

Penambahan *Glutathione* pada Medium Fertilisasi Efektif Mendukung Pembentukan Pronukleus dan Perkembangan Awal Embrio Sapi

(SUPPLEMENTATION OF GLUTATHIONE IN FERTILIZATION MEDIUM EFFECTIVELY SUPPORT NORMAL PRONUCLEUS FORMATION AND EARLY BOVINE EMBRYONIC DEVELOPMENT RATE)

Aras Prasetyo Nugroho¹, Iman Supriatna^{1,2}, Mohamad Agus Setiadi^{1,2*}

¹Program Studi Biologi Reproduksi,
Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor;

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan,
Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, IPB,

Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680,

Telp: (0251) 8626460, Fax: (0251) 8623940

*Email: setiadi03@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat fertilisasi dan kompetensi perkembangan awal embrio sapi dengan penambahan *glutathione* (GSH) pada medium fertilisasi *in vitro* (IVF) dan kultur *in vitro* (IVC). Penelitian ini terdiri atas dua penelitian yang terdiri dari masing-masing empat perlakuan dan enam kali ulangan dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan 651 oosit. Penelitian I, sebanyak 317 oosit sapi dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 dimatangkan pada inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C selama 24 jam, kemudian difertilisasi dengan spermatozoa yang telah diseleksi menggunakan teknik *swim up*. Oosit dan spermatozoa diinkubasi pada medium fertilisasi dengan penambahan 0,25 mM, 0,50 mM, dan 1,00 mM GSH. Penelitian II, sebanyak 334 oosit sapi dimatangkan pada medium pematangan dan difertilisasi, kemudian dikultur pada medium *modified synthetic oviduct fluid* (mSOF), dengan perlakuan: penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T₁), penambahan GSH hanya pada medium kultur (T₂), dan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T₃). Hasil penelitian I, menunjukkan bahwa penambahan 1,00 mM GSH pada medium fertilisasi dapat meningkatkan pembentukan pronukleus normal (2PN) yang lebih tinggi (86,9%) dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu 0,50 mM (80,3%), 0,25 mM (73,8%), dan kontrol (58,9%) ($P < 0,05$). Penelitian II menunjukkan bahwa perkembangan awal embrio sapi pada hari ke-2 kultur yang mencapai pembelahan 5-8 sel pada perlakuan T₁ (56,0%) dan T₃ (53,6%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan T₂ (26,2%) dan T₀ (kontrol) (31,3%). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa perkembangan awal embrio sapi pada hari ke-4 kultur yang mencapai pembelahan 9-16 sel pada perlakuan T₁ (26,2%) dan T₃ (27,4%) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan T₂ (11,9%) dan T₀ (kontrol) (10,8%) ($P < 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa penambahan 1,00 mM GSH pada medium fertilisasi lebih efektif dalam mendukung pembentukan pronukleus normal dan perkembangan awal embrio sapi dibandingkan pada medium kultur.

Kata-kata kunci: oosit; embrio sapi; *glutathione*; perkembangan

ABSTRACT

The objective of this study was to determine fertilization rate effectiveness and early embryonic development competency with glutathione (GSH) supplementation in fertilization medium and culture. This study consisted of two experiments comprising each of the four treatment and six repetitions with completely randomized design (CRD) using 651 oocytes. In the first experiment, a total of 317 bovine oocytes were matured in tissue culture medium (TCM) 199 at incubator 5% CO₂ with temperature 39 °C for

24 h, then fertilized with sperm separated by swim up technique. Oocyte and sperms were incubated in fertilization medium supplemented with 0.25 mM, 0.50 mM, 1.00 mM GSH. In the second experiment, bovine oocytes were matured in maturation medium and fertilized with same procedure as mentioned before, then cultured in modified synthetic oviduct fluid (mSOF) with the following treatment: supplementation GSH only in fertilization medium (T_1), supplementation GSH only in culture medium (T_2), and supplementation GSH in both fertilization and culture medium (T_3), while control not supplementation GSH (T_0). Result of the first experiment showed that supplementation 1.00 mM GSH in fertilization medium can increase higher normal pronucleus (2PN) formation (86,9%) compared to other treatments, 0.50 mM (80.3%), 0.25 mM (73.8%), and control (58.9%) ($P < 0.05$). In the second experiment showed that early bovine embryonic development on 2nd day cultured which reached 5-8 cell on treatment T_1 (56.0%) and T_3 (53.6%) were higher ($P < 0.05$) compared to treatment T_2 (26.2%) and T_0 (control) (31.3%). Result of the other were showed that early bovine embryonic development on 4th day cultured which reached 9-16 cell on treatment T_1 (26.2%) and T_3 (27.4%) were higher ($P < 0.05$) compared to that T_2 (11.9%) and T_0 (control) (10.8%). In conclusion, 1.00 mM GSH supplementation in medium was more effective in supporting normal pronucleus formation and early fertilization bovine embryonic development compared to in culture medium.

