



Kultur Embrio Mencit In Vitro: Studi Perbandingan Efektifitas Media M16 dan CZB

Mice Embryo Culture In Vitro: Comparative Study of M16 and CZB Media Effectiveness

Yudi Gebri Foenna* & Jamilah Nasution

Prodi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Medan Area, Indonesia

Abstrak

Keberhasilan kultur embrio dipengaruhi oleh metode dan kondisi kultur, yang berdampak pada faktor sitoplasmik serta kemampuan perkembangan embrio. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektifitas dua medium kultur, M16 dan CZB, dalam mendukung perkembangan embrio mencit strain DDY secara *in vitro*. Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental yang terdiri dari pemeliharaan hewan uji, persiapan medium kultur, superovulasi, pengoleksian, dan kultur embrio secara *in vitro*. Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji statistik deskriptif untuk mengukur perkembangan embrio pada masing-masing medium kultur, M16 dan CZB, dalam pengamatan selama 96 jam dengan interval 24 jam menggunakan mikroskop inverted. Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio pada medium CZB mengalami 50% perkembangan tahap expanded blastosit setelah 96 jam kultur dan 50% degeneratif. Pada medium kultur M16, sebesar 0% embrio mengalami perkembangan tahapan embrio setelah waktu 96 jam kultur dan 100% mengalami degeneratif. Penelitian ini menyimpulkan bahwa perkembangan embrio secara *in vitro* dalam medium kultur M16 tidak lebih baik dari CZB, hal ini dibuktikan dari persentase pada tahapan perkembangan expanded blastosit.

Kata Kunci: Kultur embrio; Medium kultur; In Vitro; M16; CZB

Abstract

Successful embryo culture is influenced by culture methods and conditions, which have an impact on cytoplasmic factors and the ability of embryo development. This study aims to compare the effectiveness of two culture mediums, M16 and CZB, in supporting the development of DDY strain mice embryos *in vitro*. The research method used was an experimental study consisting of animal husbandry, medium culture preparation, superovulation, collection, and *in vitro* embryo culture. Data analysis in this study used descriptive statistical tests to measure embryo development in each culture medium, M16 and CZB, in observations for 96 hours with a 24-hour interval using an inverted microscope. The results showed that embryos in the CZB medium experienced 50% development of the expanded blastocyte stage after 96 hours of culture with 50% degenerative. In the M16 culture medium, 0% of embryos experienced embryonic stage development after 96 hours of culture and 100% were degenerative. This study has concluded that the development of embryos *in vitro* in the M16 culture medium was not better than CZB, this was evidenced by the percentage at the expanded blastocyte development stage.

Keywords: In Vitro Embryo culture; Culture medium; M16; CZB.

How to Cite: Foenna, Y.G. & Nasution, J. (2024). Kultur Embrio Mencit In Vitro: Studi Perbandingan Efektifitas Media M16 dan CZB. Jurnal Ilmiah Biologi UMA (JIBIOMA), 6(2) 2024: 153-164

*E-mail: yudigebr197@gmail.com

ISSN 2722-9777 (Online)



PENDAHULUAN

Bioteknologi embrio telah memberikan dampak signifikan bagi peradaban manusia dengan beragam penelitian bermanfaat seperti pengembangan sel punca embrionik (*embryonic stem cell*), terapi gen pada sel germinal, dan rekayasa genetika hewan transgenic yang mampu menghasilkan bahan biologis. Menurut Ferré *et al.*, (2020), penerapan bioteknologi ini memiliki prospek yang sangat luas, termasuk optimalisasi produksi embrio dan penggunaannya, peningkatan kualitas dan kuantitas embrio, serta produksi bahan biologis dan biomedis yang bermanfaat. Perkembangan yang pesat ini tidak hanya mendukung peningkatan produksi ternak dan konservasi satwa liar, tetapi juga memiliki potensi untuk memperbaiki kesehatan manusia secara keseluruhan.

Bioteknologi embrio di era modern saat ini menjadi salah satu teknologi reproduksi berbantuan (ART) yang unggul dalam produksi embrio *in vitro*. Teknik seperti inseminasi buatan (IB), fertilisasi *in vitro*, dan injeksi sperma intracytoplasmic (ICSI) telah lama diterapkan pada hewan ternak, satwa langka, dan manusia. Teknologi ini tidak hanya meningkatkan kualitas genetika ternak, tetapi juga membantu mengatasi tantangan dalam memperoleh keturunan Mastromonaco, 20. Menurut Gualtieri *et al.*, (2024), pengembangan bioteknologi embrio yang berfokus pada peningkatan jumlah dan kualitas individu dapat dimulai dengan pemanfaatan hewan model, yang kemudian dapat diterapkan pada hewan budidaya yang memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan hewan model tersebut. Teknik yang umum digunakan dalam proses ini adalah kultur embrio secara *in vitro*.

