

RINGKASAN**PENENTUAN KONSENTRASI DAN UJI BIOAKTIVITAS
FAKTOR PERTUMBUHAN DAN HORMON STEROID KELAMIN
PRODUK SEL *MONOLAYER* SEL KUMULUS DAN SEL EPITEL TUBA
SEBAGAI PEMACU PERTUMBUHAN**

Sapi Bali merupakan ternak potong mumi Indonesia yang memiliki beberapa keunggulan antara lain, mudah beradaptasi terhadap lingkungan dan memiliki persentase karkas yang cukup tinggi. Populasi sapi Bali di pulau Bali diperkirakan mulai menurun sebagai akibat pesatnya perkembangan pariwisata sehingga terjadi penurunan lahan dan minat petani untuk mengembangkan sektor peternakan. Pengiriman antar pulau dan pemotongan hewan pada umur produktif juga dapat mengakibatkan penurunan populasi disamping sistem peternakan yang dilakukan masih bersifat tradisional sehingga angka kelahiran dan pertumbuhan berat badan masih rendah.

Penggunaan sel kumulus, sel epitel tuba Fallopii dan endometrium sebagai ko-kultur dalam media biakan embrio telah banyak dilaporkan dapat meningkatkan angka *cleavage* embrio, hal ini menunjukkan bahwa sel kumulus dan sel epitel tuba Fallopii menghasilkan substansi yang dapat memacu pertumbuhan embrio. Estrogen dan progesteron merupakan hormon steroid kelamin yang terutama diproduksi oleh ovarium. *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) juga diproduksi oleh sel granulosa folikel yang berperan dalam proses steroidogenesis dalam folikel.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menganalisis kemampuan sel kumulus dan sel epitel tuba sapi Bali yang dibiakkan secara *monolayer* sebagai ko-kultur media biakan embrio sapi, menganalisis produk sel yang dihasilkan oleh biakan *monolayer* sel kumulus dan sel epitel tuba sapi Bali serta penggunaan produk sel biakan *monolayer* sebagai pemacu pertumbuhan pada sapi Bali betina umur 7 – 8 bulan .

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Dalam penelitian ini digunakan organ reproduksi (ovarium dan tuba Fallopii) sapi Bali betina yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Mambal Kabupaten Badung Propinsi Bali. Untuk mendapatkan sel kumulus, dilakukan aspirasi pada folikel ovarium yang berdiameter ≥ 2 mm dengan menggunakan spuit 10 ml dengan jarum ukuran 18 G yang telah diisi dengan $\pm 0,5$ ml media biakan (TCM 199). Hasil aspirasi folikel ditampung dalam tabung gelas steril kemudian dilakukan sentrifugasi 1000 x g selama 10 menit. Cairan supernatan dibuang, selanjutnya bagian yang mengendap (pellet) dicuci dengan menambahkan 3 ml media biakan TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dan dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 x g selama 10 menit. Cairan supernatan kembali dibuang dan bagian pellet ditambahkan dengan media TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dengan perbandingan 1 : 1 sehingga terbentuk suspensi sel. Dilakukan pengenceran suspensi sel dengan media TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dengan perbandingan 1 : 9 kemudian dihitung konsentrasi sel dalam tiap ml media. Konsentrasi sel yang diperoleh adalah $1,9 \times 10^6$ sel/ml media. Untuk mendapatkan sel

epitel tuba, dilakukan tripsinasi pada lumen tuba dengan memasukkan larutan 0,125 % tripsin kedalam lumen tuba dan lumen tuba diikat pada kedua ujungnya kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah inkubasi, cairan dari lumen tuba ditampung dalam tabung gelas steril dan lumen tuba dibilas dengan media biakan (TCM 199). Hasil bilasan ditampung pada tabung gelas yang sama, selanjutnya dilakukan sentrifugasi 1000 x g selama 10 menit. Cairan supernatan dibuang, selanjutnya bagian yang mengendap (pellet) dicuci dengan menambahkan 3 ml media biakan TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dan dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 x g selama 10 menit. Cairan supernatan kembali dibuang dan bagian pellet ditambahkan dengan media TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dengan perbandingan 1 : 1 sehingga terbentuk suspensi sel. Dilakukan pengenceran suspensi sel dengan media TCM 199 yang mengandung 10 % FCS dengan perbandingan 1 : 9 kemudian dihitung konsentrasi sel dalam tiap ml media. Konsentrasi sel yang diperoleh adalah $1,9 \times 10^6$ sel/ml media. Untuk membiakan sel kumulus dan sel epitel tuba, diambil 50 µl media yang mengandung sel lalu dipindahkan pada cawan petri yang berisi 450 µl media TCM 199 + 10 % FCS tanpa atau dengan penambahan hipotaurin, kemudian diinkubasikan pada suhu 38,5 °C dengan tekanan 5 % CO₂. Konsentrasi hipotaurin yang ditambahkan pada media biakan sel adalah 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM. Penggantian media dilakukan setiap 3 hari sekali dengan mengambil 450 µl media biakan sel dan mengganti dengan 450 µl media baru. Penentuan konsentrasi IGF-1 dan hormon steroid (estrogen dan progesteron) dilakukan pada media

