

Seleksi Kemampuan Pematangan Oosit Domba Menggunakan Teknik *Brilliant Cressyl Blue*

(*SELECTING COMPETENCE SHEEP OOCYTES USING BRILLIANT CRESSYL BLUE*)

Mohamad Agus Setiadi, Iman Supriatna

Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
Telp.: (0251) 8626460, Faks: 0251-8623940
Email: masetiad@indo.net.id

ABSTRACT

In present study the developmental competence of sheep oocytes to reach maturation at second metaphase (M II) was observed following selection of oocytes using brilliant cressyl blue (BCB). Immature oocytes were harvested from ovaries collected at abattoir; the selected according to their colour appearance (cytoplasm colour) after being exposed to BCB and incubated for 90 minutes at 5% CO₂ incubator at 39°C. The selected oocytes were grouped into two based on their cytoplasm colour i.e. group of oocytes (BCB+) with blue cytoplasm and growing oocytes (BCB-) the unstained cytoplasm. The control group including freshly collected oocytes which were then selected using routine method by observing morphological character under microscope. Each treated group of oocytes (BCB+ and BCB-) and the control were processed for maturation into culture media (Tissue Culture Medium 199+10 IU/ml Pregnant Mare Serum Gonadotrophine+10 IU Human Chorionic Gonadotrophine+1µg/ml estradiol benzoat +10% fetal bovine serum) then incubated for 24 hours at 5% CO₂ incubator at 39°C. Finally oocytes from each treated group and the control were stained with arceto orcein 2% to observe the number of oocytes which reach maturatuion at M II. The result showed that the percentage of oocytes reaching M II were significantly higher in BCB+ group (54%) compared to BCB- group (8%). It is concluded that BCB is a potential method for selection of competent oocytes

Key words: Oocyte, sheep, competence, maturation

ABSTRAK

Penelitian dirancang untuk mengevaluasi kemampuan perkembangan oosit mencapai pematangan inti tahap metaphase II (MII) setelah terpapar pada pewarnaan *brilliant cressyl blue* (BCB). Oosit domba dipanen dari ovarium asal rumah potong hewan dan dipaparkan pada medium *phosphate buffered saline* yang mengandung 13 µM (micro Molar) BCB, kemudian diseleksi berdasarkan warna sitoplasma setelah inkubasi pada 39°C pada incubator 5%CO₂ selama 90 menit. Oosit diklasifikasikan sebagai oosit yang telah tumbuh sempurna dengan sitoplasma berwarna biru dinyatakan sebagai BCB+ dan oosit tidak berwarna biru pada sitoplasmanya yang menunjukkan masih dalam tahap perkembangan sebagai BCB-. Kelompok kontrol adalah oosit yang setelah dikoleksi ditransfer langsung pada kultur medium pematangan tanpa dipaparkan pada BCB. Medium pematangan terdiri dari TCM 199 yang disuplementasi dengan 10 IU/ml *Pregnant Mare Serum Gonadotrophine*, 10 IU/ml *Human Chorionic Gonadotrophine*, 10 µg/ml *Oestradiol benzoate* dan 10 % *Fetal bovine serum*. Pematangan dilakukan selama 24 jam 39°C pada incubator 5% CO₂. Hasil penelitian menunjukan persentase oosit mencapai MII pada kelompok BCB+ lebih tinggi dibandingkan dengan BCB- (54% vs 8%) dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan oosit yang mencapai MII antara kelompok BCB+ dengan kontrol (54% vs 81%). Dapat disimpulkan bahwa teknik seleksi oosit dengan pewarnaan BCB dapat membedakan oosit domba yang kompeten dan tidak kompeten

Kata kunci: oosit, domba, kompeten, pematangan

PENDAHULUAN

Tingkat keberhasilan produksi embrio *in vitro* masih rendah, sehingga terus dilakukan upaya perbaikan untuk memperoleh kualitas yang lebih baik dan kuantitas embrio yang lebih banyak. Dua komponen utama yang terlibat pada produksi embrio *in vitro* adalah spermatozoa dan oosit. Kedua komponen tersebut memegang peranan penting pada proses terjadinya embrio. Kegagalan pembentukan embrio dari aspek oosit dapat disebabkan oleh ketidakseragaman oosit yang digunakan sehingga terjadi ketidaksinkronan pembentukan pronukleus yang menyebabkan tidak terbentuknya embrio. Meskipun demikian mekanisme yang bertanggungjawab terhadap rendahnya kemampuan berkembang oosit *in vitro* belum teridentifikasi secara jelas, namun diduga ada kaitan dengan keadaan endokrin hewan pada saat hidup, faktor intrinsik ooplasma, ukuran relatif folikel dominan oosit berasal, serta umur hewan (Chohan dan Hunter, 2004) dan bahkan prosedur koleksi oosit, kondisi media fertilisasi dan kultur dan juga umur serta sejarah reproduksi donor (Nicholas *et al.*, 2005).

