

## Penggunaan Glutathione dalam Medium Fertilisasi Guna Meningkatkan Persentase Blastosis Embrio Sapi

E. TRIWULANNINGSIH<sup>1</sup>, P. SITUMORANG, I. G. PUTU, T. SUGIARTI, A. M. LUBIS, D. A. KUSUMANINGRUM, W. CAROLINE dan R. G Sianturi

Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221 Bogor 16002

<sup>1</sup>Email: deonhizkia@indo.net.id atau [etriwulanningsih@yahoo.com](mailto:etriwulanningsih@yahoo.com)

(Diterima dewan redaksi 15 Oktober 2002)

### ABSTRACT

TRIWULANNINGSIH, E., P.SITUMORANG, I.G PUTU, T SUGIARTI, A.M LUBIS, D.A KUSUMANINGRUM, W.CAROLINE and R.G Sianturi. 2002. Effect of exogenous glutathione in medium fertilization to improve blastocyst rates of bovine embryos. *JITV* 7 (2): 116-123.

Glutathione (C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) is a tripeptide ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) widespread in living organism. Glutathione (GSH) at the 5 mM concentration increased the motility and fertility of frozen-thawed sperm. Intracellular glutathione improved the cleavage rate and embryo development to the blastocyst rate. Research on *in vitro* embryos production through the implementation of GSH during IVF (*in vitro* fertilization) on embryo development has been conducted at the Laboratorium Reproductive of Physiology, Research Institute for Animal Production. Ovaries of beef cattle as source of oocytes were collected from the slaughterhouse in a thermo flask with 35°C PBS as medium and transported to the laboratory. The oocytes were fertilized *in vitro* with selected motile sperm using Percoll gradient (90 and 45%). Ten COCs (*cumulus oocytes complexes*) were transferred to 44  $\mu$ l of fertilization medium (mTALP) was performed with either 0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.00 mM of glutathione as treatment A, B, C, D and E respectively, and inseminated with 2  $\mu$ l of capacitated sperm and added 2  $\mu$ l of heparin and 2  $\mu$ l of PHE (consisting of 20  $\mu$ M penicillamine, 10  $\mu$ M hypotaurine, 1  $\mu$ M epinephrine). Incubation between sperm and oocytes in the 5% CO<sub>2</sub> incubator and RH 90% in fertilization media (TALP) for 20 hours. All zygotes were cultured in modification of CR1aa medium up to blastocyst and were fed serum 5  $\mu$ l/50 $\mu$ l medium on day 6. Results of this experiment showed that the effect of concentration of glutathione (0, 0.25; 0.50; 0.75 and 1.00 mM) on fertilization medium to the percentage of cleavage rates were 69.35  $\pm$  29.40; 79.07  $\pm$  13.17; 67.88  $\pm$  10.65; 98.10  $\pm$  3.30 and 82.62  $\pm$  24.19% not significant different (P>0.05) among treatments A, B, C, D dan E respectively. The percentages of morula and blastocyst for treatment D were 50.45  $\pm$  42.64% and 31.28  $\pm$  24.28%; while 36.55  $\pm$  24.13% and 17.74  $\pm$  17.86% for treatment E respectively.

**Key words:** Glutathione, *in vitro* fertilization, oocytes, cleavage

### ABSTRAK

TRIWULANNINGSIH E., P.SITUMORANG, I.G PUTU, T SUGIARTI, A.M LUBIS, D.A KUSUMANINGRUM, W.CAROLINE dan R.G Sianturi. 2002. Penggunaan glutathione dalam medium fertilisasi guna meningkatkan persentase blastosis embrio sapi. *JITV* 7 (2): 116-123.

