

Perbandingan Angka Fertilitas dan Hambatan Perkembangan Embrio Mencit yang Dikultur dalam Medium M16 dan *Human Tubal Fluid*

(THE COMPARISON OF MICE FERTILITY RATE AND EMBRYONIC DEVELOPMENT CELL BLOCK WHEN CULTURED IN M16 AND HUMAN TUBAL FLUID MEDIA)

Widjiati¹, Sri Endah Pusporini¹, M. Zainal Arifin²

¹Departemen Anatomi Veteriner, ²Departemen Klinik Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya
Tlp. 0315992785, Fax. 0315993015
Email :widjiati@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan penggunaan Medium 16 (M 16) dan medium Human Tubal Fluid (HTF) terhadap tingkat fertilitas dan hambatan perkembangan embrio mencit. Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina strain Balb C umur dua bulan yang disuperovulasi dengan menggunakan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG), kemudian dikawinkan dengan mencit jantan vasektomi. Setelah 17 jam mencit dikorbakan nyawanya kemudian dilakukan panen sel telur dengan cara merobek kantong fertilisasi. Sel telur kemudian dicuci, selanjutnya dilakukan fertilisasi *in vitro* dengan sperma yang dikoleksi dari *cauda epididymis*. Sel telur yang sudah ditambahkan spermatozoa kemudian diinkubasi dalam incubator CO₂ 5 % 37°C. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan persentase angka fertilisasi pada medium M16 98,09% dan pada medium HTF 99,57%. Perkembangan embrio untuk melewati *cell block* medium M16 85,09 % dan medium HTF 83,36 %. Simpulan dari penelitian ini bahwa tidak terdapat perbedaan penggunaan medium M16 dan medium HTF terhadap angka fertilisasi dan mengatasi hambatan perkembangan (*cell block*). Kedua medium tersebut mempunyai komposisi dasar yang relatif sama

Kata-kata kunci : medium M16, medium HTF, angka fertilisasi, *cell block*

ABSTRACT

The aim of this research was to compare the fertility rate and embryonic development cell block of mice when cultured in M16 and Human Tubal Fluid (HTF) media, respectively. Two months old female BalbC mice were super ovulated using *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) and *Human Chorionic Gonadotrophin* (HCG) prior to mating with vasectomies mice. At 17 hours post mating the mice was sacrificed for the collections of egg cells and spermatozoa. Egg cells were collected by tearing the fertilization sac, while the sperm were collected from caudal epididymis. After the collection, both the egg cells and sperm were put in Petri dish containing M16 and HTF media and kept in 5% CO₂ incubator at 37°C for one hour prior to the *in vitro* fertilization (IVF) was performed. *In vitro* fertilization was performed in 5% CO₂ incubator at 37°C and kept for 24 hours in M16 and in HTF culture media. The results showed that fertilization rate was 98.09% and 99.57%; cell block embryonic development was 85.09% and 83.36% when cultured in M16 and HTF media, respectively. In conclusion, HTF media can be used for culturing mouse embryo.

Key word: M16 media, HTF media, fertilization rate, cell block

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan bioteknologi pada saat ini sejalan dengan tingkat kebutuhan manusia di berbagai bidang pertanian, perikanan, peternakan, pengobatan, dan kesehatan. Menurut Gordon (1994) salah satu penggunaan bioteknologi dalam bidang peternakan, guna meningkatkan produksi peternakan meliputi : (1) teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan, transfer embrio, kriopreservasi embrio, fertilisasi *in vitro* (FIV), *sexing* sperma maupun *cloning* embrio dan *splitting*, (2) rekayasa genetika, (3) peningkatan efisiensi dan kualitas pakan, dan (4) bioteknologi yang berkaitan dengan bidang veteriner lainnya.

Teknologi reproduksi yang telah banyak dikembangkan adalah transfer embrio berupa teknik *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET) untuk menghasilkan anak (embrio) yang banyak dalam satu siklus reproduksi. Untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*, metode bioteknologi yang sering terlibat dalam pelaksanaan transfer embrio adalah FIV dan pembekuan embrio (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Beberapa embrio seperti embrio kelinci, mencit, manusia, babi, sapi, dan domba telah berhasil diproduksi melalui FIV (Hafez, 2000).

