlukan sel epitel untuk tumbuh merata dan pekat pada pasase ke2 lebih singkat dibandingkan pada pasase pertama, demikian juga pada pasase ke3 lebih singkat dari pasase ke2. Ini dapat dilihat pada salah satu contoh yang berhasil tumbuh sampai pasase keempat, yaitu untuk mencapai pasase 1, 2, 3, dan 4 dibutuhkan waktu masing masing 10, 6, 4 dan 4 hari. Hal Ini menunjukkan bahwa perlakuan pasase pada kultur sel dapat meningkatkan kemampuan berproliferasi sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Freshney (1987) yang mengatakan akan terjadi peningkatan kemampuan berproliferasi sel pada setiap pasase. Namun pada pasase kelima belum tercapai karena pada pasase keempat sel epitel tidak tumbuh / atau banyak yang mati.

4. Pengumpulan Cairan/Supernatan Biakan Sel Tuba Fallopii.

Pada saat penggantian media pada setiap pasase dilakukan penampungan cairan/ supernatan. Supernatan media ditampung dalam tabung sentrifus 4,5 ml dan disimpan dalam pendingin yang bersuhu – 40 °C untuk dikaji lebih lanjut. Pada penelitian ini telah ditampung supernatan sel epitel tuba Fallopii setelah pasase kedua dan ketiga.

5. Pembuatan stok sel epitel tuba Fallopii

Dari 16 organ tuba Fallopii monyet ekor panjang telah berhasil disimpan biakan sel epitel tuba Fallopii beserta supernatannya dan hasil ini digunakan sebagai ko-kultur untuk program fertilisasi in vitro pada monyet ekor panjang.

6. Koleksi sel telur

a. Tanpa superovulasi

Dalam pengambilan/ koleksi sel telur dari monyet betina tanpa superovulasi diperoleh sel telur dalam jumlah dan ukuran yang bervariasi serta dikelilingi sel kumulus dengan lapisan yang berbeda serta berjumlah antara 40-70 sel telur per ovarium. Diantaranya dilakukan seleksi terhadap diameter yang besar dengan sel kumulus yang mengelilinginya. Dari seleksi ini diperoleh 10-22 sel telur (rataan 13 sel telur / ovarium), stadium metafase (MI) berkisar antara 2-5 sedangkan sel telur yang matang pada stadium MII antara 0-2 per ovarium.

b. Dengan superovulasi

Sementara itu hasil yang diperoleh dari 2 ekor monyet betina yang menerima perlakuan superovulasi menggunakan rhFSH dan hCG, sel telur yang diperoleh berada pada stadium matang (metafase II, MII), masing-masing 1 dan 2 MII. Sedangkan pada dua ekor monyet yang lainnya diperoleh 10 + 42 sel telur (6 MII, 44 MI dan 2GV).

7. Pematangan Sel telur

Sel telur yang diperoleh dari ovarium tanpa superovulasi pada medium TALP diperoleh sel yang matang (MII) 7/13 (53,8%) dan dalam medium supernatan sel epitel tuba Fallopii diperoleh MII 19/29 (65,5%). Sedangkan sel telur yang dikoleksi dari ovarium yang menerima perlakuan superovulasi menghasilkan sel telur yang matang 6/10 (60%) pada medium TALP dan 37/42 (88%) pada medium supernatan sel epitel tuba Fallopii.

8. Fertilisasi sel telur

Sel telur matang (MII) yang diperoleh pada perlakuan non superovulasi setelah diinseminasi dengan sperma berhasil mengalami fertilisasi (oosit dengan PN) 4/13 (31%) pada medium TALP dan 5/13 (38%) dalam medium supernatan sel epitel tuba Fallopii. Sementara itu sel telur matang yang diperoleh dari perlakuan ovarium yang diinduksi dengan hormon (superovulasi) setelah diinseminasi belum berhasil mengalami fertilisasi (oosit dengan PN) 0/37 (0%) walaupun terjadi sperm binding dalam medium supernatan sel epitel tuba Fallopii.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Sel epitel tuba Fallopii monyet ekor panjang berhasil dikultur. Media yang digunakan adalah DMEM dengan *Fetal Bovine Serum* 10% pada kondisi inkubator yang bersuhu 37^{O} C dan 5% CO_2.
2. Sel epitel tuba Fallopii berhasil dipasase sampai pasase ke-4. Daya pertumbuhan sel sampai pasase ke-4 semakin meningkat pada setiap pasase.
3. Kultur sel epitel tuba Fallopii dapat disimpan dengan cara pembekuan.
4. Kontaminan adalah faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan kultur sel.
5. Supernatan biakan sel tuba Fallopii dapat digunakan sebagai medium maturasi oosit monyet ekor panjang.

