

Tingkat Pematangan Inti Oosit Domba dan Pembentukan Pronukleus Setelah *Parthenogenesis* dengan Penambahan *Glutathione*

(NUCLEAR MATURATION RATE OF OVINE OOCYTES AND PRONUCLEAR FORMATION
AFTER PARTHENOGENESIS WITH GLUTATHIONE ADDITION)

Hasbi¹, Sri Gustina², Mohamad Agus Setiadi³, Iman Supriatna³

¹Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis
Kemerdekaan Km. 10, Makassar, 90245. E-Mail: hasbi_fapetunhas@yahoo.com

²Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Sulawesi Barat,
Jl. Prof.Dr. Baharuddin Lopa, SH. Lutang, Majene Sulawesi Barat.

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor, 16680.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat pematangan inti oosit domba dan pembentukan pronukleus setelah *parthenogenesis* dengan penambahan *glutathione* pada medium maturasi dan kultur *in vitro*. Kegiatan penelitian dibagi atas dua tahap. Penelitian tahap I, oosit dimatangkan dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 dengan perlakuan penambahan 0 (kontrol), 0,25, 0,5, dan 1 mM *glutathione* (GSH). Penelitian tahap II, oosit dimatangkan dalam medium maturasi, kemudian oosit diaktivasi dengan dipaparkan pada larutan 7% *ethanol* (v/v) selama 7 menit dalam *phosphate buffered saline* (PBS) pada temperatur kamar selanjutnya dalam 5 μ g/ml *cytochalasin* B selama 4 jam. Oosit kemudian dikultur dalam TCM 199 + 10% FBS dengan perlakuan tanpa penambahan 1 mM GSH (T₀), penambahan hanya dalam medium maturasi (T₁), penambahan hanya dalam medium kultur (T₂) dan penambahan dalam medium maturasi dan kultur (T₃). Kultur dilakukan dalam bentuk *drop* 50 μ l untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil*, selanjutnya ditempatkan dalam inkubator 5% CO₂ pada temperatur 38,5°C selama 20-24 jam. Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa kontrol dan penambahan 0,25, 0,5, dan 1 mM GSH dalam medium maturasi tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap jumlah oosit yang mencapai tahap *metaphase* II (MII), berturut-turut adalah 79,71%, 79,07%, 80,95%, dan 84,13%. Penelitian tahap II menunjukkan bahwa persentase oosit yang teraktivasi pada perlakuan T₁ (65,31%) dan T₃ (67,27%) sangat nyata lebih tinggi (P<0,01) dibandingkan dengan T₀ (46,81%) dan T₂ (54,35%). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan GSH eksogen pada medium maturasi tidak secara nyata dapat meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap MII dan penambahan GSH dalam medium maturasi lebih optimal meningkatkan jumlah oosit yang teraktivasi dibandingkan dengan penambahan pada medium kultur.

Kata kunci: *glutathione*, pematangan, *parthenogenesis*, oosit domba

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the nuclear maturation rate of ovine oocytes and pronuclear formation following *parthenogenesis* with *glutathione* (GSH) addition in maturation and culture medium. In the first experiment, acolytes were matured in *tissue culture medium* (TCM) 199 with 0 (control), 0.25, 0.5 and 1 mM *glutathione* (GSH) addition. In the second experiment, oocytes were matured in maturation medium, then *parthenogenetically* activated by exposing to 7% *ethanol* (v/v) for 7 min, followed by treatment with 5 μ g/ml *cytochalasin* B for 4 h. Oocytes then cultured in medium TCM 199 + 10% FBS with treatments without addition of 1 mM GSH (T₀), addition in maturation medium (T₁), addition in culture medium (T₂), and addition in both maturation and culture medium (T₃) then incubated at 38,5°C with 5% CO₂ for 20-24 h. The results showed that, nuclear maturation rate was not significantly different (P>0.05) among four treatments. The percentage of oocytes reached *metaphases* II (MII) stage were 79.71%, 79.07%, 80.95% and 84.13%, respectively. Percentages of activated oocyte with T₁ (65.31%) and T₃ (67.27%) were higher (P<0.01) compared to T₀ (46.81%) and T₂ (54.35%). However, T₃ was not significantly different with T₁. In conclusion, the addition of GSH in maturation medium could not improve nuclear maturation rate but more effective in supporting the number of activated oocytes.

