

Efektivitas Manipulasi Berbagai Ko-Kultur Sel pada Sistem Inkubasi CO₂ 5% untuk Meningkatkan Produksi Embrio Sapi Secara *In Vitro*

FERRY LISMANTO SYAIFUL, ZESFIN BP., R. SALADIN, JASWANDI dan HENDRI

Fakultas Peternakan, Universitas Andalas Padang
Kampus Unand Limau Manis, Limau Manis, Padang

(Diterima dewan redaksi 12 Januari 2010)

ABSTRACT

SYAIFUL, F.L., ZESFIN BP., R. SALADIN, JASWANDI and HENDRI. 2010. The Manipulation effectivity of cell co-cultures in 5% CO₂ incubation system to increase *in vitro* cattle embryo production. *JITV* 15(1): 56-62.

The purpose of this research is to determine the effectivity of various cell co-cultures of cattle embryo production by *in vitro* CO₂ 5% incubation system and get the best cell co-culture. Cell co-culture which are used in the synthesis is the oviduct cells, isthmus cells, ampulla cells, follicle cells and without cells. Data were analyzed based on completely randomized design. The average growth rate/ cleavage in various cell culture was: the oviduct cell 59.24%, ampulla cell 58.69%, isthmus cell 58.25%, follicle cell 52.24% and without cells 47.76%. The average growth of 8-16 cells embryos to various cell co-culture was: the oviduct cell 46.02%, ampulla cell 45.45%, isthmus cell 45.15%, follicle cell 43.07%, and without cell 38.50%. The mean percentage of morula in various cell co-culture treatment was: the oviduct cell 20.59%, ampulla cell 20.48%, isthmus cell 20.30%, follicle cell 16.96% and without cell 12.58%. The average percentage of embryonic growth (*cleavage*, 8-16 cells and morula) was not significantly different ($P > 0.05$). The treatment of a variety of cell co-culture increased significantly ($P > 0.05$), blastocysts production, namely: the oviduct cell 3.28%, ampulla cell 3.22%, isthmus cell 3.08%, follicle cell 2.45% and without cell 1.97%. In conclusion, the treatment of various cell co-culture in 5%CO₂ incubation system can increase the growth of cattle embryos *in vitro*.

Key words: Cell Co-Culture, In Vitro Embryo, 5%CO₂ Incubation System, Cattle

ABSTRAK

SYAIFUL, F.L., ZESFIN BP., R. SALADIN, JASWANDI dan HENDRI. 2010. Efektivitas manipulasi berbagai ko-kultur sel pada sistem inkubasi CO₂ 5% untuk meningkatkan produksi embrio sapi secara *in vitro*. *JITV* 15(1): 56-62.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efektivitas berbagai ko-kultur sel terhadap produksi embrio sapi secara *in vitro* pada sistem inkubasi CO₂ 5% dan mendapatkan ko-kultur sel terbaik. Ko-kultur sel yang digunakan yaitu sel oviduk, sel isthmus, sel ampula, sel folikel dan tanpa sel. Data dianalisis menggunakan RAK. Dari hasil penelitian diperoleh rata-rata persentase tingkat perkembangan angka *cleavage* pada berbagai ko-kultur sel adalah: sel oviduk 59,24 %, sel ampula 58,69 %, sel isthmus 58,25%, sel folikel 52,24 % dan tanpa sel 47,76 %. Rata-rata persentase tingkat perkembangan embrio 8-16 sel terhadap berbagai ko-kultur sel yaitu sel oviduk 46,02 %, sel ampula 45,45%, sel isthmus 45,15%, sel folikel 43,07%, dan tanpa sel 38,50%. Untuk rata-rata persentase morula pada berbagai perlakuan ko-kultur sel yaitu sel oviduk 20,59%, sel ampula 20,48%, sel isthmus 20,30%, sel folikel 16,96% dan tanpa sel 12,58%. Secara analisis statistik rata-rata persentase perkembangan embrio (*cleavage*, 8-16 sel dan morula) menunjukkan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Sedangkan rata-rata persentase blastosis terhadap berbagai ko-kultur sel yaitu sel oviduk 3,28%, sel ampula 3,22%, sel isthmus 3,08%, sel folikel 2,45% dan tanpa sel 1,97%. Secara analisis statistik menunjukkan pengaruh nyata ($P > 0,05$), dimana perlakuan berbagai ko-kultur sel berbeda dibandingkan tanpa ko-kultur sel. Dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan berbagai ko-kultur sel pada sistem inkubasi CO₂ 5% dapat meningkatkan perkembangan embrio sapi secara *in vitro*.