Keberhasilan kultur embrio secara *in vitro* berasal dari metode dan kondisi kultur. Kondisi kultur juga dapat mempengaruhi faktor sitoplasmik yang mempengaruhi kemampuan embrio untuk berkembang (Mafruchati *et al.*, 2023). Viabilitas embrio yang tinggi merupakan hal penting yang harus dicapai dalam Teknik kultur embrio. Beberapa faktor yang perlu diperhatikan meliputi jenis Teknik kultur yang digunakan, komposisi medium kultur, usia embrio, kadar CO₂, suhu inkubasi, serta lingkungan yang steril dan faktor-faktor lainnya (Sciorio & Rinaudo, 2023). Mafruchati *et al.*, (2023) mengungkapkan bahwa medium kultur yang digunakan juga dapat mempengaruhi metabolisme dari embrio.

Moustakli *et al.*, (2024) menjelaskan bahwa teknik kultur umumnya memanfaatkan media dengan komposisi yang sesuai dengan kebutuhan embrio, pemilihan dan penentuan usia embrio, serta penerapan teknik manipulasi lingkungan yang tepat agar

diperoleh embrio dengan viabilitas tinggi. Prosedur ini harus dipertimbangkan sebagai langkah untuk menghasilkan hewan dalam jumlah banyak, dalam waktu yang relative singkat, dan dengan kualitas yang baik.

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektifitas dua medium kultur, M16 dan CZB, dalam mendukung perkembangan embrio mencit strain DDY secara *in vitro*. Penelitian ini diharapkan dapat mengidentifikasi medium yang lebih optimal untuk meningkatkan viabilitas dan kualitas embrio, sehingga memberikan kontribusi pada pengembangan bioteknologi reproduksi di masa depan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada Juli hingga Agustus 2017 di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan, dan Kultur Sel Hewan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, menggunakan metode eksperimental yang mencakup pemeliharaan hewan uji, persiapan medium kultur, superovulasi, pengambilan embrio, dan kultur *in vitro*.

Persiapan Medium Stok: Medium stok (A, B, C, D, E) disiapkan dalam botol terpisah, dengan komponen spesifik dalam aquabidestilla. Medium disimpan pada suhu 5°C. Masing-masing stok dimasukkan ke dalam 5 botol medium yang berbeda. Medium stok A dalam 10 mL aquabidestilla terdapat kandungan berupa NaCl 0,5534 gram, KCl 0,8356 gram, KH₂PO₄ 0,0162 gram, MgSO₄.7H₂O 0,0293 gram, sodium laktat 50% 0,05 mL dan D-glukosa 0,1 gram. Stok B, dalam 10 mL aquabidestilla mengandung komponen NaHCO₃ 0,2101 gram dan phenol red 0,001 gram. Stok C, dalam 5 mL aquabidestilla dilarutkan senyawa sodium pyruvat sebanyak 0,018 gram. Stok D, senyawa CaCl₂.2H₂O 0,126 gram dilarutkan dalam 5 mL aquabidestilla. Sedangkan stok E, senyawa HEPES 0,04766 gram dan phenol red 0,001 gram.

Persiapan Medium Koleksi Embrio: Medium M2 disiapkan dengan mencampurkan stok A hingga E, H₂O, dan BSA dalam aquabidestilla steril, kemudian disaring dan disimpan pada suhu 5°C. Medium ini menjaga kelangsungan hidup embrio saat koleksi. Medium yang digunakan pada saat pengkoleksiaan sel embrio adalah medium M2. Medium M2 dibuat dengan melarutkan beberapa stok medium yang telah dipersiapkan sebelumnya seperti stok A 1 µL, B 0,16 µL, C 0,1 µL, D 0,1 µL, E 0,84 µL, H₂O 7,80 µL dan BSA 40 mg dalam 10 mL aquabidestilla steril. Hasil pencampuran medium stok kemudian difilter menggunakan spluit dan millipore filter.

Persiapan Medium Kultur Embrio: Medium M16 disiapkan dari campuran stok serupa dengan medium koleksi dan digunakan untuk perkembangan embrio, juga disimpan pada suhu 5°C. Medium CZB + HEPES digunakan sebagai pembanding. Medium kultur yang digunakan untuk sel embrio adalah medium M16. Medium M16 dibuat dengan melarutkan beberapa stok medium yang juga telah dipersiapkan sebelumnya seperti stok A 1 µL, B 1 µL, C 0,1 µL, D 0,1 µL, H₂O 7,80 µL dan BSA 40 mg dalam 10 mL aquabidestilla steril. Hasil pencampuran medium stok kemudian difilter menggunakan spluit dan millipore filter.

