

Meningkatkan Produksi Embrio Sapi Bali Hasil Fertilisasi *In Vitro* melalui Rekayasa Sistem Kultur

Enhancement of Embryo Production of Bali Cattle by *In Vitro* Fertilization Through Cultivation Engineering System

Enny Yuliani¹, Sumadiasa IWL², Lukman HY², Muksin YD¹

¹Laboratorium Imunobiologi Universitas Mataram. Jl. Majapahit No. 62 Mataram

²Fakultas Peternakan Universitas Mataram. Jl. Majapahit No. 62 Mataram
ennyyuliani@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to compare yield of bovine embryos obtained from several number of culture conditions and culture systems. Ovaries were collected from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in PBS. Ovarian follicles (2-6 mm) were aspirated within 3 h of slaughter, using TCM-199 supplemented with 10% fetal calf serum. The oocytes were matured in TCM 199 under paraffin oil and incubated at 38°C in a humidified atmosphere in air for 24 to 26 hours. Follicular bovine cumulus oocyte complexes were matured *in vitro* and *in vitro* fertilization was carried out with the frozen semen of Bali cattle bull. Forty eight hours after *in vitro* fertilization. Under cell-free culture condition (modified Synthetic Oviduct Fluid/mSOF supplemented with 10% FCS) 48 h post fertilization, rate of development day 10 blastocysts of embryos cultured in small groups (1-5 per drop) was lower than that in large group (8 versus 25%; $P < 0.01$). There was no group effect when culture system allowing the progressive development of cumulus cells. This shows that somatic cells improve the development of single cultured bovine embryos up to the blastocyst stage; and cooperation between embryos could replace the effect of co-culture either on yield of blastocysts. Blastocysts appeared significantly earlier in mSOF than in co-culture with cumulus cell in TCM 199 and bovine oviduct epithelial cell (BOEC) in TCM 199 (detection of the blastocysts: 6.7 ± 0.2 d post insemination with mSOF versus 7.2 ± 0.2 d post insemination with cumulus cell and 7.5 ± 0.2 d post insemination in BOEC $P < 0.01$). Results show that there was improved cumulus cell development by incubating single oocyte than that of 5 or 10. Co culture media: SOF, cumulus cells and Bovine Oviduct Epithelial Cell (BOEC) in TCM 199 produced blastocyst by incubating oocyte for 6.7 ± 0.2 days, 7.2 ± 0.2 days and 7.5 ± 0.1 days following sperm insemination. It is concluded that development of cumulus cells improve by incubating less oocyte and co culture media SOF produce blastocyst earlier than that of cumulus cell and oviduct cells co culture.

Key Words: Co-culture, Synthetic Oviduct Fluid, Cumulus Cell, BOEC, Embryo, Bovine

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil embrio setelah dikultur dalam beberapa kondisi dan beberapa sistem kultur. Di bawah kondisi *cell-free culture* (modifikasi *Synthetic Oviduct Fluid*/mSOF dilengkapi dengan 10% FCS) 48 jam setelah inseminasi, setelah 10 hari inkubasi jumlah embrio pada tahap blastosis yang dikultur dalam kelompok kecil (1-5 per tetes) lebih rendah dibandingkan pada kelompok besar (8 dan 25%; $P < 0,01$). Tidak ada kelompok yang berpengaruh jika embrio dikultur pada sel kumulus. Dengan demikian diketahui bahwa sel somatik dapat memperbaiki perkembangan embrio sapi yang dikultur tunggal sampai pada tahap blastosis dan sistem kultur dengan biakkan embrio dalam jumlah tertentu dapat menggantikan pengaruh ko-kultur untuk menghasilkan embrio sampai tahap blastosis. Jumlah embrio tahap blastosis secara signifikan nampak lebih awal terbentuk dalam mSOF dibandingkan di dalam ko-kultur sel kumulus dalam TCM 199 dan sel tuba dalam media TCM 199 (deteksi blastosis: $6,7 \pm 0,2$ hari setelah inseminasi dalam mSOF, $7,2 \pm 0,2$ hari setelah inseminasi dengan sel kumulus dan $7,5 \pm 0,2$ hari setelah inseminasi tanpa ko-kultur; $P < 0,001$). Sistem ini dapat digunakan untuk mengkultur embrio dalam jumlah kecil, terutama embrio hasil dari pematangan *in vitro* dan fertilisasi dengan menggunakan oosit dari individu sapi donor.

