

Efek Suplementasi *Insulin Transferin Selenium* pada Media Vitrifikasi Embrio Mencit (*Mus musculus*) Tahap Morula terhadap Viabilitas Sel Blastomer dengan Teknik *Fluorescence* Pasca Warming

The Effects of *Insulin Transferin Selenium* Supplementation on Mice (*Mus musculus*) Embryos Vitrification Media at Morula Stage towards The Viability of Blastomere Cells Using *Fluorescence* Techniques After Warming

Didi Yudha Prawira¹, Widjiati², Arimbi²

¹PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya-60115

Telp. 031-5992185, Fax 031-5999015

Email: didiyudha9@gmail.com

Abstract

This research aimed to evaluate the influence of *Insulin Transferin Selenium* (ITS) supplementation on mice (*Mus musculus*) embryos vitrification media at morula stage towards the viability of blastomere cells using *fluorescence* techniques after *warming*. The experimental animals used were female mice strain Balb C which were superovulated using *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) and *Human Chorionic Gonadotropin*(hCG), subsequently monomating was carried out. Seventeen hours after vaginal plug examination, the mice were sacrificed by cervicalis dislocation, next the tuba fallopii was removed and fertilization pockets were torn. *In Vitro Fertilization* was done, then cultured for 72 hours to become morula stages. The morula embryos were classified into four groups: without ITS, ITS with 5 µg/100 ml, 10 µg/100 ml, and 15 µg/100 ml of concentration. Each treatment group was put into 0,25 ml *ministraw* and stored into liquid nitrogen for a week then warmed immediately. The post-warmed embryos were colored using fluorescent mark (*Hoechst* and *Propidium Iodide*) and cultured for 30 minutes. Observation of the viability of blastomere cells for morula embryos was done using fluorescent microscope. Based on the statistical analysis, it demonstrated that there were no significant differences between the treatment group $p > 0,05$, but significant differences between P3 (15 µg/100 ml) and without ITS group $p < 0,05$. Nevertheless, if it was investigated based on the viability calculation of the blastomere cells morula embryo development, it proved that 15 µg/100 ml of ITS could increase the viability of blastomere cells morula embryo by 63% compared to 16% without ITS. In conclusion, the distribution of *Insulin Transferin Selenium* (ITS) supplementation concentration on vitrification media had been functioning optimally in increasing the viability of blastomere cells morula embryos after being warmed.

Keywords : Vitrification, *Insulin Transferin Selenium*, Morula, *Fluorescence*.

Pendahuluan

Salah satu upaya dalam peningkatan jumlah populasi ternak diantaranya melalui bioteknologi reproduksi (Widjiati dkk., 2012). Ruang lingkup bioteknologi reproduksi antara lain meliputi *in vitro fertilization* (IVF), manipulasi embrio, pembekuan gamet dan embrio, serta transfer embrio. Pada *in vitro fertilization* (IVF) terdapat dua kegiatan utama yaitu koleksi telur *in vitro* dan pengembangan embrio *in vitro* (Widjiati dkk., 2011).

Aplikasi teknologi fertilisasi *in vitro* akan lebih fleksibel dan bermanfaat apabila dapat memanfaatkan oosit beku (*frozen oocyte*) (Wahjuningsih *et al.*, 2010). Teknik penyimpanan embrio dalam bentuk beku untuk spesimen biologi dikenal dengan istilah kriopreservasi. Pada saat ini telah dikembangkan teknik kriopreservasi yang mudah dilakukan dan sederhana dalam pelaksanaannya yaitu metode vitrifikasi (Abdullah, 2012).

Vitrifikasi adalah proses pemadatan cairan menggunakan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi pada suhu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tanpa pembentukan kristal es sehingga terlihat seperti kaca (Vatja, 2000). Keunggulan prosedur vitrifikasi adalah mampu mengeliminasi secara total pembentukan kristal es baik secara intraselular maupun ekstraselular, protokol lebih sederhana dan waktu pengerjaan yang lebih singkat (Liebermann and Tucker, 2002).

Kelemahan atau kekurangan dari teknik vitrifikasi adalah embrio yang disimpan dengan cara dibekukan sering kali dapat menurunkan viabilitas embrio setelah *warming*, maka perlu alternatif lain untuk mengurangi kerusakan yang terjadi setelah *warming* yaitu dengan menggunakan konsentrasi krioprotektan yang tepat.