Key words: oocytes; embryo; bovine; glutathione; development

PENDAHULUAN

Produksi embrio *in vitro* sapi masih mengalami kendala yang ditandai dengan rendahnya capaian tingkat blastosis yaitu sebesar 41,0% (Hara *et al.*, 2013), 42,4% (Costa *et al.*, 2013), dan 40,5% (Park *et al.*, 2014). Hal tersebut dapat terjadi karena produksi embrio *in vitro* umumnya dilakukan pada lingkungan yang mempunyai kadar oksigen (O_2) hampir sama dengan yang ada di atmosfer (~20%) (Karja *et al.*, 2004; Yasmin *et al.*, 2015), jauh lebih besar dari keadaan *in vivo* yang hanya berkisar 5% (Hashimoto *et al.*, 2000). Kondisi tersebut menyebabkan proses metabolisme menghasilkan lebih banyak *reactive oxygen species* (ROS) seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat bereaksi dengan unsur logam (Fe^{2+} atau Cu^+) menjadi radikal bebas berupa ion hidroksil ($OH\cdot$). Radikal bebas $OH\cdot$ sangat berbahaya karena dapat merusak membran dengan membentuk lipid peroksida (L-OOH) (Jezek dan Hlavata, 2005) sehingga dapat mengganggu fungsi fisiologi.

Secara alami oosit menghasilkan *glutathione* (GSH) yang dapat mereduksi H_2O_2 sebelum sempat bereaksi dengan unsur logam menjadi radikal bebas (Park *et al.*, 2014). Sintesis GSH tergantung pada ketersediaan *cysteine* yang sangat mudah teroksidasi menjadi *cystine* pada lingkungan ekstraseluler (Lu, 2013). Oleh karenanya selama pematangan oosit, sel kumulus berperan sangat penting dalam mereduksi *cystine* menjadi *cysteine* (Geshi *et al.*, 2000) dan kemudian ditransfer melalui *gap junction* sebagai prekursor GSH (Zhou *et al.*, 2010). Puncak konsentrasi GSH intraseluler

yang dapat dicapai oleh oosit terjadi pada pada tahap metafase II (MII) (De Matos dan Furnus, 2000). Hal tersebut terjadi karena sel kumulus tidak dapat lagi mentransfer *cysteine* ke dalam oosit setelah tahap MII akibat terputusnya *gap junction* oleh enzim *hyaluronidase* yang disekresikan sel kumulus itu sendiri (Sutton *et al.*, 2003). Oleh sebab itu konsentrasi GSH intraseluler yang dicapai selama pematangan sering dijadikan sebagai indikator kematangan oosit (You *et al.*, 2010). Konsentrasi GSH intraseluler inilah yang dipakai oleh oosit untuk mencukupi kebutuhan dalam tahapan produksi embrio *in vitro* selanjutnya. Apabila konsentrasi GSH yang dicapai selama pematangan tidak optimal, maka akan menyebabkan akumulasi ROS (Agarwal *et al.*, 2005). Akumulasi ROS merupakan penyebab stres oksidasi yang berakibat terjadinya oosit *aging* (Lord dan Aitken, 2013) dan apoptosis (Gupta *et al.*, 2009) sehingga banyak oosit yang gagal dalam perkembangan awal embrio.

Penambahan berbagai substrat selama pematangan *in vitro* untuk mengoptimalkan konsentrasi GSH intraseluler telah dilakukan seperti seperti *cysteamine* (De Matos *et al.*, 1995), *â-mercaptoethanol* (Caamano *et al.*, 1996), *l-cysteine* (Whitaker dan Knight, 2004), *green tea polyphenols* (Wang *et al.*, 2007), *N-acetyl-cysteine-amide* (Whitaker dan Knight, 2010), *resveratrol* (Kwak *et al.*, 2012), dan *l-carnitine* (You *et al.*, 2012). Konsentrasi GSH intraseluler sangat diperlukan pada proses fertilisasi (Zuelke *et al.*, 2003) dan pembentukan blastosis (Furnus *et al.*, 2008). Namun, konsentrasi GSH intraseluler yang dapat dicapai selama pematangan *in vitro* nampaknya belum

mampu mencukupi kebutuhan dalam mendukung perkembangan awal embrio. Lebih lanjut dilaporkan oleh Guerin *et al.* (2001) bahwa dalam keadaan *in vivo*, kekurangan GSH intraseluler dicukupi oleh saluran reproduksi betina sehingga perkembangan awal embrio lebih berhasil di dalam tubuh. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengamati pengaruh penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur terhadap kompetensi perkembangan awal embrio.

METODE PENELITIAN

Kemampuan Fertilisasi *In Vitro* setelah Penambahan GSH.

