

Perbandingan Penggunaan Medium CR1aa dan KSOM sebagai Medium Kultur dalam Produksi Embrio Sapi *In Vitro*

ENDANG TRIWULANNINGSIH¹, M. R. TOELIHERE², J. J. RUTLEDGE³, T. L. YUSUF², B. PURWANTARA² dan K. DIWYANTO⁴

¹Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221, Bogor 16002, Indonesia

²Biologi Reproduksi Pascasarjana IPB, Darmaga, Bogor

³Dept. of Animal Science Univ. of Wisconsin, USA

⁴Puslitbang Peternakan, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16151

Email: deonhizkia@indo.net.id atau etriwulanningsih@yahoo.com

(Diterima dewan redaksi 1 Juli 2002)

ABSTRACT

E. TRIWULANNINGSIH, M. R. TOELIHERE, J. J. RUTLEDGE, T. L. YUSUF, B. PURWANTARA and K. DIWYANTO. 2002. Using CR1aa versus KSOM as the culture medium for *in vitro* embryo production of cattle. *JITV* 7 (1): 30-37.

This research has been conducted at the laboratory of *in vitro* fertilization in the Department of Animal Science University of Wisconsin, USA. These embryos can be used for improving genetic value of Indonesian cattle. Oocytes were matured in TCM-199 medium (in 5% CO₂ incubator and at 39°C) enriched with follicle stimulating hormone (FSH) 10 µl/ml, oestradiol 17 β 1 µl/ml and 10% Fetal Calf Serum (FCS). The oocytes were fertilized *in vitro* with motile sperm and incubation between sperm and oocytes in fertilization medium Tyroide Albumin Lactate Pyruvate (TALP) for 20 hours. All zygotes were cultured in CR1aa (n=1549) medium versus modification of protein-free potassium simplex optimized medium (KSOM) (n=675) up to blastocyst stage and were fed FCS 5 µl/50 µl medium on day 6, as treatment A and B respectively. Data were analyzed by completely randomized design with SAS program. Percentages of cleavage, morula, blastocyst, expanded blastocyst, unfertilized and degenerated ova in this study were 91.4% vs 75.6%; 75.6% vs 58.9%; 61.5% vs 38.5%; 31.2% vs 5.1%, 8.6% vs 24.4%, 15.7% vs 8% which were significantly different (P<0.01) for treatment CR1aa and KSOM respectively. Based on this study, CR1aa medium is better culture medium than KSOM for efficient *in vitro* production (IVP) of bovine embryos.

Key words: Oocytes, *in vitro* fertilization, embryo, blastocyst, culture medium

ABSTRAK

E. TRIWULANNINGSIH, M. R. TOELIHERE, J. J. RUTLEDGE, T. L. YUSUF, B. PURWANTARA and K. DIWYANTO. 2002. Perbandingan penggunaan medium CR1aa dan KSOM sebagai medium kultur dalam produksi embrio *in vitro* sapi. *JITV* 7 (1): 30-37.

Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium fertilisasi *in vitro* Department of Animal Science University of Wisconsin, Amerika Serikat. Diharapkan embrio yang dihasilkan dapat digunakan sebagai sumber bibit untuk memperbaiki mutu genetik sapi di Indonesia. Oosit dimatangkan dalam medium TCM-199 di inkubator 5% CO₂ yang diperkaya dengan FSH 10 µl/ml, oestradiol 17 β 1 µl/ml dan 10% FCS, kemudian difertilisasi secara *in vitro* dengan sperma motil dan inkubasi antara sperma dan oosit dalam mTALP selama 20 jam. Oosit dikultur dalam medium kultur CR1aa (n=1549) dibandingkan dengan KSOM (n=675), masing-masing sebagai perlakuan A dan B. Pada hari keenam diberi FCS sebanyak 5µl/50µl medium kultur. Data dianalisis dengan rancangan acak lengkap menggunakan program SAS. Persentase pembelahan, morula, blastosist, *expanded blastocyst*, oosit yang tidak terfertilisasi dan embrio yang mengalami degenerasi pada penelitian ini berturut-turut 91,4% vs 75,6%, 75,6% vs 58,9%, 61,5% vs 38,5%, 31,2% vs 5,1%, 8,6% vs 24,4 % dan 15,7% vs 8,0% berbeda sangat nyata (P<0,01) antara penggunaan medium kultur CR1aa dan KSOM. Berdasarkan penelitian ini maka penggunaan medium CR1aa lebih baik dibandingkan medium KSOM untuk produksi embrio sapi secara *in vitro*.

Kata kunci: Oosit, fertilisasi *in vitro*, embrio, blastosist, medium kultur

PENDAHULUAN

Produksi embrio secara *in vitro* merupakan strategi untuk meningkatkan reproduksi dan genetik pada sapi. Pada aplikasi fertilisasi *in vitro* secara komersial, teknologi ini digunakan untuk usaha meningkatkan produksi sapi potong, untuk mengatasi infertilitas pada sapi yang bernilai tinggi (*valuable cows*), untuk

memproduksi sapi transgenik dan sebagai sumber embrio yang telah disexing.

