

Pengaruh Berbagai Konsentrasi Krioprotektan Propanediol pada Proses Vitrifikasi Terhadap Viabilitas Embrio Mencit Pasca *Thawing*

The Effects Of Various Concentration Propanediol Cryoprotectan at Vitrification Process To Viability Of Mice Embryos Post *Thawing*

¹Widjiati, ²Agmi Wan Ratri, ¹M. Zainal Arifin

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : widjiati@yahoo.com

Abstract

This experiment was doing to know the effects concentration of cryoprotectant at vitrification on viability of mice's embryos. Embryos were exposed to a different concentration of propanediol cryoprotectant, that is concentration 10%, 20% and 30%. Embryos were kept in mini straw and then plunged into liquid nitrogen rapidly. After 2 week, the frozen embryos were thawed in a 30°C water bath and be washed twice in 0,5 M Sucrose. Viability of embryos was examined used inverted microscope. The result showed there have a significant differences ($p < 0,05$) for embryos survival among treatment of propanediol 10% (46,95 %), propanediol 20% (51,73 %) and propanediol 30% (54,94 %). A various concentration of cryoprotectant was give a different result at embryos viability. The conclusion of this experiment there is a real difference ($p < 0,05$) at a various concentration of propanediol cryoprotectant with a good result give in propanediol 30% (54,94 %).

Keywords : vitrification, cryoprotectant, concentration, viability, embryos

Pendahuluan

Selama tiga dekade terakhir ini bioteknologi reproduksi berkembang sangat pesat. Ruang lingkup bioteknologi reproduksi antara lain meliputi fertilisasi *in vitro* (IVF), manipulasi embrio, pembekuan gamet dan embrio, serta transfer embrio. Pada fertilisasi *in vitro* (IVF) terdapat dua kegiatan utama yaitu pemasakan telur *in vitro* dan pengembangan embrio *in vitro*. Material utama yang digunakan untuk memproduksi embrio secara *in vitro* adalah embrio yang diperoleh dari induk yang memiliki genetik unggul dan embrio tersebut akan dikembangkan secara *in vitro* sampai tahap blastosis. Hasil dari embrio yang telah diproduksi secara *in vitro* akan digunakan untuk keperluan transfer embrio (Margawati, 1996).

Kelebihan embrio yang diproduksi secara *in vitro* adalah dapat disimpan dan sewaktu-waktu dapat digunakan kembali untuk transfer embrio. Penyimpanan embrio tersebut dilakukan dengan cara dibekukan. Pembekuan embrio tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan cara konvensional tetapi prosesnya bertahap dan membutuhkan waktu yang lama, sedangkan pembekuan embrio yang sederhana dapat dilakukan dengan teknik vitrifikasi. Teknik

vitrifikasi ini dapat menjadi salah satu alternatif dalam pembekuan embrio karena proses pembekuan yang dilakukan akan menjadi lebih efisien, lebih murah serta lebih sederhana (Cseh *et al.*, 1997).

Kelebihan teknik vitrifikasi adalah tidak terbentuk kristal es, sehingga tidak merusak sel, selain itu tidak memerlukan waktu yang lama dalam proses pembekuan dan peralatan yang digunakan tidak semahal pada metode sebelumnya. Pembekuan embrio dengan metode vitrifikasi dilakukan secara cepat pada temperatur -196 °C dan menggunakan krioprotektan konsentrasi tinggi, sehingga dapat menghindari terbentuknya kristal es yang dapat merusak membran sel saat pembekuan. Kristal es intraseluler secara mekanis dapat merusak organel sel sehingga menyebabkan kematian pada sel tersebut (Gao and Critser, 2000). Keunggulan dari teknik vitrifikasi adalah tidak terbentuknya kristal es yang dapat mematikan embrio selama proses pembekuan, sehingga teknik vitrifikasi lebih banyak disukai (Takahashi *et al.*, 2005).

Kelemahan atau kekurangan dari teknik vitrifikasi adalah embrio yang disimpan dengan cara dibekukan sering kali dapat menurunkan viabilitas embrio setelah *thawing*, maka perlu alternatif lain

untuk mengurangi kerusakan yang terjadi setelah *thawing* yaitu dengan menggunakan konsentrasi krioprotektan yang tepat. Krioprotektan berfungsi sebagai pelindung dan memelihara keutuhan membran serta meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan didalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi (Vajta *et al.*, 1997).

