

# Fetal Bovine Serum Meningkatkan Maturasi Inti Oosit Kelinci Setelah Dimaturasi Secara *In Vitro*

(FETAL BOVINE SERUM ENHANCED THE NUCLEAR MATURATION OF RABBIT OOCYTES IN VITRO)

Ni Wayan Kurniani Karja<sup>1,2\*</sup>; Winny Plumeria Aqshani<sup>1</sup>; Yesi Pratiwi Kusumawati<sup>1</sup>  
Veronika Gilang Pravitasari<sup>1</sup>; Sri Gustari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 2 Yogyakarta 55281;

<sup>2</sup>Alamat sekarang: Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680  
Email : karja\_nwk@yahoo.com

## ABSTRACT

This study was conducted to examine the meiotic competence or nuclear maturation of rabbit oocytes matured *in vitro*. Oocytes were recovered by mincing the ovaries in *modified phosphate buffer saline* (m-PBS). Selected cumulus-oocyte complexes (COCs) with compact cumulus cell mass and a dark, homogenous ooplasm were cultured in maturation medium at 38°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air, and then stained for nuclear maturation. Three experiments were carried out. In Experiment 1, COCs were cultured in maturation medium for 18-20, 22-24, and 28-30 h. The proportion of oocytes at metaphase II (MII) was similar (P>0.05) at 18-20 (69.2%), 22-24 (66.4%), and 28-30 (71.1) h of culture. In Experiment 2, COCs were cultured in either maturation medium containing 0.04% bovine serum albumine (BSA) or 5% fetal bovine serum (FBS) for 24 h. The proportion of oocytes that reached MII were higher (P<0.05) in FBS group (79.2%) than those of oocytes in BSA group (64%). In Experiment 3, based on the presence or absence of follicles and corpora lutea, the ovarian pairs were classified into follicular or luteal stages. There was no difference (P>0.05) among oocytes collected from ovaries in follicular (79.7%) and luteal stages (78.7%) in the ability to achieve nuclear maturation. These results indicated that nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro* was completed at 18-20 h of maturation culture and was not affected by ovary's reproductive stage. The presence of FBS in the maturation medium enhanced the ability of rabbit oocytes to achieve nuclear maturation.

Keywords: *in vitro* maturation, rabbit oocytes, bovine serum albumin, fetal bovine serum.

## PENDAHULUAN

Teknologi reproduksi bantuan atau *Assisted Reproduction Technology* (ART) yang berkembang saat ini merupakan teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah infertilitas dan kepunahan dari banyak spesies hewan yang semakin banyak dikhawatirkan oleh berbagai kalangan. Maturasi oosit secara *in vitro* merupakan salah satu bagian dari ART untuk menghasilkan oosit yang siap dibuahi oleh spermatozoa. Kemampuan untuk menumbuhkan dan memfertilisasi oosit secara *in vitro* berguna untuk memproduksi embrio dalam jumlah besar baik untuk keperluan studi biologi perkembangan, kriopreservasi, atau untuk studi genetik. Keberhasilan dari maturasi oosit secara

*in vitro* sangat menentukan viabilitas embrio selanjutnya.

Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) merupakan salah satu hewan yang sering dipakai sebagai hewan model untuk penelitian. Di samping karena ukurannya kecil, kelinci mempunyai siklus reproduksi yang pendek. Oosit kelinci juga dilaporkan merupakan model yang ideal untuk berbagai macam penelitian karena ukurannya yang besar, sifatnya yang elastis dan mudah untuk dimanipulasi. Sitoplasma oosit kelinci juga lebih transparan dibanding kebanyakan hewan domestik seperti babi, sapi, dan kambing (Zhao, 2006). Sitoplasma oosit kelinci juga dilaporkan mampu *mereprogram* inti sel somatik dari berbagai jenis spesies hewan dan manusia pada transfer inti interspesies dan

mampu mendukung perkembangan dari embrio interspesies tersebut sampai stadium blastosis (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Di samping itu studi tentang pengembangan teknologi reproduksi pada kelinci domestik diharapkan dapat digunakan untuk menyelamatkan spesies-spesies kelinci langka dan terancam punah karena menurut *Wildlife Conservation Society* (WCS) kelinci belang sumatera (*Nesolagus netscheri*) merupakan salah satu spesies kelinci yang dikategorikan sebagai hewan yang terancam punah.

Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro* seperti kondisi kultur, kualitas oosit yang dipergunakan, jenis protein yang ditambahkan pada media kultur, periode waktu maturasi, dan status reproduksi dari donor (Sanbuissho dan Threlfall, 1990; Johnston *et al.*, 1991, 1993; Wood dan Wildt, 1997; Karja *et al.*, 2002). Penelitian tentang maturasi oosit *in vitro* pada kelinci masih sangat terbatas. Penelitian-penelitian terdahulu kebanyakan menggunakan oosit kelinci yang diperoleh secara *in vivo* dari hewan donor setelah mendapat perlakuan superovulasi (Fissore dan Robl, 1992; Ozil, 1990; Collas dan Robl, 1990). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi faktor-faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan maturasi oosit kelinci secara *in vitro* seperti waktu maturasi, sumber protein yang digunakan dalam medium kultur, dan stadium reproduksi ovarium sehingga didapatkan suatu sistem kultur yang efisien yang dapat mendukung oosit kelinci untuk mencapai maturasi inti secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Koleksi dan Maturasi Oosit secara *In vitro*

Ovarium kelinci diperoleh dari tempat penyembelihan kelinci dan dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi *modified phosphate buffer saline* (m-PBS) pada suhu 35°C. Setelah sampai di laboratorium, ovarium dicacah di dalam cawan petri yang berisi m-PBS untuk mengeluarkan oosit dari folikel. Hanya oosit dengan sel kumulus lebih dari 5 lapis dan sitoplasma yang berwarna gelap dan homogen yang digunakan pada penelitian ini (Gambar 1a). Oosit hasil koleksi kemudian dicuci sebanyak 2 kali pada medium maturasi untuk selanjutnya dimaturasi secara *in vitro* dengan metode seperti yang digambarkan oleh

Karja *et al.*, (2002) dengan sedikit modifikasi. Oosit dimaturasi di dalam 100 mL medium maturasi yang ditutup *mineral oil*. Medium dasar yang digunakan untuk maturasi adalah *tissue culture medium* (TCM) 199 *with Earle's salts* ditambah dengan 0,1 IU/mL *follicle stimulating hormone*, 10 IU/mL *human chorionic gonadotropin*, 1 mg/mL 17 $\beta$ -estradiol, dan 100 mg/mL gentamicin. Semua kultur dilakukan pada suhu 38°C dalam 5% CO<sub>2</sub> *humidified incubator*.

Pada penelitian ini dilakukan 3 (tiga) eksperimen yang berbeda. Eksperimen 1, oosit hasil koleksi dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan dan dimaturasi pada medium dasar yang ditambahkan dengan 0,4% *bovine serum albumin* (BSA) selama 18-20 jam, 22-24 jam, dan 28-30 jam untuk mengetahui tingkat maturasi inti oosit kelinci *in vitro* pada waktu yang bervariasi. Eksperimen 2, oosit yang diperoleh dibagi menjadi dua secara acak dan dimaturasi selama 24 jam dalam *drop* 100 mL medium dasar ditambahkan dengan 0,4% BSA atau 5% *fetal bovine serum* (FBS) untuk mengetahui pengaruh penambahan protein yang berbeda dalam medium kultur terhadap tingkat maturasi inti oosit kelinci secara *in vitro*. Eksperimen 3, sebelum koleksi oosit, ovarium dikelompokkan berdasarkan stadium reproduksinya. Stadium reproduksi ovarium dibedakan berdasarkan ada tidaknya folikel atau korpus luteum pada ovarium (Karja *et al.*, 2002). Ovarium dikategorikan sebagai ovarium stadium folikular apabila terdapat satu atau lebih folikel berkembang pada salah satu atau kedua ovarium dan tidak ada korpus luteum. Ovarium dikategorikan sebagai ovarium stadium luteal apabila terdapat satu atau lebih korpus luteum pada salah satu atau kedua ovarium. Oosit hasil koleksi dari masing-masing kelompok kemudian dimaturasi pada medium maturasi dasar yang di tambah dengan 5% FBS selama 24 jam untuk mengetahui pengaruh stadium reproduksi ovarium terhadap tingkat maturasi inti oosit kelinci secara *in vitro*.