Perkembangan embrio *in vitro* dari oosit hingga *expanded blastocyst*, sangat dipengaruhi oleh kondisi oosit sejak sebelum dilakukan pematangan, karena oosit yang berasal dari ovarium hewan yang mengandung corpus luteum, berbeda dengan ovarium yang berisi folikel *de Graaf*, demikian pula bila oosit berasal dari hewan afkir, dimana ovariumnya telah mengalami

degenerasi atau hipoplasia. Pada setiap periode siklus estrus sapi terkandung hormon gonadotropin yang berbeda, karena pertumbuhan folikel di dalam ovarium juga dipengaruhi oleh adanya *folicle stimulating hormone* (FSH) dari hipofisis anterior. Disamping kondisi oosit, keberhasilan fertilisasi *in vitro* (FIV) dipengaruhi oleh spermatozoa yang digunakan, maupun metode kapasitasi spermatozoa dan konsentrasi spermatozoa yang diinseminasikan dan juga oleh medium kultur calon zigot hingga mencapai blastosist atau *expanded blastocyst* yang siap untuk ditransfer ke resipien ataupun dibekukan.

Morula lebih sensitif terhadap perubahan lingkungan karena kemampuan *transcriptionally quiescent* terbatas untuk merespon perubahan lingkungan (EDWARDS *et al.*, 1997). Sementara itu TROUNSON *et al.* (1994) melaporkan bahwa embrio sapi menggunakan asam asetat lebih banyak pada perkembangan awal embrio dibanding embrio domba. Lebih lanjut dinyatakan bahwa glukosa tidak merupakan faktor penghambat pertumbuhan embrio dua sel seperti halnya yang didapat pada embrio tikus, akan tetapi pemberiannya perlu mendapat perhatian. Dilaporkan bahwa kafein meningkatkan persentase blastosist bila diberikan bersama dengan sel epitel. Pemberian asam amino esensial dan non esensial sebagai sumber energi pada medium pembiakan dilaporkan dapat mempertahankan pertumbuhan embrio dengan catatan produksi amonium perlu dikontrol. Selanjutnya dikatakan bahwa penggunaan medium *Synthetic Oviduct Fluids* (SOF) dengan 8 mg medium *bovine serum albumin* (BSA) per ml menghasilkan 39% blastosist.

Perkembangan embrio mamalia tergantung pada adanya interaksi antara perkembangan genetik dalam kromosom dari setiap zigot dan lingkungan endometrium resipien, walaupun formula medium juga sangat berpengaruh untuk meningkatkan jumlah embrio yang dapat ditransfer (GANDOLFI, 1994). Lingkungan endometrium mencakup faktor autokrin yang umumnya berasal dari embrio sendiri memungkinkan embrio untuk berkembang, disamping faktor parakrin antara lain faktor pertumbuhan (*growth factors*) dan protein spesifik yang berasal dari embrio yang bersama-sama dikultur dalam satu tetes medium, protein yang berasal dari endometrium induk yang sering disebut sebagai susu uterus dan faktor lingkungan.

Pengaruh kualitas embrio hasil fertilisasi *in vitro* yang dikultur dengan menggunakan medium TCM-199 dengan satu lapis ko-kultur (*mono layer*) sel-sel granulosa dibandingkan dengan medium SOF dan kemudian dibekukan dan *dithawing* telah dilakukan oleh HAN *et al.* (1994). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa persentase ova yang membelah masing-masing 44% dan 49% untuk yang dikultur dengan SOF dan ko-kultur sel granulosa, tetapi

persentase blastosist adalah 16% dan 13%. Dari penelitian ini ternyata penggunaan medium SOF sedikit lebih baik dibandingkan ko-kultur sel granulosa dalam TCM.

Pengaruh perkembangan embrio yang dikultur dengan menggunakan ko-kultur satu lapis sel tuba falopii (*oviductal cell monolayer*) kelinci dibandingkan dengan yang dikultur dalam ko-kultur satu lapis sel tuba falopii sapi telah diteliti oleh PROKOFIEV *et al.* (1992); pada penelitian tersebut ternyata persentase blastosist yang berkembang pada ko-kultur satu lapis sel tuba falopii kelinci adalah 16,3%, sementara yang pada sapi 24,0%.

FURNUS *et al.* (1998) melaporkan bahwa penambahan asam hialuronik pada medium kultur dapat meningkatkan efisiensi produksi blastosist secara *in vitro*, yang menggunakan SOF sebagai medium kultur. Penambahan asam hialuronik sebanyak 0,5 mg/ml tidak efektif, tetapi bila ditambahkan sampai 1 mg/ml nyata ($P < 0,01$) meningkatkan persentase blastosist. Bila blastosist tersebut tetap diamati sampai mencapai *hatched* maka persentase blastosist tanpa asam hialuronik akan lebih tinggi dibandingkan blastosist yang menggunakan asam hialuronik (48% vs 35%).