Dalam proses FIV banyak faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilannya. Menurut Sukra *et al.*, (1993) faktor-faktor tersebut antara lain maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa, dan kondisi fisiologis medium kultur. Untuk mengatasi faktor-faktor tersebut yang harus dipahami adalah pemahaman pada prinsip-prinsip dasar tentang maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa, dan pertumbuhan embrio dalam medium kultur.

Selama FIV, embrio ditempatkan di dalam medium kultur buatan yang mengandung zat-zat nutrisi yang dibutuhkan pada setiap perkembangannya. Komposisi zat-zat nutrisi dalam medium kultur dibuat mendekati komposisi nutrisi, elektrolit, dan makromolekul yang ada di dalam saluran reproduksi betina. Pada dasarnya medium kultur dibuat berdasarkan kebutuhan nutrisi maupun lingkungan yang optimal untuk menjamin kelangsungan hidup (*viabilitas*) embrio serta dapat berkembang secara *in vitro*. Menurut Rijnders (1996) unsur-unsur yang diperlukan dalam medium kultur *in vitro* adalah substrat sebagai sumber energi dan sumber protein, larutan *buffer*, pH, osmolaritas, suhu, udara, dan air. Unsur lain yang biasa ditambahkan ke dalam medium kultur adalah serum.

Medium yang digunakan untuk kultur *in vitro* embrio mencit adalah medium M16. Komposisi dasar dari medium ini relatif sama dengan komposisi pada HTF yang merupakan medium untuk kultur *in vitro* embrio manusia. Supriatna dan Pasaribu (1992) melaporkan bahwa sel telur mencit yang difertilisasi secara *in vitro* pada medium kultur, rataan angka fertilisasi biasanya lebih besar atau sama dengan 60%. Penelitian yang dilakukan oleh Quinn *et al.*, (1985) melaporkan bahwa medium HTF dapat meningkatkan angka kehamilan pada fertilisasi *in vitro* manusia. Hal tersebut yang mendorong untuk meneliti perbandingan penggunaan medium kultur M16 dan HTF pada fertilisasi *in vitro* mencit ditinjau dari perolehan angka fertilisasi dan mengatasi hambatan perkembangan (*cell block*) embrio tahap dua sel. Berdasarkan uraian di atas tujuan penelitian ini adalah ingin mengetahui apakah terdapat perbedaan hasil dalam penggunaan medium M16 dan HTF terhadap angka fertilisasi dan hambatan perkembangan embrio mencit tahap dua sel.

METODE PENELITIAN

Membuat Pejantan Vasektomi

Mencit jantan dianestesi menggunakan ketamine dengan dosis 0,5 mg/kg BB secara intraperitoneal. Setelah terbius dilanjutkan dengan mengikat dan merentangkan kedua kaki depan dan belakang pada papan operasi dengan posisi rebah dorsal. Selanjutnya lokasi pembedahan yaitu testis disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70%. Tetis disayat pada kulit di antara testis dengan menggunakan *scalpel*. Setelah testis dikeluarkan, saluran dari bagian epididymis sampai vas deferens, diikat dengan menggunakan *cat gut*. Sebelum dijahit kembali, disemprotkan antibiotik (gentamicin) lokal pada daerah tersebut. Selanjutnya bagian kulit yang telah disayat, dijahit kembali.

Persiapan medium

Medium M16 dan medium HTF dibuat sesuai prosedur kedua medium (Tabel 1). Sebelum digunakan untuk fertilisasi *in vitro*, terlebih dahulu dibuat medium tetes (*drop*) dalam cawan petri dengan volume 50 mikroliter sebagai medium pencuci dan 25 mikroliter sebagai medium kultur *in vitro*. Medium tetes kemudian diinkubasi selama tiga jam di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 ° C sebelum digunakan untuk fertilisasi *in vitro*.