Koleksi dan Seleksi Oosit. Ovarium didapatkan dari rumah pemotongan hewan (RPH) Kota Bogor, dibawa ke laboratorium dalam NaCl 0,9% yang ditambahkan 100 IU/mL *penicillin* (Sigma, P-4687) dan 0,1 mg/mL *streptomycin* (Sigma, S-9137) pada suhu 27-28°C. Oosit dikoleksi dari folikel berukuran 2-6 mm dengan teknik *slicing* pada cawan petri menggunakan *scalpel* ukuran 23. Folikel yang telah di-*slicing* dibilas dengan *dulbecco phosphat buffered saline* (DPBS) yang ditambahkan 5% *fetal bovine serum* (FBS) (Sigma, F-7524), 100 IU/mL *penicillin*, dan 0,1 mg/mL *streptomycin*. Oosit dikoleksi pada cawan petri yang berisi 2 mL DPBS yang ditambahkan 10% FBS, 100 IU/mL *penicillin*, dan 0,1 mg/mL *streptomycin* di bawah mikroskop stereo. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini yaitu oosit yang mempunyai sel kumulus yang kompak dengan lebih dari tiga lapis dan sitoplasma homogen.

Pematangan *In Vitro*. Oosit yang sudah dikoleksi dicuci tiga kali pada medium pematangan *tissue culture medium* (TCM) 199 (Gibco) yang ditambahkan 10% FBS, 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, P-4687) yang telah diekuilibrasikan selama dua jam. Kemudian sebanyak 10-15 oosit dimatangkan pada *drop* 100 µL di bawah *mineral oil* (Sigma, M-8410) di dalam inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C selama 24 jam.

Fertilisasi *In Vitro*. Semen beku sapi ongle di-*thawing* dalam penangas air dengan suhu 37°C selama 25 detik. Semen ditempatkan di dasar medium *tyrode-albumin-lactate-pyruvate* (TALP) untuk memberi kesempatan

kepada spermatozoa yang motil berenang ke atas (*swim up*) pada inkubator 5% CO₂ dengan suhu 39°C selama satu jam. Sebagian supernatan diambil untuk disentrifugasi menggunakan kecepatan 702 g dengan suhu 28°C selama delapan menit. Pelet hasil sentrifugasi disisakan sebanyak 200 µL, kemudian dihitung konsentrasinya. Setelah didapat konsentrasi spermatozoa, kemudian dibuat *drop* 100 µL dengan konsentrasi akhir 2.10⁶ spermatozoa per mL dengan medium fertilisasi (Suzuki *et al.*, 2000) yang telah diberi perlakuan penambahan GSH (Sigma, G-4251) dengan konsentrasi sebesar 0,25 mM, 0,50 mM, dan 1,00 mM. Kemudian 10-15 oosit yang telah mengalami proses pematangan ditempatkan pada *drop* fertilisasi di bawah *mineral oil*. Oosit dan spermatozoa dinkubasi pada inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C selama 14 jam.

Evaluasi Tingkat Fertilisasi *In Vitro*.

Oosit yang telah difertilisasi didenudasi sel-sel kumulusnya. Oosit difiksasi dalam larutan asam asetat dan *ethanol absolute* (1:3) selama 72 jam. Preparat kemudian diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama tiga menit, kemudian pewarna dibersihkan dengan 25% asam asetat. Preparat diamati di bawah mikroskop fase kontras (Olympus IX 70, Japan). Persentase tingkat fertilisasi merupakan perbandingan antara jumlah oosit yang terfertilisasi normal (2PN) dengan jumlah keseluruhan oosit yang difertilisasi.

Kompetensi Perkembangan Awal Embrio Sapi setelah Penambahan GSH.

Persiapan Kultur *In Vitro*. Koleksi dan pematangan oosit dilakukan seperti pada penelitian I. Oosit difertilisasi pada medium fertilisasi dengan konsentrasi GSH terbaik pada penelitian I di dalam inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C selama 18 jam.

Kultur *In Vitro*. Oosit yang telah difertilisasi kemudian didenudasi sel-sel kumulusnya. Oosit kemudian dicuci sebanyak tiga kali dalam medium kultur *modified synthetic oviduct fluid* (mSOF) yang ditambahkan 2% *basal medium eagle* (BME) (Sigma, B-6766), 1% *minimum essential medium* (MEM) (Sigma, M-7145), 0,3% *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, A-7030), dan 50 µg/mL *gentamicyn* (Gordon, 2003). Sebanyak 10-15 oosit dikultur dalam inkubator 5% CO₂ dan suhu 39°C selama 96 jam pada medium berbentuk *drop* 100 µL di bawah *mineral oil* yang telah diberi perlakuan penambahan GSH hanya pada

medium fertilisasi (T_1), penambahan GSH hanya pada medium kultur (T_2), dan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T_3). Sementara itu pada kontrol tidak diberikan perlakuan penambahan GSH baik pada medium fertilisasi maupun kultur (T_0). Pembaharuan medium kultur dilakukan setelah 48 jam kultur.