Teknik kriopreservasi yang dilakukan pada proses pembekuan embrio umumnya dengan menggunakan metode *slow freezing*, *rapid freezing* dan *ultra rapid freezing* (Rimayanti, 2006). Krioprotektan yang digunakan pada metode vitrifikasi adalah krioprotektan yang mempunyai konsentrasi tinggi atau hiperosmolaritas. Materi yang akan dibekukan awalnya ditempatkan pada media hiperosmolaritas tersebut kemudian dicelupkan kedalam nitrogen cair sehingga larutan yang beku ini seolah-olah menjadi seperti kaca (Rimayanti, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Supriatna dkk. (2000) diperoleh hasil bahwa Propanediol dapat digunakan sebagai krioprotektan dalam proses vitrifikasi embrio. Propanediol sering digunakan dalam penelitian karena Propanediol merupakan salah satu krioprotektan yang bersifat intraseluler yang memiliki ukuran molekul kecil sehingga dapat keluar masuk melalui membran sel dan dapat mengurangi kerusakan yang terjadi akibat proses vitrifikasi, maka diperlukan konsentrasi yang tepat yaitu dengan menggunakan krioprotektan berkonsentrasi tinggi sehingga membran sel dapat terlindungi dari *cold shock* yang berpengaruh terhadap tingkat viabilitas embrio yang dibekukan.

Penelitian ini akan mencoba penggunaan metode vitrifikasi dengan menggunakan krioprotektan Propanediol dengan konsentrasi yang berbeda sebagai pembanding untuk mengetahui tingkat efektifitasnya terhadap viabilitas embrio pasca *thawing*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi efektif krioprotektan Propanediol pada proses vitrifikasi, terhadap viabilitas embrio mencit pasca *thawing*.

Materi dan Metode Penelitian

Superovulasi

Mencit betina berumur 2–3 bulan sebanyak lima ekor disuperovulasi dengan penyuntikan hormon PMSG (Foligon) dengan dosis 5 IU, 48 jam kemudian mencit tersebut disuntik dengan hCG (Chorulon) 5 IU secara subcutan (Lin *et al.*, 2003). Setelah disuntik hCG, mencit betina langsung di-kawinkan dengan mencit jantan secara *monomating*. Tujuh belas jam setelah mencit betina dikawinkan dilakukan pemeriksaan *vagina plug*. Mencit betina yang positif *vagina plug* dihitung umur kebuntingan 1 hari (Matahine dkk., 2008).

Koleksi dan Identifikasi Embrio

Pada umur kebuntingan hari pertama, mencit betina selanjutnya dikorbankan dengan cara *dislocatio os cervicalis* dan dibedah kemudian diambil uterusnya sampai dengan tuba falopii dan selanjutnya direndam dalam NaCl fisiologis 0,9 %, kemudian embrio tahap satu sel dikoleksi dengan cara menyobek kantung fertilisasi. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk dilihat morfologi dan jumlah embrionya.

Persiapan Krioprotektan

Krioprotektan yang digunakan yaitu Propanediol, yang dibagi dalam 3 kelompok perlakuan yaitu :

Kelompok 1 : krioprotektan Propanediol 10 % + PBS dengan waktu pemaparan 5 menit

Kelompok 2 : krioprotektan Propanediol 20 % + PBS dengan waktu pemaparan 5 menit

Kelompok 3 : krioprotektan Propanediol 30 % + PBS dengan waktu pemaparan 5 menit

Vitrifikasi

Embrio hasil koleksi dicuci dengan PBS dan dibagi dalam 3 perlakuan dan selanjutnya embrio dipapar pada cawan petri yang masing – masing cawan berisi Propanediol 10%, 20 % dan 30 % + embrio tahap satu sel selama 5 menit. Lalu dikemas dalam mini straw 0,5 ml dan dipaparkan pada uap nitrogen cair selama 10 detik dan langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Embrio dibiarkan didalam nitrogen cair selama 14 hari.

Pencairan Kembali (*Thawing*)

Setelah dibekukan dan disimpan selama 14 hari, dilakukan pencairan kembali dengan cara memasukkan mini straw ke penangas air bersuhu 30°C sampai kristal es dalam diluen hilang. Segera setelah hangat seluruh isi mini straw dikeluarkan ke dalam cawan petri.

Pembilasan Krioprotektan

Embrio yang telah dikeluarkan dari ministraw dibilas dua kali dengan sukrosa 0,5 M dan 0,1 M yang berfungsi untuk menghilangkan krioprotektan, seperti prosedur yang dilakukan oleh Rimayanti (2005). Setelah mengalami pembilasan krioprotektan, embrio diperiksa dibawah mikroskop *inverted* untuk diamati morfologinya.