Keywords: *glutathione*, maturation, *parthenogenesis*, ovine oocytes

PENDAHULUAN

Produksi embrio *in vitro* (PEIV) adalah salah satu *assisted reproductive technology* (ART) yang terdiri atas *in vitro maturation* (IVM), *in vitro fertilization* (IVF) dan *in vitro culture* (IVC) (Rahman *et al.*, 2008, Hegab *et al.*, 2009). Dengan teknik PEIV hewan-hewan yang fungsi reproduksinya tidak berjalan dengan normal, materi genetiknya masih dapat diselamatkan.

Keberhasilan penerapan teknologi PEIV ditentukan oleh sistem yang digunakan. Sistem PEIV umumnya dilakukan pada kondisi temperatur 38,5°C dan 5% CO₂. Pada kondisi *in vitro* tekanan gas O₂ sebesar 20%, sedangkan pada kondisi *in vivo* tekanan gas O₂ sebesar 2-8% (Krajcir *et al.*, 2008). Oleh karena itu, pada penerapan teknologi PEIV memungkinkan oosit dan embrio terpapar oleh konsentrasi oksigen dan cahaya yang tinggi, mengakibatkan metabolisme sel akan berjalan 100% sehingga dapat meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS) seperti *superoxide anions* (O₂⁻), *hydroxyl radicals* (OH⁻) dan *hydrogen peroxide* (H₂O₂). *Reactive oxygen species* pada konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan seluler (Agarwal *et al.*, 2005), kerusakan lemak, menghambat sintesis protein, dan pengurangan *adenosin triphosphate* (ATP) (Gupta *et al.*, 2009). Secara *in vivo*, produksi ROS dapat dikontrol dengan adanya antioksidan yang secara alamiah dihasilkan di dalam tubuh (Livingston *et al.*, 2009).

Penambahan *glutathione* (GSH) yang merupakan salah satu zat antioksidan dalam medium maturasi dapat meningkatkan level GSH intraseluler (Mayor *et al.*, 2001), dalam medium fertilisasi meningkatkan angka fertilisasi oosit kambing prepubertas (Urdaneta *et al.*, 2004) dan jumlah embrio yang mencapai tahap blastosis pada sapi (Kim *et al.*, 1999). Saat ini, penelitian penggunaan GSH sebagai antioksidan dalam penerapan teknik PEIV khususnya pada ternak domba masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat pematangan inti oosit domba dan pembentukan pronukleus setelah *parthenogenesis* dengan penambahan *glutathione* pada medium maturasi dan kultur *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Tahap I. Kemampuan Pematangan Inti Oosit

Ovarium domba dikoleksi dari rumah potong hewan kambing/domba, Kampung Cikanyong, Desa Citaringgul, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam larutan NaCl 0,9% ditambah 100 IU/ml *penicillin* dan 100 µg/ml *streptomycin*. Koleksi oosit dilakukan dengan metode pencacahan (*slicing*) dan pembilasan (*flushing*) pada medium *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah *fetal bovine serum* (FBS) 10% (Sigma, USA). Oosit hasil koleksi dicuci dalam medium koleksi yang terdiri atas PBS ditambah 10% FBS dan medium maturasi masing-masing dua kali, selanjutnya dilakukan maturasi dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 (Sigma, USA) ditambahkan FBS 10%, 10 IU/ml *pregnant mare serum gonadotrophin* (PMSG) (Intergonan, Intervet Deutschland GmbH), 10 IU/ml *human chorionic gonadotrophin* (hCG) (Chorulon, Intervet international B.V. Boxmeer-Holland), 1 µg/ml *estradiol* (Intervet international B.V. Boxmeer-Holland) dan 50 µg/ml *gentamycin* (Sigma, USA) dengan perlakuan penambahan 0 (kontrol), 0,25, 0,5 dan 1 mM GSH (Sigma, Japan), konsentrasi yang digunakan mengacu pada penelitian Mayor *et al.*, (2001) pada oosit kambing prepubertas. Pematangan oosit dilakukan pada cawan petri dengan Ø 35 mm (Nunclon, Denmark) dalam bentuk *drop* masing-masing 50 µl untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* (Sigma, USA) dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 38,5°C selama 24 jam.