yang dipanen pada hari ke 6 dan 9 masa inkubasi. Penentuan konsentrasi IGF-1 dilakukan dengan metode *Immuno Radio Metric Assay* (IRMA) sedangkan penentuan konsentrasi estrogen dan progesteron dilakukan dengan metode *Radio Immuno Assay* (RIA). Uji bioaktivitas *in vitro* biakan sel kumulus dan sel epitel tuba dilakukan dengan menggunakannya sebagai ko-kultur dalam media biakan embrio. Embrio yang digunakan adalah embrio sapi Bali hasil fertilisasi *in vitro* yang telah mencapai fase ≤ 8 sel atau 2 hari setelah fertilisasi kemudian dibiakan pada media dengan ko-kultur sel kumulus dan sel epitel tuba. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan setiap hari dan penggantian media biakan dilakukan setiap 3 hari sekali sampai embrio mencapai fase ≥ 32 sel atau 6 hari setelah fertilisasi. Uji bioaktivitas *in vivo* dilakukan dengan menyuntikan 10 ml produk sel biakan sel kumulus pada sapi Bali betina umur 7 – 8 bulan. Penyuntikan dilakukan 2 kali seminggu selama 6 minggu dan penimbangan berat badan dilakukan sebelum perlakuan dan diulang setiap minggu sampai 3 minggu setelah penyuntikan terakhir.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi IGF-1 produk sel biakan *monolayer* sel kumulus dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut $303,33 \pm 31,41$ ng/ml ; $395,00 \pm 44,16$ ng/ml dan $370,00 \pm 26,08$ ng/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $293,33 \pm 33,86$ ng/ml ; $341,68 \pm 33,71$ ng/ml dan $308,33 \pm 39,20$ ng/ml. Rata-rata konsentrasi IGF-1 produk sel biakan *monolayer* sel epitel tuba dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut adalah $256,68 \pm 21,60$ ng/ml ; $275,00 \pm$

15,17 ng/ml dan $268,33 \pm 24,83$ ng/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $235,00 \pm 20,74$ ng/ml ; $271,67 \pm 25,63$ ng/ml dan $260,00 \pm 20,00$ ng/ml. Rataan konsentrasi estrogen produk sel biakan *monolayer* sel kumulus dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut adalah $120,00 \pm 5,48$ pg/ml ; $145,00 \pm 4,47$ pg/ml dan $139,17 \pm 3,76$ pg/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $111,68 \pm 6,06$ pg/ml ; $131,68 \pm 6,06$ pg/ml dan $130,83 \pm 5,85$ pg/ml. Rataan konsentrasi estrogen produk sel biakan *monolayer* sel epitel tuba dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut adalah $114,17 \pm 8,01$ pg/ml ; $124,17 \pm 5,85$ pg/ml dan $111,67 \pm 6,83$ pg/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $112,50 \pm 12,15$ pg/ml ; $117,50 \pm 6,12$ pg/ml dan $120,83 \pm 3,76$ pg/ml. Rataan konsentrasi progesteron produk sel biakan *monolayer* sel kumulus dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut adalah $1,03 \pm 0,14$ ng/ml ; $1,65 \pm 0,17$ ng/ml dan $1,59 \pm 0,12$ ng/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $0,81 \pm 0,18$ ng/ml ; $1,65 \pm 0,10$ ng/ml dan $1,51 \pm 0,12$ ng/ml. Konsentrasi progesteron produk sel biakan *monolayer* sel epitel tuba dengan lama inkubasi 6 hari dan konsentrasi hipotaurin 0 mM (tanpa hipotaurin), 4 mM dan 8 mM berturut-turut adalah $0,84 \pm 0,16$ ng/ml ; $1,20 \pm 0,25$ ng/ml dan $1,17 \pm 0,12$ ng/ml sedangkan dengan lama inkubasi 9 hari adalah $0,66 \pm 0,07$ ng/ml ; $1,08 \pm 0,12$ ng/ml dan $1,07 \pm 0,12$ ng/ml. Persentase embrio sapi Bali yang mencajai fase ≥ 32 sel pada media biakan dengan ko-kultur sel kumulus adalah 21,59 % (19 dari 88 embrio yang dibiakan) sedangkan