Perubahan temperatur yang cepat pada proses vitrifikasi juga dapat mengakibatkan sel mengalami kerusakanyangdisebabkan karena mekanisme pertahanan intraseluler yang hilang sehingga tidak ada lagi dinding pertahanan pertama yang dapat melindungi sel terhadap Reactive Oxygen Species (ROS) (Choi *et al.*, 2009). Menurut Widjiati dkk. (2011) produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam proses vitrifikasi sering kali dapat menyebabkan penurunan viabilitas embrio pasca *warming* sehingga dibutuhkan suatu senyawa antioksidan pada proses vitrifikasi yang mampu menangkal efek negatif dari terbentuknya ROS dalam sel akibat aktivitas metabolik. Oleh karena itu diperlukan studi untuk mengoptimalkan medium vitrifikasi, sehingga mampu mengoptimalkan peran krioprotektan melindungi embrio akibat stressor suhu metode vitrifikasi.

Suplementasi Insulin Transferin Seleniun (ITS) diketahui dapat digunakan sebagai antioksidan karena mampu mengurangi tingkat ROS dalam sel (Das *et al.*, 2013). Insulin Transferin Seleniun (ITS) sebagai suplemen media yang kompleks terdiri dari senyawa insulin, transferin, dan seleniun yang telah dijual secara komersial (Liu *et al.*, 2014). Insulin Transferin Seleniun merupakan protein kompleks yang dapat memacu perkembangan sel, mencegah kerusakan sel karena peran antioksidan didalamnya, sehingga dapat mempertahankan viabilitas embrio pasca *warming*.

Berdasarkan uraian di atas menunjukkan bahwa dengan penambahan suplemen *Insulin Transferin Seleniun* (ITS) dapat mengurangi jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada embrio saat proses pembekuan dan *warming*.

Penelitian ini menggunakan tahap embrio yaitu embrio morula yang dikoleksi dengan

metode secara *in vitro* dan pemberian suplementasi *Insulin Transferin Selenium* (ITS) pada proses vitrifikasi yang diharapkan mampu meningkatkan daya hidup dari sel blastomer embrio morula. Embrio morula atau blastula sering digunakan dalam teknik transfer embrio karena memiliki daya tahan terhadap pembekuan yang lebih baik serta embrio tahap ini layak untuk ditransfer ke resipien (Setiadi dan Karja, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Kristianti, (2014) pada embrio mencit menggunakan suplementasi *Insulin Transferin Selenium* pada medium vitrifikasi dengan konsentrasi 10 µg/100ml dapat meningkatkan persentase kemampuan perkembangan embrio morula menjadi blastula sebesar 54% dibandingkan dengan kontrol tanpa suplementasi *Insulin Transferin Selenium* yang hanya 37%. Pada penelitian ini belum diperiksa viabilitas tiap sel blastomer pada embrio morula yang dapat berkembang menjadi blastula.

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai suplementasi *Insulin Transferin Selenium* pada medium vitrifikasi embrio mencit tahap morula terhadap viabilitas sel blastomer dengan pemeriksaan *fluorescence*.

Materi dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Maret sampai Agustus 2015.

Hewan Percobaan dan Sampel Penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C

berumur 10 minggu dengan berat badan sekitar 30-35 gram dengan populasi sekitar 60 ekor. Mencit jantan vasektomi berumur 12 minggu sebanyak 6 ekor dan mencit jantan fertil berumur 12 minggu sebanyak 6 ekor yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio tahap morula yang diperoleh dari proses fertilisasi *in vitro* dengan jumlah minimal 5 embrio pada masing-masing kelompok perlakuan.

Bahan dan Alat Penelitian Bahan-bahan penelitian yang digunakan meliputi: alkohol 70%, *Phosphate Buffer Saline*, *Bovine Serum Albumin* 3%, aquadest steril, krioprotektan menggunakan propanediol 30% (p.a. Merck) dan sukrosa 1 M, nitrogen cair (N₂). Media kultur *in vitro* yang digunakan adalah MEM yang dibuat drop di dalam *petridishdisposable* dan difiksasi dengan *mineral oil*. Bahan yang digunakan dalam superovulasi mencit betina adalah *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG), *human Chorionic Gonadotropin* (hCG). Larutan *Hoechst* dan Larutan *Propidium Iodide* sebagai pewarna *fluorescence*. *Insulin Transferin Selenium* (ITS) digunakan sebagai antioksidan.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba, inkubator CO₂ 5%, lemari es, kontener N₂ cair, *laminar air flow*, gunting, selang infus, pinset, mikroskop *fluorescent*, mikroskop *inverted*, *scapel*, *bekker glass*, *syringe disposable* (1 cc, 3 cc, 10 cc), pipet pasteur, *ministray* 0.25 ml, *petridishdisposable* (nuclon), spuit *millipore*, pembakar bunsen, *tissue*, dan *aluminium foil*.