Tahap II. Aktivasi *Parthenogenesis*

Setelah 24 jam pematangan sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0,25%, kemudian dipaparkan pada larutan *ethanol* (v/v) 7% selama tujuh menit (Nandedkar *et al.*, 2009) dalam PBS pada temperatur kamar (Ongeri *et al.*, 2001), selanjutnya dalam 5 µg/ml *cytochalasin B* selama empat jam. Setelah aktivasi oosit dicuci dua kali dan dikultur dalam TCM 199 + FBS 10% (Hosseini *et al.*, 2008) dengan perlakuan tanpa penambahan 1 mM GSH (T₀), penambahan hanya dalam medium maturasi (T₁), penambahan hanya dalam

medium kultur (T_2) dan penambahan dalam medium maturasi dan kultur (T_3). Kultur dilakukan dalam bentuk *drop* 50 μ l untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* selanjutnya ditempatkan dalam inkubator CO_2 5% pada temperatur 38,5°C selama 20-24 jam.

Evaluasi dan Prosedur Pewarnaan

Evaluasi tingkat pematangan inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan meiosis dari tahap *germinal vesicle* (GV) ke tahap *metaphase* II (MII). *Germinal vesicle* ditandai dengan membran inti dan nukleolus yang tampak dengan jelas, *germinal vesicle breakdown* (GVBD) ditandai dengan pecahnya membran inti dan inti tidak terlihat dengan jelas. *Metaphase* I (MI) ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang *equator*, *anaphase* I (AI) ditandai dengan perpindahan kromosom ke arah kutub, *telophase* I (TI) ditandai dengan kromosom telah mencapai dua daerah kutub serta MII ditandai dengan adanya polar bodi I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap MI (Romar dan Funahashi, 2006, Shirazi dan Sadeghi, 2007).

Setelah 24 jam pematangan sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0,25% (Sigma, USA) dan dilanjutkan dengan denudasi dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter sekitar 110-120 μ m (sesuai dengan ukuran oosit). Oosit yang telah dihilangkan sel-sel kumulusnya diletakkan pada *drop* KCl 0,7% di atas *cover glass* yang memiliki bantalan *paraffin* dan *vaselin* di keempat sudutnya, lalu difiksir dengan cara ditutup dengan gelas objek kemudian posisinya dibalik. Preparat tersebut dimasukkan dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan *ethanol* (1:3) selama tiga hari. Satu jam sebelum diwarnai, preparat direndam terlebih dahulu dalam larutan *ethanol absolute*, setelah itu diwarnai dengan *aceto-orcein* 2% selama 5 menit. Zat pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi *cover glass* diberi larutan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dengan mikroskop fase kontras (Olympus IX 70, Japan).

Tingkat aktivasi dinilai berdasarkan jumlah oosit yang membentuk pronukleus (PN) setelah aktivasi parthenogenesis. Sedangkan persentase jumlah pronukleus (1 PN, 2 PN, dan >2 PN) yang terbentuk dinilai berdasarkan perbandingan antara jumlah PN yang terbentuk dengan keseluruhan oosit yang teraktivasi.

Setelah 20-24 jam kultur, dilakukan pewarnaan dengan mengikuti prosedur yang sama pada penelitian tahap I.