pada media biakan dengan ko-kultur sel epitel tuba persentase embrio sapi Bali yang mencapai fase ≥ 32 sel adalah 40 % (28 dari 70 embrio yang dibiakkan). Rataan berat badan anak sapi Bali betina kelompok kontrol pada awal penelitian adalah $169,86 \pm 9,6$ kg dan pada akhir penelitian adalah $177,36 \pm 9,32$ kg sedangkan untuk kelompok yang mendapat injeksi produk sel pada awal penelitian adalah $152,00 \pm 15,43$ kg dan pada akhir penelitian adalah $170,79 \pm 15,54$ kg.

Analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi IGF-1, estrogen dan progesteron produk sel biakan kumulus berbeda secara bermakna ($p < 0,05$) dengan produk sel biakan sel epitel tuba. Penambahan hipotaurin menyebabkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap konsentrasi IGF-1, estrogen dan progesteron baik pada biakan sel kumulus maupun pada biakan sel epitel tuba, sedangkan antara konsentrasi hipotaurin 4 mM dengan 8 mM tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). Lama Inkubasi menyebabkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap konsentrasi IGF-1, estrogen dan progesteron produk sel. Terhadap perkembangan embrio dalam mencapai fase morula (≥ 32 sel), secara statistik tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) penggunaan sel kumulus dan sel epitel tuba sebagai ko-kultur media biakan embrio. Terhadap pertambahan berat badan, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara sapi Bali umur 7 - 8 bulan yang mendapat injeksi (10 ml / ekor sebanyak 2 kali seminggu selama 6 minggu) produk sel biakan *monolayer* sel kumulus dengan yang tidak mendapat injeksi.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sel kumulus dan sel epitel tuba Fallopii menghasilkan faktor pertumbuhan (IGF-1) dan hormon steroid kelamin (estrogen dan progesteron). Baik sel kumulus maupun sel epitel tuba Fallopii dapat dipergunakan sebagai ko-kultur dalam media biakan embrio. Produk sel biakan *monolayer* sel kumulus dapat digunakan sebagai pemacu pertumbuhan berat badan. Produksi faktor pertumbuhan dari biakan *monolayer* sel kumulus diharapkan dapat diproduksi dalam skala yang lebih besar untuk meningkatkan produksi peternakan melalui peningkatan berat badan ternak.



ABSTRACT

**DETERMINATION OF CONCENTRATION AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES TEST OF GROWTH FACTOR AND STEROID SEX
HORMONES PRODUCED BY MONOLAYER CELLS OF BALI CATTLE
CUMULUS AND OVIDUCTAL EPITHELIAL CELLS
AS A GROWTH PROMOTER**

This study was conducted to determine the concentration of growth factor and steroid sex hormones produced by cumulus (CC) and oviductal epithelial cells (OEC) culture of Bali cattle and its biological activities as a growth promoter.

Cumulus cells and OEC were cultured in TCM 199 supplemented with 10 % of FCS either without or with addition of 4 mM and 8 mM hypotaurine. The density of the cells culture were 1.9×10^6 cells/milliliter media and incubated at 38.5°C with atmosphere of 5 % CO_2 for 6 and 9 days. The medium was changed every 3 days.

The concentration of IGF-1 was determined by Immuno Radio Metric Assay (IRMA) techniques from the medium (cells product) which collected at 6 and 9 days of incubation, whereas the steroid sex hormones were determined by Radio Immuno Assay (RIA) techniques. Biological activities test in vitro were done by using CC and OEC as a co-culture of the embryo development medium following 6 days of fertilization and injection in vivo with 10 ml cells product of CC to Bali calves twice a week for 6 weeks also was done.

The results indicated that the concentration of IGF-1 and steroid sex hormones of CC were significantly higher ($p < 0.05$) than OEC. The highest concentration was determined from CC which cultured in the medium added with 4 mM of hypotaurine incubated for 6 days. Addition of hypotaurine were significantly increased ($p < 0.05$) the concentration of IGF-1 and steroid sex hormones but it was not significantly different ($p > 0.05$) between 4 mM and 8 mM concentration of hypotaurine. Following 6 days of fertilization, the number of blastocysts obtained in OEC co-culture medium were significantly higher ($p < 0.05$) compared to CC co-culture medium. Injection of cells product significantly increased ($p < 0.05$) the body weight of Bali calves.

Keywords : IGF-1, Steroid sex hormones, Hypotaurine, CC, OEC