Perlakuan Superovulasi: Tiga mencit betina (usia 3-4 bulan, berat 30-35 g) disuntik PMSG 7,5 IU dan hCG 5 IU untuk superovulasi. Penyuntikan hCG dilakukan setelah 48 jam penyuntikan PMSG (Li *et al.*, 2024).

Pengoleksian Embrio: Embrio diperoleh dari oviduk mencit yang telah dikawinkan alami, ditempatkan dalam medium koleksi M2 atau CZB, lalu dipindahkan ke medium M16 atau CZB untuk kultur.

Pelaksanaan Kultur In Vitro: Embrio ditempatkan dalam cawan berisi medium kultur M16 atau CZB, yang ditutupi mineral oil untuk mencegah kontaminasi dan diinkubasi pada 37,5°C. Perkembangan embrio diamati setiap 24 jam selama 4 hari menggunakan mikroskop inverted.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji statistik deskriptif untuk mengukur perkembangan embrio pada masing-masing medium kultur, M16 dan CZB, selama 96 jam dengan interval 24 jam menggunakan mikroskop inverted. Data ditampilkan dalam bentuk persentase tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan perkembangan sel embrio dilakukan 24 jam sekali dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Perkembangan sel embrio dapat dilihat dari struktur intraseluler embrionya dimulai dari perkembangan tahap morula sampai ke tahap blastosis. Tahapan blastosis pada embrio ditandai dengan terbentuknya *blastocoele*, yaitu rongga intraseluler yang terisi oleh cairan seluler, sehingga menghasilkan struktur berongga (Shahbazi, 2020). Penelitian ini menggunakan dua jenis medium kultur *in vitro* yang berbeda yaitu M16 dan CZB. Hasil pengamatan perkembangan embrio dari kedua jenis medium kultur *in vitro* pada 0 jam dapat diamati pada Tabel 1. berikut ini:

Tabel 1. Pengamatan setelah 0 jam tahap perkembangan sel embrio mencit setelah dipindahkan dalam medium kultur in vitro

Media Kultur	ΣEmbrio	Tahap Perkembangan Embrio (%)				
		Σ6-8 Sel	Σ8-16 Sel Morula	ΣCompactin g Morula	ΣEarly Blastosis	ΣExpanded Blastosis
M16	10	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	0 (0%)
CZB	4	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)

Jumlah sel embrio yang berhasil diperoleh dari proses penorehan organ oviduk sebanyak 14 embrio. Jumlah sel embrio yang dikultur di dalam medium M16 adalah 10 embrio dengan persentase perkembangan masing-masing yaitu 10% tahap 6-8 sel, 20% 8-16 sel morula, 20% *compacting morula*, dan terbanyak ditemukan 50% tahap perkembangan blastosis awal. Adapun jumlah sel embrio yang dikultur di dalam medium CZB sebanyak 4 embrio dengan persentase masing-masing perkembangan yaitu 50% pada tahap 8-16 sel morula dan 50% lagi pada tahap blastosis awal. Hasil pengamatan perkembangan sel embrio setelah 24 jam kultur dapat dilihat pada Tabel 2. berikut ini:

Tabel 2. Pengamatan setelah 24 jam kultur sel embrio mencit secara in vitro

Media Kultur	ΣEmbrio	Tahap Perkembangan Embrio (%)				
		Σ8-16 Sel Morula	ΣCompacting Morula	ΣEarly Blastosis	ΣExpanded Blastosis	ΣDegeneratif
M16	10	1 (10%)	0 (0%)	4 (40%)	0 (0%)	5 (50%)
CZB	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Persentase jumlah sel embrio yang berhasil berkembang di dalam medium drop kultur M16 masing-masing adalah 10% pada tahap 6-8 sel, 40% tahap blastosis awal, dan 50% sisanya mengalami degeneratif (kematian sel). Berbeda dengan medium kultur M16, persentase jumlah sel embrio yang berhasil dikultur di dalam medium drop kultur CZB yaitu 100% sedang berkembang di tahap blastosis awal. Hasil pengamatan ini membuktikan bahwa tingkat keberhasilan embrio pada medium kultur CZB menunjukkan persentase yang lebih besar dibandingkan pada medium kultur M16. Kondisi kedua medium kultur pun terlihat berbeda pada pengamatan 24 jam kultur. Pada medium M16 terlihat adanya bibit kontaminasi yang ditandai kondisi medium yang sudah mulai mengeruh. Pada medium CZB, kondisi medium masih terlihat bersih. Pengamatan jumlah perkembangan sel embrio setelah 48 jam kultur dapat dilihat pada Tabel 3. berikut ini:

Tabel 3. Pengamatan setelah 48 jam kultur sel embrio mencit secara in vitro

Media Kultur	Σ Embrio	Tahap Perkembangan Embrio (%)				
		Σ 8-16 Sel Morula	Σ Compacting Morula	Σ Early Blastosis	Σ Expanded Blastosis	Σ Degeneratif
M16	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)
CZB	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

