

Tingkat Maturasi *in vitro* Oosit Kambing dalam Medium dengan Suplementasi Serum dan Albumin

(*IN VITRO MATURATION RATE OF GOAT OOCYTES IN MEDIA SUPPLEMENTED WITH SERUM AND ALBUMIN*)

Sri Gustari¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{1,2},
Yuke Rizky Amelia¹, Ian Kurniawan¹, Bayu Sulisty¹

¹Bagian Reproduksi & Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Univeritas Gajah Mada, Jl. Fauna No 2 Karangmalang, Yogyakarta.
E-mail: gustari_vet@ugm.ac.id

²Bagian Reproduksi & Kebidanan, FKH, Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

The present study aimed to study the effect of "maturation media" on maturation rate of goat oocytes after *in vitro* maturation. Goat ovaries were collected from a slaughter house in Godean, Sleman. Immediately after slaughter the ovaries were collected, rinsed with physiological NaCl three times then placed in a flask containing the NaCl solutions and kept at 36-37°C before transportation to the laboratory. Oocytes were observed under stereo microscope and its quality was classified into A, B, and C. Oocytes *in vitro* maturation (IVM) was performed in TCM-199 media supplemented with : a) 0.4 mg/ml bovine serum albumin (BSA); and b) 10% newborn calf serum (NCS) then incubated at 38.5°C with 5% CO₂ for 24-27 h. Following this, oocytes were observed under inverted microscope for first polar body extrusion, then stained with aceto-orcein in order to evaluate nuclear maturation. The nuclear maturation stages including : germinal vesicles (GV), germinal vesicles break down (GVBD), metaphase I, anaphase I, telophase I and metaphase II, respectively. The overall results showed that 74-74%, 52-66.6% and 21.5-23.8% of oocytes quality A, B, and C reached maturation at metaphase II, respectively. There were no significant differences in oocytes maturation using media supplemented with either BSA or NCS.

Keywords: goat, oocytes maturation, *in vitro* fertilization

PENDAHULUAN

Salah satu dari perkembangan yang paling menakutkan dalam reproduksi hewan ternak adalah transfer embrio, yang bisa disebut sebagai generasi kedua dari bioteknologi reproduksi setelah inseminasi buatan (IB). Teknik tersebut sekarang telah digunakan dalam praktek dengan jutaan embrio diimpor-ekspor ke seluruh dunia (Thibier dan Nibart, 1992). Saat ini, penelitian pada kambing kurang berkembang dibandingkan pada sapi, domba dan babi, walaupun perkembangan ternak kambing sangat pesat di seluruh dunia. Di samping peran socio-ekonomi yang penting dari ternak kambing di dunia, telah diketahui bahwa penelitian pada kambing baik penelitian dasar maupun terapan, juga pada sistem produksinya masih jauh tertinggal dibandingkan dengan penelitian pada hewan lain. Aplikasi teknologi reproduksi dapat meningkatkan mutu genetik (Vivanco-

Mackie, 2001). *Assisted Reproductive Technology* (ART) seperti IB dan *multiple ovulation embryo transfer* (MOET) memungkinkan hewan dengan mutu genetik tinggi untuk memproduksi anak lebih dari kapasitasnya (Baldassarre dan Karatzas, 2004).

Younis *et al.*, (1991), telah mendokumentasikan keberhasilan kebuntingan sesudah *in vitro fertilization* (IVF) oosit kambing yang dimatangkan secara *in vitro* atau *in vivo* yang dapat terfertilisasi sampai stadium siap transfer. Ketersediaan oosit dalam jumlah besar merupakan syarat untuk pelaksanaan IVF. Ovarium dari rumah potong hewan merupakan sumber oosit primer yang berlimpah dan paling murah untuk memproduksi embrio secara besar-besaran.

In vitro maturation (IVM) adalah salah satu tahapan dalam proses IVF. Pada kebanyakan penelitian, medium dasar untuk IVM diperkaya oleh hormon dan berbagai konsentrasi serum.

