

THE EFFECTIVENESS OF USING COCULTURES OF FALLOPIAN TUBE
EPITHELIAL AND CUMULUS CELLS IN TCM-199 ON IN VITRO
BOVINE EMBRYOS DEVELOPMENT

(Efektivitas penggunaan kokultur sel-sel epitel tuba Fallopii dan kumulus
dalam TCM-199 terhadap perkembangan embrio sapi *in vitro*)

H E N D R I

Department of Animal Production, Faculty of Animal Husbandry, Andalas University, Padang -
West Sumatera, Indonesia (Phone : +62-751-6274208, Fax. : +62-751-71464).

ABSTRACT

This research was designed to determine the effectiveness of using cocultures of Fallopian tube epithelial and cumulus cells in Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) on *in vitro* bovine embryos development.

Oocytes were collected by aspiration method from ovaries obtained from the slaughter house. Oocytes were classified into three grades (A, B and C/D) according to their qualities and only oocytes of A and B qualities (COCs, cumulus oocyte complexes) that matured in TCM-199 supplemented with 20 percents of seven days after estrous heifer serum (SH₇), at 38.5°C, 5.0% CO₂ in humidified air for 22 to 24 hours. Oocytes were then fertilized *in vitro* with capacitated spermatozoa from fresh semen. After six to eight hours of culturing, the presumptive zygotes or the fertilized oocytes were transferred and cultured into 100 µl drop of *in vitro* culture media treatment for development of embryos that called the control medium (TCM-199 + 20% SH₇), comparing it to the ones cultured in coculture media of Fallopian tube epithelial and cumulus cells. These embryos were then incubated for 4 x 48 hours, evaluated and its culture medium was changed with a fresh one every 48 hours. Data from this experiment was transformed by $\sqrt{x+0,5}$ and analyzed by one way clasification test.

Result from this experiment indicate that the coculture systems of Fallopian tube epithelial cells and of cumulus cells do not improve the morula rate.

PENDAHULUAN

Teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) berpotensi meningkatkan daya reproduksi sapi betina, baik semasa maupun setelah habis masa produksinya (dipotong di Rumah Potong Hewan = RPH). Dengan teknik tersebut, ovarium sapi di RPH dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan embrio pada berbagai taraf perkembangan. Produksi embrio sapi *in vitro* dalam jumlah besar merupakan landasan utama bagi pengembangan bioteknologi reproduksi ternak sapi seperti teknik *cloning/splitting* untuk memproduksi anak-anak sapi kembar identik dan pengembangan penelitian-penelitian dasar dan terapan lainnya.

Kendala utama dalam pengembangan teknik FIV tercermin dari produksi embrio melalui teknik tersebut yang masih rendah dan bervariasi. Upaya untuk meningkatkan produksi embrio di laboratorium dapat dilakukan melalui perbaikan teknik pematangan oosit *in vitro* (Hendri, 1995), melalui perbaikan teknik kapasitas spermatozoa *in vitro* (Hendri *et al.*, 1999) dan dengan menambahkan 10% serum sapi yang diambil pada hari ke-7 setelah estrus (SH-7) ke dalam medium pematangan oosit *in vitro* dan medium kultur embrio *in vitro* (Hendri, 1999). Berdasarkan teknik tersebut di atas, pada saat ini dapat dihasilkan angka pematangan oosit *in vitro* 78,5% , angka *cleavage* 50%, angka embrio 8-16 sel 72% dan angka morula 28% (Hendri, 1999).

Harapan untuk lebih meningkatkan potensi perkembangan embrio 2-4 sel menjadi embrio taraf morula/blastosis secara *in vitro* dapat dilakukan dengan mengkultur embrio taraf dini tersebut di dalam medium yang mengandung kultur sel granulosa (sel-sel kumulus) dan kultur sel epitel tuba Fallopii. Medium kultur embrio *in vitro* tersebut dikenal juga dengan istilah kokultur. Menurut Wiemer *et al.* (1991) kokultur selapis sel-sel granulosa dan kokultur selapis sel-sel epitel

tuba Fallopii dapat menunjang perkembangan embrio *in vitro* dengan baik selama 72 jam. Ditambahkan bahwa kokultur sel-sel epitel tuba Fallopii mensekresikan faktor-faktor embriotropik di dalam sistem kokultur tersebut. Oosit yang telah difertilisasi, dikokultur selama 7-9 hari dengan kultur sel granulosa, dapat menghasilkan angka blastosis 15% (Goto *et al.*, 1988), menghasilkan angka morula sebesar 54% (Thibodeaux *et al.*, 1992). Zhang *et al* (1992) dan Gordon (1994) menyatakan pula bahwa penggunaan kokultur sel-sel granulosa sangat bermanfaat untuk perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro*. Para peneliti tersebut di atas umumnya menyatakan bahwa penggunaan sistem kokultur sel-sel granulosa lebih menguntungkan karena mudah dan murah untuk dilakukan, efisien, dan tingkat keberhasilannya sama atau lebih tinggi dibandingkan dengan sistem kokultur sel-sel lainnya.