Untuk meminimalkan terpilih oosit yang tidak mampu berkembang, maka biasanya oosit untuk produksi embrio *in vitro* dipilih berdasarkan kriteria morfologi di bawah mikroskop yang berlaku rutin di seluruh laboratorium *In Vitro Fertilization/IVF* (Pujol *et al.*, 2004). Namun demikian kriteria morfologi ini masih bersifat subjektif, sehingga sulit diperoleh oosit dengan kualitas yang seragam, disamping itu rendahnya angka blastosis yang diperoleh masih merupakan masalah yang belum terpecahkan. Oleh karenanya diperlukan metode untuk memperoleh sejumlah oosit yang seragam dan bersifat *non-invasif* sehingga tidak merusak struktur oosit yang akan mempengaruhi perkembangan oosit.

Telah diketahui kualitas oosit yang digunakan, menentukan keberhasilan produksi embrio *in vitro* (Sierard *et al.*, 2006). Banyak peneliti menyarankan bahwa hanya pada ukuran tertentu oosit mempunyai kemampuan berkembang lebih lanjut menjadi embrio setelah diproses secara *in vitro* (Hyttel *et al.*, 1997; Otoi *et al.*, 1997; Armstrong, 2001; Pujol *et al.*, 2004). Lebih lanjut disebutkan terdapat korelasi positif antara diameter oosit dengan kemampuan berkembang menjadi embrio. Namun demikian untuk menyeleksi satu per satu secara masal memerlukan waktu

yang lama dan tidak efektif pada kegiatan rutin produksi embrio *in vitro*. Di samping itu, kualitas morfologi saja tidak dapat dijadikan jaminan kualitas yang baik, karena aktivitas yang terjadi di dalam sitoplasma belum dapat dipastikan.

Berbagai macam sintesis dan metabolisme terjadi di bagian sitoplasma. Opiela *et al.*, (2008) melaporkan bahwa aktivitas Glukosa 6 Phosphat dehidrogenase (G6PD) sangat berguna untuk menentukan kualitas oosit. Aktivitas enzim G6PD terbesar pada oosit yang masih dalam pertumbuhan (*growing oocytes*), dan menurun pada oosit yang sudah matang (Alm *et al.*, 2005; Manjunatha *et al.*, 2007). Dengan kata lain, aktivitas enzim G6PD meningkat pada oosit yang masih dalam tahap perkembangan dan menurun aktivitasnya pada oosit yang telah mencapai perkembangan yang sempurna. Berdasarkan kriteria inilah, aktivitas G6PD dapat dijadikan kriteria dalam pemilihan oosit. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji kemampuan pematangan inti oosit domba setelah dilakukan uji aktivitas G6PD.

METODE PENELITIAN

Koleksi Oosit

Oosit dikumpulkan dari ovarium domba yang dipotong di rumah potong hewan (RPH) dan dibawa ke laboratorium pada larutan NaCl fisiologis (0,9 w/v) dalam kantong plastik. Di laboratorium, ovarium diiris-iris dengan *scalpel* steril dan dibilas dengan larutan *Phosphat buffered saline (PBS)* pada gelas arloji. Cairan yang terkumpul diperiksa di bawah mikroskop stereo. Oosit yang terlihat diisolasi dan dikumpulkan pada cawan petri pengumpul (Nunclon, Denmark) yang mengandung media PBS yang disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (Sigma, USA).

