

## Preservasi Ovarium dan Pengaruhnya Terhadap Morfologi Folikel Domba

(THE OVARY PRESERVATION AND ITS EFFECT ON THE MORPHOLOGY OF EWE FOLLICLES)

Bayu Rosadi<sup>1</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>, Dondin Sajuthi<sup>2</sup>, Arief Boediono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Jambi  
Jl. Jambi-Muara Bulian km 14, Mendalo Darat, Jambi  
E-mail: bayurosadi@yahoo.co.id

<sup>2</sup>Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB

<sup>3</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki pengaruh penyimpanan ovarium pada suhu dingin dan beku terhadap morfologi folikel domba. Penelitian ini terdiri dari 2 eksperimen. Dalam Eksperimen I, ovarium disimpan dalam larutan PBS pada suhu -20 °C dan suhu kamar 24 °C selama 24 jam, dan suhu 5 °C selama 24 jam dan 72 jam. Setelah penyimpanan, folikel-folikel dievaluasi secara histologi. Dalam Eksperimen 2, korteks ovarium diisolasi dari ovarium dan dibentuk dalam potongan berukuran ±1 mm<sup>3</sup>. Potongan jaringan dimasukkan ke dalam *hemistraw* dan ditransfer ke larutan ekuilibrasi (Phosphate Buffered Saline + 20% Fetal Bovine Serum + 7,5% Ethylene Glycol + 7,5 % Dimethyl Sulphoxide) masing-masing selama 10, 20, dan 30 menit pada suhu kamar, selanjutnya dipindahkan ke larutan vitrifikasi (PBS+ 20% FBS + 15% EG + 15 % DMSO) selama 3 menit. *Hemistraw* beserta jaringan dicelupkan dalam nitrogen cair. Setelah *thawing*, jaringan dibuat menjadi preparat histologis. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa seluruh folikel mengalami kerusakan morfologi setelah penyimpanan ovarium pada suhu kamar selama 24 jam. Persentase folikel dengan morfologi normal menurun secara nyata pada jaringan ovarium yang disimpan pada suhu -20 °C selama 24 jam pada suhu 5 °C selama 24 jam dan 72 jam, penyimpanan pada suhu 5 °C selama 24 jam memberikan hasil lebih baik (P<0,05). Folikel-folikel antral rusak pada semua perlakuan. Folikel-folikel primordial mempertahankan keutuhan morfologinya lebih baik daripada folikel-folikel yang sedang tumbuh. Pemaparan jaringan ke larutan ekuilibrasi selama 10 menit menghasilkan lebih banyak folikel-folikel dengan morfologi normal dibandingkan ekuilibrasi 20 dan 30 menit (P<0,05).

Kata-kata kunci: ovarium, preservasi, vitrifikasi, domba

### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect of cooling and freezing of ewes ovarian tissue on their follicles morphology. The study was carried out in two experiments. Experiment I, ovaries were maintained in Phosphate Buffered Saline (PBS) at -20°C and room temperature (RT) for 24 h, and at 5°C for 24 h and 72 h, respectively. After storage, follicles were histologically evaluated. Experiment II, the ovarian cortex was isolated and tissue slices (±1 mm<sup>3</sup>) were prepared. Following this tissues were loaded into *hemistraw* then transferred to equilibration solution (PBS+20% FBS+7,5% EG+7,5 % DMSO) at room temperature and held for 10, 20, 30 minutes, respectively. Afterward tissues were transferred to vitrification solution (PBS+20%FBS +15%EG+15%DMSO ) for 3 minutes, then the *hemistraw* was placed directly into liquid nitrogen. After thawing, the tissues were prepared for histological examination. All of the follicles were deteriorated after 24 h storage at RT. The percentage of morphologically normal follicles was significantly reduced when ovarian tissues were stored at -20°C for 24 h and at 5°C for 24 h and 72 h. However, it seemed to have a minor deterioration effect when the tissues were kept at 5°C for 24 h (P<0.05). Antral follicles were damaged in all of the treatments. Primordial follicles preserved their morphology intactness better than growing follicles. Exposing tissues to equilibration medium for 10 minutes seemed to produce higher numbers of morphologically normal follicles (P<0.05), compared to when tissues were exposed for 20 minutes and 30 minutes (P>0.05). It can be concluded that exposing tissues to equilibration solution for 10 minutes prior to freezing would kept the ovarian follicles morphology in good condition.