Evaluasi Tingkat Perkembangan Awal Embrio. Perkembangan awal embrio sapi diamati selama empat hari dengan mencatat kecepatan pembelahan setiap perlakuan pada hari ke-2 (jam ke-48) dan hari ke-4 (jam ke-96) kultur di bawah mikroskop (Olympus IX 70, Japan). Pembuatan preparat dan pewarnaan seperti pada penelitian I dilakukan untuk peneguhan hasil pengamatan dengan menghitung jumlah sel yang terbentuk. Persentase tingkat pembelahan embrio merupakan perbandingan antara jumlah oosit yang membelah dengan jumlah keseluruhan oosit yang dikultur.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) terdiri atas dua penelitian, masing-masing empat perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari enam kali ulangan, sehingga menggunakan 651 oosit. Penelitian I, sebanyak 317 oosit dimatangkan, kemudian difertilisasi pada medium fertilisasi yang telah diberi perlakuan penambahan GSH dengan konsentrasi 0,25 mM, 0,50 mM, dan 1,00 mM. Penelitian II, sebanyak 334 oosit dimatangkan, kemudian difertilisasi pada medium fertilisasi dan dikultur pada medium kultur dengan perlakuan: penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T_1), penambahan GSH hanya pada medium kultur (T_2), dan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T_3). Sementara itu kontrol (T_0) tidak diberi perlakuan penambahan GSH. Data diperoleh dalam bentuk persentase dan ditransfer ke dalam bentuk $\text{arc. sin } \sqrt{\%}$. Tingkat fertilisasi dan perkembangan awal embrio sapi secara *in vitro* dianalisis dengan sidik ragam atau *analysis of variance* pada taraf nyata 95%, apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan *Duncant New Multiple Range Test* (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemampuan Fertilisasi *In Vitro* setelah Penambahan GSH.

Hasil penelitian menunjukkan penambahan GSH pada medium fertilisasi dengan konsentrasi yang berbeda dapat meningkatkan total oosit terfertilisasi dan tingkat fertilisasi (2PN) jika dibandingkan dengan kontrol ($P < 0,05$) (Tabel 1). Hal tersebut diduga karena GSH memiliki peran penting dalam pembentukan pronukleus. Lebih lanjut ditunjukkan bahwa terdapat tiga peran GSH dalam meningkatkan pembentukan pronukleus. Peran pertama, GSH mampu berperan sebagai antioksidan dengan menetralkan H_2O_2 dan L-OOH yang dikatalisis oleh enzim *glutathione peroxidases* (GPx) (Lu, 2013). Hal ini diduga bahwa dengan penambahan GSH pada medium fertilisasi, dapat mencukupi kebutuhan antioksidan sehingga ROS dapat dinetralkan dengan baik. Peran kedua, GSH diduga dapat berperan sebagai buffer intraseluler oosit. Selama stres oksidasi, protein *thiol* seperti *cysteine* dapat dengan mudah teroksidasi menjadi asam sulfenik (Lu, 2013) yang diduga dapat menurunkan pH intraseluler oosit. Lebih lanjut dijelaskan oleh Finkel (2012) bahwa GSH mampu membentuk ikatan dengan asam sulfenik menjadi protein disulfida yang dapat direduksi kembali oleh GSH menjadi protein *thiol* sehingga pH oosit tidak turun. Peran ketiga, GSH diduga berperan membantu penetrasi spermatozoa ke dalam oosit dan terjadinya kondensasi dengan cara mereduksi ikatan disulfida. Dilaporkan oleh Takeo dan Nakagata (2011) bahwa GSH mereduksi ikatan disulfida yang terdapat pada zona pelusida (ZP) sehingga spermatozoa lebih mudah melakukan penetrasi melalui ZP. Dilaporkan juga oleh Sutovsky *et al.* (2000) bahwa GSH mereduksi ikatan disulfida pada ekor spermatozoa sehingga terjadi pemutusan ekor yang menginisiasi terjadinya pembentukan pronukleus. Setelah itu, GSH mereduksi ikatan disulfida pada protamin yang kemudian digantikan oleh *histon* sebagai syarat dekonkondensasi (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Apabila tidak terjadi reduksi ikatan disulfida oleh GSH pembentukan pronukleus tidak terjadi, seperti yang dilaporkan oleh

Sutovsky dan Schatten (1997). Dari ketiga peran GSH tersebut diindikasikan penambahan GSH selama proses fertilisasi dapat meningkatkan pembentukan pronukleus. Perkembangan pronukleus setelah fertilisasi disajikan pada Gambar 1.