Analisis Data

Data diperoleh dalam bentuk persentase dan dianalisis dengan sidik ragam/*analysis of variance* dan apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993). Data diolah menggunakan program Minitab 14.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Pematangan Inti Oosit

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua oosit yang dimatangkan telah memulai proses meiosis yang ditunjukkan dengan perubahan status inti oosit dari tahap GV menjadi tahap GVBD hingga mencapai tahap MII (Gambar 1). Persentase oosit yang mencapai tahap MII setelah proses pematangan berturut-turut adalah kontrol (79,71%), penambahan 0,25 mM GSH (79,07%), 0,5 mM GSH (80,95%), dan 1 mM GSH (84,13%). Hasil pematangan inti selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Dari hasil analisis statistika terhadap jumlah oosit yang mencapai tahap MII menunjukkan bahwa penambahan GSH dalam medium maturasi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) dalam penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mencapai pematangan inti penambahan GSH eksogen tidak diperlukan. Karja *et al.*, (2006) melaporkan bahwa selama awal perkembangan embrio, cadangan GSH yang dibawa oleh oosit diperoleh selama perkembangan di ovarium. *Glutathione* (GSH) adalah suatu reservoir alami yang dapat dengan cepat digunakan oleh sel-sel sebagai pertahanan melawan stres oksidatif. Lebih lanjut dijelaskan bahwa GSH memberi perlindungan terhadap kerusakan oksidatif yang terdapat dalam dua bentuk yaitu bentuk mereduksi (GSH) dan bentuk mengoksidasi (GSSG). *Glutathione* melindungi terhadap *reactive oxygen species* (ROS) dengan cara difasilitasi oleh interaksi dengan enzim-enzim seperti *glutathione peroksidase* dan *glutathione reduktase*. Dalam jaringan hewan, *glutathione peroksidase* merupakan suatu selenium yang mengandung enzim antioksidan, mempercepat reduksi *hydrogen peroksidase* dan *lipid peroksida* dengan adanya GSH, yang akan dikonversi menjadi GSSG. Pada gilirannya

GSSG akan direduksi oleh *glutathione reduktase* dengan adanya *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH), yang sebagian besar dihasilkan di dalam lintasan *pentose phosphate* (Luberda, 2005).

Mayor *et al.*, (2001) melaporkan bahwa penambahan 1 mM GSH dalam medium maturasi dapat meningkatkan level GSH intraseluler (3,23 pmol/oosit) dibandingkan dengan tanpa penambahan dan penambahan 0,25, dan 0,5 mM pada oosit kambing prepubertas. Konsentrasi GSH intraseluler pada proses pematangan oosit *in vitro* mencerminkan tingkat pematangan sitoplasma (Funahashi *et al.*, 1994), dan mungkin merupakan suatu indikator yang berharga dari pematangan sitoplasma (de Matos *et al.*, 1997, Abeydeera *et al.*, 1998, Furnus *et al.* 1998, de Matos dan Furnus, 2000).

Sintesis GSH intraseluler secara normal berlangsung selama proses pematangan sehingga penambahan GSH eksogen tidak berpengaruh nyata terhadap tingkat pematangan inti. de Matos *et al.*, (2002) melaporkan bahwa GSH disintesis selama proses pematangan baik secara *in vivo* maupun secara *in vitro*. Lebih lanjut dilaporkan bahwa konsentrasi GSH intraseluler oosit domba yang dimatangkan secara *in vitro* menggunakan TCM 199 berkisar antara 4,2–6,5 pmol/oosit sedangkan yang dimatangkan secara *in vivo* berkisar 6,38±1,58 pmol/oosit (Livingston *et al.*, 2009). Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi GSH intraseluler pada oosit domba yang dimatangkan secara *in vitro* dan *in vivo* tidak jauh berbeda, sehingga penambahan GSH dalam medium maturasi tidak memberikan pengaruh yang optimal terhadap peningkatan



Gambar 1. Oosit setelah pematangan *in vitro*. Tahap *metaphase II*, dalam oosit terdapat kromatin dan *polar body* pertama (tanda panah).



Gambar 2. Pembentukan pronukleus setelah *parthenogenesis*. A: 1 PN, B: 2 PN, dan C: >2 PN. PN: pronukleus (tanda panah).

jumlah oosit yang mencapai tahap MII, meskipun memperlihatkan adanya kecenderungan peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi GSH yang ditambahkan.