Superovulasi

Mencit betina dengan berat badan 30-35 gram disuperovulasi dengan injeksi PMSG 5 IU secara intraperitoneal. Kerja hormon PMSG analog dengan FSH berperan dalam merangsang

pembentukan folikel dan sedikit berperan dalam pembentukan korpus luteum. Empat puluh delapan jam kemudian menyuntikan hCG 5 IU yang analog dengan LH secara intraperitoneal, hormon ini berperan dalam meningkatkan laju ovulasi (Widjiati dkk., 2012).

Mencit betina kemudian dikawinkan dengan mencit jantan vasektomi dengan perbandingan 1 : 1 (*monomating*) setelah penyuntikan hCG. Delapan belas jam setelah *monomating* dilakukan pemeriksaan *vaginal plug*, mencit betina yang positif terdapat *vaginal plug* dianggap telah terjadi kopulasi (Widjiati dkk., 2012).

Fertilisasi In Vitro

Mencit betina yang positif sumbat vagina didekapitasi, di bedah dan dikeluarkan tuba falopii. Selanjutnya tuba falopii dicuci dengan larutan *Phosphate Buffer Saline*, kemudian dilakukan *flushing* di bawah mikroskop *inverted* dengan merobek kantong fertilisasi. Sel telur yang sudah dikoleksi selanjutnya dicuci berturut-turut sebanyak tiga kali pada medium MEM. Sel telur yang sudah dicuci kemudian dipindahkan pada medium fertilisasi (MEM) dan diinkubasi di dalam incubator untuk menunggu persiapan spermatozoa yang akan digunakan untuk fertilisasi *in vitro*. Spermatozoa diambil dari cauda epididimis dari mencit jantan fertil, kemudian dibenamkan pada medium fertilisasi yang sudah ada sel telurnya. Sel telur yang sudah bercampur spermatozoa kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37° C selama 7 jam, kemudian dirontokan sel granulosa untuk mengamati 2 pn.

Persiapan Medium Krioprotektan

Embrio morula hasil kultur dibilas dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* dan diletakkan pada *petridish* untuk dikelompokkan menjadi empat perlakuan. Masing-masing *petridish*

berisi PBS + PrOH 30% + Sukrosa 1 M tanpa *Insulin Transferin Selenium* (ITS) pada kontrol dan pada masing-masing perlakuan berisi PBS + PrOH 30% + Sukrosa 1 M + ITS dengan konsentrasi 5 µg/100ml, 10 µg/100ml dan 15 µg/100ml medium krioprotektan.

Vitrifikasi Dan Pemaparan Krioprotektan

Embrio yang telah dikelompokkan kemudian dipapar pada medium krioprotektan selama 15 menit sebelum divitrifikasi. Embrio kemudian dikemaske dalam *ministraw* 0,25 ml dan pada kedua ujung *ministraw* diberi sukrosa 1 M. Vitrifikasi dilakukan dengan cara *ministraw* diupkan pada nitrogen cair selama 10 detik dan langsung dimasukkan ke dalam goblet pada kontainer N₂ cair dengan suhu -196°C selama satu minggu (Wahjuningsih, 2008).

Pencairan Kembali (*Warming*)

Setelah dibekukan dan disimpan selama 7 hari, dilakukan *warming* dengan cara memasukkan *ministraw* ke penangas air bersuhu 30°C sampai kristal es dalam diluen hilang. Segera setelah hangat seluruh isi *ministraw* dikeluarkan ke dalam cawan petri (Widjiati, 2011).

Pembilasan Krioprotektan

Pembilasan krioprotektan dilakukan pada larutan sukrosa dengan konsentrasi meningkat. Embrio morula dikultur satu menit dalam larutan sukrosa 0,25M, embrio morula tersebut dipindahkan ke medium yang mengandung sukrosa 0,5M, kemudian 1M masing-masing selama dua menit (Batan, 2009)

Pembuatan Media Pewarna *Fluorescence*

Larutan *Hoechst* dan larutan *Propidium Iodide* dibuat dengan konsentrasi 1:10.000, yaitu tambahkan 1 µL larutan *Hoechst* (Komponen A) dan 1 µL Larutan PI

(Komponen B) masing-masing dilarutkan dalam 10mL PBS.