MONSON *et al.* (1992) membandingkan ko-kultur *Bovine Oviduct Epithelial Cells* (BOEC) dan CR1aa, ternyata angka blastosist pada hari ke tujuh dan delapan adalah 10% dan 8,8% untuk zigot yang dikultur dalam medium BOEC; dibandingkan dengan yang dikultur dalam CR1aa adalah 22% dan 18% masing-masing pada hari ke tujuh dan delapan. Sementara itu THOMPSON *et al.* (1998) telah berhasil mendapatkan persentase blastosist 40,1% yang dikultur dalam medium SOF dan *feeding serum* pada hari ke lima. Selanjutnya dikatakan bahwa *fetal calf serum* mempunyai *biphasic effect* pada perkembangan embrio sapi selama dikultur.

MATERI DAN METODE

Pematangan Oosit secara *in vitro*

Ovaria dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan di Milwaukee, Green Bay dan Madison, Negara Bagian Wisconsin, USA segera setelah sapi FH betina dipotong. Sebelum dipotong sapi-sapi tersebut telah diperiksa oleh tim kesehatan veteriner (USDA) secara intensif. Jadi sapi yang dipotong adalah hanya sapi yang betul-betul sehat. Hal ini dapat diamati dari ovaria yang terkumpul yang langsung diambil dari abdomen sapi lalu ditempatkan dalam termos air panas tanpa medium fisiologis. Ovaria yang terkumpul segera dibawa ke Laboratorium fertilisasi *in vitro* *Department of Animal Science, University of Wisconsin*. Ovaria dibilas dengan air suam-suam kuku dan ditempatkan dalam gelas piala di dalam penangas air bersuhu 37°C. Oosit diaspirasi

langsung dari folikel berdiameter sekitar 2-5 mm dengan jarum suntik berukuran 18 G yang dihubungkan dengan selang silikon steril ke pompa vakum yang bertekanan 5-7 *psi* dan ditampung dalam tabung kerucut bervolume 50 ml, tanpa menggunakan medium dan folikel yang besar serta *bloody follicles* (folikel yang berdarah) harus dihindari agar tidak terjadi koagulasi saat koleksi oosit. Oosit dan cairan folikel dipindahkan ke cawan petri bergaris yang berdiameter 10 cm dengan menggunakan pipet Pasteur yang panjang. Oosit dibilas tiga kali dalam medium TL Hepes steril. Setelah pembilasan, 10 oosit ditempatkan dalam setiap tetes (50 μ l) medium pematangan yang terdiri atas TCM-199 yang diperkaya dengan FSH 10 μ l/ml, estradiol 17 β 1 μ l/ml dan 10% FCS dan disimpan di dalam 5% CO₂ inkubator dengan suhu 39°C selama 24 jam.

Fertilisasi *in vitro*

Sperma beku yang digunakan *dithawing* terlebih dahulu dalam penangas air 35°C, kemudian diletakkan di atas lapisan larutan Percoll 45% (500 μ l) dan 90% (500 μ l) dalam tabung kerucut bervolume 2 ml dan di-*centrifuge* 2.200 rpm (700 G) selama 7 menit, lalu supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml TL Hepes dan di-*centrifuge* lagi selama 2 menit, supernatan dibuang sebanyak 900 μ l kemudian filtrat dihitung konsentrasinya dengan menggunakan haemocytometer, untuk penelitian ini diperlukan konsentrasi 1-2.5 x 10⁶ spermatozoa/ml guna menghindari polyspermia (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2001 a).

Oosit yang sudah dimatangkan, dibilas sebanyak dua kali dengan larutan TL Hepes dan 10 oosit ditempatkan dalam setiap 44 μ l tetes medium fertilisasi yang berupa modifikasi *Tyroide Albumin Lactate Pyruvate* (TALP) kemudian ditambahkan 2 μ l sperma, ditambahkan 2 μ l heparin dan 2 μ l *penicillamine hypotaurine epinephrine* (phe), kemudian disimpan dalam 5% CO₂ inkubator yang bersuhu 39°C selama 24 jam.

Kultur zigot

Setelah oosit diinkubasi dengan spermatozoa selama 20 jam, zigot dibilas dengan TL Hepes, di *vortex* selama 3 menit dan dibilas kembali dengan medium TL Hepes sebelum masuk ke dalam tetes kultur medium CR1aa (1549 oosit) dibandingkan dengan KSOM (*protein-free potassium simplex optimized medium*) (20-25 zigot/50 μ l medium) (675 oosit) selama 8 hari dalam 5% CO₂ inkubator dan suhu 39°C. Pada hari ke 6 diberi FCS 5 μ l/50 μ l medium CR1aa maupun KSOM (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2001b). Pada hari ke 7 *expanded blastocyst* yang berkualitas dikoleksi untuk dibekukan dengan menggunakan krioprotektan 1,5 M etilen glikol (untuk *direct transfer*) dan dengan 1,5 M

gliserol (untuk *indirect transfer*). Zigot masih diamati terus sampai hari ke 9 untuk melihat yang berhasil *hatched*, hanya *expanded blastocyst* berkualitas baik yang dibekukan, dengan harapan persentase kebuntingan menjadi tinggi. Gambar 1 berikut ini adalah menggambarkan alur penelitian ini.