Medium maturasi dan pemilihan suplemen protein dan hormon untuk IVM sangat berperan dalam keberhasilan IVF dan perkembangan selanjutnya. Menurunnya perkembangan zigot hasil IVF pada kambing merupakan indikasi bahwa kondisi IVM tidak mendukung maturasi sitoplasmik. Perbaikan sistem IVM untuk oosit sangat diperlukan dengan maksud menciptakan kondisi *in vitro* yang mirip dengan lingkungan *in vivo* (Wang et al., 2007). Sejalan dengan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan membandingkan tingkat maturasi oosit kambing dalam dua medium IVM yaitu antara yang mengandung *bovine serum albumin* (BSA) dengan yang mengandung *new born calf serum* (NCS).

METODE PENELITIAN

Koleksi oosit

Ovarium kambing dikoleksi dari kambing PE dari rumah potong hewan (RPH) dan di kirim ke laboratorium dengan jarak kurang lebih 10 km, yang ditempuh dalam 30–60 menit pada suhu hangat (36–37°C) dalam NaCl fisiologis disuplementasi dengan penicillin 1000 IU/ml dan streptomycin 1000 ug/ml. Di Laboratorium, ovarium dicacah dalam cawan petri yang berisi *phospat buffer saline* (PBS) untuk mengeluarkan oosit. *Cumulus oocyte complexe* (COC) diisolasi di bawah mikroskop stereo (Olympus Corporation, Japan) dan dikelompokkan dalam kualitas A, B, dan C. Penilaian berdasarkan bentuk selulernya dan keseragaman sitoplasmanya, sebagai berikut : 1). Kualitas A (baik): kumulus lebih dari 2 lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan *Cumulus oocyte complexe* (COC) terang dan transparan; 2). Kualitas B (sedang): kumulus lebih dari 2 lapis, kompak, ooplasma homogen, tapi COC tampak agak gelap; 3). Kualitas C (jelek): kumulus tidak kompak, ooplasma ireguler, gelap, COC tampak gelap.

Maturasi oosit *in vitro*

Protokol untuk *in vitro maturation* (IVM) oosit kambing merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Wang et al., (2007). Secara ringkas sebagai berikut, IVM dilakukan dalam 2 macam medium yang dibedakan hanya pada jenis serum yaitu 0,4 mg/ml BSA dan 10% NCS. Sebagai media dasarnya adalah 100 µl TCM 199 yang ditambah dengan bLH (0,02 U/ml), bFSH (0,02 U/ml), estradiol \hat{a} -17 (1µg/ml),

sodium pyruvate (0,2 mM), penicillin-streptomycin (50 µg/ml). Oosit yang sudah dimasukkan dalam medium tersebut diinkubasikan pada suhu 39°C dalam 5% CO₂ inkubator selama 24-27 jam. Selanjutnya oosit diperiksa dengan mikroskop *inverted* untuk *extrusion*/munculnya polar bodi pertama. Di samping itu juga dilakukan pengecatan oosit untuk menentukan tingkat maturasi nukleus. Oosit difiksasi dalam larutan asam asetat–ethanol (1:3) selama 2-7 hari. Pengecatan dilakukan dengan jalan meneteskan *staining media* (orcein 1%) hingga mengenai oosit, dan dibiarkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian *staining media* diganti dengan *restaining media* sehingga berwarna terang. Selanjutnya oosit diamati tingkat maturasinya di bawah mikroskop *phasecontrast*. Tingkatan maturasi nukleus adalah vesikula germinalis (GV), *germinal vesicle break down* (GVBD), metaphase I, anaphase I, telophase I, dan metaphase II.