Persentase jumlah perkembangan sel embrio setelah 48 jam kultur pada medium M16 terjadi penurunan drastis yaitu 100% mengalami kematian sel (degeneratif). Kondisi kontaminasi ini teramati di setiap medium drop secara keseluruhan. Sedangkan pada medium CZB, persentase jumlah sel embrio mencapai 100% berhasil berkembang hingga tahap blastosis awal dan kondisi medium masih terlihat bersih. Pengamatan jumlah perkembangan sel embrio setelah 72 jam kultur dapat dilihat pada Tabel 4. berikut ini:

Tabel 4. Pengamatan setelah 72 jam kultur sel embrio mencit secara in vitro

Media Kultur	Σ Embrio	Tahap Perkembangan Embrio (%)				
		Σ 8-16 Sel Morula	Σ Compacting Morula	Σ Early Blastosis	Σ Expanded Blastosis	Σ Degeneratif
M16	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)
CZB	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

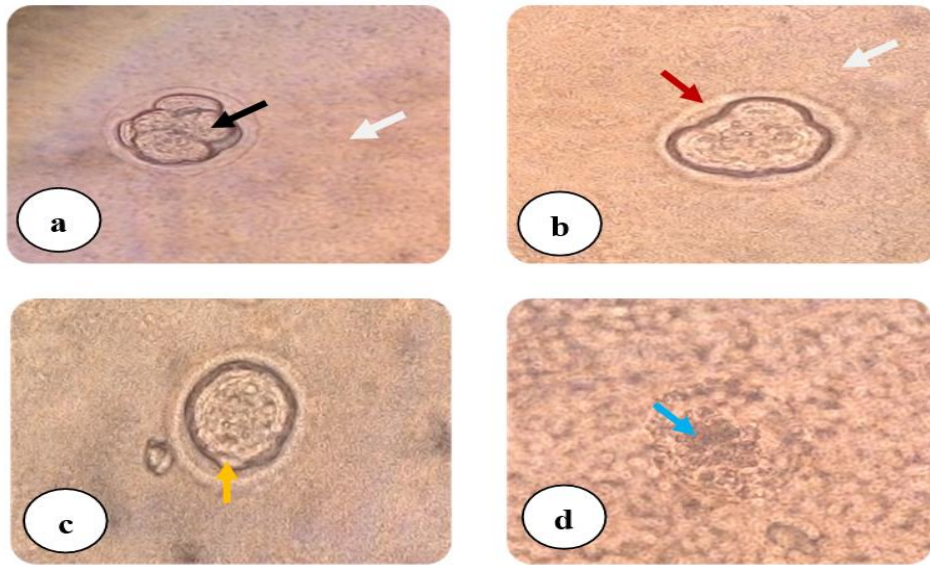
Kondisi medium CZB setelah 72 jam kultur mulai mengalami kekeruhan. Pengamatan yang dilakukan di bawah mikroskop *inverted* menunjukkan bahwa kondisi medium sudah mengalami kontaminasi. Pada medium CZB, persentase perkembangan embrio masih pada tahap blastosis awal, belum menunjukkan adanya perubahan yang signifikan. Hasil pengamatan jumlah perkembangan sel embrio setelah 96 jam kultur dapat dilihat pada Tabel 5. berikut ini:

Tabel 5. Pengamatan setelah 96 jam kultur embrio mencit secara in vitro

Media Kultur	Σ Embrio	Tahap Perkembangan Embrio (%)				
		Σ Compactin g Morula	Σ Early Blastosis	Σ Expanded Blastosis	Σ Full Expanded Blastosis	Σ Degeneratif
M16	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)
CZB	4	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)

Pada 96 jam kultur, kondisi keseluruhan medium CZB terlihat secara jelas adanya kontaminasi di bawah pengamatan menggunakan mikroskop *inverted*. Persentase perkembangan embrio dalam medium CZB, 50% embrio mengalami pembesaran *blastocoele*. Kondisi ini menandakan bahwa embrio sudah berkembang ke tahap *expanded blastocyst* (rongga intraselluler yang sudah mulai meluas). Sedangkan 50% sisanya telah

mengalami kematian sel (degeneratif). Tahapan perkembangan embrio pada medium kultur M16 dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Morfologi tahap perkembangan sel embrio dalam medium kultur M16: a. 6-8 sel, b. 8-16 sel morula, c. Blastosis awal (*Early blastocyst*), d. Unfertil (*Degeneratif*). Keterangan : Sel yang membelah (Hitam), Kematian sel/sel degeneratif (Biru), Zona pellucida (Merah), *inner cell mass* (Orange), Medium kultur (Putih) (Sumber : Dokumentasi pribadi)