Parameter yang diamati adalah pembelahan, morula, blastosist, *expanded blastocyst*, oosit yang tidak terfertilisasi serta degenerasi embrio. Untuk mengetahui medium kultur yang lebih baik dalam produksi embrio sapi *in vitro*, semua data yang terkumpul kemudian dianalisis secara statistik dengan program SAS, dengan model matematika sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan: Y_{ij} = peubah yang diukur

μ = rata-rata umum

α_i = pengaruh media kultur ke-i (i=1,2)

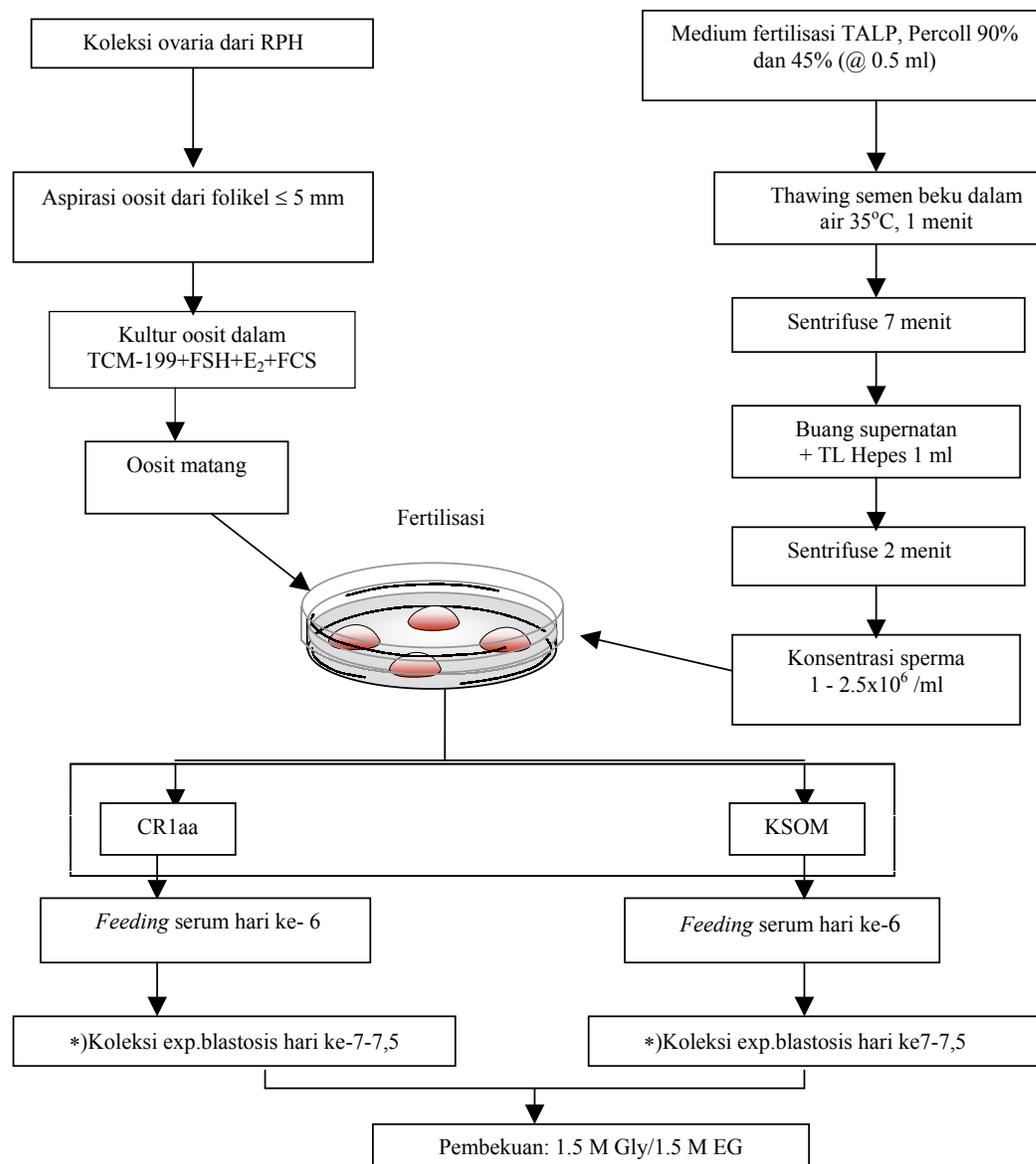
ε_{ij} = *experimental error* (Galat).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menggambarkan bahwa persentase pembelahan antara kelompok embrio yang dikultur di dalam CR1aa (91,4%) nyata lebih baik (P<0,01) dibanding dengan kelompok embrio yang dikultur di dalam KSOM (75,6%). Demikian pula persentase morula, blastosist dan *expanded blastocyst* (75,6%, 61,5%, 31,2%) yang diperoleh dari kelompok embrio yang dikultur di dalam medium CR1aa nyata lebih tinggi (P<0,01) dibandingkan dengan kelompok embrio yang dikultur di dalam KSOM, masing-masing 58,9%, 38,5% dan 5,1% (Tabel 1 dan Gambar 2).