Tabel 1. Komposisi medium M16 dan HTF

M 16	HTF
NaCl	NaCl
KCl	KCl
CaCl ₂ 2H ₂ O	CaCl ₂ 2H ₂ O
MgSO ₄ 7H ₂ O	MgSO ₄ 7H ₂ O
NaHCO ₃	NaHCO ₃
Na Laktat 60 %	HEPES
Na Piruvat	Na Laktat
Glukosa	Na Piruvat
Bovine Serum Albumin (BSA)	Glukosa
Penicilin	Gentamicin
Streptomisin	Fenol red
Fenol red	
Ethilen Diamin Tetra Acetic (EDTA)	
Aquabides	

Koleksi Sel Telur

Superovulasi pada mencit betina menggunakan hormon PMSG 5 IU dan 48 jam kemudian hCG yang diinjeksi secara intraperitoneal. Mencit kemudian dicampur dengan mencit jantan vasektomi secara *monomating* untuk menggertak ovulasi. Setelah 17 jam, dilakukan pemeriksaan sumbat vagina untuk mengetahui betina yang positif kawin dan *flushing* sel telur. Mencit betina dikorbankan nyawanya dengan cara *dislokasio os cervicalis* kemudian uterus dikeluarkan dan tuba Fallopii di angkat, setelah itu dilakukan pembilasan dengan menggunakan medium M16. Selanjutnya tuba Falopi diletakkan di cawan petri untuk dilakukan *flushing* sel telur dibawah mikroskop *inverted* (Nikon, Japan).

Flushing Sel Telur

Flushing (pembilasan) sel telur mencit dilakukan dengan cara Monk (1987) : mencit betina dikorbankan nyawanya dengan cara *dislokasio os cervicalis*. Tuba Falopii dikeluarkan dan kantong fertilisasi dirobek. Semua proses tersebut dilakukan di bawah mikroskop *inverted*. Kemudian dilakukan koleksi sel telur dengan pipet *pasteur* modifikasi dan sel telur dicuci dengan medium M16 dan HTF sebanyak tiga kali sampai sel telur terbebas dari sel-sel kumulus. Sel telur selanjutnya dipindahkan pada cawan petri yang telah berisi medium M16 dan HTF yang baru

untuk diinkubasi didalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama satu jam (Summers *et al.*, 2005)

Koleksi Spermatozoa

Mencit jantan dikorbankan nyawanya dengan cara *dislokasio os cervicalis* dan diambil bagian *cauda epididymis*. Cauda epididymis yang diperoleh dicuci menggunakan medium M16. Selanjutnya cauda epididymis diletakkan dalam cawan petri yang sudah ditambah 1 ml medium M16. Untuk membebaskan spermatozoa, *cauda epididymis* digunting kecil-kecil, kemudian diinkubasi dalam incubator CO₂ 5% pada suhu 37° C selama satu jam (Summers *et al.*, 2000; Sztein *et al.*, 2000).

Fertilisasi Sel Telur dan Kultur *in vitro*

Untuk melakukan fertilisasi *in vitro*, sel telur dan spermatozoa dicampur dan masing-masing dikultur dalam medium M 16 dan medium HTF, serta diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% selama 12 jam. Setelah 12 jam, *zigot* yang terbentuk diperiksa dan dipindahkan ke dalam medium kultur baru untuk kultur *in vitro* dan diinkubasi kembali ke dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C dan diperiksa setiap 24 jam. Untuk mengetahui kemampuan *zigot* melewati *cell block* berdasarkan kemampuan embrio berkembang mencapai tahap dua sel. *Cell block* pada mencit terjadi pada pembelahan satu sel (*zigot*) menjadi dua sel (Jiang dan Tsang, 2011).

Angka fertilisasi diamati dua belas jam setelah fertilisasi dengan cara menghitung jumlah *zigot* yang terbentuk dalam masing-masing medium kultur. Pengamatan hambatan perkembangan (*cell block*) embrio mencit dilakukan 24 jam kemudian berdasarkan jumlah *zigot* yang dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel dan yang mengalami degenerasi pada masing-masing medium kultur.

Analisis Data

Data yang diperoleh berupa angka fertilisasi berdasarkan jumlah *zigot*, dan data *cell block* berdasarkan jumlah embrio yang berkembang embrio mencit mencapai tahap dua sel dianalisis dengan uji T (Sujana, 1996). Data tersebut dianalisis menurut Statistical Product and Service Solution (SPSS) 11.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Angka Fertilisasi

Hasil penelitian menunjukkan angka fertilisasi yang diperoleh dari sel telur yang difertilisasi secara *in vitro* pada medium M16 adalah 98,09% dan pada medium HTF 99,57%. Hasil yang diperoleh terhadap angka fertilisasi pada kedua medium, tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Pada penelitian ini tidak seluruh sel telur mengalami fertilisasi, ada sebagian sel telur yang tidak mengalami fertilisasi baik pada medium M16 maupun medium HTF, tetapi jumlahnya tidak banyak. Sel telur yang telah mengalami fertilisasi *in vitro* (FIV) pada medium kultur menghasilkan zigot ditandai dengan terbentuknya badan kutub kedua. Menurut Sukra *et al.*, (1993) kegagalan FIV dapat disebabkan oleh faktor maturasi sel telur, kapasitas spermatozoa, dan kondisi fisiologis medium kultur.

