

Efektifitas Penambahan Insulin dalam Media Maturasi dan atau Media Kultur pada Tingkat Maturasi Oosit dan Perkembangan Awal Embrio Sapi secara *In Vitro*

The Effectivity of Insulin Supplement in Maturation and/or Culture Media on Bovine Oocytes Maturation and Early Embryonic Development Rate In Vitro

Syafri Nanda¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{2*}, Mohamad Agus Setiadi²

¹ Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

² Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

*E-mail : karjanwk13@gmail.com

Naskah diterima: 17 Mei 2018, direvisi: 22 Oktober 2018, disetujui: 30 November 2019

Abstract

This study was aimed to determine the effect of insulin supplementation in maturation and/or culture medium on nuclear maturation rate and the early bovine embryo development *in vitro*. Oocytes were collected and matured in maturation media without (IVM I-) or with (IVM I+) 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ insulin in incubator of 5% CO₂ and 39°C. The oocytes were divided into 4 groups, without the supplementation of insulin in the maturation medium and culture (IVM I-/IVC I-), insulin supplementation only the maturation medium (IVM I+/IVC I-), insulin supplementation only in the culture medium (IVM I-/IVC I+), and the combination of insulin supplementation in the maturation medium and culture (IVM I+/IVC I+). The result showed that supplementation of insulin in the maturation medium increased the number of nuclear maturation (87.7%) ($P < 0.05$) in comparison to without supplementation of insulin (70.1%). Cleavage rate in treatment IVM was higher IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), IVM I-/IVC I+ (59.9%) ($P < 0.05$). Result of the other were showed that early bovine embryo on day-4 cultured (IVC) reached 16 cell on treatment IVM I-/IVC I+ (31,9%) and IVM I+/IVC I+ (27,1%) were higher compared to treatment IVM I-/IVC I- (2.9%) and IVM I+/IVC I- (2.5%) ($P < 0.05$). In conclusion, supplementation of insulin to maturation medium and culture medium can increase nuclear maturation rate and improved early embryo cleavage rate.

Key words: bovine oocytes; culture; embryo; insulin; maturation

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan insulin dalam media maturasi dan atau media kultur pada tingkat pematangan inti oosit dan tingkat perkembangan awal embrio secara *in vitro*. Oosit sapi dikoleksi dan dimaturasi *in vitro* dalam media maturasi dengan (IVM I+) atau tanpa (IVM I-) penambahan insulin sebanyak 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ insulin selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 39°C, untuk mengetahui tingkat perkembangan embrio awal, oosit dengan perlakuan : tanpa penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), dan kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+). Tingkat kematangan inti oosit lebih tinggi (87.7%) pada oosit yang dimaturasi dengan insulin dibandingkan dengan tanpa penambahan insulin (70.1%, $P < 0,05$). Sedangkan tingkat pembelahan oosit setelah fertilisasi ditemukan bahwa tingkat pembelahan yang paling tinggi pada oosit yang dimaturasi dan dikultur dalam media dengan insulin (76.6%) jika dibandingkan dengan kelompok IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), dan IVM I-/IVC I+ (59.9%, $P < 0,05$). Perkembangan awal embrio sapi pada hari ke-4 kultur mencapai pembelahan 16 sel pada perlakuan IVM I-/IVC I+ (31,9%) dan IVM I+/IVC I+ (27,1%) lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan dengan perlakuan IVM I-/IVC I- (2.9%) dan IVM I+/IVC I- (2.5%). Berdasarkan

hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat meningkatkan jumlah tingkat pematangan inti oosit dan meningkatkan perkembangan awal embrio secara *in vitro*.