Oosit yang tidak terbuahi nyata lebih rendah (P<0,01) pada medium CR1aa (8,6%) dibanding pada medium KSOM (24,4%). Sebaliknya embrio yang mengalami degenerasi nyata lebih tinggi (15,7%) di dalam medium CR1aa dibanding di dalam KSOM (8,0%). Hal tersebut terjadi mungkin karena kualitas oosit yang berbeda setelah dibuahi dan menjadi zigot, sehingga walaupun lebih banyak embrio yang berkembang di dalam medium CR1aa, tetapi banyak pula yang mengalami degenerasi pada awal perkembangannya. Namun, secara keseluruhan medium CR1aa dinilai lebih baik, karena menghasilkan jauh lebih banyak blastosist dan *expanded blastocyst*, masing-masing (61,5% dan 31,6%) dari pada KSOM (38,5% dan 5,1%).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa embrio sapi lebih cocok dikultur dengan menggunakan medium kultur CR1aa, mungkin karena di dalam medium CR1aa tersedia asam-asam amino, hemicalcium laktat dan glutamin yang cukup seimbang untuk mempertahankan dan mendorong perkembangan embrio sapi *in vitro*,



*) Parameter yang diamati: Pembelahan, Morula, Blastosistt, *Expanded blastocyst*, Oosit tidak terfertilisasi dan Degenerasi Embrio

Gambar 1. Bagan alur penelitian tentang perbandingan pemakaian medium CR1aa dan KSOM sebagai medium kultur dalam produksi embrio *in vitro*

Tabel 1. Perkembangan embrio sapi *in vitro* di dalam medium kultur CR1aa dan KSOM

Perlakuan Medium kultur	Perkembangan embrio				Oosit/embrio yang tak berkembang	
	Pembelahan	Morula	Blastosistt	Expanded blastocyst	Oosit tak terfertilisasi	Degenerasi embrio
CR1aa (n=1549)	n 1415 (91,4) ^a	1156 (75,6) ^a	927 (61,5) ^a	443 (31,2) ^a	134 (8,6) ^b	259 (15,7) ^a
KSOM (n=675)	n 497 (75,6) ^b	438 (58,9) ^b	288 (38,5) ^b	37 (5,1) ^b	178 (24,4) ^a	59 (8,0) ^b

Catatan: Angka dengan huruf yang sama dalam satu kolom, menunjukkan tidak berbeda nyata (P>0,05)

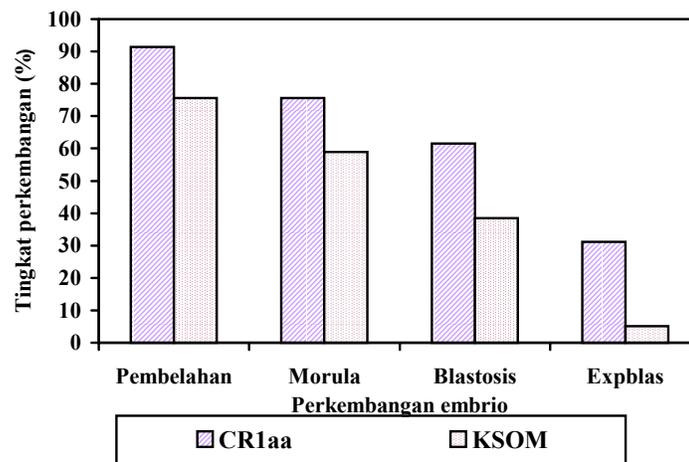
sedangkan medium KSOM tidak mengandung hemicalcium laktat, walaupun didalamnya sudah ditambahkan MEM *non essential amino acid* (Sigma, Cat.# M7145) dan BME *amino acid* (Sigma, Cat.# B 6766) sama seperti yang diberikan pada medium CR1aa. Kemungkinan penambahan hemicalcium laktat inilah yang dapat memperbaiki kondisi medium kultur CR1aa yang mempertahankan kehidupan embrio pada tahap perkembangan selanjutnya (*expanded blastocyst*).

Hasil penelitian (ROSENKRANS *et al.*, 1994) mendapatkan persentase pembelahan pada oosit yang mempunyai kumulat intak (73,2%), lebih kecil dibandingkan hasil penelitian ini (91,4%). Selanjutnya dijelaskan bahwa penambahan sejumlah asam amino esensial (EAA, *essential amino acids*) atau asam amino non esensial (NEAA, *non essential amino acids*) ke dalam medium CR1aa akan meningkatkan frekuensi perolehan blastosist, tetapi penambahan vitamin (MEM, *minimum essential amino acids*) tidak berpengaruh terhadap perkembangan blastosist.