Keberhasilan FIV salah satunya bergantung dari usaha pematangan sel telur secara *in vitro*. Sel telur yang digunakan untuk FIV berasal dari mencit betina yang telah disuperovulasi dengan menggunakan hormon PMSG dan hCG. Hormon PMSG mempunyai fungsi sama seperti *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yaitu merangsang perkembangan folikel dan hCG mempunyai fungsi sama seperti *Luteinizing Hormone* (LH) yaitu membantu perkembangan folikel hingga mencapai proses pematangan yang sempurna dan ovulasi (Gadner dan Lane, 1999).

Pada FIV terhadap sel telur yang dikoleksi dari kantung fertilisasi, sel telur telah matang akibat pengaruh LH *surge* pada kondisi alamiah atau melalui pemberian hCG pada saat superovulasi. Sel telur yang matang adalah sel telur yang sudah mengalami proses pematangan inti dan sitoplasma. Secara mikroskopis pematangan tersebut ditandai dengan inti yang mengalami metaphase II. Apabila proses

pematangan tidak serempak maka terdapat kemungkinan sel telur yang *over matured* dengan ditandai oleh *cumulus oophorus expansion*, sehingga *cumulus oophorus* sulit ditembus oleh spermatozoa dan mengganggu proses fertilisasi, selain itu dapat pula menyebabkan pelepasan badan kutub yang tidak bersamaan (Erdogan *et al.*, 2005).

Spermatozoa yang digunakan untuk FIV berasal dari *cauda epididymis*. Pada penelitian ini, spermatozoa tidak mengalami kapasitas di dalam saluran reproduksi betina. Secara *in vitro*, spermatozoa dapat melakukan kapasitas di dalam media yang dilengkapi dengan serum albumin. Penambahan albumin yang terkandung dalam *bovine serum albumin* (BSA) dapat mengubah fosfolipid pada membran spermatozoa sehingga reaksi akrosom dapat berlangsung. Yunagimachi (1990) melaporkan bahwa spermatozoa hamster dapat mengalami kapasitas spontan dengan distimulasi oleh BSA 2-5 mg/ml. Menurut Funahashi *et al.*, (1998) penambahan serum dalam medium sangat dibutuhkan untuk penetrasi spermatozoa tikus pada proses FIV.

Pada *fertilisasi in vivo*, sel telur dan spermatozoa bertemu di tuba Falopii. Kondisi lingkungan dan kandungan nutrisi dalam tuba Falopii sangat mendukung terjadinya fertilisasi. Pada FIV, sel telur dan spermatozoa dikoleksi dan difertilisasi di dalam medium kultur. Di dalam medium kultur seluruh proses, kondisi lingkungan dan komposisi zat-zat penyusun media kultur diatur menyerupai keadaan pada saat terjadinya fertilisasi *in vivo* sehingga akan diperoleh zigot yang ideal dan mampu berkembang menjadi embrio tahap selanjutnya (Harding *et al.*, 2002).

Angka fertilisasi yang diperoleh pada medium M16 adalah 98,09% dan pada medium HTF adalah 99,57% secara statistik. Angka fertilisasi pada medium HTF sama dengan angka fertilisasi pada medium M16. Angka

Tabel 2. Persentase angka fertilisasi pada medium M16 dan medium HTF

Perlakuan	Jumlah sel telur yang terfertilisasi	Sel telur yang tidak terfertilisasi	Sel telur
M16	140	136 (98,09±4,66) ^a	4 (1,91 ± 0,66) ^a
HTF	149	148 (99,57± 1,04) ^a	1 (0,43 ± 1,04) ^a