Kata kunci: embrio; insulin; kultur; maturase; oosit sapi

Pendahuluan

Tingkat keberhasilan produksi embrio *in vitro* (PEIV) pada sapi saat ini masih sangat rendah karena sebagian besar oosit gagal berkembang hingga ke tahap blastosis (Hara *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses PEIV diantaranya adalah sistem kultur dan komponen dari media yang digunakan. Tahapan produksi embrio secara *in vitro* biasanya menggunakan media yang berbeda untuk mendukung perkembangan oosit dan embrio agar mampu berkembang mencapai tahap blastosis. Media yang biasa digunakan dibedakan menjadi media kompleks dan media sederhana. Medium kompleks merupakan medium yang mengandung asam-asam amino, prekursor asam nukleat, vitamin, serta ion-ion penting lainnya yang diperlukan untuk pertumbuhan oosit dan embrio *in vitro*. Media sederhana adalah media yang memiliki komposisi bahan penyusun yang terdiri dari larutan fisiologis dan mengandung garam-garam anorganik dan natrium bikarbonat sebagai penyangga serta piruvat, laktat, glukosa sebagai sumber energi (Gordon, 2003).

Media maturasi maupun kultur sering mengandung asam amino dan glukosa sebagai sumber energi. Asam amino dapat mempengaruhi frekuensi perkembangan, meningkatkan jumlah sel blastosis dan *hatching* (Steeves & Gardner, 1999), sedangkan glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit dan perkembangan embrio, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit serta pemeliharaan kompetensi perkembangan embrio (Hashimoto *et al.*, 2000). Media yang digunakan untuk maturasi dan kultur embrio sapi tahap awal biasanya memiliki kadar glukosa yang tinggi, seperti pada medium TCM 199 memiliki kadar glukosa 1 g/L (5.5 mM). Metabolisme glukosa sangat rendah selama proses maturasi *in vitro*, karena oosit tidak dapat menyerap glukosa menjadi energi secara maksimal tanpa bantuan bahan lainnya (Rieger 1996; Augustin *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2010). Sedangkan untuk perkembangan embrio, kebutuhan akan sumber nutrisi berbeda untuk setiap tahap perkembangannya, dimana

dilaporkan bahwa embrio tahap perkembangan awal belum mampu menggunakan glukosa sebagai sumber energi sehingga apabila media yang digunakan untuk kultur embrio tahap awal perkembangannya sering menyebabkan embrio berhenti berkembang (Barnett & Bavister, 1996; Karja *et al.*, 2006; Wongsrikeao *et al.*, 2006). Oleh karena itu, kondisi kultur *in vitro* dan komponen dalam media maturasi yang digunakan memegang peranan penting dalam mendukung pematangan oosit hingga tahap M-II (Setiadi & Karja, 2013).

Insulin adalah hormon polipeptida yang disekresikan ke dalam darah oleh sel β dari pankreas dan diperlukan untuk pertumbuhan serta metabolisme sebagian besar sel-sel mamalia (Darnell *et al.*, 1986). Insulin berikatan dengan reseptor pada permukaan sel dan merangsang kapasitas sel untuk menggunakan glukosa dan asam amino sebagai bahan bakar metabolik, sehingga insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa dan asam amino sebagai sumber energi (Lehninger, 1991). Menurut Frishney (1988) insulin dapat meningkatkan *intake* glukosa dan asam amino serta dapat menyebabkan pengaruh mitogenik. Insulin dapat merangsang metabolisme dan pertumbuhan embrio pada mencit (Harvey & Kaye 1991). Fungsi hormon insulin digolongkan sebagai protein pengatur metabolisme gula pada aktivitas seluler (Lehninger, 1991) dan sebagai faktor pertumbuhan untuk beberapa sel (Darnell *et al.*, 1986). Insulin merangsang penyerapan nutrisi dalam sel dan juga merangsang sintesis protein dan trigliserida (Sjaastad *et al.*, 2003), serta merangsang sintesis *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan *ribonucleic acid* (RNA) (Rao *et al.*, 1990). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengkaji penambahan insulin ke dalam media maturasi dan atau media kultur terhadap pematangan inti oosit dan tingkat pembelahan awal embrio sapi secara *in vitro*.