Key words : ovarium, follicle, preservation, vitrification, ewe

## PENDAHULUAN

Domba merupakan hewan ternak yang sudah umum dibudidayakan di berbagai tempat karena daya adaptasi terhadap lingkungan tinggi. Ditinjau dari segi kemampuan reproduksinya domba cukup produktif, domba betina mampu menghasilkan anak dengan selang waktu delapan bulan masing-masing 1-3 ekor. Kemampuan tersebut akan terhenti secara alamiah jika domba betina mati (karena pemotongan atau sebab lain). Sementara itu ovarium dari domba yang dipotong memiliki nilai ekonomi rendah karena ukurannya sangat kecil. Ovarium tersebut sebenarnya bisa dimanfaatkan untuk produksi anak dengan mengaplikasikan teknologi reproduksi melalui produksi embrio *in vitro*, salah satu caranya adalah mengoptimalkan potensi folikel-folikel yang terkandung di dalamnya. Folikel-folikel tersebut merupakan struktur dasar dan unit fungsional ovarium mamalia yang menyediakan lingkungan mikro yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan maturasi oosit, lebih dari 90% kandungan ovarium merupakan folikel preantral (Lucci *et al.*, 2007). Cadangan folikel-folikel mamalia yang belum tumbuh berisi oosit yang beristirahat pada tahap diploten dari profase meiotik (Telfer *et al.*, 2005), pada domba jumlahnya berkisar 36.000 folikel per ovarium (Rosadi *et al.*, 2010).

Ovarium domba juga berguna dalam riset reproduksi manusia sebab ovarium domba cocok sebagai model ovarium manusia karena persamaan ukuran dan kondisi jaringan (Oktay *et al.*, 2000; Picton *et al.*, 2008). Penggunaan ovarium dalam riset bidang ini banyak diarahkan ke masalah infertilitas dan preservasi ovarium khususnya pada wanita-wanita penderita kanker. Seperti diketahui, ovarium sangat sensitif terhadap obat kanker kelompok *alkilating agent* (cyclophosphamide, busulfan, melphalan, chlorambucil, dacarbazine, procarbazine) yang diklasifikasikan memiliki resiko tinggi terhadap disfungsi gonad (Blumenfeld *et al.*, 2000; Kenney *et al.*, 2001; Tauchmanova *et al.*, 2002).

Metode penyimpanan ovarium sebelum digunakan sebagai sumber folikel penting untuk diketahui, karena sifat ovarium sebagai material biologis yang mudah rusak. Secara teknis hal tersebut dapat dipahami karena adanya kemungkinan ketidaksinkronan tersedianya ovarium dengan sistem produksi embrio *in vitro* pada satu waktu tertentu. Preservasi jangka

pendek diperlukan untuk transportasi ovarium, terutama jika lokasi sumber ovarium jauh dari laboratorium. Teknik penyimpanan ovarium jangka pendek telah dicoba pada kambing (Silva *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001), pada sapi (Lucci *et al.*, 2004), babi (Lucci *et al.*, 2007), dan anjing (Lopes, 2009). Pada penelitian-penelitian tersebut, suhu 4, 20 dan 39°C dicoba untuk preservasi folikel preantral. Secara umum hasilnya menunjukkan bahwa suhu 4°C memungkinkan preservasi folikel selama 18 atau 24 jam, sedangkan pada suhu 20°C mampu mempreservasi folikel selama 4 atau 6 jam.