6.2. Saran

1. Kultur sel epitel tuba Fallopii monyet sebaiknya dilakukan sampai pasase ke-3, karena pasase ke-3 pertumbuhannya paling meningkat.

2. Sel epitel tuba Fallopii yang telah dipasase dan supernatannya dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut baik dalam bidang kedokteran hewan maupun manusia.
3. Untuk pematangan sel telur monyet ekor panjang disarankan penggunaan supernatan biakan sel tuba Fallopii.

VII. RENCANA PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA

Tujuan Khusus

Pada periode tahun ketiga aktivitas penelitian akan difokuskan pada kegiatan-kegiatan yang belum dilaksanakan selama periode tahun kedua. Setelah dikaji penggunaan sel epitel tuba Fallopii maupun supernatannya sebagai ko-kultur dalam program maturasi oosit dan perkembangan embrio dini, maka hasil terbaik akan digunakan pada penelitian selanjutnya. Penelitian tahap ketiga ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan penggunaan sel tuba Fallopii dan supernatannya sebagai ko-kultur pada program FIV serta mentransfer embrio yang dihasilkan pada program FIV pada monyet ekor panjang.

Metode

Dari penelitian tahun kedua yang merupakan aplikasi biakan sel dan supernatannya pada maturasi oosit, pada tahun ketiga ini akan digunakan untuk memperbanyak pematangan sel telur dan perkembangan embrio pada program FIV dengan perlakuan sebagai berikut:

1. Koleksi sel telur dari monyet ekor panjang yang telah menerima perlakuan hormon untuk superovulasi.
2. Pematangan sel telur dengan media yang telah diberikan biakan sel tuba Fallopii atau supernatannya
3. Penyiapan spermatozoa yang koleksinya melalui aspirasi epididimis dan proses kapasitasi spermatozoa menggunakan medium mhTF yang ditambah kafein dan dbcAMP.
4. Fertilisasi sel telur, oosit stadium M-II diinseminasi dengan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi.
5. Evaluasi perkembangan embrio: 2-8 sel, morula dan blastosis.
6. Transfer embrio

Jadwal kerja

Aktivitas penelitian selama periode tiga tahun dapat dilihat pada Lampiran Tabel 2.

DAFTAR PUSTAKA

Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, A. R. C. Bavister and N.L. First 1983. Bovine In Vitro fertilization. Biol. of Reprod. 28:717-725.

Bavister, B. D. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary? Human Reproduction 7:1339-1341.

Boatman, D.E 1987. In vitro growth of non human primate pre and peri implantation embryos. In: B.D. Bavister. The mammalian pre implantation embryo. Plenum Press, New York.

Bongso, A., S-Chye Ng, C. Yee Fong and S. Ratnam. 1991. Improved fertilization rates of non human oocytes in co-cultur. J. of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer 8: 4:126-221

Critser, E.S., M.L. Leibfiried and N.L. First. 1984. The effect of semen extension, cAMP and caffein on in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 21,4 : 625 – 630

Freshney, R.I. 1987. Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique. Second Edition Alan R. Liss Inc. New York. 1-84

Gandolfi, F., T.A.L. Brevimi and R.M. Moor 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development J. Reprod. Fert. Suppl. 38: 107-115.

Godke, R.A., E.G. Blakewood and J.K. Thibodeaux. 1992. In Vitro Co-culture of Mammalian Embryos. Departement of Animal Science. Lousiana State University.