Kata kunci : Ko-Kultur Sel, Embrio *In Vitro*, Sistem Inkubasi CO₂ 5%, Sapi

PENDAHULUAN

Seiring dengan semakin meningkatnya ilmu pengetahuan saat ini, berbagai terobosan baru dalam bidang peternakan mulai banyak dikembangkan. Diantaranya yang cukup memberikan peluang adalah pemanfaatan bioteknologi modern melalui peningkatan

daya reproduksi sapi yaitu teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV).

Teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) merupakan teknologi produksi embrio pada lingkungan buatan diluar tubuh dalam suatu sistem biakan sel, baik menggunakan oosit dari hewan yang masih hidup maupun dari oosit hewan yang dipotong sehingga teknologi ini dapat menjadi alternatif produksi embrio

dalam pelaksanaan transfer embrio. Disamping itu, teknologi FIV sangat bermanfaat dalam mengembangkan teknik manipulasi gamet dan embrio seperti produksi kloning melalui transfer inti (*nuclear transfer*), transgenik (*genes transfer*), kimera dan pantenogenik dengan jalan menyediakan embrio dalam jumlah banyak dan murah (GORDON, 1994).

Dalam pemanfaatan oosit hewan yang dipotong untuk perkembangan embrio pada teknologi fertilisasi *in vitro*, belum semua potensi embrio yang dikultur belum memberikan hasil yang memuaskan. Hasil penelitian JASWANDI (2004), menunjukkan bahwa kultur embrio dengan menggunakan Hepas, rata-rata persentase embrio yang mencapai tahap morula hanya 14,46%.

Belum optimalnya potensi embrio tersebut maka perlunya alternatif untuk meningkatkan produksi embrio *in vitro* melalui teknik ko-kultur sel. Menurut YUSUF (2003), monolayer sel epitel tuba fallopii/oviduk dapat digunakan sebagai ko-kultur perkembangan embrio *Macaca fascicularis*. Sel kumulus maupun sel epitel tuba fallopii dapat dipergunakan sebagai ko-kultur dalam media biakan embrio. Dari hasil penelitian ONDHO (1998), embrio domba yang di ko-kultur dengan sel oviduk pada sistem inkubasi CO₂ 5% mampu berkembang mencapai 38,66 - 42,66%. Namun demikian, penerapan ko-kultur sel ini belum diketahui efektifitas manipulasi berbagai ko-kultur sel pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% terhadap ternak sapi.

Penelitian ini bertujuan yaitu; (i) untuk mengetahui efektifitas manipulasi berbagai ko-kultur sel (sel oviduk, ampula, isthmus dan folikel) pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% terhadap embrio ternak sapi secara *in vitro* untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan embrio, (ii) untuk mendapatkan ko-kultur sel terbaik pada sistem inkubasi CO₂ 5% terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Oosit diperoleh dari ovarium sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) dan semen beku sapi Simmental. Sedangkan berbagai ko-kultur sel yang digunakan yaitu sel oviduk, sel isthmus, sel ampula, sel folikel dan tanpa sel. Bahan-bahan yang digunakan yaitu; *Phosphate Buffered Salline* (PBS; Nissui Jepang), Tissue Culture Medium-199 (TCM-199; Sigma, M-5017), FSH (Ovagen, Sigma), NaCl Fisiologis 0,9%, serum sapi 10%, gentamisin (Sigma, G-1397), mineral oil (M-8410, SIGMA), *Caffeine-sodium benzoat* (Sigma, C-4144) 5 mM, Streptomycin-Penicillin (P-3539, Sigma), Aceto orcein (Sigma, O-7380), *conjugated linoleic acid*, deionized water, medium TALP, alkohol, tissue, tripsin, CaCl₂, NaH₂PO₄, MgCl₂,

KCl, asam pyruvat, henol red dan glukosa. Sedangkan alat-alat yang digunakan yaitu; pipet pasteur, filter millipore 0,22 µm (Sigma), disposable syringe, tabung gas CO₂, laminar flow, mikroskop stereo, inkubator CO₂, timbangan analitik, termos, pipet eppendorf, pH meter, cawan petri berdiameter 60 mm dan 30 mm, objek glass, cover glass, aluminium foil, sentrifuge, refrigerator, bunsen dan oven.