Kata Kunci: Ko-kultur, *Synthetic Oviduct Fluid*, Sel Kumulus, Sel Tuba, Embrio, Sapi

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi produksi embrio secara *in vitro* pada beberapa laboratorium semakin disempurnakan. Banyak kendala yang dihadapi dalam proses kegiatannya, juga disadari bahwa produksi embrio hasil *in vitro* masih rendah. Salah satu ukuran keberhasilan suatu biakan embrio *in vitro* adalah ditinjau dari perkembangan kinetiknya dan embrio mengalami beberapa kali pembelahan sampai tercapai tahap blastosis. Pada perkembangan embrio secara *in vitro* selalu terdapat fenomena “*developmental block*” yang bersifat genetik dan umum terjadi pada beberapa spesies serta akan mengakibatkan embrio muda tidak dapat berkembang ke tahap lebih lanjut seperti morula atau blastosis (Eyeston & First 1992; Bavister 1996).

Developmental block yang terjadi pada perkembangan embrio akan merupakan suatu kerugian yang sangat bermakna, sehingga keberhasilan *fertilisasi in vitro* (FIV) menjadi sangat rendah (Swanson et al. 1996). Faktor yang dapat mempengaruhi perkembangan awal embrio, diantaranya adalah kurang keseimbangan komposisi media biakan untuk perkembangan embrio *in vitro* dan defisiensi pada media biakan konvensional dapat menyebabkan hambatan perkembangan embrio pada semua spesies hewan dibandingkan dengan perkembangan embrio *in vivo* (Natsuyama et al. 1994). Selanjutnya Parrish & First (1994) telah mengidentifikasi penyebab terjadinya *developmental block* terhadap perkembangan awal embrio mamalia *in vitro* disebabkan lingkungan perkembangan awal embrio yang tidak serasi dan adanya faktor spesifik oviduct.

Untuk menanggulangi hal tersebut beberapa sistem telah dikembangkan, diantaranya ko kultur menggunakan *cell-free systems*, *syntetic oviductal fluid* (SOF) yang dilengkapi *Bovine Serum Albumin* (Eyeston et al. 1990; Goto et al. 1994; Freeman et al. 1995; Donnay et al. 1997). Ko-kultur dengan bermacam-macam jenis sel somatik (sel epitel oviduct dan sel granulosa atau sel kumulus) yang dibiakan diketahui banyak mengandung faktor tumbuh seperti *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor β* /TGF β (Keefer et al. 1994; Watson et al. 1997), *Interleukins*, *Insulin-like growth factor* serta

protein ikatannya (Margawati 1995; Watson et al. 1997). Semua faktor tumbuh ini diduga diperlukan dalam perkembangan embrio dengan memberikan lingkungan yang optimum dan sebagai tempat persediaan nutrisi yang diperlukan untuk proses metabolisme dan diferensiasi sel.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian peran berbagai sistem ko kultur (SOF, sel kumulus dan sel tuba falopi) dan jumlah oosit terhadap perkembangan embrio sapi *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (*true eksperimental*) laboratorik. Rancangan penelitian yang diterapkan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Oosit dibiakkan dalam 3 kondisi yang berbeda yaitu (1) Secara individu, satu oosit per tetes (2) 5 oosit per tetes dan (3) 10 oosit per tetes pada 3 sistem ko kultur (SOF, sel kumulus dan sel tuba falopi), selanjutnya dilakukan observasi sampai mencapai tahap blastosis. Setiap perlakuan terdiri dari 10 kali ulangan.

Koleksi ovarium, aspirasi dan maturasi oosit ovarium yang berasal dari RPH dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis pada suhu 37°C. Oosit diaspirasi dengan menggunakan alat suntik plastik berukuran 10 ml yang dilengkapi dengan jarum suntik 18 G yang sudah diisi dengan 2 ml larutan pencuci oosit (*oosit washing solution*) yang mengandung TL HEPES (Sigma Co. USA) + gentamisin (Sigma Co. USA) + BSA fraction V (Sigma Co. USA). Setiap folikel yang berpenampang 2-5 mm diaspirasi melalui jaringan ovarium. Cairan folikel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disimpan dalam penangas air dengan suhu 37°C selama 10 menit sampai oosit mengendap. Setelah pencucian oosit diseleksi dengan menggunakan mikroskop stereo pembesaran 100x. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit yang mempunyai kumulus lengkap. Maturasi dilakukan dalam 100 µl TCM 199 yang dilengkapi dengan 10% serum sapi berahi berisi 10-12 oosit yang ditutup dengan *mineral oil* (Sigma) dalam cawan petri plastik berpenampang 36 mm *disposable* (Nunclon

Denmark). Pengeraman dilakukan selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 38,5°C kelembaban 95-99% (Thermolyne, USA). Kriteria yang digunakan untuk menentukan kematangan oosit adalah telah mencapai tahap metaphase II dan terbentuk polar bodi.