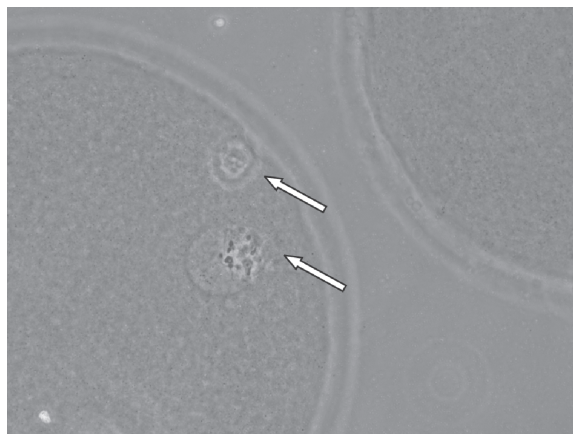
Analisis data

Data yang diperoleh mengenai tingkat maturasi oosit kambing setelah IVM dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses maturasi oosit secara *in vitro* memperoleh hasil oosit yang mencapai stadium *metaphase II* (Gambar 1) untuk kualitas A, B, dan C adalah berturut-turut 74-79 %, 52-66,6%, dan 23,8-25%. Oosit dimaturasikan dalam 2 media IVM berbeda yaitu TCM199 yang ditambah BSA dan yang ditambah serum dalam hal ini NCS. Hasil IVM selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Analisis statistika terhadap jumlah oosit kambing yang mencapai *metaphase II* setelah IVM menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara oosit kualitas A dengan kualitas B, dan C (74-79% vs 52-66,6%, 23,8-25%), juga antara kualitas B dan kualitas C (52-66% vs 23,8-25%). Kualitas oosit sangat mempengaruhi tingkat maturasi yang dihasilkan, seperti halnya yang dijelaskan oleh Gordon (1994) bahwa oosit dengan morfologi bagus yaitu kumulus berlapis-lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan COC terang dan transparan menghasilkan lebih banyak oosit yang maturasi setelah IVM. Telah diketahui bahwa hubungan antara sel-sel kumulus dan



Gambar 1. Oosit setelah IVM, pada metafase II, dengan pengecatan orcein diperiksa di bawah mikroskop perbesaran 40x10. Pada nukleusnya terlihat dua kelompok kromatin(arah panah).

oosit sangat penting, tidak hanya dalam proses maturasi oosit ke stadium *metaphase* II tetapi juga pada maturasi sitoplasma yang diperlukan untuk perkembangan oosit setelah fertilisasi (Moor *et al.*, 1990, Ka *et al.*, 1997). Interaksi sel kumulus dan oosit menghasilkan *glycosaminoglycan*, hormon steroid, nutrisi, dan faktor-faktor lain yang mendukung maturasi oosit (Yanagimachi dan Nagai, 1999, Dode dan Graves, 2002). Pada babi, pelepasan sel-sel kumulus pada proses maturasi oosit *in vitro* hanya menghasilkan oosit matur sebanyak 28,7% (Wongsrikeao *et al.*, 2005).

Dalam hal media yang digunakan untuk IVM pada penelitian ini antara yang menggunakan BSA maupun NCS tidak menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan

terkait persentase oosit kualitas A yang mencapai *metaphase* II (74 dan 75 %). Hal tersebut terjadi kemungkinan karena baik BSA maupun NCS yang ditambahkan ke dalam media IVM mengandung komponen yang dibutuhkan dalam perkembangan oosit.

Keberhasilan oosit mencapai maturasi secara *in vitro* dipengaruhi oleh kualitas oosit di samping banyak faktor lain yaitu di antaranya media, sistim kultur termasuk suhu, kelembaban dan kandungan CO₂ dalam inkubator. Menurut Gordon (1994) pada umumnya media untuk maturasi oosit secara *in vitro* diperkaya dengan serum atau albumin.. BSA mau pun *serum* yang ditambahkan pada media kultur berfungsi untuk menyediakan energi dan protein untuk proses metabolik dan anabolik (Maurer, 1992). Albumin tidak hanya membantu dalam ikatan lemah, menyediakan tempat untuk tercukupinya komponen penting seperti steroid, vitamin, asam lemak dan kolesterol, tapi juga membantu dalam persediaan ion-ion dan molekul-molekul kecil. Pada sapi, meskipun dalam penelitian Leibfried-Rutledge (1986) didapatkan bahwa FCS lebih unggul dibandingkan BSA, namun justru BSA yang paling sering digunakan (Gordon, 1994).