Berbeda dengan hasil yang diperoleh BIGGERS *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa penggunaan asam amino dalam KSOM dapat mendorong perkembangan embrio tikus *in vitro*. Sebaliknya penelitian ini menggambarkan bahwa untuk embrio sapi lebih sesuai digunakan medium CR1aa dibandingkan KSOM. Dikatakan bahwa asam amino signifikan menstimulasi sel untuk mengalami proliferasi baik pada *trophectoderm* maupun pada *inner cell mass* (ICM) serta meningkatkan membran dasar (*basement membranes*) pada permukaan *blastocoelic* pada *trophectoderm* dan antara endoderm primitif dan ectoderm primitif. BIGGERS (1998) melaporkan bahwa walaupun medium tersebut adalah terbaik, tetapi sesuatu hal yang tidak dapat dihindarkan adalah keadaan lingkungan yang tidak seimbang (*inbalance*)

yang mendorong embrio untuk terus berkembang. Embrio harus dapat beradaptasi dengan kondisi yang abnormal jika ingin bertahan hidup.

Penambahan beberapa zat ke dalam medium kultur dianggap penting untuk perkembangan embrio, yaitu asam amino, berbagai serum, Na piruvat dan hemicalcium laktat. ROSENKRANS *et al.* (1993) menemukan bahwa penambahan piruvat (0,2-5 mM) pada medium yang mengandung hemi Ca laktat tidak berpengaruh terhadap perkembangan embrio sapi *in vitro*. Pada penelitian tersebut dicapai derajat pembelahan (68,2%) yang lebih rendah dibandingkan hasil penelitian ini (91,4%). Selanjutnya dikatakan bahwa peningkatan hemi Ca L-laktat dari 5 mM menjadi 10 mM justru akan menurunkan persentase morula maupun blastosist dan rataan persentase pembelahan menjadi 58,8% (total oosit 556). Penambahan magnesium sulfat (0,5 mM) atau EDTA (10 mM) ke dalam medium CR1 dapat meningkatkan perkembangan embrio sampai morula maupun blastosist. Penelitian tersebut mengindikasikan bahwa penambahan piruvat dan zat-zat lain seperti glukosa tidak diperlukan pada medium yang sudah mengandung laktat untuk perkembangan embrio sapi *in vitro*. Piruvat yang ditambahkan sebagai sumber energi, dengan konsentrasi lebih besar dari 1 mM akan menurunkan persentase perkembangan embrio hingga blastosist. Embrio sapi terlihat lebih toleran terhadap peningkatan konsentrasi L-laktat dibandingkan piruvat, tapi tingkat perkembangannya lebih rendah bila dibandingkan dengan penambahan hemi Ca L-laktat. Penggunaan L-laktat lebih disukai dibandingkan piruvat karena tidak mengganggu konversi L-laktat ke piruvat oleh laktat dehidrogenase (LDH). Mungkin keberadaan LDH dapat digunakan sebagai indikator viabilitas embrio *in vitro*.



Gambar 2. Perbedaan produksi embrio sapi *in vitro* yang dikultur dalam medium CR1aa dan KSOM

Bovine serum albumin (BSA) signifikan dapat meningkatkan embrio yang *hatching* bila ditambahkan ke dalam KSOM. Pada penelitian ini juga ditambahkan BSA disamping Na piruvat, MEM dan BME ke dalam KSOM, namun rataan persentase *expanded blastocyst* yang diperoleh hanya 5,1% dibandingkan bila dikultur dalam medium CR1aa (31,2%). Tidak semua blastosist mampu berkembang menjadi *expanded blastocyst*; ternyata di dalam medium CR1aa 47,8% (443/927) blastosist yang mampu terus berkembang menjadi *expanded blastocyst* dibandingkan di dalam medium KSOM hanya 12,8% (37/288) blastosist.

Persentase pembelahan (75,6%), blastosist (38,5%) dan *expanded blastocyst* (5,1%) pada medium kultur KSOM pada penelitian ini ternyata lebih tinggi dari pada hasil penelitian KESKINTEPE *et al.* (1995) yang menggunakan medium kultur SOF dengan perolehan pembelahan, blastosist dan *expanded blastocyst* masing-masing 66,3%, 10,9% dan 3,3%. Tetapi bila kedalam medium SOF tersebut ditambahkan sitrat dan NEAA, pembelahan meningkat menjadi 85,1%, blastosist 42,6% dan *expanded blastocyst* 16,8%, lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian ini yang dikultur dalam KSOM. Namun hasil tersebut masih lebih rendah dibandingkan embrio yang dikultur di dalam medium CR1aa, dengan persentase pembelahan, blastosist dan *expanded blastocyst* pada penelitian ini berturut-turut adalah 91,4%, 61,5% dan 31,2%. Penambahan sitrat dan asam amino nyata ($P < 0,05$) memperbaiki kondisi medium kultur SOF. Apabila kedalam medium SOF ditambahkan glutamin dan asam amino tetapi tanpa sitrat, akan signifikan ($P < 0,05$) memperbaiki kondisi medium kultur dan dihasilkan pembelahan 75,2%, blastosist 37,8% dan *expanded blastocyst* 22,4%. Penambahan glutamin ke dalam medium kultur ternyata memperbaiki kondisi lingkungan embrio sapi *in vitro*. Hasil tersebut mendekati hasil yang dicapai pada penelitian ini yang memakai medium kultur CR1aa. Penggunaan hemicalcium laktat dan glutamin di dalam medium CR1aa akan memperbaiki kondisi lingkungan *in vitro* agar diperoleh persentase *expanded blastocyst* yang lebih besar. Apabila dalam medium SOF ditambahkan glutamin dan sitrat serta asam amino, justru akan menurunkan perolehan pembelahan menjadi 72,7%, blastosist 27,3% dan *expanded blastocyst* 15,8%. Menurut MONSON (2002, komunikasi pribadi) kandungan nutrisi yang ada di dalam medium KSOM sama seperti di dalam SOF. Hasil penelitian tersebut lebih tinggi dibandingkan penelitian ini, terutama pada perolehan *expanded blastocyst* dari yang dikultur dalam KSOM yang menghasilkan *expanded blastocyst* 5,1%; tetapi lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian ini yang dikultur dalam CR1aa. Penambahan glutamin dalam medium lebih menguntungkan untuk perkembangan embrio, karena glutamin berfungsi sebagai sumber energi.