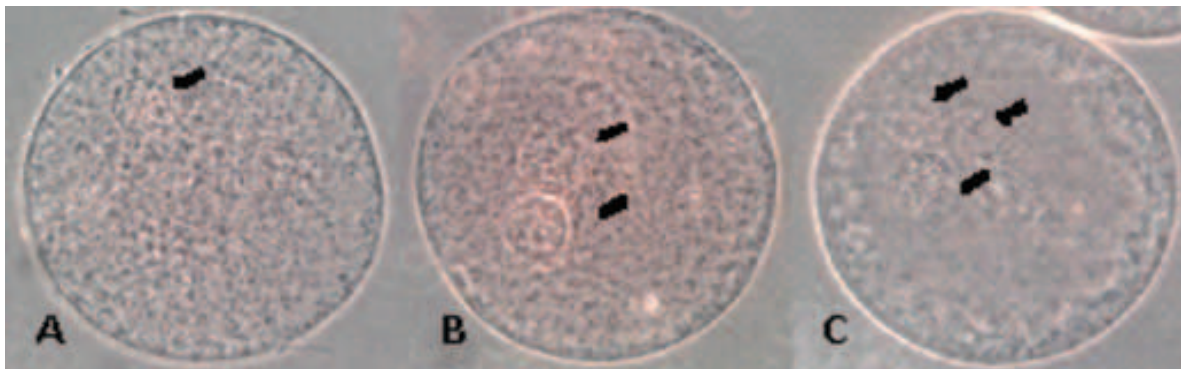
Pemberian GSH pada medium fertilisasi memberikan kecenderungan terbentuknya kejadian polispermi. Menurut Jacob *et al.* (1978), polispermi dapat menyebabkan kematian embrio dini dan aborsi. Kenaikan kejadian polispermi sebesar 6% mulai terlihat pada penambahan 1,00 mM GSH, namun tidak sampai menjadikan hasil tersebut signifikan dengan pemberian GSH dengan konsentrasi yang lebih kecil (Tabel 1). Pemberian konsentrasi GSH pada medium lebih dari 1 mM diduga dapat memberi efek yang negatif dengan menaikkan kejadian polispermi secara signifikan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan oosit yang terfertilisasi normal pada medium fertilisasi yang ditambahkan GSH dengan konsentrasi 0,25 mM, 0,50 mM, dan 1,00 mM berbeda antar perlakuan ($P < 0.05$) yaitu 73,8%, 80,3%, dan 86,9% (Tabel 1). Data penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 1,00 mM GSH yang ditambahkan pada medium fertilisasi menghasilkan tingkat fertilisasi yang

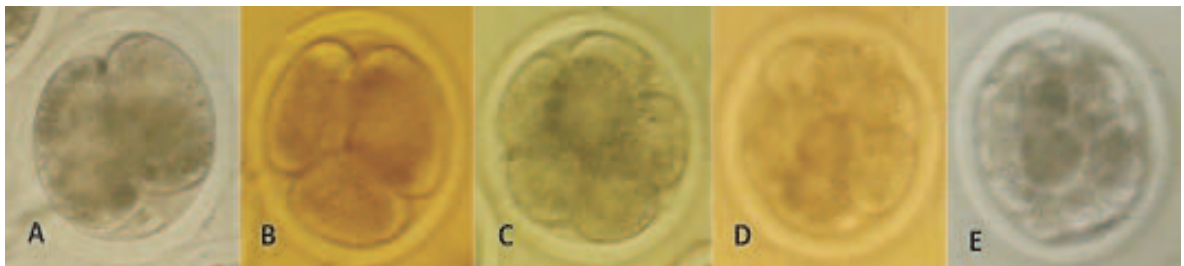
terbaik. Data pada penelitian tersebut mendukung hasil penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Ishizuka *et al.* (2013). Hal tersebut mengindikasikan bahwa penambahan GSH dengan konsentrasi 1,00 mM lebih mencukupi kebutuhan oosit daripada penambahan dengan konsentrasi GSH yang lebih rendah selama fertilisasi.

Kompetensi Perkembangan Awal Embrio setelah Penambahan GSH.

Keberhasilan produksi embrio *in vitro* dapat ditentukan dari jumlah embrio yang mencapai tahap morula dan blastosis, karena pada tahap tersebut embrio tahan terhadap pembekuan dan layak untuk ditransfer ke resipien (Setiadi dan Karja, 2013). Embrio yang mempunyai kompetensi mencapai tahap blastosis dapat dinilai sejak dini dengan melihat kecepatan pembelahannya (Lequaere *et al.*, 2003), terutama ketika embrio mencapai tahap pembelahan 16 sel karena telah melewati periode transisi genom maternal ke genom embrio (Graf *et al.*, 2014). Lebih lanjut dilaporkan oleh Lim *et al.* (1996) bahwa selama periode transisi tersebut terjadi penurunan konsentrasi GSH intraseluler. Hal tersebut dikhawatirkan menyebabkan ROS tidak dapat dinetralisir dengan baik sehingga



Gambar 1. Perkembangan pronukleus setelah fertilisasi. A. 1 PN, B. 2 PN, C. >2 PN (Pembesaran 200 kali, fase kontras, Olympus IX 70).