Kriopreservasi potongan jaringan korteks atau ovarium utuh memungkinkan penyimpanan jaringan ovarium jangka panjang diaplikasikan di antaranya untuk mempertahankan fungsi ovarium, mempertahankan spesies yang terancam punah, dan menyelidiki fenomena folikulogenesis awal (Onions *et al.*, 2008) dan mempertahankan fertilitas pada pasien kemoterapi kanker (Donnez *et al.*, 2006). Metode *slow freezing* menggunakan mesin pembekuan terprogram adalah metode konvensional kriopreservasi jaringan ovarium. Proses pembekuan tersebut membutuhkan waktu beberapa jam. Vitrifikasi merupakan metode alternatif terhadap *slow freezing* untuk kriopreservasi jaringan ovarium, konsentrasi krioprotektan yang digunakan lebih tinggi dan laju pendinginan lebih cepat, dan tidak menimbulkan terbentuknya kristal es serta tidak membutuhkan peralatan khusus (Yoeman *et al.* 2005). Metode vitrifikasi dapat mempertahankan viabilitas folikel preantral lebih baik dibandingkan metode pembekuan konvensional (Chen *et al.* 2006). Dalam pelaksanaannya salah satu tahapan yang menentukan keberhasilan vitrifikasi adalah waktu ekuilibrisasi. Lama paparan jaringan ke dalam larutan mengandung krioprotektan memperhitungkan dua hal yaitu penetrasi krioprotektan ke dalam sel dan toksisitas krioprotektan terhadap sel. Kedua hal tersebut mempengaruhi keberhasilan vitrifikasi dalam mempertahankan keutuhan sel-sel dalam jaringan (Donnez *et al.* 2006)

Pada penelitian ini dicoba metode penyimpanan jaringan ovarium pada berbagai tingkat suhu yaitu 24°C (suhu kamar), 5°C, -20°C, -196°C (vitrifikasi). Diharapkan dari eksperimen ini diketahui suhu dan lama penyimpanan ovarium domba yang dapat mempertahankan keutuhan morfologis folikel.

## METODE PENELITIAN

### Koleksi dan Penyimpanan Ovarium

Ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan dibawa dalam larutan NaCl fisiologis ditambah 50 µg/ml gentamycin. Waktu antara pengambilan ovarium sampai pengolahan di laboratorium tidak melebihi 2 jam. Ovarium ditimbang, kemudian dicuci tiga kali dalam NaCl fisiologis, dicelupkan selama lima detik dalam larutan alkohol 70%, lalu dicuci kembali dalam larutan NaCl fisiologis sebanyak tiga kali. Ovarium utuh kemudian dibagi secara acak menjadi beberapa perlakuan penyimpanan yaitu: suhu kamar selama 1 hari, temperatur 5 °C selama 1 dan 3 hari, dan -20 °C selama 1 hari. Setiap perlakuan diulang 5 kali.

### Vitrifikasi Ovarium

Untuk keperluan vitrifikasi, jaringan korteks diisolasi dari ovarium, selanjutnya dipotong-potong menjadi bagian yang berukuran ± 1 mm<sup>3</sup>. Vitrifikasi dilakukan dengan metode Chen *et al.*, (2006) dengan sedikit modifikasi pada penggunaan *hemistraw* dan lama ekuilibrisasi. Medium PBS, Sigma®, Sigma-Aldrich, USA) digunakan sebagai medium dasar. Potongan jaringan dipaparkan ke dalam medium ekuilibrisasi yaitu PBS ditambah 20% FBS, Sigma®, Sigma-Aldrich, USA), 7,5% (v/v) EG Wako, Japan dan 7,5% (v/v) DMSO, AnalaR®, BDH Laboratory Supplies, England selama 10, 20, dan 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya dipindahkan ke medium yang mengandung 15% EG, 15% DMSO, dan 0,5 M sukrosa selama 3 menit dalam suhu kamar. Sebagian jaringan dari masing-masing perlakuan lama ekuilibrisasi, diambil untuk pembuatan preparat histologi (uji toksisitas). Potongan jaringan lainnya dikemas dalam *hemistraw*, diletakkan dalam uap nitrogen cair selama 10 detik, kemudian ditenggelamkan ke dalam nitrogen cair. Untuk *thawing*, potongan ovarium beku dipaparkan ke medium mengandung 1 M; 0,5 M; 0,25 M sukrosa masing-masing selama 5 menit, selanjutnya dipindahkan ke medium tanpa sukrosa untuk perlakuan berikutnya.

### Pembuatan Preparat Histologi

Potongan jaringan korteks ovarium dari berbagai perlakuan penyimpanan dan vitrifikasi difiksasi semalam dalam 4% para formaldehid dalam PBS (pH 7,4). Proses pengerjaan preparat histologi selanjutnya dilakukan dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksin-Eosin (Kiernan 1990).