Materi dan Metode

Evaluasi tingkat pematangan inti oosit

Ovarium dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) Bubulak Kabupaten Bogor dan dibawa

ke laboratorium dalam larutan NaCl 0.9% yang ditambahkan 100 IU/mL *penicillin* (Sigma-Aldrich, Inc, P-4687) dan 0.1 g/mL *Streptomycin* (Sigma-Aldrich, Inc, S-9137). Oosit diperoleh dari folikel berukuran 2-6 mm dengan teknik *aspirasi* menggunakan *syringe* dan jarum ukuran 18G. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit dengan sel kumulus yang kompak dan sitoplasma yang homogen (Muttaqin *et al.*, 2015). Oosit hasil seleksi kemudian dimaturasi dalam media dasar tanpa insulin (Sigma, USA, I6634) (IVM I-) atau dengan 10 µg/mL insulin (IVM I+) (Lindgren 2014). Media dasar yang digunakan untuk maturasi terdiri dari *tissue culture medium-199* (TCM-199; Sigma, USA) yang disuplementasi 0.3% BSA, 10 IU/mL *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (Kyoritsu Seiyaku, Japan), 10 IU/mL *human Chorionic Gonadotrophin* (hCG) (Kyoritsu Seiyaku, Japan), dan 50 µg/mL *gentamycin* (Sigma-Aldrich, Inc, P-4687). Oosit hasil seleksi dicuci tiga kali kemudian dimaturasi di dalam *petri dish* (Nunclon, Denmark) selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 38.5 °C, kelembaban 90% dalam bentuk *drop* masing-masing 100 µL untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral *oil* (Sigma- Aldrich, Inc, M-8410). Semua media yang digunakan pada penelitian ini diekuilibrasikan minimal selama 2 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38.5 °C sebelum digunakan.

Pengamatan tingkat pematangan inti oosit dilakukan setelah melepaskan sel-sel cumulus dari oosit dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0.25% (Sigma, USA) dan dipipet berulang-ulang, kemudian dibuat preparat dan difiksasi dalam larutan *ethanol absolute* dan asam asetat (3:1) selama 48 jam, selanjutnya diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama 5 menit dan dibilas dengan 25% asam asetat. Pengamatan status inti diamati dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus IX, Japan). Evaluasi tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit dari tahap *germinal vesicle* sampai ke tahap *metaphase II* (MII). Keberhasilan pematangan oosit dinilai berdasarkan persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII. Persentase tingkat maturasi inti oosit adalah perbandingan antara jumlah oosit yang mencapai tahap MII dengan jumlah oosit keseluruhan yang dimaturasi.

Evaluasi Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi

Koleksi dan maturasi oosit dilakukan seperti pada penelitian tahap sebelumnya. Oosit dimaturasi dalam

media dasar dengan (IVM I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (IVM I-). Fertilisasi oosit dilakukan menggunakan semen beku sapi dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Lembang, Bandung. Semen beku di-*thawing* dalam air hangat dengan suhu 30-37 °C selama 30 detik, kemudian semen dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril 15 mL yang berisi 4 mL media fertilisasi (Suzuki *et al.*, 2000) dan disentrifugasi pada kecepatan 700 g selama 8 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dikeluarkan, kemudian spermatozoa diencerkan dengan media fertilisasi sampai diperoleh konsentrasi akhir 2×10⁶ spermatozoa/mL. Campuran spermatozoa dan media fertilisasi dibuat dalam bentuk *drop* pada *petri dish* sebanyak 100 µL untuk 10-15 oosit ditutup dengan mineral *oil* (Sigma, USA). Oosit yang sudah dimaturasi dicuci dalam media fertilisasi sebanyak dua kali, kemudian dipindahkan ke dalam *drop* masing-masing sesuai perlakuan dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38.5 °C selama 14 jam.