Gambar 2. Perkembangan awal embrio sapi selama empat hari. A. 2 Sel, B. 3-4 Sel, C. 5-8 Sel, D. 9-16 Sel, E. 17-32 Sel (Pembesaran 200 kali, Olympus IX 70).

mengganggu perkembangan awal embrio (Park et al., 2014). Oleh karena itu, dalam penelitian II dilakukan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur untuk mengetahui pengaruhnya terhadap perkembangan awal embrio. Perkembangan awal embrio sapi selama empat hari disajikan pada Gambar 2.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat pembelahan embrio pada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T₁) sebesar 82,1% dan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T₃) sebesar 84,3% lebih tinggi (P<0,05) daripada kontrol (T₀) sebesar 59,0%. Tingkat pembelahan perlakuan penambahan GSH hanya

pada medium kultur (T₂) sebesar 57,1% tidak berbeda (P>0,05) jika dibandingkan dengan kontrol (T₀) (Tabel 2). Hasil tersebut menunjukkan penambahan GSH pada medium kultur tidak meningkatkan oosit yang membelah. Banyaknya oosit yang membelah lebih dipengaruhi oleh banyaknya pronukleus normal yang terbentuk akibat penambahan GSH pada medium fertilisasi. Hal tersebut diduga penambahan GSH pada medium kultur tidak dapat masuk melalui membran yang telah mengalami pengerasan zona pelusida pada saat proses fertilisasi. Pernyataan ini didukung oleh Boccaccio et al. (2012) bahwa pada proses pengerasan zona pelusida terjadi peningkatan resistensi terhadap agen pereduksi seperti GSH.

Tabel 1. Kemampuan fertilisasi *in vitro* oosit sapi setelah penambahan *glutathione* (GSH).

Perlakuan(mM)	n	Fertilisasi n (% rataaan)		
		Total	Normal (2 PN)	Polispermi (>2 PN)
Kontrol	73	45 (61,6) ^a	43 (58,9) ^a	2 (2,7)
0,25	84	64 (76,2) ^b	62 (73,8) ^b	2 (2,4)
0,50	76	63 (82,9) ^b	61 (80,3) ^c	2 (2,6)
1,00	84	78 (92,9) ^c	73 (86,9) ^d	5 (6,0)

Keterangan : n= jumlah oosit; huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05).

Tabel 2. Kemampuan perkembangan awal embrio sapi setelah penambahan 1,00 mM *glutathione* (GSH).

Perlakuan	IVF	IVC	n	Tingkat pembelahan n (% rataaan)	Tingkat perkembangan awal embrion (% rataaan)				
					2 sel	3-4 sel	5-8 sel	9-16 sel	17-32 sel
Pengamatan hari ke-2									
Kontrol	-	-	83	46 (55,4) ^a	5 (6,0)	13 (15,7)	26 (31,3) ^a	2 (2,4)	0 (0,0)
T ₁	+	-	84	67 (79,8) ^b	7 (8,3)	10 (11,9)	47 (56,0) ^b	3 (3,6)	0 (0,0)
T ₂	-	+	84	48 (57,1) ^a	6 (7,1)	18 (21,4)	22 (26,2) ^a	2 (2,4)	0 (0,0)
T ₃	+	+	83	69 (83,1) ^b	4 (4,8)	17 (20,2)	45 (53,6) ^b	3 (3,6)	0 (0,0)
Pengamatan hari ke-4									
Kontrol	-	-	83	49 (59,0) ^a	4 (4,8)	14 (16,9)	20 (24,1) ^a	9 (10,8)	2 (2,4)
T ₁	+	-	84	69 (82,1) ^b	4 (4,8)	9 (10,7)	31 (36,9) ^b	22 (26,2)	3 (3,6)
T ₂	-	+	84	48 (57,1) ^a	6 (7,1)	12 (14,3)	18 (21,4) ^a	10 (11,9)	2 (2,4)
T ₃	+	+	83	70 (84,3) ^b	1 (1,2)	11 (13,1)	30 (35,7) ^b	23 (27,4)	5 (6,0)

Keterangan : n= umlah oosit atau embrio; IVF= medium fertilisasi; IVC= medium kultur; T₀= kontrol; T₁= penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi; T₂= penambahan GSH hanya pada medium kultur; T₃= kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur. Huruf superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05).

