

PEMANFAATAN SEL KUMULUS PADA MEDIUM KULTUR □IN VITRO  
EMBRIO MENCIT TAHAP SATU SEL

**EFFICIENCY OF CUMULUS CELL ON CULTURE MEDIUM IN VITRO  
ONE CELL STAGE IN MICE EMBRYOS**

E. M. Luqman\*, Widjiati\*, B. P. Soenardirahardjo\*,  
E. D. Masithah\*, H. A. Hermadi\*\*.

**ABSTRACT**

The aim of this research was to determine the influence of cumulus cell on in vitro culture medium toward mice embryos development from one cell until blastocyst stages.

This research used two months old female and adult male mice, superovulated with PMSG and HCG. After collecting oocytes, then fertilization was carried out in vitro. After six hour zygotes were transferred to a culture medium M16, some zygotes was cultured with cumulus cell and others without cumulus cell.

The result of research showed that one cell embryo that cultured without cumulus cell were better than cultured with cumulus cell. Indicating cumulus cells probably increased glucose metabolism. Early development of embryo of mice do not need much glucose after passing block development cell. Therefore in take of high glucose at early development will reduced of the development embryo at one cell stage. The number of embryo developed until blastocyst were higher in embryo cultured without cumulus cells than cultured with cumulus cells.

**PENDAHULUAN**

Pada kultur in vitro kendala yang sering dialami adalah hambatan perkembangan embrio terutama pada tahap dini sehingga persentase embrio yang berkembang mencapai tahap blastosis menjadi rendah, tetapi bervariasi tergantung dari spesies hewan (Miyoshi *et al.*, 1994). Hambatan perkembangan embrio pada kultur in vitro dipengaruhi oleh kondisi fisiologis medium kultur. Komposisi zat-zat dalam medium kultur sangat mempengaruhi kondisi optimum medium kultur. Pada sapi kultur embrio tahap dini dengan sel-sel kumulus tampaknya akan meningkatkan perkembangan embrio mencapai tahap blastosis. Sel kumulus mampu merangsang proses pembelahan sel (Saito *et al.*, 1994). Sel kumulus berperan sebagai sumber makan oosit dan embrio terutama menghasilkan piruvat. Sel kumulus juga membantu metabolisme glukosa menghasilkan energi untuk pertumbuhan embrio lanjut (Gardner *et al.*, 1996). Namun demikian pada mencit, tahap awal perkembangan glukosa yang dibutuhkan rendah.

---

\* ) Laboratorium Fisiologi Reproduksi FKH Unair

\*\* ) Laboratorium Kemajiran FKH Unair

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh sel kumulus dalam medium kultur in vitro terhadap perkembangan embrio mencit dari tahap satu sel sampai tahap blastosis.

## **METODE PENELITIAN**

Hewan penelitian yang digunakan adalah mencit betina (*Mus Musculus*) strain CBR berumur 2 bulan dan mencit jantan (*Mus Musculus*) strain CBR yang sudah siap kawin. Bahan penelitian yang digunakan adalah : medium phosphate buffer saline (PBS), medium M<sub>16</sub>, Medium Tyrode(T<sub>6</sub>), bovine serum albumin (BSA), hyaluronidase dan mineral oil (Squib).

Peralatan yang digunakan adalah mikroskop inverted stereo, inkubator CO<sub>2</sub>, refrigerator, sentrifus, analitic balances, mikropipet otomatis, gunting, skalpel, pinset, spuit disposibel dan peralatan habis pakai (tip mikro, cawan petri, mikrofilter, pipet Pasteur). Chemically defined medium yang digunakan pada penelitian ini adalah PBS untuk koleksi oosit, Medium T<sub>6</sub> (Tyrode) untuk fertilisasi in vitro dan medium M<sub>16</sub> untuk kultur in vitro.

Pada perlakuan pertama dilakukan kultur in vitro embrio mencit tahap satu sel yang masih intak sel kumulusnya. Pada perlakuan ke dua dilakukan kultur in vitro embrio mencit tahap satu sel yang sudah tidak dikelilingi sel-sel kumulus yaitu dengan cara melarutkan sel-sel kumulus dengan enzim hyaluronidase 1 %.

Pengamatan perkembangan pada tahap fertilisasi in vitro berdasarkan jumlah dan persentase embrio yang terpenetrasi dan terbentuknya pronukleus jantan dan betina. Kemudian pengamatan pada tahap kultur in vitro dilakukan dengan menghitung jumlah

embrio yang berkembang mencapai tahap 2 sel, tahap 4 sel, tahap 8 sel, tahap morula dan tahap blastosis pada masing-masing perlakuan.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **1. Pengaruh Kultur in vitro Embrio Mencit Tahap Satu Sel Yang Masih Dikelilingi Sel Kumulus Terhadap Perkembangan Embrio.**

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur in vitro embrio mencit tahap satu sel yang masih dikelilingi sel kumulus memberikan perbedaan yang tidak nyata ( $p > 0.01$ ) terhadap tingkat perkembangan embrio (Tabel 1).