Glutathione (C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) dan derivatnya yang merupakan tripeptida ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) dapat mempengaruhi banyak aspek metabolisme, diantaranya membantu detoksifikasi dan transport dari  $\gamma$ -glutamyl-amino acid, sehingga diharapkan dapat meningkatkan persentase fertilisasi *in vitro* yang pada akhirnya meningkatkan persentase blastosis. Intracellular glutathione (GSH) dapat meningkatkan *cleavage rate* dan perkembangan embrio sampai blastosis. Penelitian produksi embrio *in vitro* dengan mempelajari pengaruh glutathione terhadap perkembangan embrio telah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak. Ovaria sapi potong sebagai sumber oosit dikoleksi dari Rumah Potong Hewan ditempatkan di dalam termos berisi PBS bersuhu sekitar 35°C dibawa ke laboratorium dan sesegera mungkin oosit dikoleksi. Setelah oosit dimatangkan secara *in vitro*, kemudian diinseminasi dengan spermatozoa yang telah dikapasitasi dengan metode *Percoll gradient* (90 dan 45%). Setiap sepuluh oosit ditempatkan didalam 44  $\mu$ l medium TALP yang diberi perlakuan penambahan glutathione sebanyak 0; 0,25; 0,50; 0,75 dan 1,00 mM, sebagai perlakuan A, B, C, D dan E kemudian diinseminasi dengan 2  $\mu$ l spermatozoa lalu ditambahkan 2  $\mu$ l PHE dan 2  $\mu$ l heparin di dalam 5% CO<sub>2</sub> inkubator dengan RH 90% selama 20 jam. Zigot dikultur di dalam medium CR1aa selama 8 hari, sementara itu pada hari ke 6 diberi FCS sebanyak 5  $\mu$ l/50  $\mu$ l medium. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa konsentrasi glutathione (0; 0,25; 0,50; 0,75 dan 1,00 mM) pada medium fertilisasi terhadap persentase pembelahan adalah 69,35  $\pm$  29,40; 79,07  $\pm$  13,17; 67,88  $\pm$  10,65; 98,10  $\pm$  3,30 dan 82,62  $\pm$  24,19% tidak berbeda nyata (P>0,05) antar perlakuan A, B, C, D dan E. Persentase morula dan blastosis pada perlakuan D (0,75 mM) adalah 50,45  $\pm$  42,64% dan 31,28  $\pm$  24,28%; sementara itu pada perlakuan E (1,00 mM) adalah 36,55  $\pm$  24,13% dan 17,74  $\pm$  17,86%.

**Kata kunci:** Glutathione, *in vitro* fertilisasi, oosit, pembelahan

## PENDAHULUAN

Produksi embrio secara *in vivo* telah banyak dilaporkan oleh peneliti terdahulu, namun aplikasi teknologi ini masih sangat terbatas, karena harga hormon untuk superovulasi ternak donor sangat mahal dan adanya respon per individu yang sangat bervariasi terhadap penyuntikan hormon.

Teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV) untuk memproduksi embrio, merupakan alternatif dalam meningkatkan populasi, produktivitas dan mutu ternak sapi di Indonesia, sehingga dapat meningkatkan nilai komersial anak sapi yang dihasilkan, dengan catatan bahwa oosit diperoleh dari sapi betina yang berkualitas dan difertilisasi dengan spermatozoa pejantan yang telah diketahui baik mutu genetiknya. Melalui teknologi FIV akan didapatkan embrio secara massal dan seragam. Ada banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik FIV ini, antara lain kualitas ovarium, oosit dan sperma; teknik koleksi oosit, kapasitas sperma, medium maturasi, medium fertilisasi dan medium kultur zigot.

Guna memperoleh embrio yang berkualitas diperlukan medium yang mampu memberikan lingkungan dan nutrisi yang optimum bagi perkembangan dan pembentukan blastosist. Beberapa faktor yang dapat ditambahkan dalam medium diantaranya adalah protein, hormon, serum, *growth factor* dan zat-zat kimia yang lain seperti glutathione (YOUNIS *et al.*, 1989).

Glutathione ( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ ) dan derivatnya, merupakan tripeptida ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) dapat mempengaruhi banyak aspek metabolisme, diantaranya membantu detoksifikasi dan transport dari  $\gamma$ -glutamyl-amino acid. Keadaan yang demikian diharapkan dapat meningkatkan persentase fertilisasi *in vitro* yang pada akhirnya meningkatkan persentase blastosist. *Intracellulair* glutathione (GSH) dapat meningkatkan *cleavage rate* dan perkembangan embrio sampai blastosist (DE MATOS dan FURNUS, 2000). Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa *reactive oxygen species* (ROS) seperti halnya *superoxide anions*, *hydroxyl radicals* dan *hydrogen peroxide* meningkat dalam lingkungan kultur *in vitro* dengan menggunakan 5%  $CO_2$  dan kelembaban maximum. KIM *et al.* (1999) telah melakukan penambahan glutathione pada media fertilisasi dengan konsentrasi 0; 0,1; 1,0 dan 10 mM GSH dengan beberapa macam sperma sapi. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa proporsi pembentukan blastosist hasil FIV tergantung pada sperma pejantan yang digunakan dan konsentrasi glutathione. Pada penelitian tersebut telah diperoleh blastosist berturut-turut :20,1; 21,8; 27,3 dan 8,9%.