Hafez, E.S.E. 1987. Reproduction Cycle In: Hafez, E.S.E. Reproduction in Farm Animals 5th Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.

Lanzendorf S.E, P.M. Gliessman; A.E. Archibong, M. Alexander and D.P. Wolf. 1990. Collection and Quality of Rhesus Monkey Semen. Molecular Reproduction and Development 25:61-66.

Pinyopummintr, T. and Bavister. 1991. In vitro-matured/ In vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/ blastocyst in chemically defined. Protein-free culture media. Biol. of Reprod. 45: 736- 743.

Sajuthi, D., Tuty, L.Y., I. Mansjoer, R.P.A. Leiana., I.H. Suparto. 1997. Kursus Singkat Penanganan Satwa Primata Sebagai Hewan Laboratorium. Universitas Udayana.

Thibodeaux, J.K., J. Menezo, J.D. Roussel, W. Hansel, L.L Goodeaux, D.L Thompson

and R.A. Godke. 1992. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with oviductae epitheliae cells originating from different stages of the estrous cycle. J. of Dairy Science 75:6:1448-1454.

Thibodeaux, J.K., L.L. Godeaux, J.D. Roussel, J. Menezo, G.F. Amborski, J.D. Moreau and R.A. Godke. 1991. Effect of stage of the bovine estrous cycle on in vitro characteristics of uterine and oviductal epithelial cells. Human Reproduction 6 : 6 : 755-760

Ungerer, T., S.S. Mansjoer., E. Iskandar., D. Sajuthi. 1997. Program Studi Primatologi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Jurnal Primatologi 1:27-33.

Wiemer, K.E., J.Cohen, S.R. Wiker, H.E. Malter, G. Wright and R.A. Godke. 1989. Co-culture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblast embryonic morphology and inplantation. Fertility and Sterility. 52:3: 503-508.

Zhang, L., D.M. Barry, R.S. Denniston, T.D. Bunch and R.A. Godke. 1992. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed IVF-derifed Bovine Embryos. Department of Animal Science, Lousiana, Lousiana State University.

LAMPIRAN

Lampiran Tabel 2.

Rencana Kegiatan Penelitian Selama Tiga Tahun

Tahun I

Persiapan
Operasional Lab.
Pembuatan kultur sel tuba Fallopii
Menyimpan kultur sel dan supernatannya
Pengolahan data, laporan dan seminar

Tahun II

Superovulasi
Koleksi sel telur
Maturasi sel telur
Koleksi semen
Pengolahan data, Laporan, Seminar.

Tahun III

Koleksi Sel telur dan spermatozoa
Fertilisasi *In Vitro*
Pembekuan Embrio
Transfer Embrio dan pemeriksaan kebuntingan
Pengolahan data, Laporan dan Seminar.

nbar 1. Prosedur isolasi, kultur dan pembekuan sel epitel tuba Fallopii

ktu	Kegiatan	Media	Suhu
Jam	**Sterilisasi :** a. alat untuk bedah		$121^{O}C$
	b. bahan untuk kultur dengan filter 0,22 μ dan disimpan	PBS, TCM, anti biotika (penstrep), anti jamur (Fungizone)	$25^{O}C$ $4^{O}C$ (lemari es)
menit	**Laparotomi:** 10 ekor monyet siklus teratur, tanpa superovulasi tuba Fallopii dipotong antara ovarium dan corpus uteri.	medium transport	$25^{O}C$ (termos es)
m ke 0	**Isolasi tuba : ** pengumpulan **Fallopii** dalam medium transport	PBS + penstrep + Fungizone pH 7,2-7,4	$20^{O}C$ (termos es)
m ke 1- 3	**Pembuatan kultur sel primer epitel tuba Fallopii:** cawan petri steril, pembilasan lumen dengan inkubasi selama 15 menit	PBS Tripsin 1:250	$37^{O}C$
	Sentrifusi : 1500 RPM (5 menit) supernatan dibuang	PBS	
	Kultur : endapan sel dihomogenkan 10^5 sel. 10 ml medium dalam cawan petri 60 mm	TCM CO_2 5%	$37^{O}C$ (inkubator)
m ke 24-	**Evaluasi & Penggantian medium** pertumbuhan sel setiap hari		
hari ke 7	**Pasase kultur sel :** setelah monolayer		
ari ke n	**Pembekuan**	DMSO 10%	$-70^{O}C$