### Penghitungan Jumlah dan Pengamatan Morfologi Folikel

Identifikasi morfologi dan perkiraan keseluruhan folikel primordial, primer, sekunder, atau antral diamati dengan mikroskop cahaya. Inti (folikel primordial) atau anak inti (folikel primer-antral) digunakan sebagai referensi titik hitung. Jumlah folikel dihitung dengan menggunakan metode estimasi yaitu dengan menghitung setiap tipe folikel dari sebagian preparat. Jumlah setiap tipe folikel pada 25 sayatan serial pertama dijumlahkan kemudian dibandingkan dengan jumlah folikel pada setiap kelipatan lima. Folikel yang dihitung hanya folikel yang memiliki nukleolus dengan struktur yang jelas untuk menghindari perhitungan ganda.

Faktor pengali =

$$\frac{\text{Jumlah folikel pada 25 sayatan pertama}}{\text{Jumlah folikel pada sayatan ke-1, 5, 10, 15, 20, dan 25}}$$

Jumlah folikel pada sayatan ke-1, 5, 10, 15, 20, dan 25

Tahap perkembangan folikel diidentifikasi berdasarkan klasifikasi Myers *et al.*, (2004). Folikel-folikel dengan satu lapis sel-sel granulosa pipih yang inaktif secara mitotik dikategorikan sebagai folikel primordial. Pada folikel primer lapisan sel granulosa berbentuk kuboid, diameter oosit lebih besar. Folikel sekunder mempunyai dua lapis atau lebih sel-sel granulosa kuboid. Folikel antral memiliki antrum, beberapa lapis sel granulosa dan sel-sel theca.

Folikel-folikel dengan morfologi normal ditandai dengan oosit yang utuh, nukleus bulat dan mempunyai nukleolus, dikelilingi oleh sel-sel granulosa yang terorganisir dengan baik tanpa inti piknotik. Folikel-folikel diklasifikasikan mengalami degenerasi jika menunjukkan salah satu gejala berikut: kondensasi nukleus oosit, pengerutan oosit, ooplasma yang tidak homogen, badan-badan piknotik, sel-sel granulosa yang tidak terorganisir atau kepadatan seluler yang rendah (Kerr *et al.*, 2006).

Preparat histologi jaringan korteks ovarium diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Untuk setiap perlakuan dan ulangan jumlah folikel yang diamati setiap tahap perkembangan minimal 100 folikel kecuali untuk folikel antral. Prosentase folikel dengan morfologi utuh dihitung dengan persamaan:

$$\frac{\text{Prosentase Folikel Utuh} = \text{Jumlah folikel dengan morfologi normal}}{\text{Jumlah folikel yang dihitung}} \times 100\%$$

### Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk rataan dan dianalisis menggunakan sidik ragam (Anova). Uji jarak berganda Duncan digunakan untuk menganalisis perbedaan antarperlakuan. Semua kalkulasi statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS ver 17.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Bobot dan Jumlah Folikel Ovarium Domba

Bobot ovarium domba yang dipakai pada penelitian adalah  $0,509 \pm 0,181$  gram dan  $0,538 \pm 0,161$  gram masing-masing pada ovarium tanpa *corpus luteum* (CL) dan dengan CL (Tabel 1) Jumlah folikel rata-rata  $36.303 \pm 4470$ , proporsi terbesar adalah folikel primordial sampai dengan folikel primer (98,2%).

Ovarium mamalia neonatal mengandung cadangan folikel-folikel yang belum tumbuh yang di dalamnya terdapat oosit pada tahap diploten dari profase meiotik (Telfer *et al.*, 2005). Setelah lahir, sejumlah folikel-primordial teraktivasi dan memasuki fase perkembangan folikulogenik. Sel-sel folikel tersebut berproliferasi, oosit tumbuh, dan diameter folikel meningkat. Folikel-folikel preantral ini kemudian diprogram berdegenerasi (atresia), satu atau beberapa folikel (tergantung pada spesies), menyempurnakan maturasi, membentuk antrum yang terdiri dari lapisan sel *theca* di bagian luar, dan lapisan sel granulosa di bagian dalam. Sementara itu oosit menyelesaikan

kan meiosis I dan kemudian diovulasikan. Kerr *et al.*, (2006) melaporkan bahwa jumlah folikel primordial relatif konstan karena folikulogenesis yang aktif dan berkelanjutan berkaitan dengan dugaan adanya *germline stem cells* pascalahir di ovarium.