### Fiksasi dan Pewarnaan Oosit

Tingkat maturasi inti oosit ditentukan dengan metode pewarnaan arceto-orcein seperti yang digambarkan oleh Karja *et al.*, (2002). Pada akhir waktu maturasi, sel-sel kumulus yang menempel pada oosit dilepaskan secara manual dengan pipet dalam m-PBS yang ditambah dengan 1 mg/mL hyaluronidase. Oosit kemudian difiksasi dengan acetic acid: ethanol (1:3 v:v)

selama 48 - 72 h. Oosit diwarnai dengan acetic-orcein (1% orcein dalam 45% acetic acid) dan diperiksa di bawah mikroskop *fase-contrast*. Status maturasi inti dari setiap oosit ditentukan berdasarkan perubahan-perubahan konfigurasi kromosom dan membran nukleus yang terjadi

**Analisis Data**

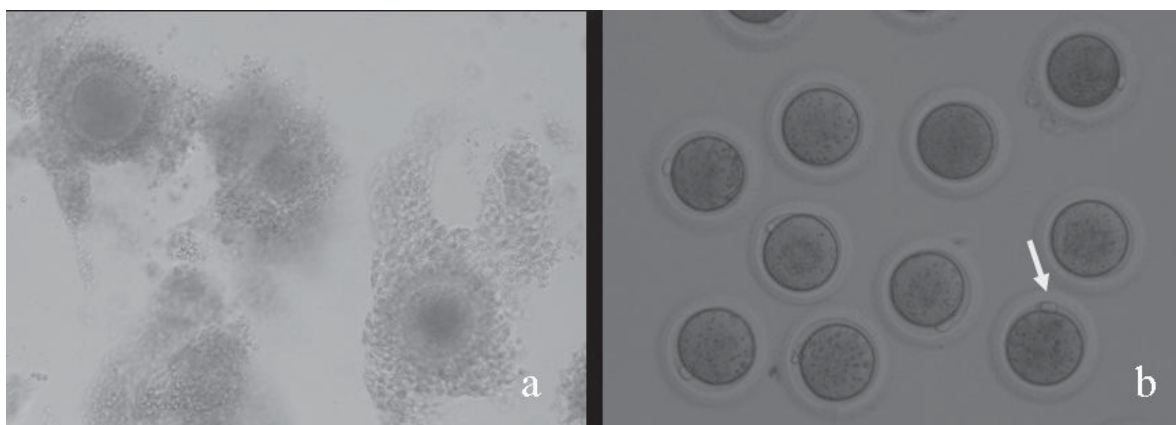
Persentase jumlah oosit pada tiap kelompok yang mencapai fase-fase dari maturasi inti ditransformasikan dalam bentuk *arc\_sin*. Data yang sudah ditransformasikan kemudian dianalisa dengan analisis varian/sidik ragam (ANOVA) yang diikuti dengan Uji Beda Nyata Terkecil Fisher menggunakan Statview program (Abacus concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Keberhasilan dari maturasi oosit *in vitro* ditandai dengan sempurnanya proses maturasi inti yang ditandai dengan terbentuknya *polar*

*body I* (Gambar 1b). Mekanisme yang memicu status meiotik oosit hampir sama pada hewan mamalia, namun waktu yang dibutuhkan oosit untuk mencapai oosit tahap MII berbeda antar spesies satu dengan spesies yang lain. Pada penelitian ini, 69 % sampai 71% oosit yang dikultur selama 18 hingga 30 jam mencapai fase MII, dan secara statistika tidak ada perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) antara oosit yang dimaturasi selama 18-20 jam, 22-24 jam, dan 28-30 jam (Tabel 1). Data pada eksperimen pertama ini mengindikasikan bahwa sebagian besar oosit kelinci mencapai maturasi inti secara sempurna dalam waktu 18 jam setelah kultur.

Pada sistem maturasi/fertilisasi/kultur *in vitro*, BSA dan atau FBS adalah sumber protein yang sering ditambahkan pada medium kultur. BSA berfungsi sebagai substrat energi dan asam amino untuk proses metabolik dan anabolik (Kane dan Headon, 1980), sedangkan serum dan komponen-komponennya menyediakan faktor-faktor yang penting untuk lingkungan kultur antara lain menyediakan substrat energi,



Gambar 1. Oosit kelinci sebelum dimaturasi (a); oosit kelinci setelah dimaturasi, sebelum difiksasi dan diwarnai dengan acetic-orcein (b). Arah panah menunjukkan *polar body I* (Perbesaran 10 x 10).