Oosit yang telah difertilisasi didenudasi sel-sel kumulusnya dengan cara dipipet. Oosit kemudian dicuci tiga kali pada media kultur *Charles Rosenkrans I amino acid* (CR1aa) yang disuplementasi 1% *minimum essential medium* (MEM) (Sigma, M-7145), 2% *basal medium eagle* (BME) (Sigma, B-6766), 50 µg/mL *gentamicyn*, 0.015 gr/mL L-Glutamine dan 0.3% BSA. Kelompok oosit yang telah dimaturasi tanpa insulin dibagi menjadi 2 (dua) secara acak dan dikultur dalam medium dengan (kelompok IVM I-/IVC I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (kelompok IVM I-/IVC I). Demikian juga oosit yang dimaturasi dengan 10 µg/mL insulin, dikultur dalam medium dengan (kelompok IVM I+/IVC I+) atau tanpa penambahan 10 µg/mL insulin (kelompok IVM I+/IVC I-). Oosit kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38.5 °C selama 96 jam. Pengamatan perkembangan awal embrio secara morfologi diamati dibawah mikroskop (Olympus IX 70, Japan) pada hari ke-2 (jam ke-48) dan ke-4 (jam ke-96) kultur. Pada hari ke-4 (jam ke-96) kultur, semua embrio kemudian difiksasi dan diwarnai seperti pada penelitian I. Persentase tingkat pembelahan embrio adalah perbandingan antara jumlah oosit yang membelah dengan jumlah keseluruhan oosit yang dikultur.

Rancangan dan Analisis Data

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan masing-masing 5 kali

ulangan. Data tingkat pematangan inti dan tingkat perkembangan awal embrio *in vitro* disajikan dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan *analisis of variance* (ANOVA) dengan taraf nyata 95%. Apabila ada perbedaan diantara kelompok maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut *duncan's multiple range test* (DMRT) menurut Steel & Torrie (1993), data diolah menggunakan program SPSS versi 22.0.

Hasil dan Pembahasan

Kemampuan Pematangan Inti Oosit Sapi dengan Penambahan Insulin pada Media Maturasi

Tahapan perkembangan pematangan inti oosit sapi dimulai dari tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase I* (MI), *anaphase/telophase I* (A/TI), hingga tahap *metaphase II* (MII). Oosit yang matang dan siap untuk difertilisasi oleh spermatozoa adalah oosit yang telah mencapai tahap MII. Berikut pada Gambar 1 tahapan perkembangan maturasi inti oosit sapi.

Tingkat pematangan inti oosit sapi berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit disajikan pada Tabel 1.

Oosit yang mencapai tahap *metaphase II* ditandai dengan terbentuknya *polar body I* dengan kromosom homolog (Gordon, 2003). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan insulin (IVM I+) dengan konsentrasi 10 µg/mL meningkatkan

jumlah oosit mencapai tahap MII (87%, P<0.05) dibandingkan tanpa diberi perlakuan insulin (IVM I-) (70.1%). Walaupun semua oosit pada kedua perlakuan mampu melewati tahap GV, tetapi 20% dari oosit yang dimaturasi tanpa insulin berhenti perkembangannya sampai pada tahap *metaphase I* (P<0.05). Peranan insulin dalam meningkatkan persentase oosit yang mencapai tahap MII diduga karena terjadi peningkatan ambilan glukosa dan asam amino yang terdapat dalam medium maturasi oleh insulin untuk perkembangan oosit (Frishney, 1988). Glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit (Hashimoto *et al.*, 2000). Sutton *et al.* (2010) melaporkan bahwa glukosa penting dalam setiap aspek dari pematangan oosit akhir yang berefek pada meiosis, sitoplasma dan pematangan sel cumulus dimana glukosa akan dimetabolisme melalui jalur glikolitik oleh kumulus oosit kompleks (COC) untuk dimanfaatkan oleh oosit.

Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi dengan Penambahan Insulin pada Media Maturasi dan atau Media Kultur

Keberhasilan perkembangan embrio sapi secara *in vitro* dilakukan dengan pengamatan dan pewarnaan (*aceto orcein*). Stadium pembelahan embrio mulai dari 2-32 sel disajikan dalam Gambar 2.