### Morfologi Folikel setelah Preservasi pada Berbagai Suhu

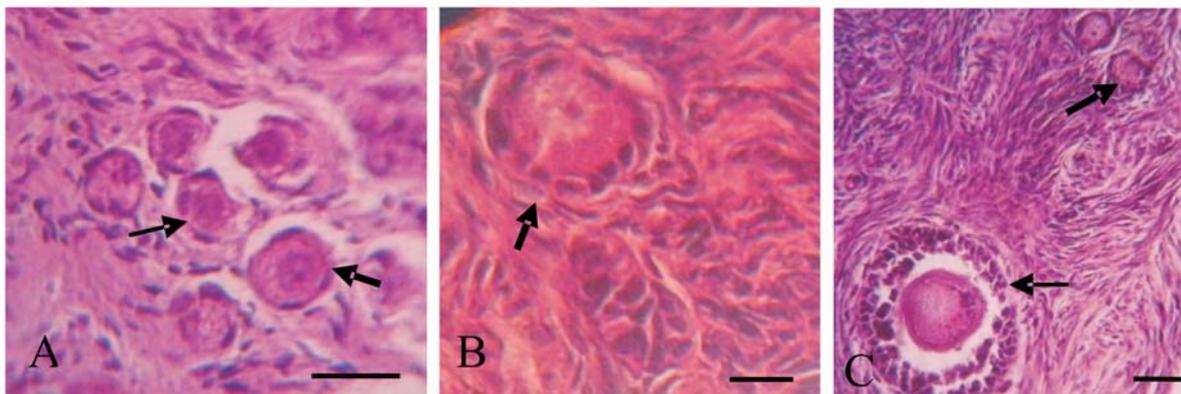
Hasil penelitian menunjukkan bahwa folikel preantral domba dapat disimpan pada suhu rendah yaitu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dan  $5^{\circ}\text{C}$  sampai 72 jam (Tabel 2, Gambar 1). Meskipun jumlah folikel dengan morfologi normal menurun ( $P < 0,05$ ) tetapi masih menyisakan banyak folikel tahap primordial, primer, dan sekunder. Penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  diduga dapat diperpanjang karena ovarium dipaparkan pada suhu sangat rendah sehingga metabolisme sel-sel dalam folikel di dalamnya akan berjalan sangat lambat, proses degenerasi sel juga akan berjalan lambat.

Kerusakan yang terjadi pada folikel-folikel pada ovarium yang disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  setelah 24 jam lebih tinggi dibandingkan suhu  $5^{\circ}\text{C}$  ( $P < 0,05$ ). Diduga kerusakan pada folikel-folikel tersebut disebabkan proses pembekuan yang dapat membentuk kristal-kristal es. Kristal-kristal es dapat merusak organ-organ dalam sel-sel folikel (Donnez *et al.*, 2006).

Kemampuan folikel tahap primordial untuk mempertahankan integritas morfologinya lebih baik dibandingkan folikel pada tahapan lebih lanjut. Kondisi tersebut diduga berkaitan dengan status metabolisme folikel-folikel primordial. Baik oosit maupun sel-sel folikel primordial inaktif dan memperlihatkan laju metabolik yang sangat rendah (Hyttel *et al.*, 1997) dan sel-sel belum berdiferensiasi, jumlah organ-organ sedikit dan belum matang (Fair *et al.*, 1997). Hal ini mengakibatkan folikel-folikel primordial relatif lebih sedikit berubah selama penyimpanan pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$ . Sebaliknya, folikel-folikel yang sedang tumbuh sudah memulai proses perkembangannya, memiliki banyak sel-sel granulosa yang aktif secara mitotik. Walaupun oosit sedang istirahat pada fase pembelahan meiosis I tetapi aktif mensintesis protein dan RNA (Hyttel *et al.*, 1997). Oleh karena itu folikel-folikel yang sedang tumbuh membutuhkan nutrisi dan oksigen, Folikel antral secara logis membutuhkan lebih banyak nutrisi dan oksigen. Data menunjukkan bahwa folikel antral tidak mampu bertahan terhadap proses degenerasi selama penyimpanan dalam