Tabel 1. Tingkat maturasi inti oosit kelinci yang dimaturasi secara *in vitro* selama periode waktu yang berbeda \*

Waktu Maturasi (jam)	Jumlah oosit yang dimaturasi	Mean ± SEM (Jumlah) dari oosit pada stadium**			
		GV	MI	AT	MII
18-20	29	24.4 ± 3.4 (7)	3.3 ± 3.3 (1)	3.0 ± 3.0 (1)	69.2 ± 4.7 (20)
22-24	24	28.1 ± 6.1 (7)	5.6 ± 5.6 (1)	0 (0)	66.4 ± 2.2 (16)
28-30	23	21.2 ± 6.5 (5)	7.4 ± 3.7 (2)	0 (0)	71.1 ± 7.8 (16)

\* Tiap perlakuan pada eksperimen ini diulang sebanyak 4 kali.

\*\*GV: *germinal vesicle*, MI: metafase I, AT: anafase I dan telofase I, MII: metafase II.

Tabel 2. Tingkat maturasi oosit kelinci yang dimaturasi secara *in vitro* dalam medium yang ditambah BSA atau FBS \*

Jenis protein	Jumlah oosit yang dimaturasi	Mean ± SEM (Jumlah) dari oosit pada stadium**			
		GV	MI	AT	MII
BSA	74	23.7 ± 3.8 (17)	11.3 ± 5.7 (8)	1.0 ± 1.0 (1)	64.0 ± 5.6 (48) <sup>a</sup>
FBS	108	16.2 ± 3.6 (14)	0.7 ± 0.7 (0)	3.8 ± 2.2 (5)	79.2 ± 4.2 (88) <sup>b</sup>

\*Tiap perlakuan pada eksperimen ini diulang sebanyak 4 kali.

\*\*GV: *germinal vesicle*, MI: metafase I, AT: anafase I dan telofase I, MII: metafase II.

<sup>a, b</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama adalah berbeda nyata (P<0,05)

Tabel 3. Tingkat maturasi inti oosit kelinci yang dikoleksi dari ovarium stadium folikular atau luteal setelah dimaturasi secara *in vitro*\*

Stadium reproduksi ovarium	Jumlah oosit yang dimaturasi	Mean ± SEM (Jumlah) dari oosit pada stadium**			
		GV	MI	AT	MII
Folikular	60	12.5 ± 3.8 (7)	1.5 ± 1.5 (1)	6.3 ± 4.2 (4)	79.7 ± 7.5 (48)
Luteal	48	18.6 ± 6.4 (6)	2.6 ± 1.5 (2)	1.3 ± 1.3 (1)	78.7 ± 5.1 (40)

\*Tiap perlakuan pada eksperimen ini diulang sebanyak 3 kali

\*\*GV: *germinal vesicle*, MI: metafase I, AT: anafase I dan telofase I, MII: metafase II.

vitamin, asam amino, dan faktor-faktor pertumbuhan (Bavister, 1995). Penggunaan serum sebagai sumber protein untuk kultur oosit sudah diteliti pada mencit (Downs *et al.*, 1986), tikus (Vanderhyden dan Amstrong, 1989), babi (Dobrinsky *et al.*, 1996) dan sapi (Saeki *et al.*, 1991) dengan tingkat keberhasilan yang bervariasi. Pada penelitian ini, persentase oosit yang dimaturasi pada medium yang ditambah FBS mencapai fase MII lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan oosit yang dimaturasi pada medium yang ditambah BSA (Tabel 2). Data ini mengindikasikan bahwa penggunaan FBS sebagai sumber protein pada medium maturasi lebih baik. Kemungkinan ada faktor-faktor yang terdapat dalam FBS yang berbeda dari BSA yang berperan penting dalam mendukung oosit kelinci mencapai maturasi inti secara *in vitro*. Meskipun mekanismenya tidak diketahui secara pasti, faktor-faktor yang terdapat dalam serum mungkin disebabkan oleh aksi dari faktor-faktor pertumbuhan dan atau asam amino yang terdapat dalam FBS. Serum juga mempunyai manfaat lain yaitu berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menurunkan pembentukan superoxide (Bavister, 1995).