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

M16 : Medium 16

HTF : *human tubal fluid*

fertilisasi pada kedua medium secara statistika tidak berbeda nyata. Kedua medium, baik medium M16 maupun medium HTF dapat mendukung terjadinya FIV pada mencit. Hal tersebut dapat terjadi karena medium M16 dan medium HTF menyediakan zat-zat yang dibutuhkan oleh sel telur dan spermatozoa untuk melakukan FIV. Pada dasarnya bila sel diambil dari jaringan atau organ asalnya dan dibuat kultur, maka medium penumbuhnya harus menyediakan semua kondisi lingkungan yang sama dengan keadaan yang dialami oleh sel dalam lingkungan *in vivo*. Dengan demikian jumlah dan komposisi zat-zat penyusun pada medium M16 dan medium HTF menyerupai jumlah dan komposisi zat-zat penyusun pada cairan dalam saluran reproduksi betina sehingga memungkinkan terjadinya fertilisasi secara *in vitro* (Leese *et al.*, 2001).

Kondisi lingkungan di dalam inkubator yang stabil juga dapat mendukung terjadinya fertilisasi. Suhu yang tidak stabil akan memengaruhi pH sehingga akan mengganggu terjadinya fertilisasi. Sistem buffer pada medium M16 dan medium HTF adalah buffer bikarbonat, untuk itu pH dan suhunya harus benar-benar terjaga. Dengan demikian kondisi lingkungan pada saat FIV dapat stabil, sel gamet tersebut dapat bertahan hidup, berkembang, dan berdeferensiasi (Feil *et al.*, 2005).

Hambatan Perkembangan (*Cell Block*)

Kemampuan embrio untuk mengatasi *cell block* berdasarkan perkembangan *zigot* menjadi embrio tahap dua sel pada medium M16 sebesar 85,09% dan pada medium HTF sebesar 83,36%. Perkembangan embrio ketahap dua sel, pada kedua medium tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). *Zigot* yang diperoleh dari FIV pada medium kultur dapat berkembang menjadi embrio tahap dua sel, namun juga terdapat *zigot* yang tidak dapat berkembang dan mengalami degenerasi yaitu sel-selnya mengalami kehancuran,

piknosis, dan fragmentasi (Tabel 3).

Timbulnya degenerasi pada kultur embrio mencit tahap satu sel baik pada medium M 16 maupun medium HTF secara umum dapat disebabkan oleh dua faktor. Faktor pertama berasal dari luar medium kultur, seperti penanganan medium kultur yang tidak baik dan peralatan yang tidak steril. Pada medium M 16 dan medium HTF sistem *buffer* yang digunakan adalah *buffer* bikarbonat yang mampu menjaga pH medium tetap stabil. Apabila terjadi fluktuasi suhu pada inkubator maka akan memengaruhi pH. Medium yang disimpan pada suhu terlalu rendah, akan memengaruhi pH melalui perubahan kelarutan CO₂ dan mungkin melalui perubahan ionisasi pH dari *buffer*. Perubahan pH memberikan pengaruh langsung terhadap pertumbuhan sel. Apabila disimpan pada suhu terlalu tinggi akan menyebabkan kerusakan pada medium tersebut. Beberapa unsur kimia penyusun medium kultur pada suhu tinggi akan membentuk senyawa yang tidak diinginkan seperti radikal bebas (Erdagon *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2002).

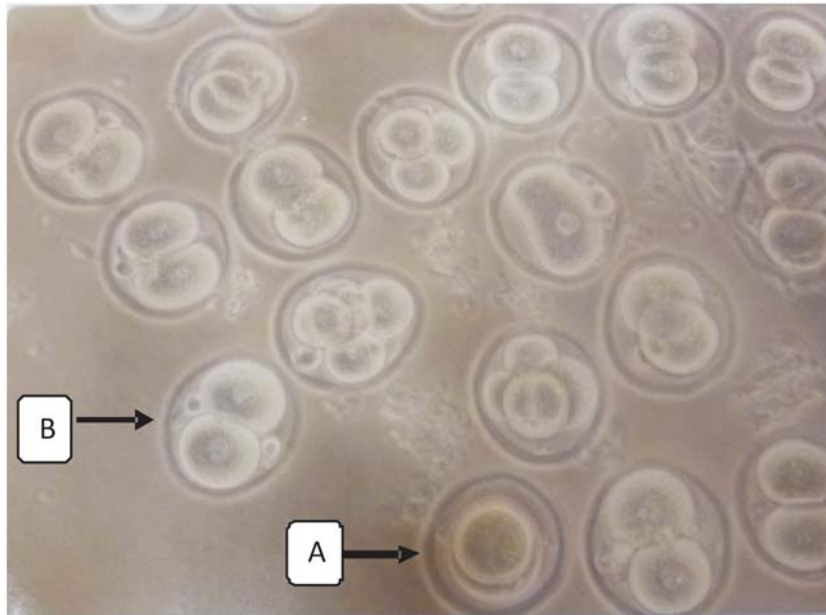
Pelaksanaan FIV harus dalam keadaan steril baik peralatan maupun tempatnya. Hal tersebut dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri yang tidak diinginkan, sehingga tidak mengganggu proses fertilisasi dan perkembangan embrio. Media kultur M16 dan HTF yang digunakan untuk kultur sel telur dan embrio sangat rentan terhadap kontaminasi. Kelembaban suhu di dalam inkubator merupakan faktor yang dapat menunjang pertumbuhan organisme lain. Kontaminasi dapat berasal dari udara luar area saat melakukan kultur dan dapat berasal dari alat yang digunakan untuk mempersiapkan medium kultur.

