

Peranan Zona Pelusida Sebagai Barrier Terhadap Cemaran *Escherichia coli* K99

(THE ROLE OF ZONA PELLUCIDA AS A BARRIER OF *E. COLI* K99 CONTAMINATION)

I Wayan Batan¹, Bibiana Widiati Lay²,
Ita Djuwita³, Supar⁴, Arief Boediono³

¹Lab Diagnosis Klinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayana, Jln Raya Sesetan Gg Markisa No 6 Denpasar,
²Lab Mikrobiologi, ³Lab Embriologi FKH Institut Pertanian Bogor,
⁴Lab Bakteriologi, Balai Besar Veteriner Bogor

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan zona pelusida (ZP) sebagai barrier embrio terhadap cemaran *Escherichia coli* K99. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap *split in time*. Perlakuan yang diberikan kepada embrio adalah : 1) embrio tanpa ZP dicemari dengan *E.coli* K99; 2) embrio dengan ZP utuh dicemari dengan *E.coli* K99; dan 3) embrio dengan ZP utuh tidak dicemari dengan *E.coli* K99, sebagai kontrol. Setiap perlakuan terdiri dari 15 ulangan dan setiap ulangan diisi dengan satu embrio. Dosis *E.coli* K99 yang digunakan sebagai pencemar adalah 10^3 CFU/mL. Embrio diinkubasi pada suhu 37°C pada inkubator CO₂ 5%. Pengamatan dengan mikroskop *inverted* dilakukan setiap enam jam selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio yang memiliki ZP utuh tetap berkembang dalam biakan yang tercemar *E.coli* K99, sedangkan embrio yang tidak memiliki ZP mengalami degenerasi. Embrio dengan ZP mampu bertahan hidup sebanyak 75%, sedangkan embrio tanpa ZP yang bertahan hidup 65%. Embrio dalam biakan yang tercemar sebagian mampu berkembang dari tahap delapan sel menjadi embrio tahap morula, morula kompak, dan blastosis. Namun, cemaran *E.coli* K99 menghambat perkembangan embrio. Simpulan yang dapat ditarik adalah ZP mampu melindungi embrio dari cemaran *E.coli* K99.

Kata-kata kunci : embrio, zona pelusida, *E.coli* K99.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the role of zona pelucida (ZP) as a barrier of embryo against *E.coli* K99 contamination. The complete randomized design was used in this study. The embryos were given treatment as a follow : 1) embryos without ZP were contaminated with *E.coli* K99; 2) embryo with intact ZP were contaminated with *E.coli* K99; and 3) embryos with intact ZP were not contaminated with *E.coli* K99, as a control. In each treatment there was 15 replication and in each replication there was one embryo. The embryos were incubated in incubator at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The embryos were observed every six hours in 24 hours using inverted microscope. The result showed that embryos with intact ZP could develop in culture contaminated with *E.coli* K99, while embryos without ZP become degenerated. The viability of intact embryos was 75% and the embryos without ZP were 65%. Embryos culture in contaminated medium could develop from eight cells embryo into morulla stage of embryo, compact morulla, and blastocyst. *E.coli* K99 contamination could inhibit embryo development. In conclusion, ZP could protect embryo against *E.coli* K99 contamination.

Keywords : embryo, zona pelucida, *E.coli* K99

PENDAHULUAN

Zona pelusida merupakan struktur membran ekstraseluler oosit atau embrio praimplantasi. Jaringan zona pelusida sangat kompleks, memiliki kekuatan yang seragam pada seluruh permukaannya dan memiliki pori-pori. Zona pelusida (ZP) terdiri dari glikoprotein yang dikenal sebagai ZP1, ZP2, dan ZP3. Zona pelusida ini sangat beragam di antara spesies yang berbeda (Dudkiewicz *et al.*, 1976). Zona pelusida disintesis oleh oosit selama tahapan oogenesis dan diendapkan di perifer sel-sel tersebut (Dunbar *et al.*, 1994; Miyano *et al.*, 1994). Zona pelusida membungkus oosit dan embrio hingga menjelang implantasi/*hatching*. Zona pelusida melindungi sel telur dan embrio dari kerusakan mekanik selama ovulasi dan perjalanan sepanjang saluran reproduksi betina (Wassarman *et al.*, 1999).

Zona pelusida juga memegang peran penting dalam pengikatan spermatozoa, mencegah fertilisasi polispermia, reaksi akrosom, menyinambungkan pola pembelahan/*cleavage* yang normal, dan mencegah perlekatan antar oosit (Jones *et al.*, 1990; Wassarman *et al.*, 1999). Akan tetapi, peran zona pelusida yang sesungguhnya pada proses fertilisasi dan implantasi tidak sepenuhnya dipahami (Konwinski *et al.*, 1978; Lai *et al.*, 1994). Wu *et al.*, (2004) melaporkan bahwa zona pelusida berperan memberi perlindungan terhadap oosit dan embrio dini terhadap mikrob yang berbahaya seperti infeksi yang disebabkan oleh virus dan bakteri. Zona pelusida merupakan pelapis penting yang menentukan status kesehatan embrio, atau sebagai barier terhadap cecaran atau infeksi agen-agen penyakit menular sebelum keluarnya embrio dari zona pelusida atau *hatching*. Akan tetapi, sejumlah agen virus dan bakteri mampu melekat pada zona pelusida (Wrathall 1995).