Berdasarkan keterangan yang dirangkum di atas perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan produksi embrio sapi taraf morula/blastosis dengan mengkultur embrio taraf dini (embrio 2-4 sel) di dalam medium kokultur sel-sel granulosa dan sel-sel epitel tuba Fallopii sapi. Diharapkan hasil penelitian ini dapat mempertinggi keberhasilan perkembangan embrio sapi *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh penggunaan medium kokultur sel epitel tuba Fallopii dan kokultur sel-sel granulosa terhadap perkembangan embrio *in vitro* (angka embrio 8-16 sel, angka morula dan angka blastosis).

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan kontribusi positif terhadap pengembangan dan penerapan teknik produksi embrio di laboratorium (fertilisasi *in vitro*) guna meningkatkan reproduktivitas dan produktivitas ternak sapi di Indonesia.

TINJAUAN PUSTAKA

Kultur Embrio *In Vitro*

Dalam kondisi *in vivo*, tuba Fallopii sapi menyediakan lingkungan yang baik untuk transportasi dan kapasitas spermatozoa, transportasi dan fertilisasi oosit. Beberapa peneliti melaporkan bahwa tuba Fallopii mensekresikan berbagai zat yang membantu perkembangan embrio, yang produksi dan fluktuasinya dipengaruhi oleh siklus estrus. Lumen tuba Fallopii yang banyak mengandung lipid bermanfaat terhadap proses fertilisasi dan perkembangan embrio taraf dini, terutama melalui perubahan integritas membran dan penyediaan sumber energi (Killian *et al.*, 1989; Henault and Killian, 1993a,b). Sintesis lipid tersebut umumnya terjadi di bagian ampula selama fase folikuler dari siklus estrus.

Viuff *et al.* (1994) menyatakan bahwa tuba Fallopii juga mensekresikan berbagai protein dan faktor penumbuh. Protein yang disintesis dan disekresikan oleh sel-sel tuba Fallopii tersebut pertama kali teramati di dalam tuba Fallopii pada fase estrus (hari pertama siklus estrus), dan masih dijumpai selama tiga sampai empat hari berikutnya (Gerena dan Killian, 1988). Boice *et al.* (1990a,b) juga menyatakan bahwa sel sel epitel tuba Fallopii mensintesis dan melepaskan glikoprotein khusus ke dalam lumennya pada fase estrus.

Dalam kondisi *in vitro*, perkembangan embrio yang tidak normal atau embrio memiliki viabilitas yang rendah dapat disebabkan oleh kualitas medium yang kurang memadai atau disebabkan karena ketidaksempurnaan pematangan oosit *in vitro* (Trounson, 1992). Kualitas medium yang kurang memadai menyebabkan timbulnya hambatan perkembangan embrio pada taraf delapan sel. Hambatan perkembangan embrio pada taraf tersebut sebenarnya disebabkan karena adanya gangguan/transisi transkripsi protein dan *messenger ribonucleic acid*

(mRNA) di dalam embrio itu sendiri. Transkripsi selama fase *cleavage* awal menghasilkan perubahan sintesis protein secara kualitatif dan kuantitatif, yang mencerminkan adanya transisi transkripsi protein dan mRNA dari pengaruh induk ke embrio (Petters, 1992 dan Gordon, 1994). Faktor-faktor seperti jenis medium, suplementasi serum, substrat energi, sistem inkubasi (seperti suhu, fase gas di dalam inkubator, pH, osmolaritas media, kualitas air dan lain-lain) dan penggunaan kokultur sel-sel epitel tuba Fallopii dan kumulus turut mempengaruhi keberhasilan perkembangan embrio *in vitro* (Gordon, 1994).