Cumulus oocytes complexes (COC's) sapi menggunakan glukosa dan piruvat sebagai sumber energi selama 18 jam pertama dalam maturasi *in vitro*. Nutrisi yang paling signifikan untuk perkembangan embrio adalah karbohidrat dan asam amino. Keduanya tidak hanya berfungsi sebagai sumber energi, tetapi juga mempertahankan fungsi embrio dengan mencegah terjadinya stres akibat kondisi medium kultur *in vitro*.

LIU dan FOOTE (1995) yang menggunakan KSOM dengan suplementasi NEAA menghasilkan blastosist (37%) yang nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan suplementasi EAA (15%). Hasil tersebut hampir sama dibandingkan hasil penelitian ini yang memperoleh blastosist 38,5%. Selanjutnya dikemukakan bahwa bila digunakan *polyvinyl alcohol* (PVA) sebagai pengganti BSA, akan diperoleh blastosist 41%. Perbedaan hasil yang diperoleh mungkin disebabkan pada penelitian tersebut embrio dikultur dalam campuran gas 5% O₂, 5% CO₂ dan 90% N₂ di dalam inkubator bersuhu 39°C, sedangkan pada penelitian ini embrio dikultur di dalam inkubator 5% CO₂ bersuhu 39°C.

Kemungkinan sebagian embrio tidak dapat berkembang hingga *expanded blastocyst* karena adanya radikal bebas yang timbul selama dikultur *in vitro*. KIM *et al.* (1999) mengemukakan bahwa kerusakan gamet atau blastosist selama dikultur *in vitro* karena adanya *reactive oxygen species* (ROS). Penambahan glutathione 1 mM dalam medium fertilisasi dapat meningkatkan perolehan blastosist hingga 39,4% (167/424) pada hari ke 9, dan yang mengalami *hatched* blastosist 27,5% (46/167) pada hari ke-11. Glutathione mungkin meningkatkan penetrasi sperma ke oosit, sehingga dihasilkan blastosist yang nyata lebih tinggi ($p < 0,01$) dibandingkan kontrol (20,1%). Penggunaan campuran gas 5% O₂, 5% CO₂ dan 90% N₂ lebih menguntungkan embrio yang dikultur di dalam KSOM dibandingkan bila hanya dalam 5% CO₂ inkubator. HAMMERSTEDT *et al.* (1993) menyatakan bahwa timbulnya radikal bebas di dalam medium fertilisasi *in vitro* sering terjadi karena adanya oksigen radikal bebas hasil proses transpor elektron dari mitochondria yang ditandai dengan terjadinya reaksi peroksidasi lemak yang dapat mematikan spermatozoa. Penggunaan medium kultur di dalam inkubator 5% CO₂ dan kelembaban 90%, memungkinkan gamet dan embrio terkena oksigen dengan konsentrasi yang tinggi. ROS seperti halnya anion superoksida, radikal hidroksil dan hidrogen peroksida meningkat pada keadaan kultur *in vitro* tersebut (LIM *et al.*, 1996). Sementara itu LUVONI *et al.* (1996) melaporkan bahwa embrio sapi sensitif terhadap stress oksidatif dan bila pada medium kultur ditambahkan glutathione akan meningkatkan perkembangan embrio *in vitro*. Penambahan *antioxidant superoxide dismutase* (SOD) tidak mempengaruhi perkembangan oosit yang mengalami pembelahan