Faktor yang kedua adalah faktor yang berasal dari dalam medium kultur itu sendiri, seperti kondisi medium kultur dan zat tambahan sebagai suplementasi nutrisi bagi

Tabel 3. Persentase *zigot* mampu melewati *cell block* pada medium M16 dan HTF

Perlakuan medium	Jumlah <i>zigot</i>	Berkembang menjadi 2 sel	Tidak Berkembang/ Degenerasi
M16	148	132 (85,09±15,88) ^a	16 (14,91± 16,69) ^a
HTF	136	118 (83,36±22,74) ^a	18 (16,54 ± 11,32) ^a

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)
M 16 : medium 16
HTF : *human tubal fluid*



Gambar 1. Embrio tahap 1 sel adalah embrio menci yang mengalami hambatan perkembangan/cell block. Embrio tahap 2 sel adalah embrio menci yang berhasil melewati hambatan perkembangan/cell block. (A) Embrio tahap 1 sel; (B) Embrio menci tahap 2 sel

embrio untuk berkembang (Widjiati, 1997). Menurut Sukra *et al.*, (1993) semakin kurang nutrisi yang ada dalam media kultur, jumlah embrio yang berkembang makin menurun karena nutrisi untuk perkembangan semakin sedikit. Selama periode awal perkembangan embrio, kebutuhan energi yang dibutuhkan tinggi. Zat sebagai sumber energi utama seperti piruvat, glukosa, dan laktat ditambahkan ke dalam kultur embrio mamalia pada umumnya. Energi substrat tersebut dibutuhkan untuk mendukung perkembangan embrio praimplan-tasi dari tahap satu sel hingga mencapai tahap blastosis. Pemberian glukosa pada 36 sampai 48 jam setelah kultur dapat membantu perkembangan embrio menci mencapai tahap blastosis (Sawai *et al.*, 1994). Hal tersebut sejalan dengan pendapat Widjiati (1997) bahwa penambahan glukosa dengan konsentrasi 5,0 mmol/liter dapat meningkatkan pertumbuhan embrio sampai morula (34,5%) dan tahap blastosis (14,4%).

Medium yang digunakan untuk kultur embrio disusun berdasarkan tujuan penggunaan medium kultur jaringan atau organ, sedangkan jaringan embrio sampai fase blastosis relatif lebih homogen asalkan kebutuhan dasar lainnya untuk kultur terpenuhi (Hafez, 2000). Berdasarkan penjelasan di atas, medium M16 dan medium HTF yang digunakan sebagai

medium kultur dapat memenuhi kebutuhan dasar sel gamet untuk berkembang menjadi embrio sehingga tidak memengaruhi morfologinya. Secara umum embrio memerlukan lingkungan yang sama dengan lingkungan yang diperlukan sel mamalia lain yang dikultur. Unsur-unsur yang diperlukan untuk kultur *in vitro* embrio yang terkandung di dalam medium M 16 dan HTF antara lain substrat, udara, air, dan suhu. Substrat dalam medium kultur M 16 dan medium HTF terdiri dari bahan kimia organik dan anorganik. Jumlah substrat yang ditambahkan ke dalam medium kultur tersebut diatur mendekati komposisi zat-zat dalam cairan tuba Falopii tempat embrio berkembang. Substrat tersebut terdiri dari nutrisi maupun zat-zat lain dalam bentuk yang terlarut, dan nutrisi yang diberikan berupa sumber energi dan protein (Summer *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2009)