Dalam pemrosesan embrio, seperti tindakan pencucian dengan buffer dan perlakuan tripsin, ternyata tidak efektif menyingkirkan virus *blue tongue*, virus penyakit mulut dan kuku, *bovine herpes virus-1*, *bovine viral diarrhoea virus*. Pada percobaan bakteri *Leptospira sp.*, dan *Escherichia coli* K99 yang sengaja dipaparkan ke embrio (Stringfellow dan Givens 2000; Otoi *et al.*, 1993), bakteri-bakteri itu dapat menempel ke permukaan zona pelusida. Penempelan bakteri *E.coli* O9 K99 ke zona pelusida mencit telah dibuktikan dengan pemeriksaan mikroskop elektron dan uji ELISA

(Batan *et al.*, 2006). Dengan demikian infeksi patogen dapat terjadi dan berlangsung pada proses memproduksi embrio melalui teknik fertilisasi oosit *in vitro* dan transfer embrio.

Embrio beku telah menjadi komoditi perdagangan internasional, bila terjadi infeksi patogen pada proses tersebut maka dapat menginisiasi menyebarkan penyakit (Otoi *et al.* 1992; Otoi *et al.* 1993). *The International Embryo Transfer Society* (IETS), lembaga yang berperan mengawasi perdagangan embrio mensyaratkan adanya pencucian embrio dengan PBS dan tripsin sebelum ditransfer ke resipien. Namun, tindakan ini kurang efektif menyingkirkan salah satu agen penyakit seperti bakteri *E.coli* K99 dari embrio (Otoi *et al.* 1993). Hal ini mungkin disebabkan antigen pili K99 dapat menempel pada komponen glikolipid yang mengandung asam muramik, galaktosa, dan glukosa (Isaacson 1985). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk menguji kemampuan zona pelusida sebagai barier atau pelindung embrio terhadap *E.coli* K99 dan kemampuan hidup embrio yang memiliki zona pelusida utuh dan yang tidak memiliki zona dalam medium kultur embrio yang dicemari bakteri *E.coli* K99.

METODE PENELITIAN

Superovulasi dan Panen Embrio

Mencit betina berumur 12 minggu yang berasal dari koloni bebas penyakit, dirangsang folikulogenesis ovariumnya dengan menyuntikkan hormon *pregnant mare's serum gonadotropine* (PMSG) (Folligon, Intervet, Boxmeer, Holland) 5-IU secara intra peritoneum pada pukul 16.00. Setelah 48 jam penyuntikan PMSG, dilakukan penyuntikan hormon *human chorionic gonadotropin* (HCG) (Chorulon, Intervet, Boxmeer, Holland) 5-IU secara intraperitoneum. Mencit betina tersebut setelah disuntik HCG langsung dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Hari berikutnya, mencit betina yang telah kawin ditandai dengan adanya sumbat vagina (*vagina plug*) dipisahkan dari pejantan. Tiga hari setelah dipisahkan dengan pejantannya, mencit betina bunting itu dikorbankan nyawanya dengan cara dislokasio *os occipitalis*. Bagian oviduk atau tuba Falopii diisolasi dan ditempatkan pada medium mPBS (Hogan *et al.*, 1994). Oviduk tersebut dicacah dengan menggunakan jarum suntik 26G. Sambil

diamati di bawah mikroskop binokuler, embrio delapan sel atau morula yang diperoleh dicuci dengan cara merendamnya berturut-turut 2-3 kali ke dalam mPBS yang telah diberi BSA 3%, tanpa antibiotik.

Penghilangan Zona Pelusida

Embrio tahap delapan sel atau morula, zona pelusidanya dihilangkan guna mendapatkan embrio tanpa zona pelusida. Zona pelusida dihilangkan dengan cara merendam embrio tersebut dalam mPBS yang mengandung enzim pronase 0,25% (Sigma St.Louis USA) selama kurang lebih tiga menit dan tetap diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui proses peluruhan zona pelusida. Segera setelah zona pelusida menjadi sangat tipis akibat perlakuan pronase, embrio dipindahkan ke larutan mPBS (Boediono *et al.*, 1993), dan dicuci berturut-turut sebanyak tiga kali.

Penyiapan Bakteri *E.coli* K99

Bakteri *E.coli* diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor. Bakteri *E.coli* O9 K99 diisolasi dari anak sapi asal Sukabumi Jawa Barat. Isolat *E.coli* dibiakkan semalam pada media agar *Minca plus vitox* (Oxoid, UK) yang disiapkan pada cawan petri. Setelah inokulasi selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam. Pada suhu tersebut antigen K99 lebih banyak diproduksi dibandingkan dengan suhu di bawah 25°C (Guinee *et al.*, 1977). Setelah diinkubasi, sel-sel bakteri pada permukaan agar dibilas dengan NaCl fisiologis, sel-sel itu dicuci tiga kali. Sel-sel dipisahkan dengan sentrifugasi 4000 rpm selama 20 menit. Endapan sel dari pencucian terakhir kemudian dibuat suspensi dengan kekeruhan setara dengan tabung standar Mc Farland nomor 10 (Supar 1986).