Uji *Brilliant Cresyl Blue*

Oosit yang terkumpul diinkubasi pada larutan *brilliant cresyl blue* (Sigma, USA) sesuai dengan metoda Rodriguez-Gonzalez *et al.*, (2003) yang telah dimodifikasi dengan konsentrasi 13 μM (5 μl BCB dalam 250 μl PBS yang disuplementasi dengan 10% serum) selama 90 menit pada 39°C pada 5% incubator CO_2 . Setelah inkubasi dalam larutan BCB, oosit dicuci beberapa kali dalam larutan mPBS yang disuplementasi dengan serum dan diklasifikasikan berdasarkan tingkat pewarnaan sitoplasma

menggunakan mikroskop stereo. Oosit yang menunjukkan warna biru pada sitoplasmanya dikriteriakan sebagai (BCB+) yang mengindikasikan oosit telah berkembang sempurna (*fully grown oocyte*) dan oosit yang sitoplasmanya tidak berwarna atau mengalami pemudaran warna setelah pencucian berulang dikriteriakan sebagai (BCB-) yang mengindikasikan oosit masih dalam tahap pertumbuhan (*growing oosit*). Kedua kelompok tersebut dipisahkan untuk kemudian dimatangkan pada masing-masing media pematang.

Pematangan Oosit *in vitro*

Kelompok oosit yang terseleksi baik yang berwarna (BCB+) dan tidak berwarna (BCB-) dimatangkan masing-masing secara terpisah pada media TCM-199 yang disuplementasi dengan 10 IU/ml *Pregnant Mare Serum Gonadotrophine/PMSG* (Intervet, Holland), 10 IU/ml *Chorullon* (Intervet, Holland), 1 µg/ml *Estradiol* (Intervet, Holland) dan 10% *Fetal bovine serum* (Sigma, USA). Untuk membandingkan kemampuan pematangan oosit, maka sebagai kontrol, dilakukan pula maturasi oosit yang diseleksi dengan metode rutin di bawah mikroskop tanpa dilakukan pewarnaan BCB sebelumnya. Kultur oosit dilakukan pada suhu 39°C, pada inkubator 5% CO₂ selama 24 jam.

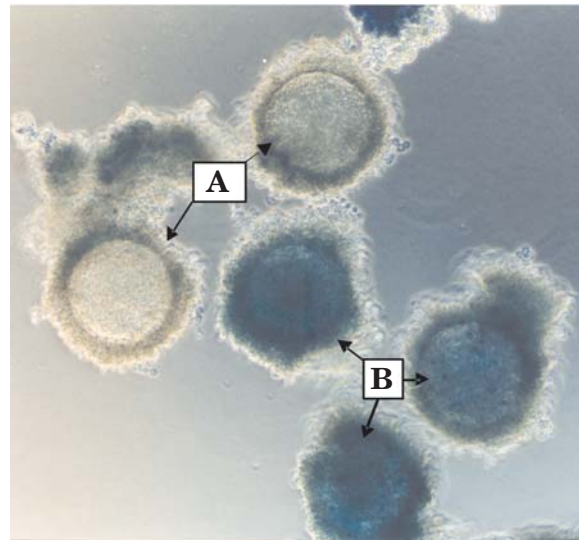
Evaluasi Keberhasilan dan Analisis Statistika

Evaluasi keberhasilan dilakukan dengan mengamati jumlah oosit yang mampu mencapai tahap metaphase II setelah diwarnai dengan *Aceto Orcein 2%* sebagai indikator tingkat kematangan inti oosit. Jumlah oosit yang mencapai tahap *metaphase II* dan tahapan meiosis lainnya (*Germinal vesicle*, *Germinal vesicle breakdown (diakinesis)*, *metaphase I*, *anaphase I*, dan *telophase I*) dibandingkan di antara perlakuan. Perbandingan status inti oosit pada masing masing kelompok diuji secara statistik menggunakan *Poisson Regression Analysis* dengan SAS 9.1 pada taraf nyata 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Oosit Hasil Deteksi Aktivitas G6PD

Berdasarkan tahap perkembangannya, secara umum oosit dikelompokkan menjadi oosit yang sedang berkembang dan oosit yang telah menyelesaikan proses perkembangannya.