Pengaruh Kokultur Sel-Sel Somatik

Menurut Bavister (1993) dengan menerapkan kontrol kualitas yang tepat dalam pembuatan medium dan dengan mengeliminasi atau memodifikasi beberapa komponen biokimia dalam medium maka penggunaan sistem kokultur mungkin tidak menghasilkan manfaat yang berarti. Senada dengan itu Gandolfi *et al.* (1988) menyatakan bahwa sel-sel tuba Fallopii (saluran telur) dalam sistem kultur selapis cepat mengalami dediferensiasi, melekat pada permukaan tempat kultur, tidak mempunyai karakteristik bentuk kolumnar dan silia serta mengalami pembelahan sel yang teratur yang jarang terjadi pada kondisi *in vivo*. Perubahan-perubahan tersebut menyebabkan sel-sel saluran telur kehilangan pengaruh steroidogenik disebabkan reseptornya tidak aktif atau hilang sama sekali. Dengan alasan tersebut kokultur selapis sel-sel epitel tuba Fallopii mungkin tidak dapat menciptakan keadaan lingkungan seperti di dalam tuba Fallopii sapi *in vivo*. Namun demikian sebagian besar peneliti mempublikasikan bahwa kokultur embrio taraf dini dengan sel-sel somatik (terutama sel-sel epitel tuba Fallopii atau sel-sel granulosa/kumulus) dapat meningkatkan perkembangan embrio menjadi taraf morula/blastosis (Wiemer *et al.*, 1991; Goto *et al.*, 1988; Thibodeaux *et al.*,

1992; Zhang *et al.*, 1992 dan Gordon, 1994).

Sel-sel epitel tuba Fallopii sapi dapat diambil dengan cara membilas saluran telur sapi yang masih hidup, atau dengan mengambil tuba Fallopii sapi yang dipotong di RPH kemudian diperlakukan dengan tripsin (Thibodeaux *et al.*, 1992). Menurut McCaffrey *et al.* (1990) tidak ada perbedaan pengaruh sel-sel epitel tuba Fallopii yang dibilas sehari sebelum estrus (fase proestrus) dengan yang diambil dua hari setelah estrus terhadap perkembangan embrio *in vitro*. Thibodeaux *et al.* (1991, 1992) menyatakan pula bahwa tidak ada perbedaan pengaruh sel-sel epitel tuba Fallopii yang diambil pada fase luteal awal dengan yang diambil pada fase luteal akhir.

Wiemer *et al.* (1991) menyatakan bahwa laju perkembangan embrio yang dikultur tidak hanya berhubungan dengan umur kokultur selapis sel-sel epitel tuba Fallopii tetapi juga tingkat aktivitas biologik di dalam kokultur sel selapis. Lebih lanjut dinyatakan bahwa kokultur sel-sel granulosa dan sel-sel epitel tuba Fallopii hanya mampu menunjang perkembangan embrio dengan baik selama 72 jam, dan penurunan laju perkembangan embrio setelah waktu tersebut mungkin disebabkan oleh penurunan aktivitas sel setelah pembentukan kokultur selapis. Ditambahkannya bahwa kemampuan sel-sel epitel tuba Fallopii untuk memelihara kondisi diferensiasi dan untuk mensekresikan faktor-faktor embriotropiknya menjadi hilang setelah beberapa waktu di dalam kultur.

Oosit yang telah difertilisasi dikokultur selama tujuh sampai sembilan hari di dalam kultur sel selapis yang ditumbuhkan dari sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dapat menghasilkan angka blastosis 15% (Goto *et al.*, 1988). Menurut Zhang *et al.* (1992) dan Gordon (1994) penggunaan kokultur sel-sel kumulus diikuti dengan penurunan konsentrasi oksigen menjadi 5,0% atau 10%, penam-

bahan EDTA 0,1 mM dan peningkatan konsentrasi FBS atau serum sapi estrus menjadi 20% dalam sistem kultur secara bersamaan sangat bermanfaat untuk perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro*. Penggunaan sistem kokultur sel kumulus menguntungkan karena mudah dilakukan, efisien, dan tingkat keberhasilannya sama atau lebih baik dibandingkan dengan sistem kultur atau kokultur lainnya. Penggunaan sistem kokultur ini lebih murah, sebab sel kumulus dapat diperoleh bersamaan dengan pengambilan oosit dari ovarium sapi untuk dimatangkan dan difertilisasi *in vitro*.