Hasil penelitian hari ke-2 kultur menunjukkan perkembangan awal embrio 5-8 sel pada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T_1) sebesar 56,0% dan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T_3) sebesar 53,6% lebih tinggi ($P<0,05$) daripada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium kultur (T_2) sebesar 26,2% dan kontrol (T_0) sebesar 32,3%. Hasil penelitian selanjutnya pada hari ke-4 kultur yang menunjukkan perkembangan awal embrio 9-16 sel pada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T_1) sebesar 26,2% dan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T_3) sebesar 27,4% lebih tinggi ($P<0,05$) daripada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium kultur (T_2) sebesar 11,9% dan kontrol (T_0) sebesar 10,8% (Tabel 2). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penambahan GSH pada medium fertilisasi lebih efektif dalam mendukung perkembangan awal embrio daripada penambahan GSH pada medium kultur sehingga lebih berkompetensi untuk mencapai tahap blastosis. Menurut Asgari *et al.* (2012) bahwa embrio yang memiliki kompetensi menjadi blastosis mencapai pembelahan delapan sel pada hari ke-2 kultur dan pembelahan 9-16 sel sampai morula awal pada hari ke-4 kultur. Hal tersebut dapat dijelaskan karena pada perkembangan awal embrio delapan sampai 16 sel terjadi peningkatan sintesis GSH sejalan dengan pengaktifan genom embrio (Lim *et al.*, 1996). Peningkatan GSH intraseluler berperan sangat penting selama perkembangan awal embrio dalam menetralkan ROS (Sun *et al.*, 2015) dan proliferasi (Lu, 2013).

Hasil penelitian hari ke-4 kultur menunjukkan perkembangan awal embrio 5-8 sel pada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium fertilisasi (T_1) sebesar 36,9% dan perlakuan kombinasi penambahan GSH pada medium fertilisasi dan kultur (T_3) sebesar 35,7% lebih tinggi ($P<0,05$) daripada perlakuan penambahan GSH hanya pada medium kultur (T_2) sebesar 21,4% dan kontrol (T_0) sebesar 24,1% (Tabel 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat banyak embrio delapan sel pada hari ke-2 kultur yang tidak mampu melanjutkan perkembangannya menjadi 9-16 sel pada hari ke-4 kultur. Menurut Asgari *et al.* (2012) bahwa perkembangan awal embrio delapan sel pada hari ke-4 kultur merupakan perkembangan

awal embrio yang terlambat. Lebih lanjut Gasparrini *et al.* (2003) menyatakan bahwa embrio sapi sering mengalami blokade pada perkembangan awal delapan sel. Memili dan First (2000) menjelaskan bahwa blokade perkembangan embrio berhubungan dengan tahap perkembangan ketika embrio mengandalkan transkripsi mRNAs dari genomnya sendiri untuk meneruskan pembelahan. Selain itu, hal ini diduga kecepatan pembelahan embrio pada hari ke-2 kultur menyebabkan metabolisme berjalan lebih cepat sehingga menghasilkan akumulasi ROS yang memicu stres oksidasi. Park *et al.* (2014) menyatakan bahwa stres oksidasi selama tahap kultur dapat mengganggu perkembangan awal embrio. Lebih lanjut dijelaskan bahwa stres oksidasi dapat menyebabkan kerusakan molekul biologi yang penting di dalam sel, penurunan *adenosine triphosphate* (ATP), dan apoptosis (Guerin *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Penambahan 1,00 mM GSH pada medium fertilisasi mampu memenuhi kebutuhan GSH oosit selama tahap *in vitro* sehingga menghasilkan pembentukan pronukleus normal dan perkembangan embrio sapi yang optimal.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penambahan GSH dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 1,00 mM pada medium fertilisasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pembentukan pronukleus dan perkembangan awal embrio sapi secara *in vitro*. Perlu dilakukan seleksi embrio dengan pronukleus >2PN secara non invasif pada tahap fertilisasi sehingga tidak diikutkan dalam tahap kultur *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan dan Perguruan Tinggi yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui Program Beasiswa Program Pascasarjana Dalam Negeri (BPPDN) periode 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2005. Oxidative stress and its implications in female infertility-a clinician's perspective. *Rep Bio Med* 11: 641-650.
- Asgari V, Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. 2012. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology* 65: 278-283.
- Boccaccio A, Frassanito MC, Lamberti L, Brunelli R, Maulucci G, Monaci M, Papi M, Pappalettere C, Parasassi T, Sylla L, Ursini F, De Spirito M. 2012. Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine zona pellucida. *Roy Soc Inter* 1: 1-12.
- Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR. 1996. β -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/ in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod* 55: 1179-1184.
- Costa NN, Cordeiro MS, Silva TVG, Sastre D, Santana PPB, Sa ALA, Sampaio RV, Santos SSD, Adona PR, Miranda MS, Ohashi OM. 2013. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 30: 1-7.
- Coy P, Aviles M. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev* 85: 593-606.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 42: 432-436.
- De Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of beta-mercaptoethanol, cysteine, and cystine. *Theriogenology* 53: 761-771.
- Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Cell Biol* 194(1): 7-15.
- Furnus CC, de Matos DG, Picco S, Garcia PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. 2008. Metabolic requirement associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. *Anim Rep Sci* 109: 88-99.
- Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, de Matos DG, Donay I, Zicarelli L. 2003. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60: 943-952.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 63: 1730-1734.
- Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Ed-2. London (GB): CABI Publishing. Hlm. 241-242.
- Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H, Wolf E. 2014. Genom activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim Reprod Sci* 149: 46-58.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in pre-implantation embryo and its surrounding. *Hum Reprod* 7: 175-189.
- Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, Agarwal A. 2009. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implication. *Int J Fertil Steril* 2(4): 147-164.
- Hara H, Yamane I, Noto I, Kagawa N, Kuwayama M, Hirabayashi M, 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.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000. Low oxygen tension during in vitro maturation in beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 57: 353-360.
- Ishizuka Y, Nisihimura M, Matsumoto K, Miyashita M, Takeo T, Nakagata N, Hosoi Y, Anzai M. 2013. The influence of GSH in fertilization medium on the fertility of in vitro-mature C57BL/6 mouse oocytes. *Theriogenology* 80: 421-426.