Berdasarkan Gambar 1, perkembangan embrio dalam medium kultur M16 menunjukkan beberapa tahapan kritis yang menggambarkan kondisi embrio pada fase awal. Pada Gambar 1a, terlihat embrio pada fase 6-8 sel, ditandai dengan adanya sel yang membelah secara aktif (panah hitam), yang menunjukkan bahwa proses pembelahan mitosis berjalan dengan baik. Kondisi ini merupakan fase normal dalam perkembangan embrio. Namun, pada Gambar 1b, yang mewakili tahap morula (8-16 sel), terlihat adanya zona pellucida (panah merah) yang tetap utuh, tetapi menunjukkan tanda-tanda kekeruhan pada sekitar lingkungan medium (panah putih), yang dapat memicu beberapa sel mengalami kerusakan struktural dan kematian sel, yang sering kali terjadi pada embrio dengan kualitas suboptimal. Pada Gambar 1c, embrio mulai memasuki fase blastosis awal, yang disirikan oleh pembentukan *inner cell mass* (panah orange). Tahap ini sangat penting karena dapat menentukan keberhasilan implantasi jika embrio terus berkembang. Namun, pada Gambar 1d, embrio tampak tidak berkembang secara normal (degeneratif), yang ditandai dengan kematian sel yang signifikan (panah biru), mengindikasikan bahwa kultur embrio mengalami kondisi tidak optimal. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor

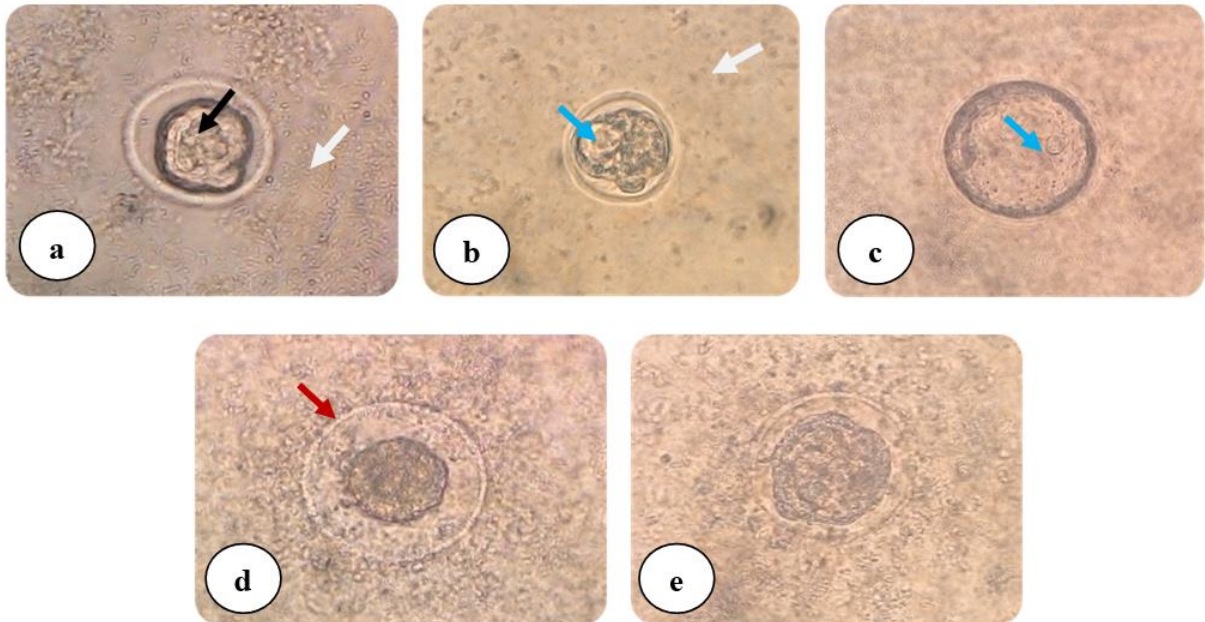
eksternal seperti komposisi medium kultur atau kondisi lingkungan yang tidak mendukung perkembangan embrio secara optimal.

Secara umum, Gambar 1 menunjukkan kondisi medium kultur yang tampak sedikit buram dan kotor, terutama terlihat jelas pada Gambar 1d, di mana degradasi sel embrio lebih jelas tampak. Kondisi ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor. Peneliti menduga adanya kemungkinan kontaminasi dalam medium kultur yang disebabkan oleh mikroorganisme, partikel debu, atau zat sisa metabolik dari embrio yang berkembang (Zheng *et al.*, 2023). Ketika embrio mulai mengalami degenerasi atau kematian sel, seperti yang terlihat pada Gambar 1d (panah biru), sisa-sisa sel mati dapat terlepas ke dalam medium kultur dan mencemari lingkungan sehingga mengakibatkan medium terlihat buram.