Pemaparan Embrio terhadap *E.coli* K99

Sekelompok embrio yang memiliki zona pelusida utuh dan embrio yang tidak memiliki zona atau tanpa zona pelusida ditempatkan dalam 80µL medium mPBS dan diberi bakteri *E.coli* K99 dengan konsentrasi bakteri 10³ CFU/mL (Batan *et al.*, 2006). Setelah itu biakan embrio diinkubasi selama 1 jam dalam 80 µL medium mPBS pada suhu 37°C dalam inkubator.

Embrio-embrio yang terpapar kemudian dicuci dengan cara merendamnya tujuh kali ke dalam *drop* atau tetes-tetes berbeda media mPBS tanpa antibiotik (Otoi *et al.* 1992; Otoi *et*

al. 1993). Embrio yang telah dibasuh tersebut selanjutnya dipindahkan ke dalam media kultur *kalium simplex optimized medium* (KSOM) (Summer *et al.*, 2000). Setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5%, embrio dievaluasi terhadap: 1) keadaan morfologi; 2) viabilitas (daya tahan hidup) embrio; dan 3) tingkat perkembangan.

Rancangan Percobaan

Rancangan yang dipakai pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap pola *split in time*. Ada tiga perlakuan yang diberikan kepada embrio unit percobaan, antara lain: 1) embrio tanpa zona pelusida dicemari dengan *E.coli* K99; 2) embrio dengan zona pelusida utuh dicemari dengan *E.coli* K99; dan 3) embrio dengan zona pelusida utuh dan tidak dicemari *E.coli* K99 (kontrol). Konsentrasi pencemaran bakteri *E.coli* K99 ke embrio adalah 10³ CFU/mL. Pengamatan dilakukan setiap enam jam selama 24 jam. Setiap perlakuan terdiri dari 15 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari satu embrio. Parameter yang diamati adalah viabilitas (daya tahan hidup) dan tingkat perkembangan embrio yakni dari tahap delapan sel berkembang menjadi morula kompak, blastosis dan blastosis ekspan. Viabilitas embrio dihitung berdasarkan pengamatan morfologi. Tingkat viabilitas dihitung dari jumlah embrio yang menunjukkan morfologi normal per jumlah embrio yang dikultur. Tingkat perkembangan embrio dihitung dari jumlah embrio yang berkembang per jumlah embrio yang dikultur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