Penilaian Viabilitas Embrio

Viabilitas embrio setelah pencairan kembali dan pembilasan krioprotektan ditentukan berdasarkan morfologis normalnya yaitu: plasma membran utuh, embrio tidak bergranula, sitoplasma jernih dan homogen, tidak ada degenerasi, zona pelucida dan sitoplasma berbatas jelas (Rimayanti, 2006). Morfologi dari embrio yang tidak normal adalah bentuknya

tidak teratur dan terjadi degenerasi serta berfragmentasi (Bavister, 1995).

Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam kali ulangan. Data yang diperoleh dari penelitian tersebut dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Data persentase ditransformasikan kedalam arc sin. Bila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil 5 % (BNT 5 %) untuk mengetahui perlakuan terbaik. Pengerjaan analisis statistik diolah menggunakan program SPSS (*Statistical Program of Social Science*).

Hasil dan Pembahasan

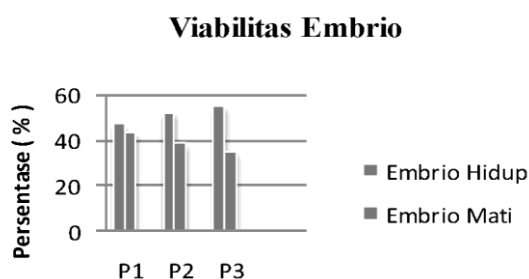
Data tentang persentase viabilitas embrio mencit pasca *thawing* setelah diberi berbagai macam konsentrasi krioprotektan dengan tiga perlakuan : krioprotektan Propanediol konsentrasi 10% dengan lama waktu pemaparan 5 menit (P1), krioprotektan Propanediol konsentrasi 20% dengan lama waktu pemaparan 5 menit (P2) dan krioprotektan Propanediol konsentrasi 30% dengan lama waktu pemaparan 5 menit (P3) tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi persentase viabilitas embrio mencit pasca *thawing*

Perlakuan (t)	Viabilitas Embrio (%) (rerata ± standar deviasi)
(P1)	46,95 ^a ± 4,90
(P2)	51,73 ^a ± 4,07
(P3)	54,94 ^b ± 6,12

Keterangan : superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata (p<0,05)

Berdasarkan tabel diatas, diagram batang rerata persentase viabilitas embrio mencit pasca *thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 1. Diagram batang persentase viabilitas embrio mencit pasca *thawing*

Propanediol merupakan krioprotektan yang biasa digunakan dalam vitrifikasi, karena propanediol memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menjaga kondisi morfologi normal suatu sel dalam proses vitrifikasi (Supriatna dkk, 2000). Menurut laporan Arav *et al.*, (1993), propanediol memiliki permeabilitas yang tinggi dan efek toksisitasnya rendah. Propanediol juga lebih unggul karena stabilitasnya lebih besar dan kemampuan dalam pembentukan kristal es rendah (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Meskipun demikian, beberapa penelitian menunjukkan hasil yang berbeda tergantung dari spesies yang digunakan, tahapan embrio yang digunakan dan konsentrasi krioprotektan.

Walaupun propanediol merupakan krioprotektan yang memiliki toksisitas rendah, tetapi dalam penggunaannya harus diperhatikan. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kematian pada sel atau embrio yang divitrifikasi. Teknik kriopreservasi yang baik akan dapat mempertahankan viabilitas sel dengan cara mereduksi fungsi dan aktivitas metabolik yang normal dari embrio tanpa terjadinya kerusakan membran maupun organel dari embrio.

Viabilitas embrio dinyatakan dalam persentase jumlah sigot hidup per seluruh sigot yang teramati. Pengamatan viabilitas embrio dilakukan dengan pemeriksaan sigot dibawah mikroskop *inverted*. Pemeriksaan viabilitas embrio pasca *thawing* dinilai berdasarkan morfologi normalnya, yaitu plasma membran utuh, embrio tidak bergranula, sitoplasma jernih dan homogen, tidak ada degenerasi, zona pelucida dan sitoplasma berbatas jelas (Rimayanti, 2006). Morfologi dari embrio yang tidak normal adalah bentuknya tidak teratur, terjadi degenerasi, berfragmentasi serta terjadi piknosis pada selnya yang mengakibatkan embrio tersebut mati (Bavister, 1995).