Menurut Mafruchati *et al.*, (2023), medium M16 adalah medium yang memiliki komposisi dasar cukup mirip dengan komposisi medium HTF, yang digunakan untuk kultur *in vitro* embrio manusia. Sebenarnya, medium M16 dirancang untuk mendukung fertilisasi *in vitro* (FIV) pada mencit. Kemampuan medium M16 dalam menyediakan zat-zat yang diperlukan oleh sel telur dan spermatozoa memungkinkan terjadinya proses FIV. Jika sel diambil dari jaringan atau organ asalnya dan dibuat kultur, medium yang digunakan harus menciptakan semua kondisi lingkungan serupa dengan keadaan yang dialami oleh sel dalam kondisi *in vivo*. Jumlah dan komposisi zat-zat dalam medium M16 menyerupai jumlah dan komposisi zat-zat dalam cairan saluran reproduksi betina, sehingga mendukung perkembangan embrio secara *in vitro*.

Degenerasi yang terjadi pada kultur embrio mencit dalam medium M16 umumnya disebabkan oleh dua faktor. Faktor pertama berasal dari luar medium kultur, seperti penanganan yang kurang baik dan penggunaan peralatan yang tidak steril. Yao & Asayama (2016) menjelaskan bahwa medium M16 menggunakan sistem buffer bikarbonat yang berfungsi menjaga stabilitas pH. Fluktuasi suhu pada inkubator juga dapat mempengaruhi pH tersebut. Penyimpanan medium pada suhu yang terlalu rendah dapat mengubah kelarutan CO₂ dan ionisasi pH dari buffer, sehingga mempengaruhi pH. Perubahan pH ini berdampak langsung pada pertumbuhan sel. Penyimpanan pada suhu tinggi dapat menghasilkan senyawa yang tidak diinginkan, seperti radikal bebas.

Selain kemampuan medium M16 dalam mendukung perkembangan, Mafruchati *et al.*, (2023) menekankan pentingnya menjaga sterilitas selama proses FIV dan kultur embrio, baik pada peralatan maupun tempat kultur. Upaya ini bertujuan mencegah kontaminasi bakteri yang tidak diinginkan, sehingga proses perkembangan embrio tidak terganggu. Penggunaan medium M16 untuk kultur sel telur dan embrio sangat rentan terhadap kontaminasi. Kelembapan suhu di dalam inkubator juga dapat berkontribusi pada pertumbuhan organisme lain. Kontaminasi dapat terjadi akibat udara luar yang masuk saat kultur berlangsung dan alat yang digunakan dalam persiapan medium. Faktor kedua berasal dari dalam medium kultur itu sendiri, meliputi kondisi medium dan zat tambahan yang berfungsi sebagai suplementasi nutrisi bagi perkembangan embrio. Berikut ini adalah tahapan perkembangan embrio hasil kultur dalam medium CZB dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Morfologi tahap perkembangan sel embrio dalam medium kultur CZB : a. 8-6 sel, b. Blastosis awal (*Early blastocyst*), c. Blastosis ekspan (*Expanded blastocyst*), d. Blastosis mau degeneratif, e. Blastosis degeneratif. Keterangan : Sel yang membelah (Hitam), Rongga/*blastocoel* (Biru), Zona pellucida (Merah), Medium kultur (Putih) (Sumber : Dokumentasi pribadi)

Gambar 2 menunjukkan perkembangan sel embrio dalam medium kultur CZB. Tahapan yang diamati termasuk morfologi dari 8-16 sel (a) hingga blastosis degeneratif (e). Pada Gambar 2a-b, terlihat perkembangan embrio yang relatif normal dengan struktur sel yang kompak dan zona pellucida (ditunjukkan dengan panah merah pada Gambar 2b) masih utuh, menandakan blastosis awal. Gambar 2c memperlihatkan *expanded blastocyst*, yang menunjukkan rongga/*blastocoel* yang lebih besar (ditandai dengan panah biru),

mengindikasikan bahwa embrio berada dalam tahap yang lebih lanjut sebelum implantasi. Namun, pada Gambar 2d-e, terlihat adanya tanda-tanda degenerasi, di mana sel-sel tampak mengalami kerusakan dan degradasi, terutama dengan semakin kaburnya zona pellucida dan sel-sel di dalamnya (yang ditunjukkan oleh morfologi blastosis yang mengalami degenerasi).

Kondisi medium kultur pada gambar di atas tampak relatif baik hingga tahapan blastosis awal, meskipun mulai terlihat adanya degradasi selular pada tahapan blastosis ekspansi. Penyebab degradasi ini diduga terkait dengan pengaruh kualitas kultur, penurunan nutrisi, atau akumulasi produk metabolik, yang dapat mempercepat proses degenerasi pada sel embrio. Selain itu, faktor-faktor seperti kualitas udara di ruang kultur dan kemungkinan kontaminasi mikroba juga bisa berkontribusi pada kerusakan sel.