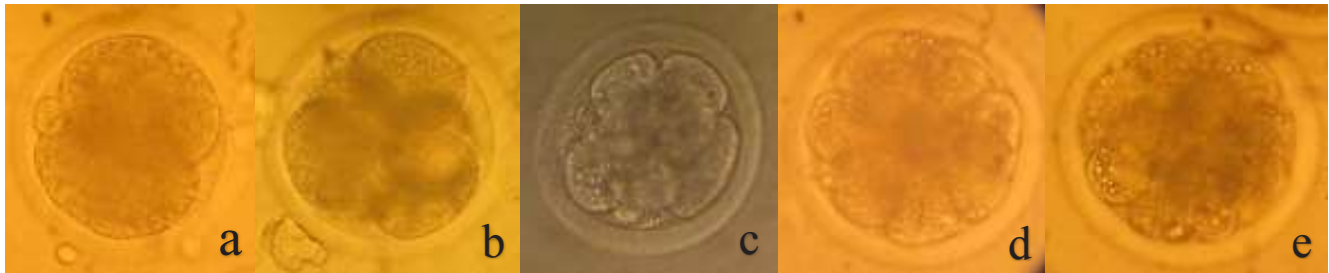


Gambar 1. Perkembangan status inti oosit setelah maturasi *in vitro*. A. *Germinal vesicle* (GV), B. *Germinal vesicle breakdown* (GVBD), C. *Metaphase I* (MI), D. *Metaphase II* (MII), E. Degenerasi, (tanda panah); (perbesaran 200x).

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit sapi dengan penambahan insulin pada media maturasi

Perlakuan	Total Oosit (n)	Tingkat Pematangan Inti Oosit n (%± SD)					
		GV	GVBD	MI	A/TI	MII	Deg
IVM I-	80	0(0±0)	6(7.0±7.2)	20(22.9±12.2) ^b	0(0±0)	54(70.1±9.4) ^a	0(0±0) ^a
IVM I+	88	0(0±0)	1(0.7±1.6)	6(6.9±7.0) ^a	0(0±0)	77(87.7±4.3) ^b	4(4.6±45) ^b

Keterangan: *Germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase I* (MI), *anaphase-telophase* (AT), *metaphase II* (MII), Degenerasi (Deg). maturasi tanpa insulin (IVM I-) dan maturasi penambahan insulin (IVM I+). ^{a,b} superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0.05).



Gambar 2. Tahapan perkembangan awal embrio selama empat hari kultur. (a) Dua sel; (b) Empat sel; (c) Delapan sel; (d) Enam belas sel; (e) Tiga puluh dua sel (Perbesaran 200x, Olympus IX 70).

Tabel 2. Tingkat pembelahan dan perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi pada hari kedua kultur *in vitro*.

Perlakuan Insulin		Tingkat Pembelahan n (rata-rata %±SD)	Perkembangan Awal Embrio n(%±SD)			
IVM	IVC		2 sel	4 sel	8 sel	
-	-	87	49(55.8±10.0) ^a	29(61.0±17.3)	18(33.7±14.5)	2(5.3±7.7)
+	-	88	56(64.1±7.1) ^a	25(44.4±4.9)	27(47.4±6.1)	4(8.2±10.2)
-	+	90	55(59.9±6.5) ^a	24(47.8±20.0)	26(43.9±16.5)	5(8.3±18.6)
+	+	91	70(76.6±2.7) ^b	24(35.9±12.0)	36(50.2±13.4)	10(13.9±17.3)

Keterangan: Medium maturasi (IVM), medium kultur (IVC), jumlah oosit atau embrio (n), kontrol (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+), ^{a,b} superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0.05).

Tabel 3. Tingkat perkembangan embrio sapi yang diamati secara morfologi dan pewarnaan pada hari keempat kultur *in vitro*.

Perlakuan Insulin		Perkembangan Awal Embrio n(%±SD)				
IVM	IVC	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel	32 sel
-	-	12(26.5±35.2)	17(31.3±18.2)	18(36.1±24.3)	1(2.9±6.4) ^a	1(3.3±7.5)
+	-	19(34.0±13.2)	22(38.9±4.7)	14(24.7±17.5)	1(2.5±6.6) ^a	0(0±0)
-	+	14(29.3±17.7)	17(29.3±9.9)	4(6.2±5.9)	18(31.9±13.5) ^b	2(3.3±4.6)
+	+	8(12.7±9.7)	21(29.5±5.2)	15(24.3±14.7)	21(27.1±15.4) ^b	5(6.4±7.7)

Keterangan: Medium maturasi (IVM), medium kultur (IVC), kontrol (IVM I-/IVC I-), penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC-), penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+), kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur (IVM I+/IVC I+), ^{a,b} superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0.05).