Kondisi ini berbeda pada hewan mamalia (sapi). Oosit yang dimatangkan adalah oosit yang mempunyai kualitas A yaitu oosit dengan sel-sel kumulus yang masih lengkap dan berlapis-lapis. Pematangan hingga kultur embrio dengan menggunakan sel-sel kumulus yang masih lengkap memberikan hasil yang lebih baik, karena sel-sel kumulus merupakan mediator bagi mekanisme kerja hormon Luteinizing Hormone (LH) (Younis *et al.*, 1989 ; Shioya *et al.*, 1988). Adanya hormon gonadotropin dalam medium kultur sangat diperlukan untuk keberhasilan in vitro maturation (IVM) (Harper and Brackett, 1992; Chian *et al.*, 1994). Sel-sel kumulus

pada pematangan oosit dan kultur embrio dalam medium dapat mempertinggi metabolisme glukosa (Brackett and Zuelke, 1993).

Tabel 1. Pengaruh Kultur in vitro Embrio Mencit Tahap Satu Sel Yang Masih Dikelilingi Sel Kumulus dan Tanpa Sel Kumulus Terhadap Perkembangan Embrio.

| Perlakuan      | Ulangan | Jumlah sigot yang dikultur | Persentase dan jumlah embrio yang berkembang |                      |                     |                     |                    |
|----------------|---------|----------------------------|----------------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|                |         |                            | 2 sel                                        | 4 sel                | 8 sel               | Morula              | Blastula           |
| Dengan Kumulus | 1       | 30                         | 30(100)                                      | 24(80) <sup>b</sup>  | 8(33) <sup>b</sup>  | 3(38) <sup>b</sup>  | 0(0)               |
|                | 2       | 35                         | 35(100)                                      | 22(63) <sup>b</sup>  | 10(45) <sup>b</sup> | 4(40) <sup>b</sup>  | 1(25) <sup>b</sup> |
|                | 3       | 24                         | 24(100)                                      | 20(83) <sup>a</sup>  | 11(55) <sup>b</sup> | 5(45) <sup>b</sup>  | 2(40) <sup>b</sup> |
| Tanpa Kumulus  | 1       | 26                         | 26(100)                                      | 26(100) <sup>a</sup> | 13(50) <sup>a</sup> | 6(48) <sup>a</sup>  | 0(0)               |
|                | 2       | 40                         | 40(100)                                      | 38(95) <sup>a</sup>  | 18(47) <sup>a</sup> | 12(67) <sup>a</sup> | 8(67) <sup>a</sup> |
|                | 3       | 32                         | 32(100)                                      | 26(81) <sup>b</sup>  | 18(69) <sup>a</sup> | 8(87) <sup>a</sup>  | 4(50) <sup>a</sup> |

Superskrip a, b dan c pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.01$ )

Rendahnya embrio yang berkembang mencapai tahap blastosis disebabkan karena adanya sel-sel kumulus yang masih utuh sehingga akan mempertinggi metabolisme glukosa dalam medium. Hal ini sejalan dengan pendapat Betteridge *et al.* (1985) bahwa glukosa penting untuk perkembangan embrio meskipun hanya dalam konsentrasi rendah, sehingga dengan tingginya metabolisme glukosa pada tahap awal perkembangan embrio justru akan menghambat perkembangan embrio mencapai tahap blastosis.

Kondisi ini berbeda pada sapi, pematangan oosit dilakukan secara in vitro sehingga diperlukan sel-sel kumulus yang utuh dan berlapis-lapis untuk menghasilkan metabolisme yang tinggi akibatnya akan menginduksi hormon Luteinizing Hormone (LH) dan meningkatkan aktivitas tricarboxylic acid (TCA) dan menambah ketersediaan Adenosin Triphosphat (ATP) yang diperlukan (Brackett and Zuelke, 1993).

## 2. Pengaruh Kultur In Vitro Embrio Mencit Tahap Satu Sel Yang Tidak Dikelilingi Sel Kumulus Terhadap Perkembangan Embrio.

Dari hasil penelitian menunjukan bahwa kultur in vitro embrio mencit tahap satu sel yang tidak dikelilingi sel kumulus memberikan perbedaan yang nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap tingkat perkembangan embrio (Tabel 1 ).