Koleksi oosit

Oosit diperoleh dari ovarium sapi yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH). Ovarium dari RPH dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi media NaCl fisiologis 0,9% pada temperatur 30-35°C. Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara menyayat ovarium (*slicing*) dalam petridish yang berisi medium PBS yang disuplementasi dengan serum sapi 10% dan gentamisin 50 µg/ml, selanjutnya oosit hasil koleksi diamati di bawah mikroskop. Sedangkan oosit perlakuan yang digunakan adalah oosit kualitas A.

Maturasi oosit *in vitro*

Oosit kualitas A yang telah terseleksi lalu dicuci 3 kali dalam medium *Phosphate Buffered Saline* (PBS) lalu dilanjutkan dalam medium maturasi. Selanjutnya oosit dimatangkan dalam medium TCM-199 yang disuplementasi dengan FSH 10 µg/ml, *Calf serum* 10% dan gentamisin 50 µg/ml. Kemudian oosit yang telah dicuci dalam medium TCM-199 dimasukkan ke dalam 300 µl mikrodrip medium yang dibuat pada sebuah petridish. Prosedur maturasi/pematangan oosit menurut JASWANDI *et al.* (2003), dimana pada cawan petri oosit dimatangkan dalam mikrodrip (100 µl) dari masing-masing medium lalu mikrodrip ditutup dengan mineral oil (Sigma, M-8410), kemudian medium dalam cawan petri di pre-inkubasi selama 30 menit dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C. Selanjutnya untuk maturasi oosit dimasukkan 20-30 oosit ke dalam setiap mikrodrip lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C selama 24 jam.

Fertilisasi *in vitro*

Oosit yang telah matang lalu difertilisasi dengan sperma sesuai prosedur fertilisasi dilakukan JASWANDI *et al.* (2003), dimana sperma setelah thawing dimasukkan ke dalam tabung sentrius lalu ditambah dengan 6 ml medium TALP untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan dibuang dan diatas endapan dilapiskan 2 ml medium TALPS yang disuplementasi serum sapi 10% dan *caffeine-sodium benzoat* 5 mM (Sigma, C-4144) 5 mM lalu diinkubasi pada suhu 38,5°C selama 30 menit dalam inkubator. Bagian atas

medium kemudian diambil sebanyak 500 µl dan sperma yang terdapat di dalamnya diencerkan sampai konsentrasi 10×10^6 sperma/ml dengan medium medium TALP yang disuplementasi *caffeine-sodium benzoat* 5 mM (Sigma, C-4144), heparin 20 µg/ml, serum sapi 10% dan gentamisin 50 µg/ml.

Proses fertilisasi dilakukan dengan mencuci oosit terlebih dahulu sehingga hanya dikelilingi 1-2 lapis sel-sel kumulus, untuk memudahkan pencucian media ditambah dengan hyaluronidase (Sigma, USA) 1%. Kemudian siapkan lima buah mikrodrip dalam cawan petri lalu mikrodrip ditutup dengan mineral oil (Sigma, M-8410). Medium dalam cawan petri dipreinkubasi selama 30 menit dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C. Selanjutnya 20-30 oosit dan sperma kemudian dimasukkan ke dalam setiap mikrodrip lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C selama 17 jam.

Pembuatan sel line untuk ko-kultur

Untuk pembuatan sel line berbagai ko-kultur sel yang digunakan yaitu; (sel oviduk, ampula, isthmus, folikel dan tanpa sel). Adapun teknik pembuatan sel line ko-kultur sel tersebut yaitu; sel oviduk diperoleh dari bagian oviduk sapi yang dipotong. Isolasi sel oviduk dilakukan dengan menyayat secara horizontal oviduk lalu bagian lumen distriped dalam medium D-PBS yang mengandung tripsin 0.25 %. Sel sel yang diperoleh dihomogenisasi dengan magnetic stirrer, lalu disentrifugasi 2 kali. Endapan yang diperoleh diencerkan dengan medium TCM-199 sampai konsentrasi 1×10^9 sel/ml. Selanjutnya dikultur dengan prosedur yang sama dengan sel folikel untuk mendapatkan terbentuknya selapis sel line (*monolayer*) pada sel oviduk di dasar petridis. Sedangkan untuk perlakuan sel ampula dan sel isthmus diperoleh dari bagian sel oviduk utuh yang dipotong. Isolasi sel ini dilakukan dengan menyayat secara horizontal pada bagian-bagian sel oviduk utuh tersebut. Proses pembuatan ko-kultur kedua sel sama seperti pembuatan ko-kultur sel oviduk diatas. Berbeda pada perlakuan tanpa sel dilakukan secara konvensional (tanpa menggunakan sel line/monolayer untuk ko-kultur sel dalam perkembangan embrio). Sedangkan sel folikel yang digunakan untuk perlakuan ko-kultur diperoleh dari serpihan sel dinding folikel sewaktu *slicing* ovarium untuk koleksi oosit. Sel-sel ini dikultur dengan prosedur yang sama dengan pematangan oosit, sehingga pada dasar cawan petri akan terbentuk selapis sel line (*monolayer*).