ambar 2. Prosedur koleksi, maturasi dan fertilisasi oosit *Macaca fascicularis*

'aktu	Kegiatan	Media	Suhu
0 menit	**Laparotomi:** 10 ekor monyet siklus teratur, tanpa superovulasi	TALP+FCS 5%	37^{O}C
m ke 0	**Koleksi Oosit:** pengumpulan & kultur dalam drop 100 µl medium dilapisi mineral oil	TALP+FBS 20% M 199 + FBS 20% TALP 199 + ko-kultur M 199 + ko-kultur	
n ke 12	**Evaluasi elektif :**		
n ke 24	**Evaluasi** : ekspansi kumulus, dimensi ruang PV, GVBD, ekstrusi PB-I Dispersi oosit dari kumulus (manual) Eksklusi oosit yang rusak		
ke 30	**Koleksi Semen :** pencucian,		
	inkubasi selama 4 jam	$C0_2$ 5%	37^{O}C
	aktivasi : selama 1 jam	dbc AMP & kafein 1mM	
ke 36	**Evaluasi dan Inseminasi:** seluruh oosit M-II, 20.000 sperma/ drop 100 µl	TALP	
ke 45	**Koleksi Semen ke-II**		
ke 50	**Inseminasi :** seluruh oosit M-II		

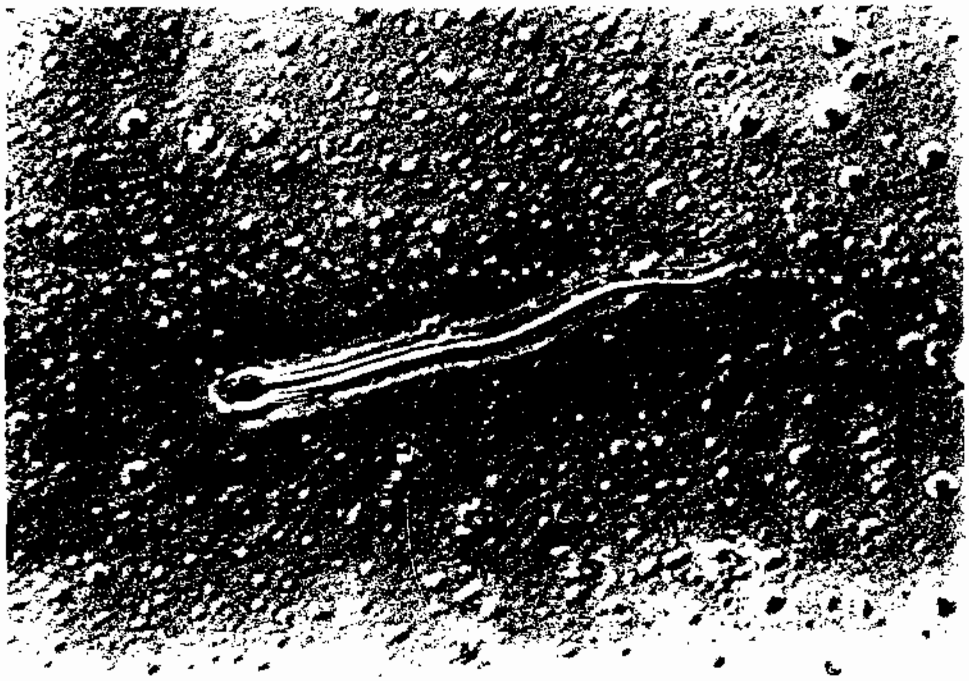
Dulbecco's[1] Modified Eagle Media (D-MEM) ®