Tingkat Aktivasi Oosit

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa *ethanol* 7% yang dikombinasikan dengan *cytochalasin B* mampu mengaktivasi oosit domba yang ditandai dengan pembentukan pronukleus, meskipun jumlah pronukleus yang terbentuk bervariasi (Gambar 2). Ducibella *et al.*, (2002) melaporkan bahwa oosit yang teraktivasi ditandai oleh adanya beberapa kejadian antara lain reaksi korteks, pembentukan pronukleus, dan pembelahan sel.

Tingkat aktivasi dapat diketahui secara tidak langsung dengan melihat persentase pembentukan pronukleus setelah proses fertilisasi maupun *parthenogenesis*. Berdasarkan hasil analisis statistika menunjukkan bahwa semua perlakuan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap jumlah oosit yang teraktivasi dibandingkan dengan kontrol. Tingkat aktivasi dan jumlah pronukleus yang terbentuk disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan uji statistika menunjukkan bahwa perlakuan T_1 , T_2 , dan T_3 , menghasilkan jumlah oosit yang teraktivasi lebih tinggi ($P < 0,01$) dibandingkan dengan T_0 . Perlakuan T_1 dan T_3 jumlah oosit yang teraktivasi lebih tinggi dibandingkan dengan T_2 , sedangkan perlakuan T_2 jumlah oosit yang teraktivasi lebih tinggi dibandingkan dengan T_0 . Namun demikian, perlakuan T_1 jumlah oosit yang teraktivasi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan T_3 . Beberapa peneliti melaporkan bahwa penambahan GSH mungkin memberikan pengaruh yang positif pada pematangan sitoplasma sehingga bisa mendukung pembentukan pronukleus pada penelitian ini. Penambahan GSH hanya pada medium kultur hasilnya lebih baik dibandingkan dengan kontrol, karena penambahan GSH saat kultur mungkin membuat kondisi kultur lebih baik daripada kontrol sehingga jumlah pronukleus yang terbentuk lebih banyak. Karja *et al.*, (2006) melaporkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi GSH di dalam sel mulai dari *unfertilized* oosit sampai berkembang menjadi blastosis. Lebih lanjut Kim *et al.*, (1999) dan Zuelke *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa pada

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit domba setelah penambahan GSH

Perlakuan (mM)	Jumlah Oosit	Tingkat Pematangan Inti (%)				
		GV	GVBD	MI	AI/II	MII
Kontrol	69	0 (0,00)	1 (1,45)	13 (18,84)	0 (0,00)	55 (79,71)
0,25	43	0 (0,00)	1 (2,33)	8 (18,60)	0 (0,00)	34 (79,07)
0,5	42	0 (0,00)	0 (0,00)	8 (19,09)	0 (0,00)	34 (80,95)
1	63	0 (0,00)	3 (4,76)	7 (11,11)	0 (0,00)	53 (84,13)

Keterangan: GSH: *glutathione*, GV: *germinal vesicle*, GVBD: *germinal vesicle breakdown*, MI: *metaphase I*, AI-II: *anaphase I/telophase I*, MII: *metaphase II*.

Tabel 2. Tingkat aktivasi dan jumlah pronukleus yang terbentuk setelah *parthenogenesis* pada medium yang ditambahkan GSH

Perlakuan	Jumlah Oosit	Pembentukan Pronukleus			Tidak Teraktivasi (%)	Tingkat Aktivasi (%)
		1 PN (%)	2 PN (%)	>2 PN (%)		
Kontrol (T_0)	47	12(54,54)	5(22,73)	5(22,73)	25(53,19)	22(46,81) ^a
Medium Maturasi (T_1)	49	13(40,62)	15(46,88)	4(12,50)	17(34,69)	32(65,31) ^b
Medium Kultur (T_2)	46	13(52,00)	10(40,00)	2(8,00)	21(45,65)	25(54,35) ^c
Medium Maturasi dan Kultur (T_3)	55	16(43,24)	16(43,24)	5(13,52)	18(32,73)	37(67,27) ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). GSH: *glutathione*, PN: Pronukleus

oosit yang matang GSH mempunyai peran yang penting dalam pembentukan pronukleus jantan setelah fertilisasi. Maedomari *et al.*, (2007) melaporkan bahwa GSH yang terdapat pada sitoplasma oosit berperan dalam proses pembentukan pronukleus dimulai dari pemecahan ikatan disulfida membran inti yang dilanjutkan dengan inisiasi dekondensasi kromosom.