- Jacob PA, Angel RR, Buchanan IM, Hassold TJ, Matsuyama AM, Manuel B. 1978. The origin of human triploids. *Ann Hum Gen* 42: 49-57.
- Jezek P, Hlavata L. 2005. Mitochondria in homeostatis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Biochem Cell Biol* 37: 2478-2503.
- Karja NWK, Wongsrikeao, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. 2004. *Theriogenology* 62: 1585-1595.
- Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. 2012. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* 78: 86-101.
- Lequaere AS, Marchandase J, Moreau B, Massip A, Donnay I. 2003. Cell cycle at the time of maternal zygotic. *Biol Reprod* 69: 1707-1713.
- Lim JM, Liou SS, Hansel W. 1996. Intrascytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46: 429-439.
- Lu SC. 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3143-3153.
- Lord T, Aitken RJ. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 146: 217-227.
- Memili E, First NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanism of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8: 87-96.
- Mukhopadhyay CS, Verma A, Dubey PP, Jain R, Singh N. 2008. Sperm nuclear chromatin decondensation test: its applicability to predict fertility of cryopreserved semen samples. *Ind Anim Res* 42: 285-287.
- Park SH, Cho HS, Yu IJ. 2014. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of in vitro-produced blastocysts. *Reprod Dom Anim* 1: 1-8.
- Setiadi MA, Karja NWK. 2013. Tingkat perkembangan awal embrio sapi *in vitro* menggunakan media tunggal berbahan dasar *tissue culture medium* (TCM) 199. *J Ked Hewan* 7: 150-154.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik*. Penerjemah: B Sumantri. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka. Hlm. 75-77.
- Sun WJ, Pang YW, Liu Y, Hao HS, Zhao XM, Qin T, Zhu HB, Du WH. 2015. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improve the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 30: 1-8.
- Sutovsky P, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 56: 1503-1512.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 63: 582-590.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod* 9(1): 35-48.
- Suzuki K, Erikson B, Shimizu H, Nagai I, Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of hyaluron on monospermic penetration of porcine oocyte fertilized in vitro. *Int Androl* 23: 13-21.
- Takeo T, Nakagata N. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod* 85: 1066-1072.
- Wang ZG, Yu SD, Xu ZR. 2007. Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes. *Anim Reprod Sci* 100: 22-31.

- Whitaker BD, Knight JW. 2004. Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 62: 311-322.
- Whitaker BD, Knight JW. 2010. Effects of N-acetyl-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide supplementation on in vitro matured porcine oocyte. *Reprod Dom Anim* 45(5): 755-759.
- Yasmin C, Otoi T, Setiadi MA, Karja NWK. 2015. Maturation and fertilization of sheep oocytes cultured in serum-free medium containing silk protein sericin. *Acta Vet Hung* 63(1): 110-117.
- You J, Kim J, Lim J, Lee E. 2010. Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryo by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology* 74: 777-785.
- You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. 2012. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular GSH synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* 78: 235-243.
- Zhou P, Wu YG, Wei DL, Li Q, Wang G, Zhang J. 2010. Mouse cumulus-denuded oocytes restore development capacity completely when matured with optimal supplementation of cysteamine, cystine, and cumulus cells. *Biol Reprod* 82: 759-768.
- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. 2003. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, pre-implantation stage embryos. *Mol Rep Dev* 64: 106-112.