Kultur embrio mencit tahap satu sel tanpa sel kumulus lebih baik dibandingkan dengan kultur embrio mencit tahap satu sel yang masih dikelilingi sel kumulus. Hal ini jika dilihat dari keberhasilan perkembangan embrio mencapai tahap blastosis. Pada kultur embrio tanpa sel kumulus jumlah embrio yang berkembang cukup tinggi

dibandingkan dengan kultur embrio mencit tahap satu sel yang masih dikelilingi sel kumulus. Hal ini berbeda pada sapi, apabila sel-sel kumulus dilepaskan sebelum dikultur maka akan tidak terjadi pematangan oosit dan akan menghambat perkembangan embrio. Pada sapi kultur dengan sel-sel kumulus lengkap menunjukkan perkembangan lebih baik dibandingkan dengan yang tanpa sel-sel kumulus (Younis *et al.*, 1989).

Berbeda pada mencit, proses pematangan oosit terjadi secara *in vivo*. Setelah fertilisasi, untuk awal pembelahan tidak banyak membutuhkan glukosa sebagai sumber energi, ini berkaitan dengan sistem metabolisme mencit. Setelah melewati hambatan perkembangan kebutuhan glukosa meningkat. Perlu diketahui bahwa adanya sel-sel kumulus akan meningkatkan metabolisme glukosa. Ditunjukkan pada kultur embrio mencit tahap satu sel tanpa sel kumulus hasilnya lebih baik dibandingkan dengan adanya kumulusnya. Menurut Brown *et al.* (1991) bahwa rendahnya metabolisme glukosa pada tahap awal pembelahan berhubungan dengan sintesa glikogen. Tingkat glikogen diketahui tinggi pada tahap pertama dan kedua pembelahan sel pada embrio mencit. Pada awal pembelahan pertama, embrio mencit dapat memakai piruvat tetapi tidak bisa memakai laktat jika tidak ada glukosa. Ini disebabkan oleh perbandingan ATP dan ADP yang tinggi. Perbandingan ATP dan ADP yang tinggi menyebabkan pengeluaran elektron menjadi kurang seimbang, sehingga NAD<sup>+</sup> yang diperlukan untuk mengubah laktat menjadi piruvat dengan bantuan laktat dehidrogenase menjadi piruvat terbatas (Takahashi *et al.*, 1992).

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan:

1. Kultur embrio mencit tahap satu sel yang masih dikelilingi sel-sel kumulus menyebabkan perkembangan embrio mencapai tahap blastosis rendah.
2. Kultur embrio mencit tahap satu sel tanpa sel kumulus dapat meningkatkan jumlah embrio yang berkembang mencapai tahap blastosis.

Berdasarkan hasil penelitian maka disarankan:

Agar dapat dilakukan penelitian kebutuhan glukosa optimal untuk perkembangan dini embrio sehingga dapat diketahui jumlah glukosa yang diperlukan pada tahap awal pembelahan, dengan demikian dapat mengatasi hambatan perkembangan atau sel blok.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Betteridge, B. and R. W. Wright. 1985. Development of One Cell Ovine Embryos into Culture Media Under Two Gas Atmospheres. *J. Theriogenology* 23 : 547-555.
- Brackett, B. G., and K. A. Zuelke. 1993. Analysis of Factor Involved in The *in Vitro* Production Bovine Embryo. *J. Theriogenology*. 39: 43-64.

- Brown, J. G. and D. G. Whitingham. 1991. The Rules of Pyruvate, Lactate and Glucose During Preimplantation Development of Embryo From F1 Hybrite Mice in Vitro. *J. Development* 112 : 99-105.
- Chian, R. c. and K. Niwa. 1994. Effect of Cumulus Cell Present During Different Periods of Culture on Maturation in Vitro of Bovine Oocytes. *J. Theriogenology* 41 : 176.
- Gardner, D. K., M. Lane, I. Calderon and J. Leeton. 1996. Environment of the Preimplantation Human Embryo In Vivo : Metabolite Analysis of Oviduct and Uterine Fluids and Metabolism of Cumulus Cells. *J. Fert. and Sterility*. Vol. 65.
- Harper, K. M., and B. G. Brackett. Bovine Blastocyst Development After in Vitro Maturation in A Defined Medium With Epidermal Growth Factor and Low Concentration of Gonadotropins. *Biol. Reprod.* Accepted.
- Miyoshi, K., H. Funahashi, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Development of Rat One Cell Embryos in a Chemically Defined Medium; Effects of Glucose, Phosphate and Osmolarity. *J. rep. and Fert.* 100 : 21-26.
- Saito, H., T. Hirayama, K. Koike, T. Saito, M. Nohara and M. Hiroi. 1994. Cumulus Mass Maintains Embryo Quality. *J. Fert. and Sterility*. Vol. 62.
- Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima and S. Iwasaki. 1988. In Vitro Fertilization and Cleavage Capability of Bovine Follicular Oocyte Classified by Cumulus Cell and Matured in Vitro. *J. Theriogenology* 30 : 3.
- Younis, A. I., B. G. Brackett and R. A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of Serum and Hormones on Bovine Oocyte Maturation and Fertilization in Vitro. *Gamete Research* 23: 189-201.