Hasil pemeriksaan persentase viabilitas embrio mencit *pasca thawing* setelah diberi perlakuan pada tabel 1. menunjukkan angka rerata dan standar deviasi berturut-turut adalah P1 sebesar 46,95 ± 4,90, P2 sebesar 51,73 ± 4,07 dan P3 sebesar 54,94 ± 6,12. Hasil pemeriksaan tersebut dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA dan menunjukkan bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel dengan p < 0,05 yang berarti terdapat perbedaan yang nyata antar P1, P2 maupun P3 tetapi perbedaan yang signifikan terjadi antar perlakuan 1 dengan 3, yaitu P1 sebesar 46,95 ± 4,90 dengan P3 sebesar 54,94 ± 6,12. Dari hasil tersebut, viabilitas embrio tertinggi diperoleh pada perlakuan ketiga (P3) yaitu propanediol dengan konsentrasi 30%, karena dengan konsentrasi yang tinggi akan memberikan perlindungan yang cukup bagi embrio yang akan divitrifikasi walaupun lama waktu pemaparannya hanya 5 menit. Selain itu, propanediol juga merupakan krioprotektan yang memiliki ukuran berat

molekul kecil sehingga mudah masuk kedalam membran sel (Supriatna dkk, 2000).

Propanediol adalah krioprotektan yang dapat dijadikan sebagai pilihan alternatif dalam kriopreservasi, karena pada beberapa penelitian dapat memberikan hasil yang efektif dengan dampak abnormalitas morfologinya kecil bila dibandingkan dengan krioprotektan lain yang berkonsentrasi 30% (Dike, 2009). Menurut Rall and Fahy (1985) yang dikutip oleh Dike and Paliniswamy (2011), keberhasilan suatu proses vitrifikasi diperoleh pada penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi yang tinggi tetapi efek toksik yang ditimbulkan oleh krioprotektan tersebut rendah.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada pemaparan konsentrasi krioprotektan Propanediol 10%, 20% dan 30% terhadap viabilitas embrio dan hasil viabilitas embrio yang terbaik diperoleh dari krioprotektan dengan konsentrasi sebesar 30% dengan lama waktu pemaparan 5 menit.

Daftar Pustaka

- Arav, A., D. Sheddu and M. Mattoli. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocyte. *J.Reprod Fertil.* 99(2) : 353 – 358.
- Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Reprod.Update.* 1 : 91–148.
- Cseh, S., J. Corselli, S.L. Nehlsen-Cannarella, L.L. Bailey and Szalay. 1997. The effect of quick freezing in ethylen glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology.* 48 : 43 – 50.
- Dike, I.P. 2009. Efficiency of intracellular cryoprotectants on the cryopreservation of sheep oocytes by controlled slow freezing and vitrification techniques. *J. Cell and Animal Biology.* 3(3) : 44 – 49.
- Dike, I.P and S Palaniswamy. 2011. Vitrification of sheep oocyte using propylene glycol and its effect on the viability and fertilizability and chromosome patterns. *International J. Current Research.* 3(4) : 69 – 73.
- Gao, D., and J.K.C Critser. 2000. Mechanisme of cryoinjury in living cells. *J. Institute of Laboratory Animal Research.* 41 : 187.
- Lin, H., J.Q Lie, D. Wininger, M.T. Nguyen, R. Khanna, C. Harthmann, W.L. Yan, and S.C. Huang. 2003. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *J. Stem cell.* 21 : 152-161.
- Margawati, T.E. 1996. Produksi embrio sapi secara in-vitro. *Warta Biotek.* 10 (2) : 3 – 6.
- Matahine, T., I. Supriatna., and A. Boediono. 2008. Produksi embryonic stem cell dari inner cell mass blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatik dan immunosurgery. *J. Stem cell.* 53 : 61- 63.
- Rall, W.F and G.M Fahy. 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. *Nature* 313: 573 – 575.
- Rimayanti. 2005. Pengaruh proses vitrifikasi dengan krioprotektan terhadap daya hidup oosit sapi. *Media Kedokteran Hewan.* 21(1) : 295.
- Rimayanti. 2006. Pengaruh lama pemaparan krioprotektan pada proses vitrifikasi terhadap morfologi dan daya hidup oosit sapi. [Thesis]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Supriatna, I., M. Gozali., dan B. Purwantara. 2000. Penerapan metode transfer langsung pada kriopreservasi embrio sapi perah. *Media Veteriner.* 6 (1) : 1 – 5.
- Takahashi, K., T. Mukaida., T. Goto., and C. Oka. 2005. Perinatal outcome of blastocyst with vitrification using cryoloop : 4 year follow up study. *J. Fertil Steril* 84 (1) : 88 – 89 .
- Vajta, G., P.J. Booth., P. Holm., T. Greeve., and H. Callesen. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryo with the open pull straw method (ops). *Cryoletter.* 18 : 191 – 195.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocyte and embryos in domestic animals. *Anim Reprod. Sci.* 61 : 357 – 364.