Perlakuan ko-kultur sel

Oosit yang telah difertilisasi ditempatkan secara acak pada 5 (lima) perlakuan ko-kultur sel yaitu, ko-kultur sel oviduk, sel isthmus, sel ampula, sel folikel

dan tanpa sel. Setiap perlakuan terdiri dari 3 (tiga) ulangan dan masing-masing ulangan/unit perlakuan terdiri dari 20-30 oosit. Selanjutnya oosit dikultur bersama sel line (*monolayer*) lalu diinkubasi pada suhu 38,5°C dalam inkubator CO₂ 5% sampai hari ketujuh. Adapun medium kultur adalah TCM-199 yang disuplementasi dengan Hepes 30 mM, serum sapi 10%, dan gentamisin 50µg /ml. Medium kultur diganti setiap 48 jam (48, 96, 144 dan 192 jam) sambil mengamati perkembangan embrio (*cleavage*, 8-16 sel, morula dan blastosis).

Variabel yang diamati

Variable yang diamati yaitu; (i) angka *cleavage* yakni membandingkan jumlah embrio yang mencapai pada tahap *cleavage* dengan jumlah embrio yang dikultur. Sedangkan untuk (ii) angka 8-16 sel yaitu membandingkan jumlah embrio yang mencapai pada tahap 8-16 Sel dengan jumlah embrio yang dikultur. Kemudian untuk (iii) angka morula diperoleh dengan membandingkan jumlah embrio yang mencapai pada tahap morula dengan jumlah embrio yang dikultur. Selanjutnya (iv) angka blastosis yakni membandingkan jumlah embrio yang mencapai pada tahap blastosis dengan jumlah embrio yang dikultur.

Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Jika terdapat pengaruh yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) (STEEL dan TORRIE, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Angka Cleavage

Perkembangan embrio sapi pada berbagai ko-kultur sel secara *in vitro* terlihat pada Tabel 1. Sementara itu, perkembangan embrio yang mencapai *cleavage* pada berbagai ko-kultur sel dapat dilihat pada Gambar 1. Terlihat pada Tabel 1 bahwa persentase rata-rata angka *cleavage* yang tertinggi adalah ko-kultur sel oviduk (59,24%), sedangkan persentase rata-rata angka *cleavage* yang terendah adalah tanpa sel (47,76%). Secara analisis statistik, persentase angka *cleavage* pada berbagai ko-kultur sel menunjukkan tidak pengaruh nyata ($P > 0,05$). Hal ini disebabkan *cleavage* lebih dipengaruhi oleh proses sebelumnya seperti pematangan maupun fertilisasi. Menurut KAIIN *et al.* (2001), kondisi ovarium pada saat dikoleksi oosit berpengaruh terhadap jumlah embrio yang dapat

Tabel 1. Persentase perkembangan embrio sapi pada berbagai ko-kultur sel

Jenis sel	Persentase perkembangan embrio (%)			
	<i>Cleavage</i>	8-16 Sel	Morula	Blastosis
Sel oviduk	59,24 ^a ± 2,30	46,02 ^a ± 0,67	20,59 ^a ± 0,88	3,28 ^a ± 0,43
Sel ampula	58,69 ^a ± 3,38	45,45 ^a ± 2,52	20,48 ^a ± 2,40	3,22 ^{ab} ± 0,06
Sel isthmus	58,25 ^a ± 3,51	45,15 ^a ± 2,89	20,30 ^a ± 1,15	3,08 ^{ab} ± 0,32
Sel folikel	52,24 ^a ± 2,33	43,07 ^a ± 1,45	16,96 ^a ± 1,85	2,45 ^{ab} ± 0,06
Tanpa sel	47,76 ^a ± 1,45	38,50 ^a ± 1,20	12,58 ^a ± 1,76	1,97 ^b ± 0,49