Preparasi Semen

Semen beku sapi Bali dalam kemasan mini straw mengandung rata-rata 25x10⁶/ml sel spermatozoa di *thawing* dengan air hangat 35-37°C selama 1 menit. Pencucian spermatozoa dilakukan dengan sentrifugasi 1.800 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali, pellet yang berada di dasar tabung sekitar 200 µl ditambahkan 3 ml media *Earle's balanced salt solution* (EBSS) secara perlahan pada bagian atasnya. Tabung diletakkan tegak lurus selama 30 menit pada suhu kamar di dalam *laminar flow*. Ambil 2/3 bagian atas medium yang mengandung spermatozoa motil. Kemudian semen diencerkan hingga konsentrasi 1, 2 juta/50 µl.

Fertilisasi *in vitro*

Bentukan *rosset* dibuat dalam petri steril dengan volume 100 µl media EBSS untuk tetes besar pada bagian tengah dan 25 µl untuk tetes kecil sebanyak 6 buah yang mengelilingi tetes besar. Masing-masing tetes kecil dihubungkan ke tetes besar dengan menggunakan ujung pipet. Selanjutnya *rosset* ditutup dengan minyak parafin dan diekuilibrasikan selama 2 jam sebelum spermatozoa dimasukkan.

Sebelum waktu 30 menit tercapai pada proses *swim up*, oosit yang telah didewasakan dicuci 2 kali dalam media pencuci oosit (OWS) dan sekali ke dalam media EBSS lalu dimasukkan ke dalam tetes media kecil *rosset*, masing-masing berisi 8-10 buah oosit. Proses fertilisasi dilakukan dengan cara memasukkan suspensi spermatozoa pada bagian tengah tetes sebanyak 50 µl. Observasi oosit yang telah dibuahi dilakukan setelah 24 jam fertilisasi, kemudian oosit tersebut dipindahkan ke dalam media biakan berupa biakan sel kumulus dan biakan sel tuba dalam media TCM 199 yang telah dilengkapi 10% *Fetal Calf Serum* (FCS). Untuk setiap ulangan secara acak oosit yang

telah difertilisasi ditempatkan pada 3 sistem ko-kultur dalam 3 kondisi yang berbeda: (1) Dibiakkan secara individu, satu oosit per tetes; (2) Dibiakkan sebanyak 5 oosit per tetes; dan (3) Sebanyak 10 oosit per tetes.

Pergantian media dilakukan setiap 72 jam, namun setiap 24 jam biakan sel digoyang perlahan. Suhu inkubator CO₂ tetap pada kisaran 37-38,5°C dengan kelembaban 95-99°C. Observasi berakhir setelah embrio pada tahap blastosis.

Biakan sel kumulus

Sel kumulus diperoleh dari reruntuhan pencucian akhir oosit di dalam media OWS yang disentrifugasi 2.500 rpm selama 15 menit. Pellet yang ada pada dasar tabung sekitar 100 µl ditambahkan 2.000 µl TCM, kemudian disentrifugasi lagi 2.000 rpm. Pellet yang tertinggal dibuat suspensi 10x10⁴sel/ml dalam TCM yang telah dilengkapi dengan 10% ECS, kemudian dibuat tetes mikro pada cawan petri 36 mm masing-masing sebanyak 50 µl. Selanjutnya ditutup dengan minyak parafin. Biakan ini disimpan dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 38,5°C selama waktu yang diperlukan untuk biakan embrio. Penggantian media baru sebanyak 50% dilakukan setiap hari.