Medium pembanding yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium CZB. Yao & Asayama (2016) mengungkapkan bahwa medium CZB sering digunakan untuk kultur embrio secara *in vitro* karena mampu mengatasi hambatan sel blok kandungan EDTA dan glutamin yang efektif, terutama pada mencit. Xie *et al.*, (2016) melaporkan bahwa medium CZB mengandung NaCl dan KCl (sebagai garam anorganik) yang berperan dalam mengatur osmolaritas medium, serta asam amino esensial dan non esensial yang diperlukan bagi metabolisme embrio pra dan pasca implantasi. Penambahan komponen lain seperti sodium piruvat, asam laktat dan glutamin juga berfungsi sebagai sumber energi bagi perkembangan embrio. Sedangkan penambahan NaHCO₃ juga berperan sebagai *buffer* dalam menjaga kestabilan pH (derajat keasaman) medium, meskipun hanya dalam rentang pH 6,7-7,8. Ini dapat membantu mencegah kerusakan embrio akibat perubahan pH.

Penelitian ini menunjukkan bahwa pH medium kultur berada dalam rentang 7,2-7,4. Temuan ini sejalan dengan penelitian Chansel-Debordeaux *et al.*, (2023), yang mengungkapkan bahwa pH optimum untuk kultur *in vitro* yang mendukung perkembangan embrio praimplantasi adalah 7,0-7,6. Yao & Asayama (2016) melaporkan bahwa medium kultur CZB juga mengandung serum berupa BSA (*Bovine Serum Albumin*). Penambahan serum ke dalam medium kultur berkontribusi pada perkembangan embrio secara *in vitro*, karena serum mengandung komponen yang dapat memengaruhi proses perkembangan embrio.

Medium yang digunakan dalam kultur embrio dirancang sesuai dengan tujuan penggunaan kultur jaringan atau organ (Simopoulou *et al.*, 2018). Penggunaan medium

M16 dan CZB bertujuan untuk memenuhi kebutuhan dasar sel gamet agar dapat berkembang menjadi embrio. Secara umum, embrio memerlukan lingkungan yang serupa dengan kondisi yang dibutuhkan oleh sel mamalia lainnya secara *in vivo*. Unsur-unsur yang diperlukan dalam kultur *in vitro* embrio yang terdapat dalam medium M16 dan CZB meliputi substrat, udara, air, dan suhu. Substrat dalam medium kultur M16 dan CZB terdiri dari bahan kimia baik organik maupun anorganik. Jumlah substrat yang ditambahkan diatur sedemikian rupa agar mendekati komposisi zat-zat dalam cairan tuba falopi, tempat embrio berkembang. Substrat ini mencakup nutrisi dan zat-zat lain dalam bentuk terlarut, di mana nutrisi yang diberikan berfungsi sebagai sumber energi dan protein (Yao & Asayama, 2016).

Selaras dengan faktor kontaminasi dan ketersediaan nutrisi, Yagmur *et al.*, (2022), menyatakan bahwa keseimbangan gas CO₂ juga berpengaruh terhadap keberhasilan perkembangan embrio secara *in vitro*. Pada penelitian ini, digunakan inkubator dengan kandungan CO₂ 5% untuk meningkatkan tingkat keberhasilan perkembangan embrio. Kondisi kultur yang menyediakan gas CO₂ sebanyak 5% sangat membantu menjaga kestabilan pH medium kultur. Dubey *et al.*, (2021) menyebutkan bahwa embrio yang dikultur dalam lingkungan CO₂ 5% bertujuan agar sel-sel dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Selama proses inkubasi, media kultur *in vitro* sering mengalami perubahan yang biasanya disebabkan oleh berbagai faktor, seperti kontaminasi, kehilangan zat-zat penting, dehidrasi, perubahan pH, dan denaturasi protein yang dapat merusak sel. Perubahan-perubahan ini dapat diatasi dengan kondisi inkubator CO₂ yang sesuai.

Berdasarkan keseluruhan pengamatan yang telah dilakukan pada medium kultur M16, embrio hanya mampu berkembang hingga 48 jam kultur, sedangkan setelah 48 jam persentase embrio mengalami degenerasi meningkat tajam hingga 100% atau setara dengan total keseluruhan embrio. Pada medium CZB, hasil pengamatan menunjukkan 50% embrio berhasil berkembang hingga tahap expanded blastocyst setelah 96 jam kultur dan 50% sisanya mengalami degenerasi. Walaupun tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dihasilkan dari kedua medium kultur *in vitro* terlihat jelas pada medium CZB, namun jumlah daya hidup embrio yang dihasilkan dari penelitian ini masih tergolong rendah. Sehingga, penelitian lanjutan dengan jumlah sel embrio yang lebih banyak dan didukung oleh pengulangan yang cukup sangatlah penting untuk dilakukan di masa depan.