Gambar 1. Oosit domba BCB+ (B) warna biru dan BCB- (A) tidak berwarna

Secara morfologi kedua kriteria tersebut sulit dibedakan di bawah mikroskop. Hanya oosit yang telah mengalami perkembangan penuh yang mempunyai kemampuan berkembang lebih lanjut. G6PD merupakan enzim yang disintesis selama perkembangan oosit (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2006). Aktivitas enzim ini meningkat pada oosit yang masih dalam tahap perkembangan dan menurun aktivitasnya pada oosit yang telah mencapai perkembangan yang sempurna (Alm *et al.*, 2005; Opiela *et al.*, 2008). *Brilliant cressyl blue* merupakan bahan pewarna yang dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim G6PD secara intraseluler dan bersifat non-invasif (Pujol *et al.*, 2004) dan pewarna ini akan dipecah oleh G6PD (Opiela *et al.*, 2008). Oleh karenanya oosit yang telah mengalami perkembangan yang sempurna tidak mampu mengurangi intensitas warna sehingga sitoplasmanya akan berwarna biru akibat menurunnya aktivitas G6PD dan berlaku sebaliknya pada oosit yang sedang tumbuh (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003) seperti terlihat pada Gambar 1.

Tingkat Pematangan Inti Oosit

Sudah menjadi postulat umum bahwa hanya oosit yang telah matang yang mampu berkembang lebih lanjut membentuk embrio setelah dibuahi oleh spermatozoa. Oleh karenanya tingkat pematangan oosit dapat dijadikan indikator yang akurat untuk mengamati tahap awal kompetensi perkembangan oosit. Perkembangan pematangan oosit

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit domba setelah pewarnaan *brilliant cresyl blue*

Perlakuan	Jumlah Oosit	Status Inti Oosit (%)					Tidak terdeteksi
		GV	D (GVBD)	MI	AI-TI	MII	
BCB+	57	8(14)	7(12) ^a	1(2)	-	31(54) ^a	10
BCB-	60	9(15)	32(53) ^b	5(8)	-	5(8) ^b	10
Kontrol	52	-	5(10) ^a	1(2)	-	42 (81) ^a	4

^{a, b}, superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata

GV: *Germinal vesicle* GVBD: *Germinal vesicle breakdown* D: Diakinesis MI: Metaphase I A: Ana-phase T: Telophase MII: Metaphase II

dimulai dengan pecahnya membran germinal yang dikenal sebagai *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Pada Tabel 1 disajikan bahwa oosit dalam kategori BCB- sebagian besar (53%) memiliki kemampuan awal untuk melakukan proses pematangan yang ditandai dengan kemampuan mengalami pecahnya lapisan inti, tetapi tidak berkembang lebih lanjut ke tahap MII. Hal ini mengindikasikan oosit dalam kelompok ini memiliki kemampuan perkembangan yang belum sempurna meskipun oosit ditumbuhkan pada media yang mempunyai nutrisi yang cukup, karena masih termasuk dalam kategori oosit yang sedang tumbuh.

Hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa oosit dengan kategori BCB+ memiliki kemampuan pematangan inti mencapai MII lebih baik dibandingkan dengan BCB- (54% vs 8%) (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa prosedur seleksi oosit sebelum pematangan dengan BCB mampu memilih oosit yang kompeten dan tidak kompeten. Data ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan pada sapi (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Alm *et al.*, 2006; Bohjwani *et al.*, 2007; Opiela *et al.*, 2008), pada kerbau (Manjunatha *et al.*, 2007), pada babi (Roca *et al.*, 1998), pada kambing (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003; Urdaneta *et al.*, 2003) dan pada tikus (Wu *et al.*, 2007), bahwa test BCB mampu membedakan oosit yang kompeten dan tidak kompeten.

Disisi lain, beberapa oosit tidak terdeteksi status intinya (Tabel 1) yang berarti tidak mampu berkembang lebih lanjut. Beberapa hal yang mungkin sebagai penyebab tidak terdeteksinya status inti oosit dan ketidakmampuan untuk berkembang lebih lanjut setelah pewarnaan BCB adalah karena adanya kerusakan yang ditimbulkan oleh bahan pewarna akibat pencucian yang kurang

sempurna. Opiela *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa oosit yang terpapar dengan BCB mempunyai kecenderungan mengalami apoptosis, meskipun hasil analisis protein tidak meneguhkan kejadian apoptosis tersebut. Akibat adanya proses apoptosis dan kecenderungan sisa pewarnaan yang tidak tercuci semuanya, secara perlahan-lahan akan menurunkan kemampuan perkembangan oosit. Lebih lanjut hal lain yang mungkin menyebabkan terjadinya penurunan kemampuan oosit seperti yang telah dilaporkan oleh Torner *et al.*, (2008) karena adanya perbedaan organisasi tingkat molekuler dan subseluler pada oosit yang diseleksi dengan aktivitas G6PD yang berbeda.