Biakan sel tuba

Biakan sel tuba diperoleh dari tuba falopi yang sudah dipisahkan dari jaringan penggantungnya, kemudian salah satu ujungnya dilakukan pengikatan. Masukkan larutan tripsin 0,125% ke dalam lumen tuba, kemudian diikat pada bagian ujung. Setelah 15 menit diinkubasi, kedua ikatan tuba dilepaskan, selanjutnya *flushing* dengan menggunakan 2 ml larutan tripsin. Hasil *flushing* ditampung dalam tabung steril kemudian dicuci dengan TCM 199 yang dilengkapi 10% FCS. Pellet yang dihasilkan diresuspensi dengan TCM 199 dengan perbandingan 1:400.

Analisis data.

Untuk mengetahui perkembangan embrio (persentase blastosis dan kecepatan perkembangan embrio) dalam berbagai sistem

kultur dan jumlah embrio per tetes yang berbeda, data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis dengan menggunakan ANOVA pada taraf nyata 5% dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase blastosis dalam berbagai sistem kultur dan jumlah embrio per tetes yang berbeda terangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa oosit yang dikultur dalam kondisi *cell-free culture* (mSOF yang dilengkapi dengan 10% FCS 48 jam setelah inseminasi) pada kelompok kecil (1-5 embrio per tetes) menghasilkan embrio tahap blastosis yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok besar (8:25%; $P < 0,01$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat peningkatan perkembangan embrio sampai tahap blastosis sejalan dengan rasio peningkatan jumlah embrio dan volume medium. Pengaruh ini secara umum menunjukkan bahwa adanya sekresi embrio preimplantasi yang mengandung faktor mitogenik berperan dalam *autocrine-paracrine*, disamping itu diduga ada faktor atau mekanisme lain yang berpengaruh. Didukung oleh tinjauan Simmen et al. (1993), terdapat keterikatan kerjasama yang rumit dan kompleks telah terjadi di antara embrio preimplantasi. *Autocrine* dan *paracrine* merupakan wujud dari aksi *Insuline-like growth factors* (IGFs) yang mengatur dalam lingkungan mikro uterus oleh reseptor IGF-I dan IGF binding protein yang dipecah pada pengontrol lokal dalam uterus dan konseptus. IGF-I dan IGF-II memiliki derajat asam amino yang tinggi homolog dengan insulin (Heyner et al. 1993). Insulin dan IGFs terikat pada sel reseptor dan aksinya sebagai *receptor-mediated*. Reseptor spesifik mengikat IGF-I dan IGF-II dalam *inner cell mass* (ICM) dan *trophectoderm* blastosis (Mattson et al. 1998).

Pengaruh IGF-I telah diteliti dari perkembangan embrio sapi secara *in vitro* (Herrier et al. 1992). Aplikasi potensial dari faktor penumbuh peptida khususnya IGF dapat memperbaiki viabilitas embrio, “menyelamatkan” embrio yang lemah, mensinkronkan lingkungan uterus induk untuk dapat menerima embrio, menambah daya hidup embrio dan menambah angka kebuntingan dan efisiensi reproduksi (Pope et al. 1990). Selanjutnya Hadley (1984) melaporkan bahwa IGF-I berperan sebagai faktor mitogenik, sehingga IGF-1 dalam proses *compensatory growth* embrio pascamanipulasi dapat membantu proses metagenesis pada ICM maupun *trofoblast* serta kualitas ICM sangat bermanfaat untuk pertumbuhan pascatransfer sedangkan trofoblas sangat berperan pada saat implantasi dan pembentukan plasenta.

Tabel 2 menunjukkan bahwa tidak ada kelompok yang berpengaruh ($P > 0,05$), baik embrio yang dikultur dalam jumlah kecil maupun embrio yang dikultur dalam kelompok besar, jika embrio dikultur pada sel kumulus dan sel tuba dalam TCM 199. Medium sel granulosa mempunyai kelengkapan *embriotropic*. Sel granulosa menghasilkan jaringan inhibitor *metalloproteinases* (TIMP-1) sama dengan TGF-beta yang dapat meningkatkan perkembangan embrio *in vitro* (Mulheron & Schomberg 1992; Satoh et al. 1994). Dalam medium biakan terdapat kombinasi sekresi faktor-faktor yang bertanggung jawab terhadap pengaruh positif terhadap embrio yang dikultur dalam kelompok atau dalam sel somatik.