Hasil analisis tingkat perkembangan awal embrio sapi dengan penambahan insulin pada media maturasi dan atau media kultur disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tingkat perkembangan awal embrio pada hari ke-2 setelah kultur pada kelompok oosit yang dimaturasi dan dikultur dengan insulin (IVM I+/IVC I+) (76.6%) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok IVM I-/IVC I- (55.8%), IVM I+/IVC I- (64.1%), dan IVM I-/IVC I+ (59.9%) (P<0.05). Sedangkan tidak terdapat perbedaan pada stadium

perkembangan embrio antara 2 sel, 4 sel, dan 8 sel diantara kelompok perlakuan (P>0.05). Pada hari ke-2 setelah kultur, 5-13% embrio sudah berkembang mencapai stadium 8 sel. Sedangkan pengamatan pada hari ke-4 setelah kultur embrio, ditemukan 2-27% embrio berkembang mencapai stadium 16 sel. Embrio yang berkembang mencapai stadium 16 sel ditemukan paling banyak pada kelompok IVM I-/IVC I+ dan IVM I+/IVC I+ (P<0.05). Akan tetapi tidak ada perbedaan tingkat perkembangan embrio yang mencapai stadium 32 sel diantara kelompok perlakuan (P>0.05). Hasil

ini mengindikasikan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat meningkatkan persentase oosit yang membelah dan berkembang sampai stadium 16 sel. Terdapat interaksi yang nyata ($P < 0.05$) terhadap tingkat pembelahan embrio, dimana dengan adanya kombinasi penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur (IVM I+/IVC I+) menghasilkan tingkat pembelahan embrio yang paling banyak (76.6%) ($P < 0.05$) dibandingkan perlakuan kontrol (IVM I-/IVC I-) sebesar 55.8%, perlakuan penambahan insulin hanya pada medium maturasi (IVM I+/IVC I-) sebesar 64.1%, dan perlakuan penambahan insulin hanya pada medium kultur (IVM I-/IVC I+) sebesar 59.9%, hal ini dikarenakan pada perlakuan (IVM I+/IVC I+) insulin diduga mampu meningkatkan ambilan glukosa menjadi sumber energi secara maksimal untuk pematangan oosit pada saat maturasi dan juga meningkatkan pengangkutan asam amino ke dalam sel untuk perkembangan pembelahan embrio pada tahap kultur, hal ini sesuai dengan pendapat Schultz *et al.*, (1992) insulin dapat meningkatkan penggunaan glukosa sebagai sumber energi. Insulin dapat meningkatkan ambilan glukosa dan asam amino serta dapat menyebabkan pengaruh mitogenik (Frishney, 1988). Glukosa merupakan substrat energi penting untuk pematangan oosit dan perkembangan embrio, melibatkan mekanisme normal yang mengatur pematangan inti dan sitoplasma oosit dan pemeliharaan kompetensi perkembangan embrio (Hashimoto *et al.*, 2000). Insulin juga regulator penting pada proses intraseluler, seperti transportasi asam amino, glukosa, metabolisme lipid, transkripsi gen, dan sintesis protein (Cheatham & Khan, 1995). Asam amino dilaporkan digunakan sebagai sumber energi, penyangga pH intraseluler, antioksidan (Gardner *et al.*, 2000). Asam amino dapat mempengaruhi frekuensi perkembangan, meningkatkan jumlah sel blastosis dan *hatching* (Steeves & Gardner, 1999; Lee *et al.*, 2004). Hasil yang sama pada mencit menurut Sakkas and Trounson (1991) penggunaan 100 ng/mL insulin pada *co-culture* embrio mencit dapat meningkatkan jumlah sel pada tahap morula dan blastosis. Insulin merangsang penyerapan nutrisi dalam sel dan juga merangsang sintesis protein dan trigliserida (Sjaastad *et al.*, 2003), serta merangsang sintesis DNA, RNA dan protein dari tahap morula (Rao *et al.*, 1990). Insulin dapat merangsang metabolisme dan pertumbuhan embrio mencit (Harvey & Kaye, 1991).