Huruf berbeda pada kolom sama menunjukkan adanya pengaruh yang nyata (P<0,05)

Nilai dinyatakan dengan rata-rata ± standar error (SE)

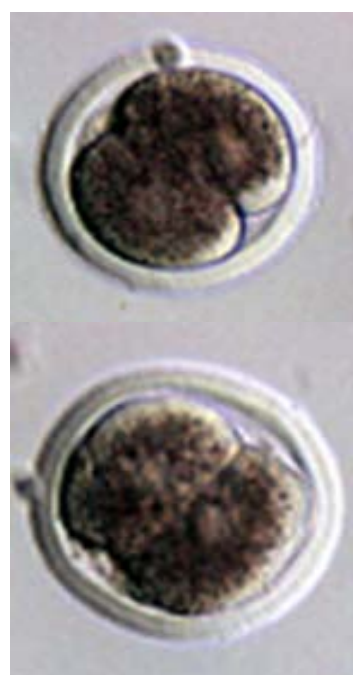
Nilai persentase perkembangan blastosis merupakan hasil transformasi $\sqrt{(y+1)}$ dinyatakan dengan rata-rata ± standar error(SE)

membelah (*cleavage*). KRISHER dan BAVISTER (1998) mengatakan bahwa perkembangan embrio sangat dipengaruhi oleh aktifitas dan proses pematangan. Hubungan fisiologis ini juga dikemukakan HYTTLE *et al.* (1997), struktur oosit menunjukkan bahwa selama pematangan pada bagian sitoplasma terjadi perkembangan secara terus menerus cadangan lipid oosit, pengurangan pada bagian golgi dan penjajaran butiran kortikal membentuk struktur dasar untuk menghambat polyspermia. Peningkatan secara gradual dari bagian lipid oosit selama kapasitas dan pematangan tersebut diduga sangat penting untuk memulai perkembangan fase embrionik. Lipid merupakan tempat penimbunan energi sama halnya dengan kuning telur pada ayam dan digunakan sampai tahap blastosis.

Pada penelitian ini, tingkat perkembangan embrio *cleavage* hampir sama dengan yang dilaporkan oleh DE SMETD *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa tingkat perkembangan embrio 2 sel (*cleavage*) dalam medium menenzo mencapai 58%. Ditambahkan oleh DODE *et al.* (2002), kultur embrio dengan system inkubasi dengan CO₂ 5%, yaitu 54,4%. LU *et al.*, (1992) melaporkan hasil penelitiannya tentang ko-kultur menggunakan sel granulose dari folikel sapi menggunakan medium CR1-aa mendapatkan angka *cleavage* sebesar 62-66% dengan menambahkan taurine, dalam media tersebut. Selanjutnya, BROWN dan RADZIEWIC (1992) menggunakan cairan folikel untuk kultur embrio mendapatkan angka *cleavage* yang hampir sama dengan tanpa cairan folikel. Hasil ini membuktikan zat aktif yang dihasilkan, sel folikel dapat membantu pertumbuhan atau tidak menekan pertumbuhan sel embrio.

Angka perkembangan embrio 8-16 sel

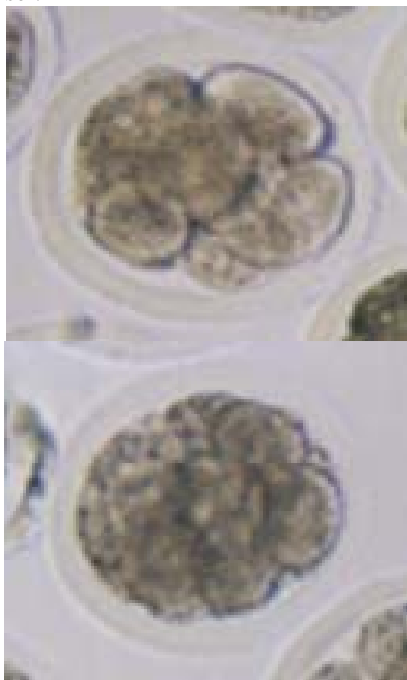
Perkembangan embrio setelah *cleavage*, berkembang mencapai tahap 8-16 sel setelah dikultur pada berbagai ko-kultur sel terlihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Perkembangan embrio *cleavage*

Terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 2 terlihat bahwa rata-rata persentase angka embrio 8-16 sel yang tertinggi adalah ko-kultur sel oviduk (46,02%), sedangkan persentase rata-rata angka 8-16 sel yang terendah adalah tanpa sel (38,50%). Secara analisis statistik menunjukkan bahwa embrio yang berkembang 8-16 sel menunjukkan tidak adanya pengaruh nyata (P>0,05). Hasil ini menunjukkan perubahan komposisi medium dengan penambahan sel kultur yang berbeda tidak memperlihatkan perbedaan nyata terhadap perkembangan embrio demikian juga tidak ada pengaruh berbagai ko-kultur sel dengan embrio. Dibandingkan dengan sistem kultur tanpa CO₂ 5% yang tidak menggunakan ko-kultur sel terlihat adanya peningkatan embrio yang berkembang sampai tahap 8-16 sel dengan menggunakan ko-kultur sel.

Menurut BOEDIONO *et al.* (2004), tingkat perkembangan embrio delapan sel pada sapi potong adalah 41%. Dengan demikian hasil yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ko-kultur pada produksi embrio dengan sistem inkubasi tanpa CO₂ 5% dapat memberikan hasil yang sama baiknya dengan produksi embrio menggunakan inkubasi dengan CO₂ 5%. Perkembangan embrio pada tahap 8-16 sel merupakan tahap yang paling krusial dalam produksi embrio secara *in vitro*, karena pada tahap ini embrio menghadapi hambatan perkembangan (*development block*). Beberapa laporan lain menunjukkan adanya dampak positif penambahan sel kultur untuk mengatasi hambatan tersebut. Menurut GORDON (1994) perkembangan embrio dini pada mamalia dikendalikan oleh protein dan *messenger ribonucleic acid* yang disimpan oosit. Transkripsi selama tahap *cleavage* menghasilkan baik secara kualitatif maupun kuantitatif perubahan sintesis protein. Pada sapi transkripsi ini terjadi akhir tahap 4 sel dan awal tahap 8 sel. Kegagalan transkripsi akan menyebabkan embrio mengalami hambatan perkembangan (*block development*) meskipun embrio tersebut terlihat masih hidup. POLLARD *et al.* (1991) menyatakan bahwa sel epitelial oviduk dapat menjadi mediator untuk melewati fase kritis perkembangan embrio dari 4-8 sel mencapai tahap 16 sel.



Gambar 2. Embrio 8-16 Sel

Angka Morula

Angka morula sebagai gambaran kemampuan embrio yang berkembang tahap 32 sel dapat dilihat

pada Gambar 3. Terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 3. diatas terlihat bahwa rata-rata persentase angka morula terhadap berbagai ko-kultur sel yaitu; sel oviduk 20,59%, sel ampula 20,48%, sel isthmus 20,30%, sel folikel 16,96% dan tanpa sel 12,58%. Sedangkan rata-rata persentase angka morula yang tertinggi adalah ko-kultur sel oviduk 20,59%, sedangkan persentase rata-rata angka morula yang terendah adalah tanpa sel (12,58%). Secara analisis statistik rata-rata persentase angka morula pada berbagai ko-kultur sel menunjukkan tidak pengaruh nyata ($P > 0,05$).

Bila dilihat rataan angka morula pada perlakuan berbagai ko-kultur sel (sel oviduk, ampula, isthmus dan folikel) relatif lebih tinggi dibandingkan tanpa sel yaitu lebih tinggi sekitar 4,38 – 8,01. Ditambahkan oleh TRIAKSANA dan BAGUS (2008), ko-kultur sel epitel tuba persentase embrio sapi Bali yang mencapai fase morula adalah 40 %. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan berbagai ko-kultur sel dapat meningkatkan efektifitas produksi embrio secara *in vitro* pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%. Hasil yang diperoleh juga memberi peluang untuk menghasilkan media yang mengandung zat tumbuh yang berasal dari sel kultur. Hasil ini menunjukkan efek menguntungkan dari penggunaan ko-kultur sel untuk produksi embrio. Peningkatan angka keberhasilan embrio yang berkembang mencapai tahap morula menunjukkan adanya kontribusi dari sel kultur oviduk terhadap perkembangan embrio terutama untuk melewati fase hambatan atau block perkembangan embrio pada tahap sebelumnya. Menurut HAFEZ (2000), sel oviduk memiliki lumen yang banyak mengandung substrat dan faktor penunjang pertumbuhan seperti piruvat, asam amino bebas, nukleotida steroid dan beberapa komponen lain.