Menurut Zhang *et al.* (1992) bila hanya menggunakan sel kumulus sebagai sistem kokultur embrio, biasanya separoh atau kurang dari morula akan berkembang menjadi blastosis. Penyebab penurunan perkembangan dari morula ke blastosis ini tidaklah jelas. Mungkin komponen-komponen lain seperti faktor penumbuh yang diperlukan dalam sistem *in vitro* tidak tersedia atau tersedia dalam konsentrasi yang tidak memadai bagi embrio selama inkubasi dengan sel-sel kumulus sapi. Hal lain yang penting adalah kemungkinan peningkatan tingkat sisa metabolik yang bersifat toksik, yang dihasilkan oleh sistem kokultur selapis sel kumulus, dapat mengganggu perkembangan embrionik selama waktu inkubasi berikutnya. Oleh karena itu Zhang *et al.* (1992) menyarankan untuk menambahkan sel-sel kumulus segar ke dalam sistem kokultur dengan interval 48 jam inkubasi, bila melakukan penggantian media kultur. Dengan cara tersebut diharapkan faktor penumbuh yang tidak jelas tersebut cukup tersedia untuk meningkatkan jumlah embrio yang berkembang menjadi blastosis. Thibodeaux *et al.* (1992) berhasil mengembangkan sel embrio sapi sampai tahap morula sebanyak 54% dengan penambahan sel kumulus, dibandingkan hanya 32% pada kontrol.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi dan AI Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang dan di Laboratorium Jurusan Reproduksi dan Kebidanan FKH IPB, selama 5 bulan.

Materi Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- (1) Oosit berkualitas A dan B sebanyak 240 buah yang diaspirasi dari ovaria sapi lokal yang dipotong di RPH.
- (2) Semen segar yang ditampung dari sapi pejantan Frisian Holstein (FH).
- (3) Serum sapi FH dara yang diambil pada hari ketujuh setelah hari estrus (SH₇) dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) (F 3018, SIGMA).
- (4) Kultur sel epitel tuba Fallopii dan kultur sel granulosa/kumulus.
- (5) Air yang telah di-deionisasi dan di-destilasi.
- (6) Serbuk *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS) (11500-022, GIBCO BRL), serbuk *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199) (31100-027, GIBCO BRL), *Bovine Serum Albumin Fraction V* (BSA) (A 3311, SIGMA) dan bahan-bahan kimia untuk membuat medium Brackett-Oliphant (BO). Rataan tekanan osmotik berbagai media berkisar antara 276-296 mOsm/kg H₂O.

Sedangkan peralatan yang digunakan adalah sebagai berikut :

- (1) Mikroskop diseksi, Nikon SMZ10.
- (2) Mikroskop inverted, Olympus CK-2, AB Technology 060 26-2226 yang dimodifikasi menjadi trinokuler (memakai kamera Canon A 11).
- (3) Sentrifuge Hettich EBA 35, kecepatan maksimum 6.000 rpm.

- (4) pH meter HORIBA F-14 sistem digital.
- (5) Osmometer, Advanced Wide-Range Osmometer 3W2.
- (6) Oven untuk sterilisasi kering, bertemperatur maksimum 220⁰C.
- (7) Akuadestilator dengan mantel pemanas, sistem vertikal, kapasitas 1,0 l/jam.
- (8) Inkubator Imperial (Lab-line), temperatur 0-70⁰C.
- (9) Gaspak (Oxoid Anaerobik Jar, BR38), volume 3,5 l, dilengkapi flowmeter.
- (10) Tabung gas CO₂ murni, kapasitas 30 kg dilengkapi flowmeter dan filter Sartorius Midistart 2000, ukuran 0,22 μ m, berdiameter 5,0 cm.
- (11) Cawan petri Corning sekali pakai berdiameter 60 mm dan 30 mm.

Metode Penelitian

Ovarium ditransportasikan dari RPH ke laboratorium di dalam larutan NaCl 0,9% yang mengandung penisilin 100 IU/ml dan streptomisin 0,1 mg/ml pada temperatur 37⁰C dalam waktu 3-5 jam setelah sapi dipotong. Oosit diaspirasi dari folikel berdiameter 2-6 mm pada ovaria sapi.

Satu periode kerja dikumpulkan paling kurang 36-40 oosit kualitas A dan B (dari 5 pasang ovarium). Penelitian ini dilakukan selama 8 periode kerja.