Penentuan Viabilitas Embrio dengan Metode *Fluorescence*

Morula dikultur dalam campuran larutan *Hoechst* dan *Propidium Iodide* didalam inkubator CO₂ selama 30 menit kemudian morula dipindahkan ke object glass dengan pipet modifikasi, selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop *fluorescent* dengan perbesaran 200x. Diamati jumlah sel blastomer yang hidup dan mati. Apabila sel blastomer hidup di bawah mikroskop *fluorescent* akan tampak berwarna hijau. Bila sel blastomer mati akan tampak berwarna merah. Kemudian dihitung berapa persentase jumlah sel blastomer yang hidup dan mati.

Analisis Data

Data yang diperoleh dihitung dalam bentuk persentase ditransformasi ke arc sin $\sqrt{\text{persen}}$ untuk dianalisis menggunakan *One Way Anova* (Uji F). Apabila terdapat perbedaan yang nyata dalam pengujian maka akan dilanjutkan ke Uji BNT untuk membandingkan perbedaan antar perlakuan (Kusriningrum, 2008).

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan viabilitas embrio morula di bawah mikroskop *fluorescent* dilakukan berdasarkan kemampuan daya hidup dari sel blastomer embrio morula pasca *warming*, sebagai berikut.

Tabel 1. Rerata, Simpangan Baku, dan Presentase Pengaruh suplementasi *Insulin Transferin Selenium* (ITS) pada kemampuan hidup sel blastomer pada Embrio Morula pasca *warming*.

Perlakuan	Embrio Morula	Rata-rata Viabilitas		(x ± SD)
		Hidup	Mati	
Kontrol	5	1(16%)	4(84%)	17,53 ^a ± 20,74
P1	5	2(32%)	3(68%)	33,47 ^{ab} ± 13,72
P2	5	4(46%)	1(54%)	42,04 ^{ab} ± 19,24
P3	5	4(63%)	1(37%)	52,84 ^b ± 32,94

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0.05)

Kontrol = Tanpa penambahan Insulin Transferin Selenium (ITS)

P1 = 5µg/100ml Insulin Transferin Selenium (ITS)

P2 = 10µg/100ml Insulin Transferin Selenium (ITS)

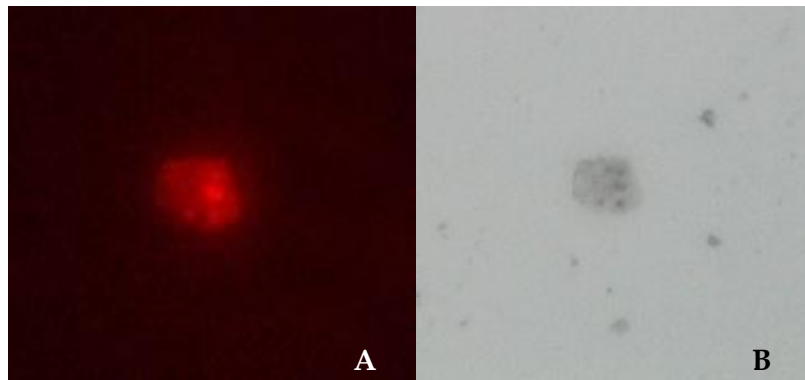
P3 = 15µg/100ml Insulin Transferin Selenium (ITS)

Data yang diperoleh dianalisis dengan metode analisis *One Way Anova* (Uji F) dan dilanjutkan dengan *posthoc Duncan Alpha* (0.05) untuk membandingkan perbedaan antar perlakuan. Analisis *One Way Anova* dilakukan

untuk menguji ada tidaknya perbedaan tiap perlakuan.

Di bawah ini adalah hasil pengamatan morfologi embrio morula di bawah mikroskop *fluorescent*

:



Gambar 1. Hasil pemeriksaan viabilitas sel blastomer embrio morula dengan teknik *fluorescence* pada mikroskop *fluorescent* pada mikroskop *fluorescent*. A : Filter *fluorescence* perbesaran 200x; B : Natif perbesaran 200x.

Berdasarkan Tabel 1. hasil analisis menggunakan metode *One Way Anova* (Uji F) test menunjukkan bahwa terdapat hasil yang berbeda nyata diantara kelompok perlakuan ($p < 0.05$), dilanjutkan dengan Uji *Duncan Alpha* didapatkan Kontrol berbeda nyata dengan P3 ($p < 0.05$), tetapi tidak berbeda nyata dengan P1 dan P2. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan penambahan *Insulin Transferin Selenium* (ITS) memiliki nilai signifikansi sebesar 0,135.