Tabel 1. Bobot dan jumlah folikel ovarium domba

<i>Bobot ovarium</i>	
Tanpa CL (n=58) (g)	$0,509 \pm 0,181$
Dengan CL (n=32) (g)	$0,538 \pm 0,161$
<i>Jumlah folikel (n=7)</i>	
Primordial	$20680 \pm 1853,97$
Intermediet	$7990 \pm 1355,47$
Primer	$6987 \pm 1187,49$
Sekunder	$630 \pm 108,17$
Antral	$17 \pm 3,06$
Jumlah	$36303 \pm 4470$



Gambar 1. Gambaran histologi folikel.(A) Folikel primordial utuh (tanda panah tebal) dan rusak (tanda panah tipis), (B) Folikel primer utuh, (C) folikel primer (panah tebal) dan folikel sekunder (tanda panah tipis) yang mengalami kerusakan. Bar = 50  $\mu$ m.

Tabel 2. Prosentase folikel dengan morfologi utuh setelah preservasi

Perlakuan	Tahap perkembangan			
	Primordial	Primer	Sekunder	Antral
Kontrol	86,73 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	84,34 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	90,29 $\pm$ 9,17 <sup>a</sup>	96,00 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>
Suhu kamar (24 jam)	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
5° C (24 Jam)	41,41 $\pm$ 7,24 <sup>bA</sup>	36,40 $\pm$ 7,12 <sup>bA</sup>	28,00 $\pm$ 4,99 <sup>bB</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>bC</sup>
5° C (72 Jam)	22,96 $\pm$ 3,97 <sup>cA</sup>	16,84 $\pm$ 2,35 <sup>cB</sup>	12,33 $\pm$ 3,12 <sup>cC</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>bD</sup>
-20°C (24 jam)	11,19 $\pm$ 3,35 <sup>d</sup>	10,78 $\pm$ 2,78 <sup>d</sup>	8,51 $\pm$ 1,32 <sup>d</sup>	0,0 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>

Superskrip huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)  
Superskrip huruf besar yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Tabel 3. Prosentase folikel dengan morfologi utuh setelah uji toksisitas dan prosedur beku-thawing

Perlakuan	Fase perkembangan			
	Primordial	Primer	Sekunder	Antral
Kontrol	85,67 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	84,34 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	90,29 $\pm$ 9,17 <sup>a</sup>	96,00 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>
Ekuilibrasi 10':				
Uji toksisitas	69,60 $\pm$ 6,47 <sup>b</sup>	70,27 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>	76,14 $\pm$ 6,55 <sup>b</sup>	23,00 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup>
Beku-thawing	57,54 $\pm$ 3,76 <sup>cd</sup>	56,01 $\pm$ 3,74 <sup>c</sup>	61,82 $\pm$ 9,88 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Ekuilibrasi 20':				
Uji toksisitas	50,85 $\pm$ 7,67 <sup>d</sup>	51,32 $\pm$ 3,91 <sup>d</sup>	55,05 $\pm$ 2,14 <sup>c</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Beku-thawing	40,59 $\pm$ 8,89 <sup>e</sup>	43,15 $\pm$ 2,80 <sup>e</sup>	42,00 $\pm$ 7,30 <sup>d</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Ekuilibrasi 30':				
Uji toksisitas	47,66 $\pm$ 7,39 <sup>de</sup>	49,22 $\pm$ 3,08 <sup>d</sup>	52,35 $\pm$ 5,83 <sup>cd</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Beku-thawing	38,64 $\pm$ 6,99 <sup>f</sup>	34,62 $\pm$ 6,02 <sup>f</sup>	43,63 $\pm$ 6,09 <sup>e</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

larutan yang miskin nutrient. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan pada sapi (Lucci *et al.*, 2004), kambing (Silva *et al.*, 2000, Carvalho *et al.*, 2001), babi (Lucci *et al.*, 2007) dan anjing (Lopes *et al.*, 2009)