Dalam upaya untuk meningkatkan kompetensi perkembangan oosit pada produksi embrio *in vitro*, medium maturasi sering disuplementasi dengan serum (Setiadi 1999), atau dilakukan *co-culture* dengan menirukan keadaan alamnya seperti *co-culture* dengan dinding folikel (Setiadi, 2002). Hal ini karena G6PD tidak mengukur secara kuantitatif kompetensi oosit, maka diharapkan oosit yang pada dasarnya memiliki kemampuan dapat didukung untuk berkembang lebih lanjut apabila dikultur pada media yang kaya akan nutrisi yang diperlukan. Pendapat ini sejalan dengan hasil penelitian Wu *et al.*, (2007) pada oosit tikus bahwa kompetensi oosit BCB+ pun bervariasi tergantung diameter oosit, tingkat kematangan hewan, dan stimulasi gonadotropin.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa seleksi kompetensi oosit untuk mencapai tingkat perkembangan lebih lanjut sangat efektif menggunakan *brilliant*

cressyl blue dan oosit dengan kategori BCB+ mempunyai kompetensi pematangan inti lebih baik dibandingkan dengan oosit kategori BCB-.

SARAN

Diperlukan pembuktian kompetensi oosit lebih lanjut mencapai perkembangan embrio setelah pengujian aktivitas G6PD

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktur DP2M Dirjen DIKTI yang telah memberikan dukungan dana penelitian melalui Hibah Penelitian Fundamental tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Alm H, Bhojwani S, Lohrke B, Pohland R, Kanitz W, Torner H. 2006. Einfluss der G6PDH-Aktivitat in bovinen Oozyten vor der IVM auf die embryonale Entwicklungsfahigkeit nach IVF und Kerntransfer. Proc. 33 Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft embryotransfer deutschsprachiger Lander (AET-d), Celle-Hannover, Germany pp. 23-24.
- Alm H, Torner H, Lohrke B, Viequtz T, Ghoneim IM, Kanitz W. 2005. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cressyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6 phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63(8):2194-2205
- Armstrong DT. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303 – 1322
- Bhojwani S, Alm H, Torner H, Kanitz W, Phoehland R. 2007. Selection of developmentally competence oocytes through brilliant cressyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 67 (2): 341 -345
- Chohan KR, Hunter AG. 2004. In vitro maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology* 61: 373-380
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32
- Manjunatha BM, Gupta PS, Devaraj M, Ravindra JP, Nadi S. 2007. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cressyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68(9): 1299-1304
- Nicholas B, Alberio R, Foulda-Nashta AA, Webb R. 2005. Relationship between Low-molecular-weight Insulin-like growth factor-binding proteins, Caspase-3 activity and oocyte quality. *Biol Reprod* 72: 796-804
- Opiela J, Katska-Ksiazkiewizt L, Lipinski D, Slomski R, Bzowska M, Rynska B. 2008. Interaction among activity of glucose -6-phosphat dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology* 69(5): 546 - 555
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48: 769 - 774
- Pujol M, Lopez-Bejar M, Paramio MT. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cressyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61: 735-744
- Roca J, Martnez E, Vasquez JM, Lucas X. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cressyl blue test. *Reprod Fertil Dev* 10(6):479-485
- Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Izquierdo D, Paramio MT. 2003. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cressyl blue. *Reprod Nutr Dev* 43: 179-187
- Setiadi MA. 1999. Kapasitas perkembangan oosit babi yang dimatangkan secara in vitro pada media tanpa suplemen serum. Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner, Bogor, pp 292-296
- Setiadi MA. 2002. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes in vitro. *Reprotech* 1(2): 87-91
- Sierard, MA, Ricahrd F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocytes to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136

- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tomek W, Phatsara C, Alm H, Sierard MA, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D. 2008. Molecular and Subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* 135(2): 197-212
- Urdaneta A, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Paramio MT. 2003. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue test. *Zygote* 11(4): 347 - 354
- Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, Tan JH. 2007. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res* 17(8):722-731