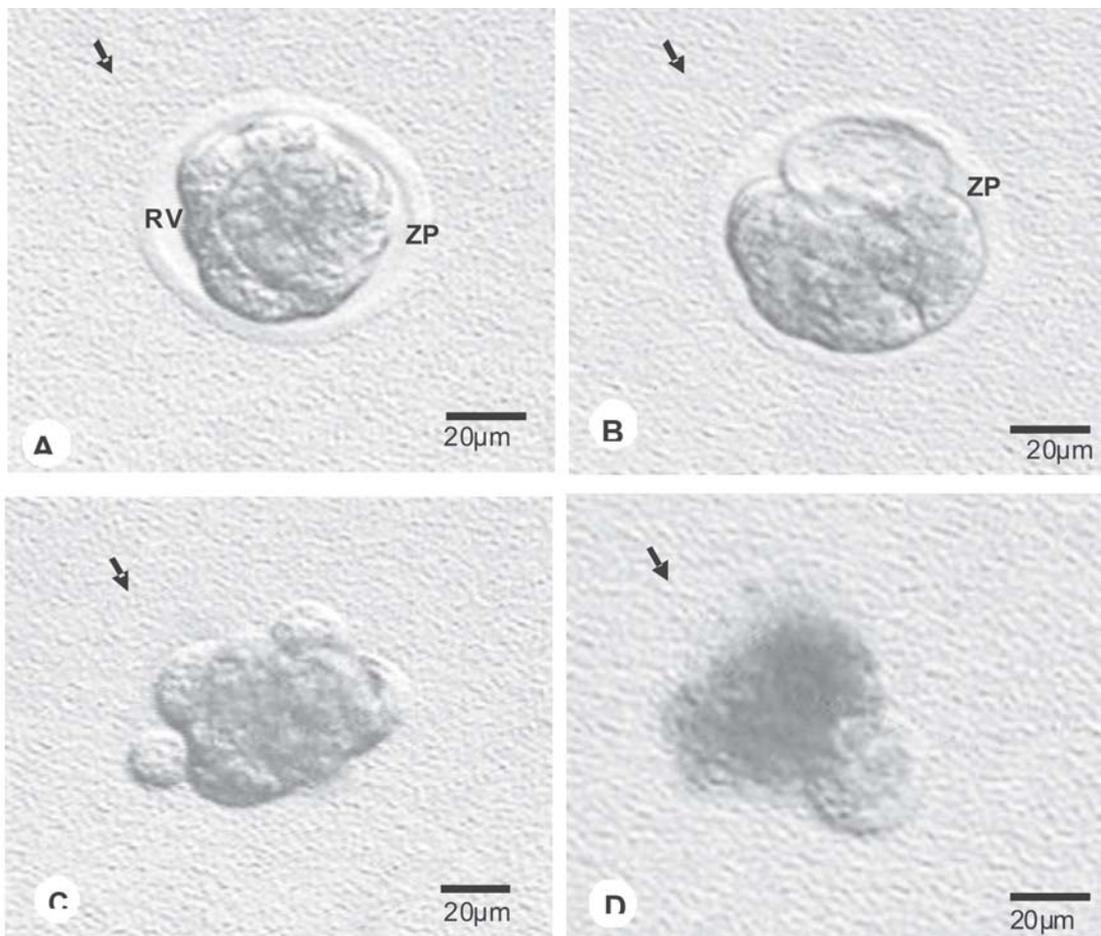
Pengamatan Morfologi Embrio

Hasil pemanenan (koleksi) embrio dari tuba Fallopii pada hari ketiga setelah mencit dikawinkan, diperoleh embrio tahap delapan sel. Setelah mendapat perlakuan, embrio dikultur secara *in vitro* selama 24 jam dan pengamatan dilakukan setiap enam jam. Pengamatan pada 12 jam pertama, embrio dalam medium kultur KSOM menunjukkan bahwa morfologi embrio yang memiliki zona pelusida yang terpapar oleh *E.coli* tidak berbeda dengan embrio kontrol, sedangkan embrio tanpa zona pelusida dan dipaparkan dengan *E.coli* secara morfologi menunjukkan kualitas relatif lebih buruk dibandingkan embrio yang memiliki zona pelusida dan gambaran tersebut tampak semakin jelas setelah 18 jam kultur. Pada

embrio tanpa zona teramati sel-sel embrio mengalami degenerasi (Gambar 1). Kematian embrio juga teramati pada embrio yang memiliki zona pelusida utuh. Setelah dikultur selama 24 jam, embrio tanpa zona yang mati teramati sel-selnya mengalami lisis (Gambar 1D).

Pada perlakuan embrio tanpa zona pelusida tampak bahwa sel-sel embrio langsung bersinggungan dengan bakteri *E.coli* K99 yang ada dalam medium yang telah dicemari (Gambar 1C) Embrio yang memiliki zona pelusida utuh, sel sel blastomer tampak terlindungi dengan baik oleh zona pelusida (Gambar 1A). Pada gambar yang memperlihatkan medium KSOM

di luar zona pelusida tampak keruh dipenuhi oleh bakteri *E.coli* K99 (kepala panah), sedangkan ruang vitelin (RV), ruang yang ada di dalam embrio tampak bening sebagai pertanda bakteri *E.coli* K99 tidak menyusup masuk menembus zona pelusida. Pada embrio 24 jam pascapencemaran, terlihat embrio yang tidak memiliki zona pelusida memasuki tahap kematian (Gambar 1D). Embrio yang memiliki zona pelusida pada *drop* medium yang sama masih hidup setelah 24 jam kultur (Gambar 1B). Hal ini menandakan bakteri *E.coli* K99, memberi pengaruh yang tidak menguntungkan bagi perkembangan embrio yang tidak memiliki zona pelusida.



Gambar 1 Perkembangan embrio yang tidak dan memiliki zona pelusida (zp) dalam medium kultur yang dicemari *E.coli* K99. Diamati dengan *inverted microscope*. (A) Embrio memiliki zp utuh, 18 jam setelah pencemaran. *E.coli* tidak menembus zp. (B) Embrio memiliki zp utuh, 24 jam setelah pencemaran. *E.coli* tidak menembus zona, embrio berkembang mencapai tahap blastosis. (C) Embrio tanpa zp, 18 jam setelah pencemaran. Medium penuh bakteri, terlihat embrio tahap morula. (D) Embrio tanpa zp, 24 jam setelah pencemaran dengan medium penuh *E.coli*, embrio terlihat mulai degenerasi. Medium tercemar *E.coli* K99 (kepala panah); RV: ruang vitelin.

Viabilitas Embrio

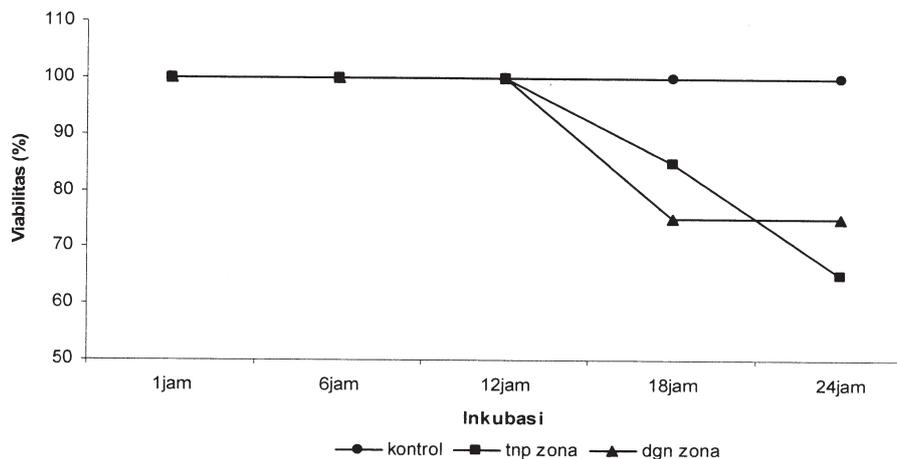
Viabilitas embrio pada ketiga perlakuan embrio setelah dikultur selama 12 jam tidak menunjukkan perbedaan, yakni masing-masing perlakuan menunjukkan viabilitas 100%. Perbedaan viabilitas mulai tampak setelah 18 jam kultur *in vitro* yakni terjadi penurunan viabilitas pada embrio yang telah dicemari bakteri *E.coli* yaitu menurun menjadi 85,0% dan 75,0% masing-masing pada embrio tanpa zona dan yang memiliki zona (Gambar 2). Setelah 24 jam kultur viabilitas embrio tanpa zona yang dicemari *E.coli* semakin menurun menjadi 65,0%. Terjadinya cemaran bakteri *E.coli* baik pada embrio tanpa zona maupun yang memiliki zona mengakibatkan terjadinya degenerasi sel-sel embrio yang diikuti dengan kematian embrio (Gambar 1 D).