Dalam medium M16 dan medium HTF sumber energi yang ditambahkan adalah glukosa, piruvat, dan laktat. Energi dalam substrat tersebut ditambahkan untuk mendukung perkembangan embrio praimplan-tasi dari tahap satu sel hingga mencapai tahap blastosis. Secara umum pH dalam medium kultur sel adalah 7,4 di luar pH tersebut sel tidak tumbuh dengan baik, walaupun pH yang optimum untuk pertumbuhan memiliki variasi

yang kecil di antara berbagai jenis sel. Ion-ion Ca, Mg, K, dan PO₄ yang terkandung di dalam medium M16 dan medium HTF diperlukan untuk aktivitas enzim dan menjaga osmolaritas embrio mencit tahap satu sel berkisar antara 250-280 mOsm dan untuk dua sel berkisar antara 272-280 mOsm (Biggers dan McGinnis, 2001).

Karbondioksida merupakan unsur penting dan bermanfaat dalam perkembangan embrio. Karbondioksida berhubungan dengan *buffer* bikarbonat, yang sangat penting untuk mengatur keseimbangan pH, sehingga untuk mengatur keseimbangan tekanan CO₂ di dalam dan di luar media dapat diberikan CO₂ 5% dalam udara. Keseimbangan antara CO₂ karbonat yang berhubungan dengan keseimbangan pH juga berhubungan dengan suhu. Suhu dapat memengaruhi pH melalui peningkatan kelarutan CO₂ pada suhu rendah dan mungkin melalui perubahan ionisasi dan pH dari *buffer*. Keseimbangan di antara ketiga hal tersebut harus dijaga sebab ketiganya mempunyai pengaruh langsung terhadap pertumbuhan sel (Feil *et al.*, 2006; Steeves *et al.*, 2001)

Air dalam kultur sel digunakan sebagai pelarut bahan-bahan kimia penyusun medium, selain itu air juga sebagai media pengantar zat-zat yang dibutuhkan untuk embrio berkembang. Unsur-unsur kimia penyusun medium kultur jika tercampur dengan logam atau unsur lainnya yang dapat hadir di dalam air akan toksik terhadap kultur. Unsur lain yang ditambahkan dalam medium M16 dan medium HTF adalah BSA. Serum adalah cairan biologis yang terbukti dapat menunjang pertumbuhan sel di luar tubuh. Serum berfungsi memberikan sejumlah faktor penumbuh, mengandung hormon serta menyediakan protein pengikat yang membawa dan mengikat unsur-unsur yang berukuran kecil. Serum juga merupakan sumber bermacam-macam lemak yang secara umum dibutuhkan sel untuk hidup dan berkembang (Leese *et al.*, 2001; Summer *et al.*, 2005).

Dari hasil penelitian, pada kedua macam medium M16 dan HTF angka fertilisasi dan kemampuan *zigot* melewati *cell blok* tidak berbeda nyata, hal tersebut karena komposisi dasar antara medium M16 dan HTF hampir sama. Kemampuan *zigot* melewati *cell blok* terlihat berdasarkan kemampuan *zigot* membelah menjadi tahap dua sel. Pada kedua kelompok perlakuan jumlah embrio yang

membelah menjadi tahap dua sel cukup tinggi. Oleh karena itu medium HTF dapat digunakan untuk kultur embrio mencit karena adanya kesamaan komposisi dasar dari medium tersebut.

SIMPULAN

Medium M16 dan medium HTF sama baiknya digunakan sebagai medium fertilisasi, dan kultur *in vitro zigot* melewati hambatan perkembangan (*cell block*).

SARAN

Perlu dipertimbangkan penggunaan medium M16 untuk kultur embrio manusia dan dilakukan penelitian kultur *in vitro* embrio tahap dua sel sampai blastosis menggunakan medium HTF.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Dr. drh. Ita Djuwita MPhil., di Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, atas bimbingan selama penulis melaksanakan pendidikan S2.