Ditambahkan oleh GORDON (1994), ko-kultur merupakan satu alternative untuk memberikan lingkungan menyerupai kondisi *in vivo* secara terbatas disamping menyediakan faktor penumbuh (*embryothopic*) yang dapat membantu embrio melewati fase hambatan 4-16 sel serta menyediakan faktor penumbuh untuk perkembangan embrio tahap berikutnya. Dengan demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ko-kultur dapat meningkatkan perkembangan embrio tahap morula.

Angka blastosis

Angka blastosis pada berbagai perlakuan ko-kultur sel dapat dilihat pada tabel 1 dan Gambar 4

Terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 4. diatas terlihat bahwa rata-rata angka blastosis pada berbagai ko-kultur sel yaitu; sel oviduk 3,28%, sel ampula 3,22%, sel isthmus 3,08%, sel folikel 2,45% dan tanpa sel 1,97%. Sementara itu, rata-rata persentase angka blastosis yang tertinggi pada ko-kultur sel oviduk



Gambar 3. Embrio morula

(3,28%), sedangkan persentase rata-rata angka blastosis yang terendah adalah tanpa sel (1,97%). Secara analisis statistik rata-rata persentase angka blastosis pada berbagai ko-kultur sel menunjukkan berpengaruh nyata ($P > 0,05$). Dimana pada perlakuan tanpa ko-kultur sel berbeda dibandingkan perlakuan ko-kultur sel lainnya. Sedangkan pada perlakuan ko-kultur sel oviduk tidak berbeda dibandingkan perlakuan sel ampula, sel isthmus dan folikel tetapi berbeda dibandingkan pada perlakuan tanpa ko-kultur sel. Namun pada perlakuan tanpa ko-kultur sel tidak berbeda dibandingkan perlakuan ko-kultur sel ampula, sel isthmus dan folikel. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan ko-kultur sel efektif dan menguntungkan dalam meningkatkan kemampuan perkembangan embrio sapi sampai tahap blastosis. Selain itu hasil ini juga membuktikan bahwa potensi penumbuh yang dapat membantu perkembangan embrio yang dikultur. Menurut COLEMEN *et al.* (2007) ko-kultur merupakan satu alternative untuk memberikan lingkungan menyerupai kondisi *in vivo* secara terbatas disamping menyediakan faktor penumbuh (*embryothopic*) yang dapat membantu embrio. Menurut GANDOLFI *et al.* (1992), kultur sel dapat mengurangi faktor penghambat zat racun yang terdapat dalam medium atau dihasilkan oleh embrio.

Bila dilihat rata-rata angka blastosis yang didapat pada perlakuan berbagai ko-kultur sel relatif lebih tinggi dibandingkan tanpa sel yaitu lebih tinggi sekitar 0,48 – 1,31%. Pengaruh perlakuan berbagai ko-kultur sel menghasilkan angka blastosis yang tidak berbeda. Hasil ini sejalan dengan yang dilaporkan SHIRAZI dan MOALEMIAN (2006) bahwa sel kumulus yang berasal dari folikel memperlihatkan aktifitas steroidogenik untuk menghasilkan estradiol (E2) pada medium kultur tanpa keberadaan oosit atau secara bersama oosit. Pelepasan steroid dalam medium ini akan mempengaruhi proses metabolisme embrio termasuk mempengaruhi proses transkripsi. Ko-kultur embrio dengan sel granulosa yang dilakukan pada sistem inkubasi dengan CO₂

menunjukkan angka blastosis sekitar 29-35% (PALMA *et al.*, 1992). JIANG *et al.* (1991) melaporkan angka blastosis hasil ko-kultur sel dengan berbagai sel monolayer yaitu sebesar 13%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan berbagai ko-kultur sel baik dengan sel oviduk, ampula, isthmus atau sel folikel dapat meningkatkan efektifitas produksi embrio secara *in vitro* pada sistem inkubasi tanpa CO₂ 5%. Hasil yang diperoleh juga memberi peluang untuk menghasilkan media yang mengandung zat tumbuh yang berasal dari sel kultur.