Younis *et al.*, (1991) menggunakan media yang diperkaya dengan serum untuk maturasi oosit kambing secara *in vitro*, dan memperoleh hasil yang bagus. Serum sapi dalam hal ini *fetal calf serum* (FCS) digunakan sebagai sumber protein yang utama di dalam media IVM (Gordon, 1994). Serum mengandung komponen esensial seperti hormon, vitamin, protein, dan faktor pertumbuhan (van der Valk, 2004), yang tentunya bermanfaat dalam perkembangan sel.

Tabel 1. Tingkat maturasi oosit kambing setelah IVM dalam media yang mengandung BSA dan NCS.

Kualitas Oosit	Perlakuan	Jumlah	GV (%)	MI (%)	A/T (%)	MII (%)	F (%)
A	BSA	64	3 (4,8%) ^a	4 (6,2%) ^a	4(6,2%) ^a	48 (75%) ^a	5 (7,8%)
	NCS	35	2 (6%) ^a	6 (17%) ^a	1 (3%) ^a	26 (74%) ^a	0
B	BSA	64	3 (4,6%) ^a	18 (28%) ^a	6(9,4%) ^a	33 (52%) ^b	4 (6%)
	NCS	27	1 (4%) ^a	1 (4%) ^a	5(18%) ^b	18 (66,6%) ^b	2 (7,4%)
C	BSA	28	8(28,5%) ^b	11(39,3%) ^b	0	6 (21,5%) ^c	3(10,7%)
	NCS	21	3(14,3%) ^a	6(28,6%) ^a	4(19%) ^b	5 (23,8%) ^c	3(14,3%)

Keterangan: GV: germinal vesicle, MI: metaphase I, A/T:anaphase/telophase, MII: metaphase II, F: fragmentasi. Tanda huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kualitas oosit sangat menentukan tingkat maturasi dari oosit yang dimatursasikan secara *in vitro*, dimana kualitas A yang paling baik dibandingkan kualitas B dan C. Maturasi oosit kambing dapat dilakukan secara *in vitro* baik menggunakan media yang mengandung BSA maupun NBS dengan tingkat maturasi yang seimbang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Bersaing XV dengan Nomor: LPPM-UGM/529/2007 tanggal 29 Maret 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Baldassare H, Karatzas CN, 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82-83: 255-266.
- Dode MA, Graves C, 2002. Involvement of steroid hormone on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 57: 811-821.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Oxon UK. Cab International. Wellingford.
- Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K. 1997. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cell at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod* 57: 1478-1483.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 35: 850-857.
- Maurer MJ. 1992. *Toward serum free. Chemical defined media for mammalian cell culture. A practical approach*. 2nd ed. New York. Oxford University Press.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T, 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Fertil* 40 (Suppl), 197-210.
- Thibier M, Nibart M. 1992. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Anim Repro Sci* 28: 139-148.
- van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gsthraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V, 2004. The human collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* 18: 1-12.
- Vivanco-Mackie HW, 2001. Embryo transfer in ovine and caprine. In: Palma G. (Ed), *Biotechnology of Reproduction*. Buenos Aires. Ediciones INTA.
- Wang ZG, Zu ZR, Yu SD, 2007. Effects of oocytes collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in boer goat. *Czech. J Anim Sci* 52 (1): 21-25.
- Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M, Otoi T, 2005. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod Dom Anim* 40:166-170.
- Yamauchi N, Nagai T. 1999. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 61: 828-833.
- Younis AI, KA Zuelke, KM Harper, MA Oliveira, Brackett BG. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 44: 1177-1182.