DAFTAR PUSTAKA

- Biggers JD, McGinnis LK. 2001. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development in vitro. *Hum Reprod* 11: 153-163
- Erdagon S, Fitzharris G, Tartia AP, Baltz JM. 2005. Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Dev Biol* 45: 231-250
- Feil D, Lane M, Roberts CT, Kell, Edwards LJ, Thompson JG, Kind KL. 2005. Effect of culturing mouse embryos under different oxygen concentrations on subsequent fetal and placental development. *Physiol* 572: 87-96
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cell on the acrosome reaction, Fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 26:40-46.

- Funahashi H, She-Hoon OH, Miyoshi K. 1998. Rat oocytes fertilized in modified rat 1cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration and bovine serum albumin maintain ability to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 59:884-889.
- Gadner DK, Lane M. 1999. Embryo Culture Systems. In Trounson, AO and Gadner, DK, *Handbook Of In Vitro Fertilization*, 2nd. Boca Raton. CRC Press. Pp. 205-264
- Hafez, ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals* 7th. Philadelphia Lea and Febiger. P. 509.
- Harding EA, Gibb CA, Johnson MH, Cook DI, Day ML. 2002. Development changes in the management of acid loads during preimplantation mouse development. *Biol Reprod* 67: 1419-1429
- Irvine Scientific. 2011. Modified HTF Medium with Gentamicin-HEPES. http://www.irvinesci.com/ecom/app_ecom_irvinesci.cfm?
- Jiang JY, Tsang BK. 2011. Optimal conditions for successful in vitro fertilization and subsequent embryonic development in Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod* 71(6) : 1-10
- Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. 2001. Formation of fallopian tubal fluid : role of a neglected epithelium. *Reprod* 121: 339-346
- Lloyd RE, Romar R, Matas C, Gurtermez-Adan A, Holt WV, Coy P. 2009. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocyst produced in vitro. *Reprod* 1(37): 679-687
- Monk M. 1987. *Mammalian Development. A Practical Approach*. Washington DC IRL Press. P. 313.
- Nalley WM. 2001. Tinjauan Filosofis Bioteknologi. Makalah Filsafat Sains. Program Pasca Sarjana (S₃). Institut Pertanian Bogor. http://www.hayatiipb.com/users/rudyct/indiv2001/wm_nalley.Htm.
- Phillips KP, Petrunewich MAF, Collins JL, Baltz JM. 2002. The intracellular pH-regulatory HCO₃⁻/Cl⁻ exchanger in the mouse oocyte is inactivated during first meiotic metaphase and reactivated after egg activation via the MAP kinase pathway. *Mol Biol Cell* 13: 3800-3810
- Quinn P, Kerin JF, Wren GM. 1985. Improved pregnancy rate in human *in vitro* with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fert Steril* 44:493-498.
- Rijnders PM. 1996. *Laboratory Aspect of in vitro Fertilization*. Netherland. NV Organon. Pp75-174
- Sawai K, Kim JH, Okuda, Niwa K. 1994. Effect of glucose in semidefined culture medium on development of mouse 1cell embryos. *Mamm Ova Reprod* 11:8-16.
- Steeves CL, lane M, Bavister BD, Phillips KP, Baltz JM. 2001. Differences in intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ antiporter among two cell mouse embryos derived from female of different strains. *Biol Reprod* 65: 14-22
- Sudjana. 1996. *Metode Statistika Edisi Keenam*. Bandung . Tarsito. h. 508.
- Sukra Y, Djuwita I, Boediono A, Golfani S. 1993. Studi tentang pengembangan teknik fertilisasi in vitro, kultur, pewarnaan kromosom dan pematangan embrio dalam proses perekayasa embrio. Prosiding seminar hasil-hasil penelitian. Cisarua. Bogor.
- Summers MC, McGinnis LK, Lawitts JA, Raffin M, Biggers, FD. 2000. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod* 15(8) : 1791-1801
- Summers MC, McGinnis LK, Lawitts JA, Biggers, FD. 2005. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod* 20(5): 1364-1371
- Supriatna I, Pasaribu. 1992. *In vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. h.150.
- Sztein JM, Farley JS, Mobraaten LE. 2000. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 63 (6) : 1774-1778
- Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya Dalam Medium Kultur In Vitro Terhadap Perkembangan Embrio Mencit. Tesis. Bogor. Institut Pertanian Bogor
- Yunagimachi R. 1990. In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. *Biol Reprod* 3:147.