(cleavage) ataupun perkembangan hingga morula dan blastosist. Proporsi oosit yang mengalami pembelahan (84,5%) di dalam medium kultur SOF yang diberi 1 mM glutathione lebih baik ($P < 0,001$) dibandingkan yang tidak diberi glutathione (57,0%). Perkembangan morula/blastosist (33,3%) nyata lebih baik ($P < 0,005$) dibandingkan tanpa glutathione (13,9%). Pada penelitian ini, persentase pembelahan lebih rendah (75,6%) dibandingkan dengan yang diperoleh LUVONI *et al.* (1996), tetapi persentase blastosist hampir sama (38,5%). Kemungkinan perolehan *expanded blastocyst* yang hanya 5,1% dari 675 oosit yang diinseminasi pada penelitian ini karena tidak diberikan antioksidan primer seperti glutathione ke dalam medium KSOM untuk menekan radikal bebas yang mungkin timbul dalam kultur embrio *in vitro*. Pada penelitian ini digunakan 5% CO₂ dan bukan campuran gas 5% O₂, 5% CO₂ dan 90% N₂ yang lebih menguntungkan embrio yang dikultur di dalam medium KSOM. Penggunaan medium kultur CR1aa dalam penelitian ini lebih baik dibandingkan KSOM walaupun tanpa glutathione; karena medium CR1aa mengandung MEM dan BME, hemi Ca laktat, glutamin, Na piruvat dan BSA Fraction V yang cukup mendukung pertumbuhan embrio dibandingkan KSOM yang hanya mengandung MEM, BME, dan Na piruvat sebagai sumber energi.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil memproduksi embrio sapi *in vitro* dengan menggunakan CR1aa medium sebagai medium kultur yang nyata lebih sesuai dibandingkan KSOM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Proyek ARMP II yang telah membiayai penelitian ini dan kepada Prof. Dr. J. J Rutledge dari Department of Animal Science University of Wisconsin, USA sebagai supervisor dan fasilitator kerjasama penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BIGGERS, J. D. 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int.J Dev. Biol.* 42: 879-884. PMID:9853817 (PubMed – indexed for MEDLINE).
- BIGGERS, J. D., L. K. MCGINNIS and M. RAFFIN. 2000. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol. Reprod.* 63(1):281-93. PMID:10859270 (PubMed – indexed for MEDLINE).
- EDWARDS, J. L., A. D. EALY, V. H. MONTERROSO and P.J. HANSEN. 1997. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 48:25-33.
- FURNUS, C. C., D. G DE MATOS and A. G. MARTINEZ. 1998. Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 49:1489-1499.
- GANDOLFI, F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41:95-100.
- HAMMERSTEDT, R. H., A. D. KEITH, W. SNIPES, R. P. AMANN, D. ARRUDA and L. C. GRIEL. 1993. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity on sperm. *J.Biol.Reprod.* 18:686 – 696.
- HAN, Y. M., H. YAMASHINA, N. KOYAMA, K. K. LEE and Y. FUKUI. 1994. Effects of quality and development stage on the survival of FIV-derived bovine blastocyst cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology* 42:645-654.
- KESKINTEPE, L., C.A. BURNLEY and B. G. BRACKETT. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol. of Reprod.* 52:1410-1417.
- KIM, I. H., A. VAN LANGENDONCKT, A. VAN SOOM, G. VANROOSE, A. L. CASI, P. J. M HENDRIKSEN and M. M.BEVERS. 1999. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52:537-547.
- LIM, J. M., S. S. LIOU and W. HANSEL. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 43:429-439.
- LIU, Z and R. H. FOOTE. 1995. Effects of amino acids on development of *in vitro* matured *in vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Human Reprod.* 10(11):2985-2991. PMID:8747059 (PubMed – indexed for MEDLINE).
- LUVONI, G. C., L. KESKINTEPE and B. G. BRACKETT. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction and Development* 43: 437-443.
- MONSON, R., D. L. NORTHEY, R. GOTTFREDSON, D.R. PESCHEL, J. J. RUTLEDGE and D. M. SCHAEFER. 1992. Pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos following nonsurgical transfer. *Theriogenology* 37:261 (Abstract).
- PROKOFIEV, M. I., L. K. ERNST, N. M. SURAEVA, I. S. LAGUTINA, N. N. UDAVLENNIKOVA, A. Z. KESYAN and A. I. DOLGOHATSKIY. 1992. Bovine oocytes maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology* 38:461-469.
- ROSENKRANS JR., C. F., G. Q. ZENG, G. T. MCNAMARA, P. K. SCHOFF and N.L. FIRST. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction* 49: 459-462.

- ROSENKRANS JR., C. F and N. L. FIRST 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J Anim.Sci.* 72(2):434-437. PMID:8157527 (PubMed-indexed for MEDLINE).
- THOMPSON, J. G., N. W. ALLEN, L.T. MCGOWAN, A. C. SBELL, M.G .LAMBERT and H.R. TERVIT 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 49: 1239-1249.
- TRIWULANNINGSIH, E., M. R. TOELIHERE, T. L. YUSUF, B. PURWANTARA dan K. DIWYANTO. 2001a. Seleksi dan kapasitasi spermatozoa dengan metode *Percoll gradient* untuk fertilisasi oosit dan produksi embrio *in vitro* pada sapi (*unpublished*).
- TRIWULANNINGSIH, E., M. R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan K. DIWYANTO. 2001b. Peningkatan persentase blastosist melalui berbagai metode *feeding* serum dalam produksi embrio sapi *in vitro* (*unpublished*).
- TROUNSON A, D. PUSHETT, I. J. MACLELLAN, I. N. LEWIS and D. K. GARDNER. 1994. Current status of *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (FIV) and embryo culture in human and farm animal. *Theriogenology* 41:51-66.