COMPONENT	320-1885 1X Liquid	380-2320 1X Liquid	430-1600 Powder	320-1965 1X Liquid	380-2430 1X Liquid	430-2100 Powder	430-2800 Powder	430-3000 Powder	320-1960 1X Liquid	320-197 .1X Liqu
	mg/L	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*	*mg/L*
INORGANIC SALTS:										
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
KCl	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00
KNO_3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$MgSO_4$ (anhyd.)	—	—	97.67	—	—	97.67	97.67	97.67	—	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200.00	200.00	—	200.00	200.00	—	—	—	200.00	200.00
NaCl	6400.00	4750.00	6400.00	6400.00	4750.00	6400.00	6400.00	6400.00	6400.00	6400.00
$NaHCO_3$	3700.00	3700.00	—	3700.00	3700.00	—	—	—	3700.00	3700.00
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$*	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00	125.00
$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OTHER COMPONENTS:										
D-Glucose	1000.00	1000.00	1000.00	4500.00	4500.00	4500.00	4500.00	4500.00	4500.00	4500.00
Phenol red	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	—	15.00	15.00
HEPES	—	5958.00	—	—	5958.00	—	—	—	—	—
Sodium pyruvate	110.00	110.00	110.00	—	—	—	110.00	—	—	—
AMINO ACIDS:										
L-Alanine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Asparagine · H_2O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Arginine · HCl	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00	84.00
-Aspartic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-Cystine	48.00	48.00	—	48.00	48.00	—	—	—	48.00	48.00
-Cystine · 2HCl	—	—	62.57	—	—	62.57	62.57	62.57	—	—
-Glutamic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-Glutamine	584.00	584.00	584.00	584.00	584.00	584.00	584.00	584.00	—	—
lycine	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
-Histidine HCl · H_2O	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
-Isoleucine	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00
-Leucine	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00	105.00
-Lysine HCl	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00	146.00
-Methionine	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	—
-Phenylalanine	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00	66.00
-Proline	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-Serine	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
-Threonine	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00	95.00
-Tryptophan	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
-Tyrosine	72.00	72.00	—	72.00	72.00	—	—	—	72.00	72.00
-Tyrosine (disodium salt)	—	—	103.79	—	—	103.79	103.79	103.79	—	—
-Valine	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00	94.00
ITAMINS:										
iotin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-Ca pantothenate	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
holine chloride	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
olic acid	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
inositol	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20	7.20
icotinamide	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
yridoxal HCl	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
iboflavin	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
hiamine HCl	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
itamin B_{12}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

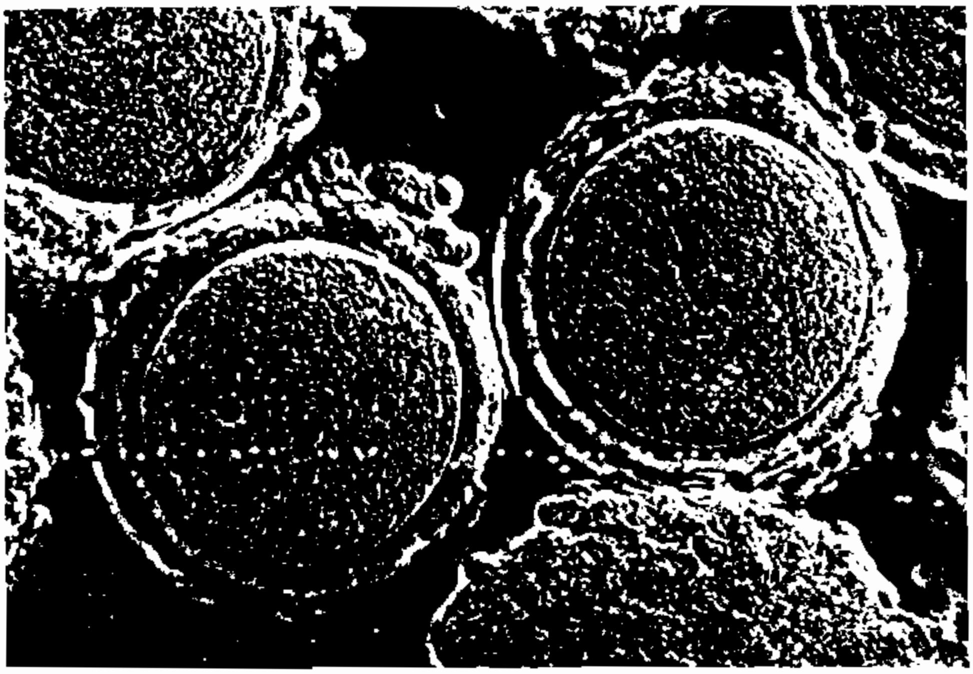
Dulbecco, R., Freeman, G. (1959) *Virology 8*, 396. Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M. and Dulbecco, R. (1960) *Virology 12*, 185. Tissue Culture Standards Committee, *In Vitro 6* 2, 93