Tingkat Perkembangan Embrio

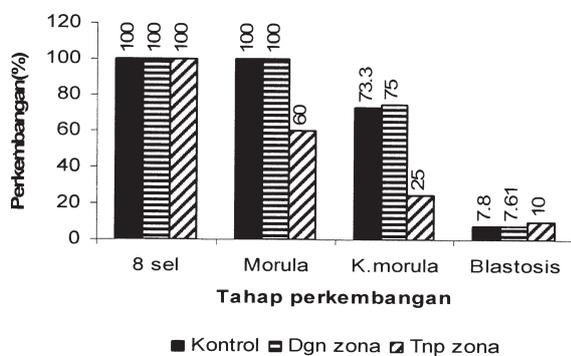
Hasil pengamatan pada ketiga embrio perlakuan setelah dikultur selama 24 jam

menunjukkan bahwa tingkat perkembangan embrio kontrol (100,0%) lebih tinggi dibandingkan dengan embrio perlakuan yang memiliki zona pelusida yang dicemari *E.coli* K99 (62,6%) dan embrio tanpa zona pelusida yang dicemari *E.coli* K99 (20,0%)(Tabel 1). Persentase jumlah embrio yang mengalami kematian (degenerasi) pada embrio perlakuan yang dicemari bakteri *E. coli* K99 adalah 35,0% dan 25,0% masing-masing embrio yang memiliki zona pelusida utuh dan embrio tanpa zona pelusida. Hal ini menunjukkan bahwa pencemaran bakteri *E.coli* K99 pada medium kultur *in vitro* dapat mengakibatkan terhambatnya perkembangan embrio dan kematian embrio.

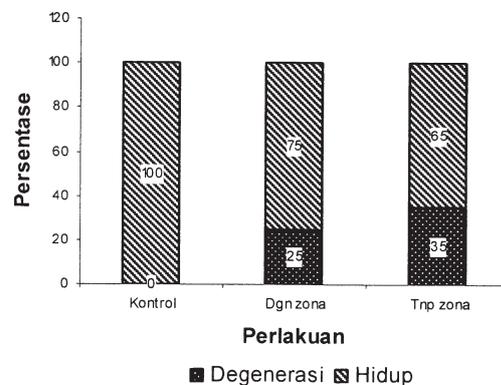
Embrio yang telah dicemari bakteri *E. coli* dan diinkubasi selama 24 jam menunjukkan bahwa tingkat perkembangan embrio yang memiliki zona pelusida utuh (62,6%) nyata lebih tinggi dibandingkan embrio tanpa zona pelusida (20,0%)($P < 0,05$). Terlihat bahwa embrio yang



Gambar 2. Viabilitas embrio perlakuan selama 24 jam kultur *in vitro* dalam KSOM



Gambar 3. Persentase tahapan perkembangan embrio setelah kultur *in vitro* selama 24 jam.



Gambar 4. Persentase kematian embrio tanpa zona pelusida dan dengan zona pelusida setelah kultur *in vitro* selama 24 jam.

dicemari *E.coli* K99 yang paling banyak mengalami degenerasi dan kematian adalah dari kelompok embrio yang tidak memiliki zona pelusida (35%), sedangkan kelompok embrio yang memiliki zona pelusida mempunyai tingkat kematian 25%. Hal ini membuktikan bahwa zona pelusida mampu memberikan proteksi terhadap pengaruh buruk pencemaran bakteri.

Pada embrio tanpa zona pelusida dan dicemari dengan *E.coli* K99, persentase embrio yang mampu berkembang secara *in vitro* mencapai tahap morula kompak adalah 15%; sedangkan pada embrio yang memiliki zona pelusida dan embrio kontrol masing-masing adalah 56,3% dan 75,0%. Embrio dengan zona pelusida utuh dan yang tidak dicemari dengan *E.coli* K99 dalam 24 jam dapat berkembang mencapai tahap blastosis, tetapi embrio tersebut tidak mampu mencapai tahap blastosis ekspan, kecuali kelompok kontrol (Tabel 1).