Aspirasi oosit menggunakan siringe 10 ml dengan jarum 21 G yang berisi 3,0 ml medium aspirasi oosit (D-PBS yang mengandung 3,0% FBS, penisilin 100 IU/ml dan streptomisin 0,1 mg/ml).

Seleksi oosit berkualitas A dan B menggunakan mikroskop diseksi yang didasarkan pada penilaian morfologik secara visual, terutama didasarkan pada kriteria keutuhan dan kuantitas sel-sel kumulus yang menyelimuti oosit, kehomogenan ooplasma dan performans korona radiata disekitar zona pellusida (Loos *et al.*, 1989 dan Gordon, 1994).

- Oosit kualitas A : adalah kompleks oosit-kumulus yang memiliki multi lapisan sel kumulus yang utuh, ooplasma homogen dan korona radiatanya terlihat lebih gelap. Secara keseluruhan oosit kualitas A ini terlihat terang dan transparan.
- Oosit kualitas B : adalah kompleks oosit-kumulus yang memiliki lapisan sel-sel kumulus yang kurang utuh (kurang dari 70% permukaan oosit yang diselimuti sel-sel kumulus), performans ooplasma yang kurang homogen atau agak kasar dan korona radiata yang tidak jelas. Secara keseluruhan oosit kualitas B terlihat lebih gelap dan kurang transparan.
- Oosit kualitas C/D : adalah oosit yang sel-sel kumulusnya telah terlepas (gundul) atau oosit masih dikelilingi oleh sel-sel kumulus tetapi sel-sel kumulusnya telah mengembang (berdegenerasi), diselimuti fibrin dan menjadi pignotis (telah mati).

Oosit kualitas A dan B hasil aspirasi dipindahkan secara acak menggunakan pipet Pasteur ke dalam tetes-tetes medium pematangan oosit *in vitro* (10 sampai 20 oosit/tetes 100 μ l), diinkubasi di dalam inkubator pada temperatur 38,5°C, 5,0% CO₂ dalam udara dan kelembaban nisbi 90-100% selama 22-24 jam. Hanya oosit kualitas A dan B yang dimatangkan *in vitro*. Medium pematangan oosit *in vitro* adalah TCM-199 yang di-suplementasi dengan 20% SH-7. Tingkat kematangan oosit dievaluasi secara morfologik menggunakan mikroskop diseksi, berdasarkan kriteria kelonggaran sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dan korona radiata menurut Chye (1986).

Setelah dimatangkan *in vitro*, 10 sampai 15 oosit tersebut (di dalam tetes 50 μ l medium BO yang mengandung heparin 20 μ g/ml, BSA 2,0% dan ditutup

dengan minyak mineral) di-inseminasi dengan 50 μ l larutan spermatozoa yang berasal dari semen segar (dengan konsentrasi $8-10 \times 10^6$ sel/ml medium BO yang mengandung 10 mM caffeine). Penyiapan spermatozoa untuk fertilisasi menggunakan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 1 500 rpm selama 10 menit (0,125 ml semen segar dalam 6-8 ml medium pencuci spermatozoa). Larutan spermatozoa yang mengandung oosit matang tersebut diinkubasi selama 6-8 jam.

Evaluasi keberhasilan fertilisasi *in vitro* didasarkan pada kriteria morfologik yaitu jumlah zigot yang berhasil membelah (*cleavage*) menjadi embrio 2-4 sel. Evaluasi perkembangan embrio *in vitro* diamati setiap periode 48 jam berikutnya menggunakan mikroskop inverted, sedangkan penggantian medium kultur embrio dengan medium yang segar menggunakan mikroskop diseksi.

Selanjutnya oosit yang telah difertilisasi (zigot) tersebut dikultur dengan salah satu dari tiga perlakuan medium kultur embrio *in vitro* sebagai berikut :

- A = medium TCM-199 yang mengandung SH γ 20% (kontrol).
- B = medium kontrol yang mengandung selapis kultur sel epitel tuba Fallopii.
- C = medium kontrol yang mengandung selapis kultur sel kumulus.

Evaluasi perkembangan embrio dilakukan berdasarkan perkembangan blastomer di dalam embrio.

Parameter Penelitian

Parameter penelitian adalah persentase angka perkembangan embrio *in vitro* yang diamati dengan interval 48 jam semenjak awal inseminasi, yaitu :

- Angka fertilisasi *in vitro* (angka *cleavage*/angka embrio 2-4 sel).
- Angka embrio 8-16 sel.
- Angka morula/blastosis.