Urdaneta *et al.*, (2004) telah melaporkan penambahan 1,0 mM GSH dalam medium fertilisasi meningkatkan angka fertilisasi dari 10,61% menjadi 30,20% dibandingkan dengan tanpa penambahan GSH pada oosit kambing prepubertas. Lebih lanjut Kim *et al.*, (1999) juga melaporkan penambahan 1 mM GSH dalam medium fertilisasi, jumlah embrio sapi yang mencapai tahap blastosis lebih tinggi (27,3%) dibandingkan dengan 0 mM (20,1%), 0,1 mM (21,8%) dan 10 mM (8,9%).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa perlakuan T_1 , T_2 , dan T_3 tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap jumlah PN yang terbentuk, tetapi memperlihatkan kecenderungan peningkatan jumlah oosit yang membentuk 2 PN pada perlakuan T_1 (46,88%) dan T_3 (43,24%) dibandingkan dengan T_0 (22,73%) dan T_2 (40,00%). Hal tersebut menunjukkan bahwa GSH berperan dalam proses pembentukan PN pada oosit domba hasil *parthenogenesis*. Maedomari *et al.*, (2007) melaporkan bahwa GSH yang terdapat pada sitoplasma oosit berperan dalam proses pembentukan pronukleus dimulai dari pemecahan ikatan disulfida membran inti yang dilanjutkan dengan inisiasi dekondensasi kromosom. Lebih lanjut Zuelke *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa pada oosit yang matang, GSH mempunyai peran yang penting dalam pembentukan pronukleus jantan setelah fertilisasi.

Selain itu, hal lain yang menarik dari hasil penelitian ini adalah jumlah pronukleus yang terbentuk setelah proses aktivasi bervariasi yakni 1 PN, 2 PN dan > 2 PN (Tabel 2). Terbentuknya 2 PN atau embrio diploid hasil *parthenogenesis* biasanya dihasilkan dari penghambatan pengeluaran *polar body* kedua oleh *cytochalasin B* (Yi dan Park, 2005). *Cytochalasin* mencegah polimerisasi aktin dan menyebabkan perubahan yang dramatis pada sitoskeleton (Imahie *et al.*, 2002), mengganggu mikrofilamen, sehingga secara efektif menghambat pengeluaran *polar body* kedua tanpa ada pengaruh terhadap pembentukan dan pergerakan pronukleus (Somfai *et al.*, 2006).