Values shown are in conformance with the Tissue Culture Standards Committee, *In Vitro* (1970) *9.6*

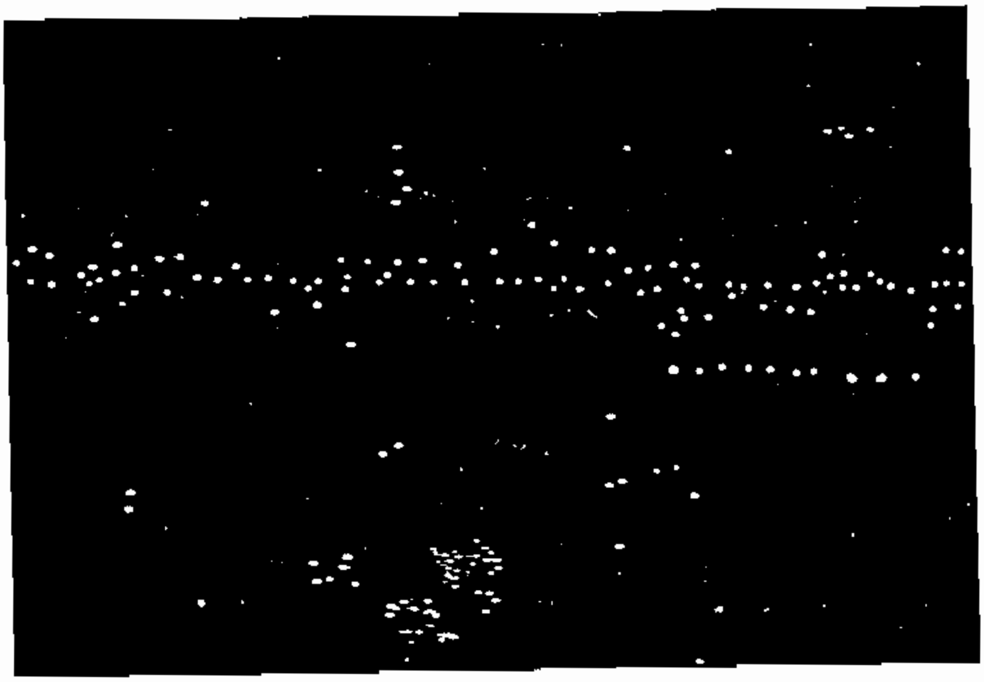
Lampiran Gambar 1
Pertumbuhan biakan sel tuba Fallopii