Gambar 4. Blastosis

KESIMPULAN

Penggunaan media berbagai ko-kultur sel (sel oviduk, ampula, isthmus dan sel folikel) dapat meningkatkan kemampuan perkembangan embrio *in vitro*. Rata-rata persentase angka *cleavage* tidak berpengaruh nyata terhadap perlakuan berbagai ko-kultur sel yaitu; sel oviduk 59,24%, sel ampula 58,69%, sel isthmus 58,25%, sel folikel 52,24%, dan tanpa sel 47,76%. Rata-rata persentase angka embrio 8-16 sel pada berbagai ko-kultur sel yaitu sel oviduk 46,02%, sel ampula 45,45%, sel isthmus 45,15%, sel folikel 43,07% dan tanpa sel 38,50%. Rata-rata persentase angka morula pada berbagai ko-kultur sel yaitu sel oviduk 20,59%, sel ampula 20,48%, sel isthmus 20,30%, sel folikel 16,96% dan tanpa sel 12,58%. Sedangkan rata-rata persentase angka blastosis pada berbagai ko-kultur sel yaitu, sel oviduk 3,28%, sel ampula 3,22%, sel isthmus 3,08%, sel folikel 2,45% dan tanpa sel 1,97%.

Penggunaan berbagai ko-kultur sel tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan embrio secara *in vitro*. Ko-kultur berbagai sel (sel oviduk, ampula, isthmus dan sel folikel) pada sistem inkubasi

tanpa CO₂ 5% dapat meningkatkan perkembangan embrio *in vitro*.

Perlunya dilakukan penelitian lanjutan mengenai kandungan hormonal dan asam amino dari media berbagai ko-kultur sel tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- BOEDIONO, A., Y. RUSIYANTONO and R.A. GODKE. 2004. Comparison of hybreed and pure breed in vitro derived cattle embryos during in vitro culture. *Anim. Reprod Sci.* 78:1-11
- BROWN, B.W. and T. RADZIEWIC. 1998. Production of sheep embryos *in vitro* fertilization and development of progeny following single and twin embryos transfer. *Theriogenology*. 49: 1525-1537.
- COLEMEN, V.C., G.A. SHAGIAKHMETOVA, I.Y. LEBEDEVA, T.I. KUZMINA and A.K. GOLUBEV. 2007. In vitro maturation and early development capacity of bovine oocytes cultured in pured follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology* 68: 1053-1059.
- DE SMEDT, V., N. CROZET, M. AHMED-ALI, A. MARTINO and Y. COGNIE. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*. 37: 1049-1060.
- DODE, M.A.N., N.C. RODOVALHO, V.G. UENO and C.E. FERNANDES. 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time in vitro fertilization of bos indicus oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 15-23
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Biotechnology in Agricultural Series. CAB. Int.
- HAFEZ, B. and E. S.E. HAFEZ. 2000. Reproduction in Farm Animal. 7th Edition Lea Febiger.
- HYTTLE, P., T. FAIR, H. CALLESEN and T. GREEVE, 1997. Oocytes growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47: 23-3
- JIANG, H.S., W.L. WANG, K.H. LU, I. GORDON and C.P. OLGE. 1991. Roles of different cells monolayer in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*. 35: 16.
- KRISHER, R.I. and B.D. BAVISTER. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49: 103-114
- LU, S.S.; M.G. WADE and M.P. BOLAND. 1992. Effect of taurine dan granulose cells. In Modified Cr2 on Bovine Embryonic Development *In Vitro*. *Theriogenology* (Abstract). 47: 281.
- ONDHO, Y.S. 1998. Pengaruh Penambahan FSH, Estradiol-17 β dan Kultur Sel Tuba Fallopii ke Dalam TCM-199 Untuk Meningkatkan Pematangan Oosit dan Perkembangan Embrio Domba Dalam Program Fertilisasi *In Vitro*. *Disertasi*. Pascasarjana IPB. Bogor.
- POLLARD, J.W., J.M. SCODRAS, L. PLANTE, W.A. KING and K.J. BETTERIDGE. 1991. Definition of cleavage stages at which oviduct epithelial cellsenable bovine embryos to pass through the in vitro 8-16 cell block. *Theriogenology* (Abstract). 35: 256.
- SHIRAZI and Z. MOALEMIAN. 2006. Ovine cumulus cell estradiol-17 beta production in presence or absence of oocyte. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 125-133.