TGF secara struktur analog dengan *epidermal growth factor* (EGF). Kelompok TGF ada dalam sel *theca* sapi dan mempunyai tempat dalam lapisan sel *theca* selama pertumbuhan folikel (Lobb & Dorrington 1992). TGF mempunyai kemampuan untuk merangsang kecepatan pengembangan *blastocoel* sapi (Dardik & Schuktz 1991).

Tabel 1. Persentase blastosis dalam sistem kultur yang berbeda dan jumlah embrio per tetes yang berbeda

Sistem kultur	Jumlah embrio per tetes		
	1	5	10
SOF	0/10 (0) ^a	4/50 (8) ^a	25/100 (25) ^b
Sel kumulus	3/10 (30)	15/50 (30)	33/100 (33)
Sel tuba	2/10 (20)	14/50 (28)	35/100(35)

Tabel 2. Variasi deteksi blastosis (jumlah rata-rata hari setelah inseminasi \pm SEM) dengan jumlah embrio per tetes dan sistem kultur

Sistem kultur	Jumlah embrio per tetes			
	1	5	10	Total
SOF	0	6,7 \pm 0,3	6,7 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2 ^a
Sel kumulus	7,4 \pm 0,2	7,3 \pm 0,2	7,1 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2 ^b
Sel tuba	7,9 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	7,5 \pm 0,2 ^b

Nilai dengan superskrip yang berbeda dalam kolom dan baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0,01$)

Penambahan TGF dapat meningkatkan perkembangan embrio sampai tingkat blastosis jika embrio dikultur tunggal, namun jika embrio dikultur dalam kelompok TGF tidak mempengaruhi perkembangan blastosis, *hatching* atau jumlah sel embrio sapi (Keefer et al. 1994).

Kebutuhan ko-kultur untuk mendukung perkembangan secara individu embrio sapi menjadi blastosis telah ditunjukkan dalam penelitian ini. Pengaruh nyata ko-kultur terhadap perkembangan embrio, seperti yang direfleksikan nampak lebih awal jumlah sel blastosis pada embrio yang dikultur dengan menggunakan sel kumulus. Hal ini dapat dihubungkan pada kebutuhan kompleks dan spesifik embrio pada tahap awal perkembangan, khususnya pada saat diferensiasi inisiasi sel menjadi morula kompak. Secara *in vivo*, yaitu pada awal preimplantasi embrio dalam oviduct zigote telah mencapai tahap 9-16 sel, namun pada embrio preimplantasi akhir dalam uterus embrio telah mencapai tahap 9-16 sel. Pada tahap tersebut sangat tergantung pada faktor lingkungan yang kompleks. Kondisi inipun tercermin dalam media biakan *in vitro*, saat ini sangat diperlukan media kultur yang lebih kompleks (Lesse 1995). Terbukti dari penelitian Gardner et al. (1994) bahwa pembelahan embrio lebih lambat apabila embrio domba dikultur secara tunggal dalam mSOF yg dilengkapi dengan asam amino. Ko-kultur dengan sel somatik dapat mempengaruhi perkembangan embrio sapi tunggal dalam 2 cara: (1) Dapat memperbaiki angka perkembangan dari tahap 9-16 sel sampai tahap blastosis dan (2) Dapat meningkatkan pertumbuhan ukuran embrio sejak tahap 5-8 sel.

Waltson et al. (1997), embrio sapi preimplantasi menghasilkan faktor-faktor potensi *embriotropic* yaitu *platelet-activating factor* (PAF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *Insuline-like growth factor I* dan II (IGF-I dan IGF-II), *transforming growth factor alpha* (TGF-alpha), TGF-beta dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Keberadaan reseptor untuk faktor-faktor ini, seperti reseptor *leukemia inhibiting factor* (LIF) juga dideteksi dalam embrio sapi berpengaruh pada faktor embriotropic.

Faktor penumbuh telah ada dalam awal perkembangan embrio di dalam saluran reproduksi. Telah diketahui bahwa sekresi uterus (*histotrophe*) untuk mengatur kelengkapan, implantasi, nutrisi dan pertumbuhan konseptus (Biggers 1998; Roberts & Bazer 1999). Selanjutnya diungkap bahwa lingkungan uterus dengan kapasitas sebagai sumber nutrisi dapat menyediakan faktor penumbuh dan protein secara teratur pada pertumbuhan kritis dan kelangsungan hidup konseptus preimplantasi. Seperti tinjauan Brigstock et al. (1999) keterlibatan peptida dan polipeptida faktor penumbuh menjadi suatu kenyataan yang mengontrol proliferasi sel dan diferensiasi fungsional sel embrio preimplantasi (Heyner et al. 1993). Secara fisiologis peran faktor penumbuh telah dipertimbangkan oleh Gospodarowics & Moran (1976) sebagai pengaturan perkembangan normal sehingga dapat mempertahankan homeostasis, pemeliharaan dan regenerasi.

Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa faktor penumbuh dapat berfungsi sebagai mitogen dalam satu keadaan dan dapat meningkatkan diferensiasi sel yang lainnya. Faktor penumbuh dapat mengatur ekspresi gen dalam sel target. Pada awalnya terjadi aksi

faktor penumbuh sebagai ikatan reseptor spesifik dalam sel embrional (Mercola & Stiles 1988; Heyner et al. 1993). Hal ini akan meningkatkan afinitas reseptor yang terentang pada bagian luar sel membran. Secara umum, reseptor adalah *tyrosine-specific* protein kinase (Mercola & Stiles 1988). Selanjutnya dikatakan ikatan faktor penumbuh oleh reseptor menjadi pecah/larut, *messengers* kedua ini kemungkinan phosphoprotein, inositol phosphat, *diacylglycerol*, *cyclic nucleotida*, ion-ion monovalent atau divalent. Dalam beberapa menit, setelah pembentukan *growth factor-receptor complex*, perubahan dalam ekspresi gen dapat dideteksi dengan adanya kumpulan gen yang secara cepat melintas batas jaringan sebagai respon pada faktor penumbuh.

Variasi deteksi blastosis setelah inseminasi pada sistem kultur dan jumlah embrio per tetes yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2. Jumlah embrio tahap blastosis nampak secara signifikan ($P < 0,01$) lebih awal terbentuk dalam mSOF dibandingkan dengan di dalam ko-kultur sel kumulus dalam TCM 199 dan sel tuba dalam TCM 199 (deteksi blastosis: $6,7 \pm 0,2$ hari setelah inseminasi dalam mSOF; $7,2 \pm 0,2$ hari setelah inseminasi pada sel kumulus dan $7,5 \pm 0,1$ hari setelah inseminasi pada sel tuba).

Blastosis nampak lebih awal, jika embrio dikultur dengan sel kumulus dalam TCM 199 dibandingkan dalam sel tuba dalam TCM 199. Rorie et al. (1994), menyatakan bahwa sejak perkembangan embrio dalam medium sederhana menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dikultur dalam medium lengkap. Keuntungan yang diperoleh dari medium sederhana, seperti mSOF dan sistem ko-kultur dengan suplementasi yang memadai dapat menyediakan kebutuhan viabilitas sel somatik.

KESIMPULAN

Oosit yang dikultur dalam kondisi *cell-free culture* (mSOF yang dilengkapi dengan 10 % FCS 48 jam setelah inseminasi) pada kelompok kecil (1-5 embrio per tetes) menghasilkan embrio tahap blastosis (8%) yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok besar (25%). Embrio yang dikultur dalam jumlah kecil maupun embrio yang dikultur dalam kelompok besar dalam sel kumulus dan sel tuba tidak

menunjukkan perbedaan persentase blastosis yang nyata. Ko-kultur dapat meningkatkan perkembangan embrio sampai tingkat blastosis jika embrio dikultur tunggal, namun jika embrio dikultur dalam kelompok, ko-kultur tidak mempengaruhi perkembangan blastosis sapi. Ko-kultur dapat memperbaiki perkembangan embrio sapi yang dikultur tunggal sampai pada tahap blastosis dan sistem kultur pada biakkan embrio dalam jumlah tertentu dapat menggantikan pengaruh ko-kultur untuk menghasilkan embrio sampai tahap blastosis. Jumlah embrio tahap blastosis nampak secara nyata lebih awal terbentuk dalam mSOF yaitu $6,7 \pm 0,2$ hari setelah inkubasi, sedangkan di dalam sel kumulus dan sel tuba adalah $7,2 \pm 0,2$ hari dan $7,5 \pm 0,1$ hari setelah inkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bavister BD. 1996. Culture of preimplantation embryo. Fact and artifacts. J Human Reprod. Up date 1:91-148.
- Biggers J. 1998. Introductory remark on the milieu of the egg and the early embryo. J Reprod Fertility 82:809-811.
- Brigstock DR, Heap RB, Brown KD. 1999. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. J Reprod Fertility. 85:747-758.
- Dardik A, Schultz. RM. 1991. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo; stimulatory effect of TGF alfa and EGF. Development. 113:919-930.
- Donnay I, Van A, Langendonck P, Auquier B, Grisart, Vansteenbrugge A, Massip, Dessy F. 1997. Effect of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. J Theriogenol. 47:1549-1561.
- Eyeston WH, Jones JM, First NL. 1990. The use of oviduct conditioned medium for culture of bovine oocyte to blastocyst stage. J Theriogenol. 33:226.
- Eyeston WH, First NL. 1992. A study of the 8 to 16 cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. J Theriogenol. 25:152.
- Freeman MR, Whitworth CM, Hill GA. 1995. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. J Hum Reprod. 10:408-414.

- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the *blastocyst* stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cell: amino acids, vitamins, and culturing embryos in group stimulate development. *J Biol Reprod.* 50:390-400.
- Gospodarowics D, Moran JS. 1976. Growth factors in mammalian cell culture. *Ann. Review Biochem.* 45:531-558.
- Goto K, Iwai N, Ide K, Takema Y, Nakanishi Y. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: Comparison of cell-free culture with co-culture. *J Reprod Fertility.* 100:239-243.
- Hadley ME. 1984. *Endocrinology*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey (USA): Englewood cliffs.
- Herrier A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Effects of insuline-like growth factor-1 on *in vitro* production of bovine embryos. *J Theriogenol.* 37:1231-1224.
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ, Schultz GA. 1993. The role of growth factors in embryo production. *J Theriogenol.* 39:151-161.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM. 1994. Effect of follicle stimulating hormon and luteinizing hormone during bovine *in vitro* maturation on development following *in vitro* fertilization and nuclear transfer, *J Mol Reprod Dev.* 36:469-474.
- Lesse H. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *J Hum Reprod.* 1:63-72.
- Lobb DK, Dorrington J. 1992. Intraovarian regulation of follicle development. *J Animal Reprod Sci.* 28:343-354.
- Margawati ET. 1995. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on bovine embryo development *in vitro* [Thesis]. [New Zealand (Selandia Baru)]: Master of Agricultural Science in Animal Science at Massey University New Zealand.
- Matson BA, Rosenblum IY, Smith RM, Heyner S. 1998. Autoradiographic evidence for insuline-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diabetes* 37:585-589.
- Mercola M, Stiles CD. 1988. Growth factors superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102:451-456.
- Mulheron GW, Schomberg DW. 1992. Effect of diethylstilbestrol on rat granulosa cell and thecal/interstitial cell transforming growth factor-beta 2 mRNA expression *in vivo*: analysis by reversed transcription-polymerase chain reaction. *J Biol Reprod.* 46:546-550.
- Natsuyama S, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. 1994. Release of two-cell block by reduction of protein disulfide with thioredoxin from *escherichia coli* in mice. *J Reprod Fertility.* 95:649-656.
- Parrish JJ, First N.L. 1994. Fertilization. In: King GJ (Ed). *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. pp 195-227.
- Pope WF, Xie, Broermann SDM, Nephew KP. 1990. Cause and consequences of early embryonic diversity in pigs. *J Reprod Fertility.* supplement 40:251-260.
- Roberts RM, Bazer FW. 1999. The function of uterine secretion. *J Reprod Fertility.* 82:387-397.
- Rorie RW, Xu KP, Betteridge KJ. 1994. Effect of culture on the post-thaw viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenol.* 33:311
- Simmen RCM, Ko Y, Simmen FA. 1993. Insuline-like growth factors and blastocyst development. *J Theriogenol.* 39:163-175.
- Satoh T, Kobayashi K, Yamadhita S, Kikuchi M, Sendai Y, Hoshi H. 1994. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances *in vitro* development of bovine embryo. *J Biol. Reprod.* 50:835-844
- Steel RGD, Torrie JH. 1989. *Prinsip dan prosedur statistik. suatu pendekatan biometrik*. Jakarta (Indonesia): PT Gramedia. 168-205.
- Swanson WF, Roth TL, Godke RA. 1996. Persistence of developmental block of *in vitro* fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. *J Mol Reprod Development.* 3:297-305.
- atson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA. 1997 Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *J Mol Reprod Development.* 31:87-95