Analisa Statistik

Data ditransformasi dengan $\sqrt{(x+0,5)}$ dan dianalisis menggunakan Analisis Klasifikasi Satu Arah dalam Rancangan Acak Lengkap menurut Steel and Torrie (1981). Tiga perlakuan dengan delapan periode kerja sebagai ulangan. Uji lanjut menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa angka morula di dalam medium kontrol (18,23%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan medium kokultur sel epitel tuba Fallopii (8,50%) dan kokultur sel kumulus (0,00%). Sedangkan perkembangan embrio pada taraf awal (angka *cleavage* dan angka embrio 8-16 sel) di dalam medium kokultur sel epitel tuba Fallopii dan kokultur sel kumulus tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan medium kontrol (Tabel 1). Hasil penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian Shamsuddin *et al.* (1993) yang menyatakan bahwa penggunaan medium kokultur sel epitel tuba Fallopii atau kokultur sel kumulus tidak berbeda nyata dibandingkan dengan medium kontrol (TCM-199 + 10% ECS).

Penggunaan medium kokultur sel sel epitel tuba Fallopii dan kumulus di dalam penelitian ini ternyata tidak mampu meningkatkan angka morula. Hasil ini diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : (1) Pengaruh fase siklus estrus pada saat pengambilan sel sel epitel tuba Fallopii, (2) Pengaruh perubahan karakteristik dan morfologi sel sel epitel tuba Fallopii ke sistem *in vitro* (yang mengalami dedifferensiasi lebih cepat, tidak mempunyai karakteristik bentuk kolumnar dan silia serta mengalami pembelahan sel yang teratur yang jarang terjadi pada kondisi *in vivo*) yang menyebabkan sel-sel tersebut kehilangan

pengaruh steroidogenik karena reseptornya tidak aktif atau hilang sama sekali, (3) Pengaruh penurunan lingkak aktivitas biologik sel setelah pembentukan kultur selapis di mana kultur sel-sel granulosa dan sel-sel epitel tuba Fallopii hanya mampu menunjang perkembangan embrio dengan baik selama 72 jam, (4) Embrio tidak sensitif terhadap pengaruh sel epitel tuba Fallopii sampai embrio tersebut mencapai taraf perkembangan 8-16 sel.

Tabel 1. Persentase angka perkembangan embrio yang dikokultur dengan sel-sel epitel tuba Fallopii dan sel-sel kumulus
The percentage of development rate of embryos co-cultured with Fallopian tube epithelial cells and cumulus cells

Jenis sel kokultur (Type of co-culture cells)	Jumlah oosit matang (Number of matured oocytes)	Angka perkembangan embrio (Embryo development rates)		
		cleavage 2-4 cells, (48 hrs)	Embryos 8-16 cells, (96 hrs)	Morula, (144 hrs)
Kontrol (Control)	(67)	(39) 58,49 ^a	(13) 34,38 ^a	(7) 18,23 ^a
Sel epitel tuba Fallopii (Fallopian tube epithelial cells)	(69)	(45) 68,46 ^a	(12) 28,76 ^a	(3) 8,50 ^b
Sel kumulus (Cumulus cells)	(76)	(39) 54,80 ^a	(5) 14,10 ^a	(0) 0,00 ^b

Angka di dalam () menunjukkan jumlah oosit atau embrio.

Huruf yang berbeda di lain kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Faktor-faktor lain yang berpengaruh negatif terhadap hasil penelitian ini adalah kualitas air, endotoksin dan sistem inkubator yang digunakan. Keefer *et al.* (1991) melaporkan tidak ada embrio yang berkembang menjadi taraf blastosis di dalam medium yang menggunakan air yang dideionisasi dan didestilasi seperti

yang digunakan di dalam penelitian ini, dibandingkan dengan air yang dihasilkan dari sistem ultra filtrasi (Milli-Q). Penyiapan air dan medium dengan metode konvensional (pemanasan atau filtrasi) tidak dapat menghilangkan fragmen endotoksin yang berasal dari lipid yang aktif secara biologik yang berasal dari membran bakteri Gram-negatif setelah bakteri tersebut mati. Sedangkan tipe inkubator yang digunakan dapat mempengaruhi komposisi gas yang dibutuhkan dalam sistem penginkubasian. Konsentrasi oksigen yang tinggi (sekitar 20%) di dalam medium kultur embrio dapat melepaskan superoksida radikal, sebagai *oxidative stress*, yang menimbulkan pengaruh menghambat perkembangan embrio taraf awal terutama di dalam medium yang mengandung glukosa.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menggunakan peralatan yang relatif terbatas ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan kultur sel epitel tuba Fallopii dan kultur sel kumulus ternyata tidak dapat meningkatkan kemampuan perkembangan embrio *in vitro* menjadi morula.