Insulin Transferin Selenium (ITS) terdiri dari tiga senyawa aktif yang memiliki fungsi saling mendukung diantaranya insulin, transferin dan selenium. Insulin dapat membentuk *Adenosine Triphosphate* (ATP) dan *glutathione peroxidase*. Adanya *Adenosine Triphosphate* (ATP) untuk membantu membran sel mengeluarkan ion kalsium (Ca_2^+), H_2O dan Na^+ dari dalam sel sehingga faktor apoptosis tidak terbentuk. Transferin bekerja memutus rantai pembentukan radikal hidroksil (OH^*) sebagai salah satu produk *Reactive Oxygen Species*

(ROS) dengan cara mengikat akumulasi Fe yang berlebih di dalam sel. Penambahan selenium pada medium vitrifikasi dapat meningkatkan aktivitas enzim *glutathione peroxidase* sehingga embrio morula dapat bertahan terhadap *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Glutathione peroxidase* dapat membentuk pertahanan terhadap radikal bebas di dalam sel dan mencegah kerusakan sel dengan cara mengkatalisa hidrolisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang nyata pada kelompok perlakuan P3 dengan konsentrasi 15 $\mu g/100ml$ sebagai konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan viabilitas sel blastomer embrio morula. Hal ini menunjukkan ketiga senyawa yang terkandung dalam *Insulin Transferin Selenium* berperan optimum dalam mencegah defisiensi ATP saat vitrifikasi dan meminimalisir terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) pada konsentrasi 15 $\mu g/100ml$.

Kesimpulan

Pemberian suplementasi *Insulin Transferin Selenium* (ITS) pada media vitrifikasi dapat meningkatkan persentase viabilitas sel blastomer embrio morula pasca *warming* secara signifikan pada konsentrasi 15 µg/100ml.

Daftar Pustaka

- Abdullah, T. N. 2012. Pengaruh Lama Pemaparan Krioprotektan Propanediol pada Proses Vitrifikasi terhadap Viabilitas Embrio Mencit pada Kultur In Vitro [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Batan, I. W., I. W. Suatha, W. E. Prasetyoningtyas, N. Handayani, I. Djuwita, dan A. Boediono. 2009. Vitrifikasi blastosis mencit dengan metode kriolup. *Jurnal Veteriner* Desember 10 (4) : 219-226.
- Choi, K., J. Kim, W. Gyung, Kim dan C. Chulhee. 2009. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Current Neurovascular Research* 6 (4) : 213-222.
- Das, Z. C, M. K. Gupta, S. J. Uhm and H. T. Lee. 2013. Supplementation of insulin–transferrin–selenium to embryo culture medium improves the *in vitro* development of pig embryos. *Cambridge Journals Online (Abstract)* 18 :1-8.
- Kristianti, C. 2014. Efek Suplementasi Insulin Transferin Selenium (ITS) pada Media Pembekuan Embrio Tahap Morula terhadap Persentase Perkembangan Embrio Tahap Blastula [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Kusriningrum, 2008. Perancangan Percobaan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Liebermann, J. And M.J. Tucker. 2002. Effect of Carrier System on The Yield of Human Oocytes and Embryos as Assesed by Survival and Development Potential After Vittrification. *J. Reproduction*. 124: 483-489.
- Liu, X., J. Liu, N. Kang, L. Yan, Q. Wang, X. Fu, Y. Zhang, R. Xiao, and Y. Cao. 2014. Role of insulin transferrin selenium in auricular chondrocyte proliferation and engineered cartilage formation in vitro. *International Journal of Molecular Sciences* 15 : 1525-1537.
- Vajta, G. 2000. Vittrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod, Sci.*, 60-61 : 125-126.
- Wahjuningsih, S. 2008. Sitoskeleton oosit sapi pasca vitrifikasi menggunakan krioprotektan etilen glikol. *Jurnal Kedokteran Hewan* 2 (2).
- Wahjuningsih, S., S. Hardjoprano, dan S.B. Sumitro. 2010. Pengaruh konsentrasi etilen glikol dan lama paparan terhadap tingkat fertilitas in vitro oosit sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan* 4(2):61-64.
- Widjiati, A. W. Ratri, dan M. Z. Arifin. 2011. Pengaruh berbagai konsentrasi krioprotektan propanediol pada proses vitrifikasi terhadap viabilitas embrio mencit pasca thawing. *Veterinaria* 4 (2).

Widjiati, S. E. Pusporini, M. Z. Arifin. 2012.
Perbandingan angka fertilitas dan hambatan perkembangan embrio mencit yang dikultur dalam medium M16 dan *Human Tubal Fluid*. *Jurnal Veteriner* 13 (3) : 227-234.