Pengamatan hari ke-2 setelah kultur, 13.9% embrio sudah berkembang mencapai stadium 8 sel dengan penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur (IVM I+/IVC I+). Hasil ini menggambarkan embrio lebih cepat proses pembelahannya karena diduga penambahan insulin pada medium maturasi dan medium kultur dapat memaksimalkan embrio meningkatkan ambilan glukosa dan asam amino menjadi sumber energi sehingga mempercepat pembelahan embrio. Kecepatan pembelahan embrio awal dapat dijadikan indikator untuk menilai kualitas embrio (Lequaere *et al.*, 2003) dan untuk menentukan potensi embrio yang akan berkembang menjadi blastosis (Loneragan *et al.*, 2000). Waktu terjadinya pembelahan (*cleavage timing*) merupakan titik kritis karena embrio yang lebih awal berkembang memiliki potensi lebih besar dibandingkan dengan yang lambat (Meirelles *et al.*, 2004; Nedambale *et al.*, 2006).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan insulin pada medium maturasi dapat meningkatkan persentase oosit sapi yang mencapai *metaphase II*. Penambahan insulin pada medium maturasi dan kultur dapat meningkatkan jumlah embrio yang membelah.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan dan Perguruan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPP-DN) Calon Dosen periode 2014.

Daftar Pustaka

- Augustin, R., Pocar, P., Navarrete-Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann H. and Fischer B. (2001). Glucose Transporter Expression is Developmentally Regulated in *In Vitro* Derived Bovine Preimplantation Embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 60:370-376.
- Barnett, D.K., and Bavister, B.D. (1996). What is Relationship Between the Metabolism of Preimplantation Embryos and Their Developmental Competence. *Mol. Reprod. Dev.* 43:105-133.