### Morfologi Folikel setelah Vitrifikasi

Uji toksisitas dengan memaparkan jaringan ovarium ke dalam larutan ekuilibriasi (PBS + 20% FCS + 7,5% EG + 7,5% DMSO + 0,5 M sukrosa) menunjukkan bahwa lama paparan selama 10 menit lebih baik dalam mempertahankan keutuhan morfologi folikel ( $P < 0,05$ ; Tabel 3). Tidak ada perbedaan yang nyata antara lama paparan dalam larutan ekuilibriasi 20 menit dan 30 menit ( $P > 0,05$ ). Pada folikel antral paparan selama 10 menit menurunkan secara nyata prosentase folikel dengan morfologi normal, ekuilibriasi selama 20 menit dan 30 menit merusak struktur morfologi seluruh folikel antral. Proses pembekuan dan *thawing* menurunkan prosentase folikel dengan morfologi normal ( $P < 0,05$ ). Secara keseluruhan proses vitrifikasi pada folikel-folikel preantral mampu mempertahankan integritas morfologi sejumlah besar folikel. Laju kerusakan kriogenik terkecil didapatkan pada jaringan ovarium yang diekuilibriasi selama 10 menit sebelum dibekukan.

Perbedaan hasil antara folikel-folikel preantral dengan folikel antral berkaitan dengan proses penetrasi krioprotektan ke dalam sel-sel dan jaringan folikel. Folikel antral mempunyai banyak air dalam antrum yang harus dikeluarkan dan digantikan oleh larutan krioprotektan untuk mencegah kerusakan kriogenik saat proses pembekuan. Kemungkinan pada folikel antrum terutama folikel antrum besar lama ekuilibriasi dan paparan dalam larutan vitrifikasi tidak mencukupi untuk menarik seluruh komponen air dari antrum dan lapisan sel-sel folikel dan menggantinya dengan krioprotektan. Tertahannya air didalam sel dan antrum dapat menimbulkan kerusakan pada saat proses pembekuan berlangsung.

Dalam proses vitrifikasi, penetrasi krioprotektan yang memadai melalui sel-sel stroma menuju oosit sangat diperlukan, tetapi pada saat yang sama harus dihindari toksisitas krioprotektan (Donnez *et al.*, 2006). Newton *et al.* (1998) mendemonstrasikan pengaruh laju dan suhu difusi pada kriopreservasi konvensional, kerusakan jaringan dapat diminimalkan dengan memilih laju pembekuan dan *thawing* optimal.

Pemilihan krioprotektan dengan kapasitas penetrasi maksimum tetapi toksisitas minimum spesifik pada setiap tipe sel dan jaringan (Fuller dan Paynter, 2004). Dalam penelitian ini digunakan EG dan DMSO yang diketahui mempunyai kapasitas penetrasi yang baik dan toksisitas yang lebih kecil dibandingkan krioprotektan lainnya pada jaringan ovarium (Lucci *et al.*, 2007). Secara umum, pada ovarium, kriopreservasi harus memperhatikan respon sel-sel stroma, sel-sel folikuler dan oosit terhadap penetrasi krioprotektan (Hovata *et al.*, 2005).

### SIMPULAN

Preservasi ovarium domba sampai 24 jam pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $24^{\circ}\text{C}$  (suhu kamar), dan  $5^{\circ}\text{C}$  menurunkan jumlah folikel dengan morfologi normal, penyimpanan pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  memberikan hasil lebih baik. Folikel-folikel primordial mampu mempertahankan keutuhan morfologinya, dan lebih baik daripada folikel-folikel yang sedang tumbuh. Hasil vitrifikasi terbaik diperoleh pada jaringan ovarium yang dipaparkan dalam larutan ekuilibriasi selama 10 menit.

### SARAN

Untuk menguji kompetensi pertumbuhan folikel-folikel preantral setelah preservasi maka perlu dilakukan kultur *in vitro* pada folikel-folikel tersebut.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini melalui program Beasiswa Penelitian Mahasiswa Program Doktor Tahun 2009.

### DAFTAR PUSTAKA

Blumenfeld Z, Shapiro D, Shteinberg M, Avivi I, Nahir M. 2000. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. *Lupus* 9:401–405.