Lee *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa faktor utama yang mengakibatkan kegagalan pembentukan pronukleus jantan setelah *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) pada oosit babi adalah konsentrasi GSH. Konsentrasi GSH dalam sitoplasma oosit hasil pematangan *in vitro* tergantung pada kondisi awal proses pematangan yang ditentukan oleh keberadaan sel-sel kumulus. Konsentrasi GSH dalam oosit menunjukkan tingkat kematangannya dan GSH memengaruhi keberhasilan dan perkembangan embrio selanjutnya (Maedomari *et al.*, 2007, Furnus *et al.*, 2008). Lebih lanjut dijelaskan bahwa di bawah kondisi fisiologi, level GSH tinggi pada oosit tikus dan hamster, penting untuk pembentukan pronukleus jantan setelah fertilisasi dan mendukung perkembangan embrio dini (Gardiner dan Reed, 1994, Zuelke *et al.*, 2003).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan GSH eksogen pada medium maturasi tidak secara nyata dapat meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap MII dan penambahan GSH dalam medium maturasi lebih optimal meningkatkan jumlah oosit yang teraktivasi dibandingkan dengan penambahan pada medium kultur.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat tingkat perkembangan embrio dan analisis konsentrasi GSH intraseluler setelah penambahan eksogen dalam medium maturasi dan kultur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Dikti yang telah memberikan beasiswa program pascasarjana (BPPS) sehingga penelitian ini bisa terlaksana. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Fertilisasi In Vitro*, Departemen KRP, Institut Pertanian Bogor, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada kepala laboratorium Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian dan menggunakan berbagai fasilitas yang ada di laboratorium serta semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Day BN. 1998. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod* 58: 213-218
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 1-21
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57: 1420-1425
- de Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cystein and cystin. *Theriogenology* 53: 761-771
- de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57: 1443-1451
- Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, Fissore R, Madoux S, Ozil JP. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev Biol* 250: 280-291
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day B. 1994. Use of low-salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 51: 633-639
- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. 1998. Cumulus expansions during in vitro maturation of bovine oocytes: Relationship level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 51: 76-83
- Furnus CC, de Matos DG, Picco S, Garcia PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. 2008. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 109: 88-99
- Gardiner CS, Reed DJ. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the pre-implantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51: 1307-1314
- 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
- Hegab AO, Montasser AE, Hamman AM, Abu El-Naga EMA, Zaabel SM. 2009. Improving in vitro maturation and cleavage rates of buffalo oocytes. *Anim Reprod* 6(2): 416-421
- Hosseini SM, Hajian M, Moulavi F, Shahverdi AH, Nasr-Esfahani MH. 2008. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 108: 122-133
- Imahie H, Takahashi M, Toyoda Y, Sato E. 2002. Differential effects of cytochalasin B on cytokinesis in parthenogenetically activated mouse oocytes. *J Reprod Dev* 48:31-40
- Karja NWK, Kikuchi K, Fahrudin M, Ozawa M, Somfai T, Ohnuma K, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T. 2006. Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations in vitro under different oxygen tensions. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:54
- Kim IH, Langendonck AV, Soom AV, Vanroose G, Casi AL, Hendriksen PJM, Bevers MM. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52: 537-547
- Krajcir N, Chowdary H, Gupta S, Agarwal A. 2008. Female infertility and assisted reproduction: impact of oxidative stress. *Curr Women's Health Rev* 4:9-15
- Lee J, Tian XC, Yang X. 2003. Failure of male pronucleus formation in the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 68: 1341-1347
- Livingston T, Rich K, MacKenzie S, Godkin JD. 2009. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. *Anim Reprod Sci* 116: 265-273
- Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Biol Reprod* 5(1): 5-17
- Mayor P, Lopez-Bejar M, Rodriguez-Gonzalez E, Paramio MT. 2001. Effects of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 9: 323-330

- Maedomari N, Kikuchi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Nakai M, Shino M, Nagai T, Kashiwazaki N. 2007. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology* 67: 983-993
- Nandedkar P, Chohan P, Patwardhan A, Gaikwad S, Bhartiya D. 2009. Parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in sheep oocytes using polscope. *Indian J Exp Biol* 47: 550-558
- Ongeri EM, Bormann CL, Butler RE, Melican D, Gavin WG, Echelard Y, Krisher RL, Behboodi E. 2001. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods. *Theriogenology* 55: 1933-1945
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Wan Khadijah WE. 2008. In vitro maturation of oocytes with special reference to goat: A review. *Biotechnology* 7(4): 599-611
- Romar R, Funahashi H. 2006. In vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34^{cdc2}/cyclin B kinase. *Anim Reprod Sci* 92: 321-333
- Shirazi A, Sadeghi N. 2007. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Rum Res* 69: 103-107
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Karja NWK, Fahrudin M, Maedomari N, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. 2006. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during in vitro maturation of follicular oocytes. *Reproduction* 132: 559-570
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometric*. Alih bahasa: B. Sumantri. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Urdaneta A, Jimenez AR, Paramio MT, Izquierdo D. 2004. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 12: 277-284
- Yi YJ, Park CS. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci* 86: 297-304
- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. 2003. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 64: 106-112.