Pada lingkungan atau medium embrio yang tercemar atau terinfeksi oleh mikroba, mikroba akan menempel dan berikatan dengan reseptor jaringan sel inang. Bakteri *E.coli* yang mempunyai antigen adhesin (K99) dapat menempel pada zona pelusida. Ikatan itu sulit dilepaskan dengan pembasuhan menggunakan mPBS mau pun pembasuhan dengan enzim tripsin dan diduga ikatan ini sifatnya spesifik (Otoi *et al.*, 1993). Ikatan yang spesifik ini telah dibuktikan adanya dengan uji ELISA yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya, di samping pembuktian dengan melakukan pemeriksaan mikroskop elektron terhadap ikatan bakteri *E.coli* K99 dengan zona pelusida mencit (Batan *et al.*, 2006).

Zona pelusida mencit mengandung tiga jenis glikoprotein, yakni ZP1, ZP2, dan ZP3. Ketiganya berbeda dalam hal rantai polipeptida dan oligosakaridanya (Wassarman, 1999). Analisis biokimia terhadap zona pelusida telah

dilaporkan, bahwa zona pelusida mengandung glikoprotein yang mempunyai gugus ion positif atau negatif serta mempunyai bobot molekul yang berbeda-beda, tergantung pada spesies hewan asal zona pelusida tersebut. Pada permukaan zona pelusida dilaporkan terdapat sejumlah gugus gula, seperti α D-manosa, D-glukosa, β -galaktosa, dan N-asetil-glukosamin (Skutelsky *et al.*, 1994).

Gugus-gugus gula rantai oligosakarida pada glikoprotein zona pelusida ini, berperan penting dalam pengikatan spermatozoa pada saat fertilisasi (Miller dan Ax 1990). Pada mencit banyak ditemukan gugus gula α -galaktosa, L-fukosa, D-manosa, dan metil manosida, pada tikus adalah L-fukosa, sedangkan pada hamster, marmut, dan manusia adalah D-galaktosa (Skutelsky *et al.*, 1994), pada rusa timor banyak ditemukan gula D-N-asetilgalaktosamin dan galaktosa, namun sedikit α -glukosa dan a-manosa (Rifqiyati *et al.*, 2006). Gugus gula pada zona pelusida mamalia itu merupakan tempat interaksi yang spesifik. Memahami adanya gula-gula ini pada permukaan zona pelusida sangatlah penting guna memahami terjadinya ikatan yang spesifik ke permukaan zona pelusida (Skutelsky *et al.*, 1994).

Adanya gugus gula-gula pada permukaan zona pelusida tersebut berfungsi sebagai reseptor terhadap bakteri atau virus. Bakteri ini melekat pada zona pelusida dengan perantaraan antigen pili atau *adhesin* K99 pada gugus molekul gula monosakarida seperti galaktosa, dan glukosa selain asam neuramik (Dean dan Isaacson 1985).

Gugus gula pada zona pelusida tersebut, selain bermanfaat dalam proses fertilisasi, juga memberi efek samping yang merugikan. Adanya gugus gula manosa pada permukaan spermatozoa misalnya memungkinkan bakteri *E.coli* melekat pada spermatozoa. Bakteri *E.coli*

Tabel 1 Tingkat perkembangan embrio setelah dicemari bakteri *E.coli* K99 dan diinkubasi selama 24 jam

Perlakuan embrio	embrio**	Jumlah embrio yang berkembang (%)				Jumlah embrio
		Morula kompak	Blastosis	Blastosis ekspan	Total degenerasi	
Tanpa zp*	20	3 (15,0)	2 (5,0)	0 (0,0)	5 (20,0)	7 (35,0)
Zp utuh*	16	9 (56,3)	1 (6,3)	0 (0,0)	10(62,6)	4 (25,0)
Kontrol	12	9 (75,0)	2 (17,0)	1 (8,0)	12(100,0)	0 (0,0)

* Embrio yang dicemari bakteri *E. coli*. **Embrio tahap 8-sel.

mungkin dapat terbawa oleh spermatozoa yang akan membuahi sel telur, dan hal ini akan berpeluang menginfeksi embrio yang terbentuk, di samping itu bakteri *E.coli* dapat menjadi pengikat yang menghubungkan antar spermatozoa. Ikatan ini membuat spermatozoa terikat dengan sesamanya, sehingga spermatozoa-spermatozoa itu menjadi tidak lincah, tidak leluasa bergerak, dan akhirnya tidak dapat melakukan pembuahan terhadap oosit (Wolff *et al.*, 1993).

Sifat patogenisitas enterotoksigenik *E.coli* seperti *E.coli* K99 keganasannya ditentukan oleh: kemampuannya memproduksi enterotoksin dan antigen perlekatan yang dihasilkan agar dapat mengkolonisasi organ targetnya (Supar 1997). Antigen perlekatan (*adhesin*) yang disebut juga pili atau fimbriae ini berupa tonjolan-tonjolan di permukaan bakteri berbentuk seperti filamen atau benang-benang halus. Antigen perlekatan seperti F4(K88) dan F6(987P) merupakan faktor kolonisasi penting pada kasus anak babi, sedangkan F5(K99), F41 merupakan antigen perlekatan yang penting untuk menempel pada usus anak sapi dan atau anak babi. Bakteri-bakteri tersebut berpotensi mencemari proses produksi embrio atau penyiapan semen untuk keperluan inseminasi buatan.