Penelitian tentang stadium reproduksi ovarium pada berbagai spesies hewan menunjukkan hasil yang bervariasi. Pada kucing dilaporkan bahwa kemampuan oosit kucing untuk mencapai fase MII dipengaruhi oleh status reproduksi dari donor karena kemampuan oosit kucing untuk mencapai maturasi inti secara *in vitro* dari ovarium dengan stadium luteal lebih rendah bila dibandingkan dengan oosit dari ovarium pada stadium *inactive* dan *follicular* (Johnston *et al.*, 1989). Hal tersebut diduga karena pengaruh progesteron yang dominan pada ovarium fase luteal. Akan tetapi penambahan progesteron pada medium kultur tidak memberikan pengaruh yang negatif terhadap kemampuan oosit untuk *matured* dan terfertilisasi (Wood *et al.*, 1995). Penelitian lebih lanjut melaporkan bahwa secara histologi tidak ada perbedaan yang nyata antara kompleks oosit-kumulus kucing yang dikoleksi dari ovarium dengan fase folikular dan luteal (Wood *et al.*, 1997). Penelitian pada sapi, melaporkan bahwa tidak ditemukan adanya pengaruh dari stadium reproduksi ovarium terhadap kemampuan oosit untuk mencapai fase MII secara *in vitro* (Leibfried dan First, 1979)



tetapi mempunyai perpengaruh terhadap tingkat perkembangan dari oosit tersebut setelah difertilisasi (Machatkova *et al.*, 1996). Hasil penelitian pada kelinci tersebut juga tidak ditemukan adanya perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) pada kemampuan oosit yang diperoleh dari ovarium dengan stadium reproduksi folikular dengan stadium luteal untuk mencapai fase MII (Tabel 3). Hal tersebut kemungkinan disebabkan folikel tetap tumbuh dan mengalami regresi meskipun sedang dalam fase luteal. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan oosit tersebut untuk berkembang setelah difertilisasi.

### SIMPULAN

Oosit kelinci mengalami maturasi inti secara sempurna dalam waktu 18 jam setelah kultur *in vitro*. Kemampuan oosit kelinci untuk mencapai fase MII tidak dipengaruhi oleh stadium reproduksi ovarium tetapi dipengaruhi oleh jenis protein yang ditambahkan pada medium maturasi.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan berkembang menjadi stadium blastosist dari oosit-ooisit pada setiap eksperimen di atas setelah difertilisasi secara *in vitro*.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah menyediakan ovarium kelinci untuk penelitian ini dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod Update* 1: 91-148.
- Chen Y, He ZX, Liu A, Wang K, Mao WW, Sheng HZ. 2001. Embryonic cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res* 13: 252-263.
- Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Sun QY, Han ZM, Liu ZH, Shi P, Li JS, Xiangyu JG, Lian L, Kou ZH, Wu YQ, Chen YC, Wang PY, Zhang HM. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of the panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 67: 637-642.
- Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 43: 877-884.
- Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effect of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 55: 1069-1074.
- Downs SM, Schroeder AC, Eppig JJ. 1986. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro* by preventing of the zona pellucida. *Gamete Res* 15: 115-122.
- Fissore RA, Robl JM. 1992. Intracellular  $Ca^{2+}$  response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol Reprod Dev* 32: 9-16.
- Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res* 24: 343-356.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. 1993. Influence of culture medium and protein supplementation on *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. *Theriogenology* 40: 829-839.
- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. 1991. Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil* 92: 377-382.
- Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. 2002. *In vitro* maturation, fertilization, and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stage of reproductive cycle. *Theriogenology* 57: 2289-2298.
- Kane MT, Headon DR. 1980. The role of commercial bovine serum preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastosysts. *J Reprod Fertil* 60: 469-475.
- Leibfried ML, First N. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76-86.
- Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45: 801-810.

- Ozil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109: 117-127.
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44: 256-260.
- Sanbuissho A, Threlfall WR. 1990. The influence of serum and gonadotropin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 34: 341-348.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. 1989. Role of cumulus cells and serum on *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 40: 720-728.
- Yang CX, Han ZM, Wen DC, Sun QY, Chen DY. 2003. *In vitro* development and mitochondria fate of macaca-rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 65:396-401.
- Wood TC, Byers AP, Jennette BE, Wildt DE. 1995. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. *J Reprod Fertil* 104: 315-323.
- Wood TC, Wildt DE. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil* 110: 355-360.
- Wood TC, Montali RJ, Wildt DE. 1997. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 46: 190-200.
- Zhao ZJ, Ouyan YC, Nan CL, Lei ZL, Song XF, Sun QY, Chen DY. 2006. Rabbit oocyte cytoplasm supports development of Nuclear Transfer embryos Derived from the Somatic Cells of Camel and Tibetan Antelope. *J Reprod Dev* 52: 449-459.