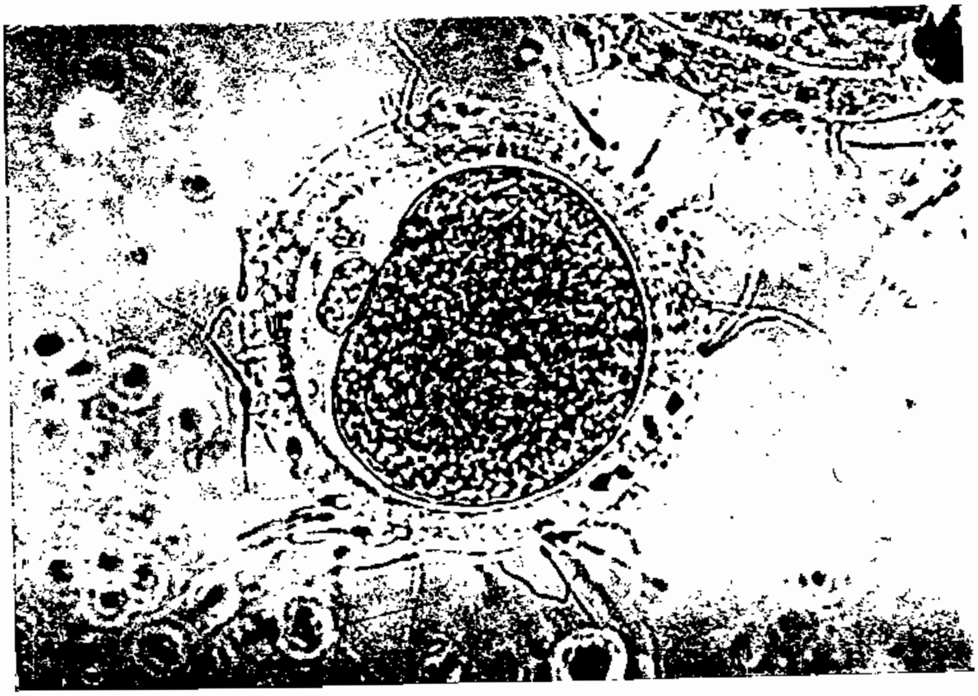
Lampiran Gambar 2
Spermatozoa monyet ekor panjang hasil aspirasi epididimis



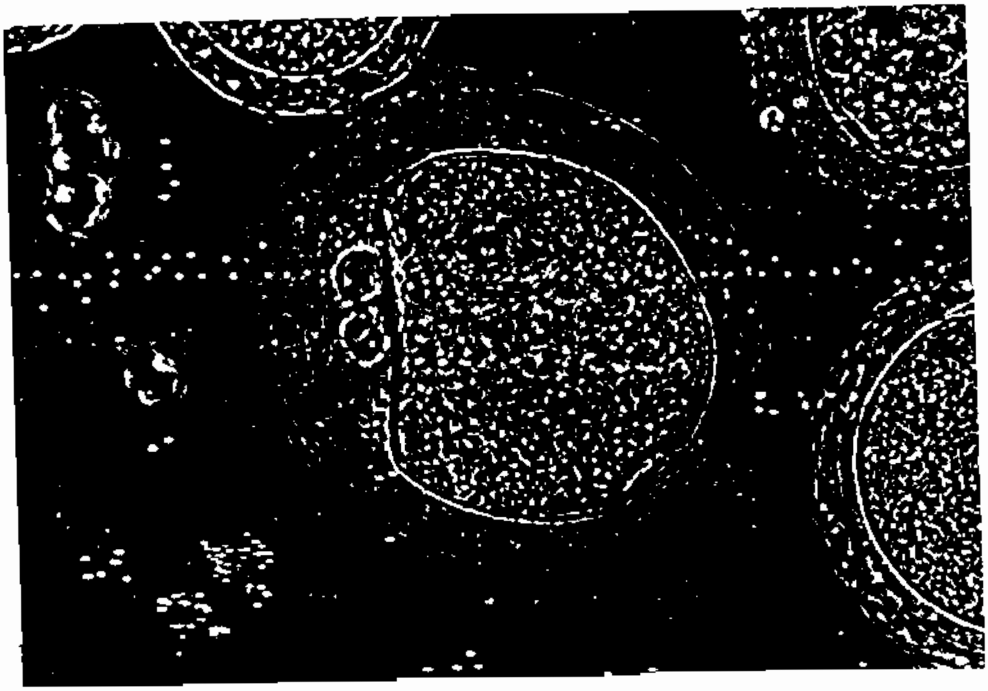
Lampiran Gambar 3
Sel telur monyet ekor panjang pada stadium inti, GV



Lampiran Gambar 4
Sel telur monyet ekor panjang pada stadium M-I, GVBD



Lampiran Gambar 5
Sel telur monyet ekor panjang yang matang, stadium M-II , PB I



Lampiran Gambar 6
Sel telur monyet ekor panjang yang telah dibuahi, PB II