Perlekatan antigen perlekatan atau fimbriae F5(K99), F41, dan F4(K88) semuanya melalui pola *mannose resistant hemagglutination* atau MRHA (Vazquez *et al.*, 1996). Selain itu, sejumlah galur enterotoksigenik dan septikhemik asal sapi memiliki antigen fimbriae yang dinamai CS31A. Antigen ini berupa subunit protein dengan bobot molekul 29 kDa. Bobot molekul fimbriae bakteri K99 adalah 17 kDa dan 29,3 kDa, berat molekul fimbriae F41 sekitar 30,9 kDa dan 29,3 kDa, sedangkan berat molekul fimbriae K88 adalah 29,3 kDa. Pada satu bakteri *E.coli* di samping memiliki satu jenis fimbriae, mungkin pula memiliki fimbriae K99 dan F41, seperti pada kelompok bakteri *E.coli* O₁₀₁ dan O₉ (Supar 1996). Keberhasilan bakteri *E.coli* K99 melekat pada embrio sapi (Otoi *et al.*, 1993) dan embrio mencit (Batan *et al.*, 2006) membuka kemungkinan bakteri patogen *E.coli* lainnya mampu melekatkan dirinya pada embrio.

Selama embrio yang mengalami pencemaran dikultur dalam media tanpa antibiotik, terjadi pula perkembangan jumlah bakteri pencemar, sehingga jumlah bakteri itu menjadi semakin banyak (Otoi *et al.*, 1993;

Bielanski *et al.*, 2000). Dalam penelitian ini, kultur KSOM yang dipakai untuk mengembangkan embrio sama sekali tidak diberikan antibiotik, agar tidak memengaruhi bakteri *E.coli* K99. Padatnya jumlah bakteri pada suatu sistem biakan embrio akan mendorong terjadinya perebutan zat-zat nutrisi yang terkandung pada medium KSOM, antara bakteri dengan embrio. Semakin padat jumlah bakteri, berarti bahan nutrisi untuk pertumbuhan embrio akan semakin terbatas. Adanya bakteri pencemar yang bertambah banyak membuat suasana lingkungannya menjadi toksik, sebagai akibat bakteri yang berkembang dalam biakan itu menghasilkan produk-produk metabolik seperti hidrogen peroksida dan amonium. Keadaan yang toksik ini akan mengakibatkan laju perkembangan embrio melamban atau terhenti (Bielanski *et al.*, 2000), seperti yang terlihat pada embrio perlakuan yang dicemari bakteri *E. coli* K99.

Pada perlakuan embrio yang tidak memiliki zona pelusida, bakteri *E.coli* K99 dapat langsung mencapai membran plasma dari blastomer atau sel-sel embrio, karena ketiadaan zona pelusida sebagai barier pelindung (Gambar 1B dan 1D). Gilbert (1988), melaporkan bahwa permukaan sel-sel blastomer embrio yang zona pelusidanya dihilangkan ditemukan glikogen yang tersebar pada membrannya. Dengan demikian bakteri *E.coli* K99 pencemar tersebut akan melekat pada gugus gula membran plasma blastomer. Membran plasma secara umum mengandung sedikit karbohidrat. Sebagai contoh pada sel darah, kandungan karbohidrat pada membran plasmanya sekitar 8%, terutama dalam bentuk glikoprotein dan berbentuk rantai pendek. Rantai gula ini hanya ditemukan pada permukaan luar membran plasma (Becker dan Deamer 1991).

Pada perlakuan, embrio tanpa zona yang dicemari dengan bakteri *E.coli* K99, terlihat bahwa ikatan antar sel blastomer menjadi renggang dan pada sel-sel blastomer tampak teramati tonjolan-tonjolan sitoplasma. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* mungkin memengaruhi sel-sel blastomer. Toksin tahan panas bakteri *E.coli* bekerja mengikat guanilat siklase yang berada pada membran apikalis sel-sel inang. Ikatan ini akan mengaktifkan kerja guanilat siklase. Pengaktifan guanilat siklase akan mengakibatkan terjadinya perubahan kadar cGMP, dan hal ini memengaruhi sejumlah proses di dalam sel-sel, termasuk aktivitas pertukaran ion. Gangguan aktivitas pertukaran

ion mengakibatkan terjadinya pengeluaran cairan yang berlebihan dari sel-sel yang dikolonisasi oleh bakteri (Salyers dan Whitt 1994).

SIMPULAN

Cemaran *E.coli* K99 terhadap embrio yang memiliki zona pelusida utuh maupun embrio tanpa zona pelusida, dapat mengakibatkan perkembangan embrio terhambat dan kematian (degenerasi). Zona pelusida mampu melindungi embrio dari infeksi bakteri *E. coli* K99.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemungkinan cara membersihkan embrio yang tercemar dengan *E.coli* K99. Seperti yang telah direkomendasikan oleh *the International Embryo Transfer Society*, yakni pembasuhan dengan PBS atau tripsin serta alternatif metode lain yang efisien.