Saran

Untuk meningkatkan kemampuan perkembangan embrio *in vitro* menjadi morula/blastosis dalam penelitian selanjutnya perlu diperhatikan penggunaan kualitas air yang lebih tinggi (kandungan endotoksin yang rendah) dan sistem inkubator dan peralatan lainnya yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bavister, B. D., T. A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Boice, M. L., R. D. Geisert, R. M. Blair and H. G. Verhage, 1990a. Characterization of secretory glycoproteins synthesized by the bovine oviduct at oestrus. *Biol. Reprod.*, 42 (Suppl. 1):128-129.
- _____, 1990b. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at oestrus. *Biol. Reprod.*, 43:457-465.
- Chye, N. S. 1986. *Laboratory Manual for In Vitro Fertilization*. National University of Singapura.
- Gandolfi, F., T. A. L. Brevini and D. M. Blakeley. 1988. Detection of an oviduct mitogenic factor in the sheep. *J. Reprod. Fertil., Abstr. Series No. 1*, 63 (Abs.).
- Gerena, R. L. and G. J. Killian. 1988. Estrus-associated 98 k Dalton protein in bovine oviductal fluid (ODF). *Biol. Reprod.*, 35(Suppl. 1), 246 (Abs.).
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Biotechnology in Agriculture Series. CAB International.
- Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi, and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation *in vitro* and their transfer to the cow uterus. *Theriogenology*, 29:251 (abstr).
- Henault, M. A. and G. J. Killian. 1993a. Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. *J. Reprod. Fertil.*, 98:431-438.
- _____. 1993b. Neutral lipid droplets in bovine oviductal epithelial and lipid composition of epithelial cell homogenates. *J. Dairy Sci.*, 76:691-700.
- Hendri, 1995. Efisiensi Teknik Pematangan Oosit dalam Program Fertilisasi *In Vitro* pada Sapi. Laporan Hasil Penelitian, LP UNAND, Padang.
- Hendri, 1999. Penambahan berbagai jenis serum pada medium TCM-199 untuk produksi embrio sapi melalui teknik fertilisasi *in vitro*. *J. Peternakan dan Lingkungan*, Vol. 5 No. 03 (Oktober).
- Hendri, Jaswandi dan M. Mundana. 1999. Pengaruh pembekuan spermatozoa, penambahan caffeine dan heparin dalam media Brackett-Oliphant terhadap angka fertilisasi *in vitro* pada sapi. *J. Penelitian Andalas*, No. 29 (Mei) Tahun XI: 34-47.

- Keefe, C. L., S. L. Stice and M. Maki-Laurila. 1991. Bovine embryo development *in vitro* : Effect of *in vitro* maturation conditions on fertilization and blastocyst development. *Theriogenology*, 35:223.
- Killian, G. J., D. A. Chapman, J. F. Kavanaugh, D. R. Deaver and H. B. Wiggin. 1989. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 86:419-426.
- Loos, de F., C. van Vliet, P. van Maurik and Th. A. M. Kruip. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24:197-204.
- Petters, R. M. 1992. Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 28 : 415 - 421.
- Shamsuddin, M. , B. Larsson, H. Gustafsson and H. Rodriguez-Martinez. 1993. *In Vitro* Development up to hatching of bovine *in vitro*-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology*, 39:1067-1079.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1981. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2nd Ed. McGraw-Hill International Book Company.
- Thibodeaux, J. K., L. L. Goodeaux, J. D. Roussel, G. F. Amborski, J. D. Moreau and R. A. Godke. 1991. Stages of the bovine estrous cycle and *in vitro* characteristics of uterine and oviductal epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, 74(Suppl. 1):295 (Abs. So8).
- , 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 oviduct epithelial cells originating from different stages of estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75:1448-1455.
- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:125-137.
- Viuff, D., P. Hyttel and S. Alexandersen. 1994. Expression and localization of growth factor mRNA in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 41:328.
- Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. L. McKenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Zhang, L., R. S. Denniston and R. A. Godke. 1992. A simple method for *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and co-culture of bovine oocytes. Manuscript, unpublished.