SIMPULAN

Hasil penelitian mengindikasikan bahwa perkembangan embrio terbaik secara *in vitro* terjadi pada medium kultur CZB, hal ini dibuktikan dengan 50% embrio mampu berkembang hingga tahap *expanded blastocyst* setelah 96 jam kultur.

DAFTAR PUSTAKA

- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. doi:10.1017/S1751731119002775
- Chansel-Debordeaux, L., Carles, M., Moreau, J., Depuydt, C., Gallo, S., Genvrin, E., Léandri, R., Gatimel, N. (2023). How and when to measure pH in IVF culture media: validation of a portable blood gas analyzer in two IVF culture dishes for time lapse and conventional incubators. *J Assist Reprod Genet.*, 40(7), 1677-1687. doi: 10.1007/s10815-023-02828-6. Epub 2023 Jun 14. PMID: 37314570; PMCID: PMC10352227.
- Dubey, A. K., Lavanya, L., Sadananda, D., Gouthami, K., Elfansu, K., Singh, A., Singh, A. and Singh, A. K. (2021). Inferences of Carbon Dioxide in Present-Day Cell Culture Systems: An Unacknowledged Problem and Perspectives. *Austin Therapeutics*, 6(1), 1033. DOI:10.26420/AUSTINTHERAPEUTICS.2021.1033
- Gualtieri, R., De Gregorio, V., Candela, A., Travaglione, A., Genovese, V., Barbato, V., Talevi, R. (2024). *In Vitro Culture of Mammalian Embryos: Is There Room for Improvement?* *Cells*. 13(12), 996. <https://doi.org/10.3390/cells13120996>
- Li, M., Han, J., Yang, N., Li, X. and Wu, X. (2024). Transcriptome profiling reveals superovulation with the gonadotropin-releasing hormone agonist trigger impaired embryo implantation in mice. *Front. Endocrinol*, 15, 1354435. doi: 10.3389/fendo.2024.1354435
- Mafruchati, M., Makuwia, J. (2023). Analysis of mice (*Mus musculus* L.) and hamster embryo development using culture and vitrification medium: Systematic review. *Open Vet J.*, 13(2), 143-149. doi: 10.5455/OVJ.2023.v13.i2.2. Epub 2023 Feb 4. PMID: 37073251; PMCID: PMC10105789.
- Mastromonaco, A. F. (2024). A quarter century of CANDES: The state of embryo technologies in companion animals, non-domestic and endangered species. *Theriogenology Wild*, Volume 4, 100069. ISSN 2773-093X, <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100069>.
- Moustakli, E., Zikopoulos, A., Skentou, C., Bouba, I., Dafopoulos, K., Georgiou, I. (2024). Evolution of Minimally Invasive and Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing: An Overview. *Journal of Clinical Medicine*, 13(8): 2160. <https://doi.org/10.3390/jcm13082160>
- Sciorio, R. & Rinaudo, P. (2023). Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 40. 1-17. Doi: 10.1007/s10815-023-02934-5.
- Shahbazi, M. N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*, 147(14), dev190629. doi: 10.1242/dev.190629. PMID: 32680920; PMCID: PMC7375473.
- Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Rapani, A., Giannelou, P., Anifandis, G., Bolaris, S., Pantou, A., Lambropoulou, M., Pappas, A., Deligeoroglou, E., Pantos, K., Koutsilieris, M. (2018). Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics. *In Vivo*, 32(3), 451-460. doi: 10.21873/invivo.11261. PMID: 29695546; PMCID: PMC6000787.
- Xie, H. L., Wang, Y. B., Jiao, G. Z., Kong, D. L., Li, Q., Li, H., Zheng, L. L., and Tan, J. H. (2016). Effects of glucose metabolism during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Sci Rep*, 6, 20764. <https://doi.org/10.1038/srep20764>
- Yagmur, E., Melek, B., Aydin, A., Murat, B. (2022). The Assessment of Purity Level of CO2 Used in Horizontal Incubators and The Effect of Additional In-Line Filters on Embryo Development. *Am J Biomed Sci & Res.*, 7(2), 126-131. AJBSR.MS.ID.002323, DOI: 10.34297/AJBSR.2022.17.002323.
- Yao, T. and Asayama, Y. (2016). Human Preimplantation Embryo Culture Media: Past, Present, and Future. *Journal of Mammalian Ova Research*, 33(1), 17-34. <https://doi.org/10.1274/jmor.33.17>
- Zheng, T., Li, Q., Chen, N., Du, P., Ye, H. (2023). Analysis of the clinical outcomes of microbial contamination caused by environmental contamination of the embryology laboratory during IVF-ET treatment cycles. *BMC Pregnancy Childbirth*, 23(1): 190. doi: 10.1186/s12884-023-05516-6. PMID: 36934251; PMCID: PMC10024385.