DAFTAR PUSTAKA

- Batan IW, Boediono A, Djuwita I, Lay BW, Supar. 2006. Pelacakan perlekatan bakteri *Echerichia coli* K99 pada zona pelusida embrio mencit dengan metode *enzym linked immunosorbent assay* (elisa) dan *scanning electron microscope* (SEM). *J Veteriner*. 2006 (7): 29-38.
- Becker WM, Deamer DW. 1991. *The world of the cell*. IInd Ed. The Benjamin/Cummings Co.Inc. Singapore. Pp. 171-172.
- Bielanski A, Devenish J, Phipps-Todd B. 2000. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in Semen on Fertilization and Association with *in vitro* Produced Morula and Blastocyst Stage Embryo. *Theriogenology* 53: 1213-1223.
- Boediono A, Ooe M, Yamamoto M, Takagi M, Saha S, Suzuki T. 1993. Production of chemeric calves of *in vitro* fertilized embryos without zone pellucidae. *Theriogenology* 40: 1221-1230.
- Dean EA, Isaacson RE. 1985. Purification and characterization of receptor for the 987P pilus of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 47(1): 98-105.
- Dudkiewicz A.B, Shivers C A,Williams W L. 1976. Ultrastructure of the hamster zona pellucida treated with zona precipitating antibody. *Biol Reprod* 14: 175-185.
- Dunbar B.S, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwoebel D. 1994. The mammalian zona pellucida : its biochemistry, molecular biology, and development expression. *Reprod Fertil Dev* ; 6 : 331-347.
- Gilbert FS. 1988. *Development biology*. Massachusetts: Sinauer Assoc. Inc. Pub. Pp. 82-92.
- Guinee PAM, Veldkamp J, Jansen WH. 1977. Improved minca medium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect.Immun* 15:676-678.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo a laboratory manual*. 2nd Ed. Danvers: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 49.
- Jones R. 1990. Identificatian and functions of mammalian sperm-egg recognition molecules during fertilization. *J. Reprod Fertil*. 42 : 89-105.
- Konwinski M, Solter D, Koprowski H. 1978. Effect of removal zona pellucida on subsequent development of mouse blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil*. 54:137-143.
- Lai AC-H, Ryan J P, Saunders D M. 1994. Removal of zona pellucida and parthenogenetic activation affect rates of survival of ultrarapidly frozen mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 6:771-775.
- Miller DJ, Ax RL. 1990. Carbohydrat and fertilization in animals. *Mol Reprod Dev*, 26: 184-198.
- Miyano, T., Hirao Y, Ikeda Y, Kato S. 1994. Zona pellucida formation by naked mouse oocytes grown *in vitro*. *J Reprod Dev* 40: 189-195.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki S. 1992. Effect of antibiotics treatment of *in vitro* fertilized bovine embryos to remove adhering . *J. Vet. Med. Sci*. 54 (4): 763 - 765.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T. 1993. Effect of washing, antibiotic and trypsin treatment of bovine embryos on the removal of adhering K99 *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. Sci*. 55 (6): 1053-1055.

- Rifqiyati N, Toelihere MR, Agungpriyono S. 2006. Dinamika perkembangan morfologi dengan tinjauan khusus tentang gambaran dan karakteristik histokimia folikel pada ovarium rusa timor (*Cervus timorensis*). Seminar Tesis Sekolah Pascasarjana IPB, 9 Februari 2006.
- Salyers AA, Whitt DD. 1994. *Escherichia coli* Gastrointestinal Infections. In *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. ASM Press. Washington. Pp:190-212.
- Skutelsky E, Ranen E, Shalgi R. 1994. Variation in distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species specific determinants of mammalian oocytes. *J Reprod Fertil*: 100:35-41.
- Stringfellow DA, Givens MD. 2000. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Animal Reproduction Sci*. 60-61: 629-642.
- Summer CM, McGinnis LK, Lawitts M, Raffin M, Biggers JD. 2000. IVF mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod*. 15(8): 1791-1801.
- Supar. 1997. Faktor-Faktor Virulensi Enterotoksin dan Perlekatan *Escherichia coli* Terhadap Kesehatan Ternak dan Manusia. *Wartazoa* 6(1): 7-17.
- Supar. 1986. Penggunaan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk deteksi antigen pili K99 dan K88 pada *Escherichia coli* dari anak sapi dan anak babi diare. *Penyakit Hewan* Vol XVIII, No 32:159-167.
- Vazquez F, Gonzales EA, Garabal JI, Blanco J. 1996. Fimbriae Extracts from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Bovine and Porcine Origin with K99 and/or F41 Antigens. *Vet Microbiol* 48: 231-241.
- Wasaarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. 1999. Structure and functions of mammalian egg zona pellucida. *J Exp. Zool*. 285: 251-258.
- Wassarman PM. 1994. Gamete interaction during mammalian fertilization. *Theriogenology*, 41:31-44.
- Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M. 1993. Adherence of *Escherichia coli* to sperm : a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *Escherichia coli*. *Fertil Steril* 60(1):154-158.
- Wrathall A E. 1995. Embryo tranfer and disease transmission in livestock; A review of recent research. *Theriogenology*. 43: 81-88.
- Wu GM., Lai L. Mao J, McCauley T C, Caamano JN, Cantley T, Rieke A, Murphy C N, Prather R S, Didion B A, Day B N. 2004. Birth piglet by in vitro fertilization of free zona porcine oocyte. *Theriogenology* 62: 1544-1556.