- Cheatham, B. and Kahn, C.R. (1995). Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrinol. Rev.* 16:117-42.
- Darnell, J.E., Losish, H.F. and Baltimore, D. (1986). Molecular Cell Biology Scientific American Books Inc. 667-713.
- Frishney, R.I. (1988). Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique 2nd edition. Alan R. Liss. Inc. New York. 57-84.
- Gardner, D.K., Pool, T.B., Lane, M. (2000). Embryo Nutrition and Energy Metabolism and Its Relationship to Embryo Growth, Differentiation, and Viability. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18:205-18.
- Gordon, I. (2003). Laboratory of Cattle Production: 2nd edition. London (GB): CABI Publishing.
- Hara, H., Yamane, I., Noto, I., Kagawa, N., Kuwayama, M., Hirabayashi, Hochi, S. (2013). Microtubule Assembly and In Vitro Development of Bovine Oocytes with Increased Intracellular Glutathione Level Prior to Vitrification and In Vitro Fertilization. *Zygote.* 22:476-482.
- Harvey, M.B. and Kaye, P.L. (1991). Mouse Blastocyst Responds Metabolically to Short Term Stimulation by Insulin and IGF-1 Through the Insulin Receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 29:253-258.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H. and Kashima, N. (2000). Low Oxygen Tension During *In Vitro* Maturation Is Beneficial For Supporting the Subsequent Development of Bovine Cumulus-Oocyte Complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57:353-360.
- Karja, N.W.K., Kikuchi, K., Fahrudin, M., Ozawa, M., Somfai, T., Ohnuma, K., Noguchi, J., Kaneko, H., and Nagai T. (2006). Development To The Blastocyst Stage, The Oxidative State, And The Quality Of Early Developmental Stage Of Porcine Embryos Cultured In Alteration Of Glucose Concentrations *In Vitro* Under Different Oxygen Tensions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:54 1-12.
- Lee, E.S., Fukui, Y., Lee B.C., Lim J.M. and Hwang, W.S. (2004). Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 257-267.
- Lehninger, A.L. (1991). Dasar Dasar Biokimia. Jilid 1 dan 3. Alih Bahasa Thenawidjaja M. IPB. Penerbit Erlangga Jakarta.
- Lequare, S.A., Marchandase, J., Moreau, B., Massip, A. and Donnay, I. (2003). Cell Cycle At The Time Of Maternal Zygotic. *Biol. of Reprod.* 69:1707-1713.
- Loneragan, P., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F., Fuente, J.D., and Boland, M. (2000). Relationship Between Time First Cleavage And The Expression Of IGF-I Growth Factor, Its Receptor, And Two Housekeeping Genes In Bovine Two-Cell Embryos And Blastocyst Produced In Vitro. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 7:146-152.
- Meirelles, V.F., Caetano, R.A., Watanabe, F.Y., Ripamonte, P., Carambula, F.S., Merighe, K.G. and Garcia, M.S. (2004). Genome Activation and Developmental Block in Bovine Embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:13-20.
- Muttaqin, Z., Karja, N.W.K. and Setiadi, M.A. (2015). Kemampuan Maturasi Dan Fertilisasi Oosit Sapi Yang Diseleksi Menggunakan Teknik Pewarnaan *Brilliant Cresyl Blue*. *Jurnal Veteriner.* 16(2):242-248.
- Nedambale, L.T. Du, F., Yang, X. and Tian, C.X. (2006). Higher Survival Rate Of Vitrified And Thawed In Vitro Produced Blastocysts Following Culture In Defined Medium Supplemented With B-Mercaptoethanol. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 61-75.
- Park, S.H., Cho, H.S. and Yu, I.J. (2014). Effect of Bovine Follicular Fluid On Reactive Oxygen Species and Glutathione on Oocytes, Apoptosis and Apoptosis-Related Gene Expression of In Vitro-Produced Blastocysts. *Reprod. Dom. Anim.* 1:1-8.
- Rao, L.V., Wikarczuk, M. and Heyner, S. (1990). Functional Roles of Insulin And Insulin-like Growth Factors In Preimplantation Mouse Embryo Development. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 1043-1048.
- Rieger, D. (1996). The Metabolic Activity Of Cattle Oocytes And Early Embryos. *J. Reprod. Dev.* 42 (Suppl):85-89.

- Sakkas, D. and Trounson, A.D. (1991). Formulation of a Complex Serum-Free Medium (CSM) For Use In The Co Culture of Mouse Embryos With Cells of The Female Reproductive Tract. *Reprod. Fert. Dev.* 3:1 99-108.
- Schultz, G.A., Hogan, A., Watso, A.J., Smith, R.M. and Heyner, S. (1992). Insulin, Insulin –Like Growth Factors And Glucose Transporters: Temporal Patterns of Gene Expression In Early Murine and Bovine Embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 4: 361-371.
- Setiadi, M.A. and Karja, N.W.K. (2013). Tingkat Perkembangan Awal Embrio Sapi *In Vitro* Menggunakan Media Tunggal Berbahan Dasar *Tissue Culture Medium* (TCM) 199. *J. Kedokteran Hewan.* 7:150-154.
- Sjaastad, O.V., Hove, K. and Sand, O. (2003). *The Physiology of Domestic Animals.* 1. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1993). *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometric.* Sumantri B, penerjemah. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Steeves, T.E. and Gardner, D.K. (1999). Temporal and Differential Effects of Amino Acids on Bovine Embryo Development In Culture. *Biol. Reprod.* 61:731-740.
- Sutton, M.L., Gilchrist, R.B. and Thompson, J.G. (2010). The Pivotal Role of Glucose Metabolism in Determining Oocyte Development Competence. *Reproduction.* 139:685-695.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Taniguchi, M., Karja, N.W.K., Agung, B., Nii, M. and Nagai T. (2006). Effects of Hexoses on *In Vitro* Oocyte Maturation and Embryo Development In Pigs. *Theriogenology.* 65:332-343.