Perkembangan embrio mamalia tergantung pada adanya interaksi antara perkembangan genetik dalam khromosom dari setiap zigot dan endometrium resipien, walaupun formula media juga sangat berpengaruh untuk meningkatkan jumlah embrio yang dapat ditransfer (GANDOLFI, 1994). Adanya faktor autokrin yang umumnya dari embrio sendiri yang memungkinkan untuk berkembang, faktor parakrin yang antara lain adalah faktor pertumbuhan (*growth factors*) dan protein spesifik yang berasal dari embrio yang bersama-sama dikultur dalam satu drop media, protein yang berasal dari endometrium induk yang sering disebut sebagai susu uterus dan faktor lingkungan.

Glutathione adalah salah satu faktor yang banyak mempengaruhi reaksi biologi yang terjadi dalam sitoplasma. TAKAHASHI *et al.* (1993) melaporkan bahwa konsentrasi glutathione intrasitoplasmik meningkat dengan penambahan  $\beta$ -mercaptoethanol (2-ME) dan cysteamine pada medium kultur yang menguntungkan untuk perkembangan embrio 6-8 sel ke blastosist. Stimulasi sintesa glutathione pada embrio *in vitro* dengan penambahan 2-ME dapat meningkatkan perkembangan embrio. Sementara itu LIM *et al.* (1995) menyatakan bahwa penambahan 2-ME dengan konsentrasi 0; 6,25 dan 12,5  $\mu$ M pada medium kultur tidak berpengaruh terhadap perkembangan embrio 16 sel ke blastosist. Namun demikian bila 2-ME dengan konsentrasi 0; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5 dan 25  $\mu$ M ditambahkan pada medium kultur yang berisi calon embrio (zigot) maka akan dihasilkan persentase morula berturut-turut 25; 27; 35; 38; 44; 32% dan persentase blastosist 17; 19; 23; 30; 28 dan 18%. Dengan perkataan lain konsentrasi glutathione intrasitoplasmik embrio *in vitro* meningkat selama perkembangan preimplantasi embrio sebelum 4 sel, yang pada akhirnya meningkatkan persentase blastosist.

LUVONI *et al.* (1996) melaporkan bahwa embrio sapi sensitif terhadap stress oxidative dan bila pada medium kultur ditambahkan glutathione akan meningkatkan perkembangan embrio *in vitro*. Selanjutnya dikatakan bahwa bila ditambahkan *antioxidan superoxide dismutase* (SOD) tidak mempengaruhi perkembangan oosit yang mengalami pembelahan (*cleavage*) ataupun perkembangan hingga morula dan blastosist. Peningkatan proporsi oosit yang mengalami pembelahan (84,5% vs 57,0%,  $P < 0,001$ ) dan morula/blastosist (33,3% vs 13,9%,  $P < 0,005$ ), bila dalam medium kultur (SOF= *Synthetic Oviduct Fluid*) diberi 1 mM glutathione dibandingkan dengan tanpa glutathione. Tetapi KIM *et al.* (1999) menyatakan bahwa 1 mM glutathione dalam medium fertilisasi mempengaruhi pembentukan blastosist, tetapi tidak berpengaruh pada pembelahan, dimana pada penelitian tersebut menggunakan GSH dengan konsentrasi (0; 0,1;

1 dan 10 mM) pada medium fertilisasi. Oosit diinseminasi dengan sperma pejantan yang diketahui rendah kemampuan fertilitasnya secara *in vitro* maka dihasilkan persentase pembelahan berturut-turut sebagai berikut 62,8; 62,3; 66,5 dan 44,9% serta blastosis 20,1; 21,8; 27,3 dan 8,9%. Sementara itu, EARL *et al.*, (1997) mendapatkan persentase pembelahan 57,5; 71,0 dan 84,5% dan persentase blastosis 10,0; 18,0 dan 30,0% bila oosit diinseminasi dengan sperma dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$ ;  $2 \times 10^6$ ; dan  $3 \times 10^6$  dan tanpa GSH dalam medium fertilisasi. Bila dalam medium fertilisasi ditambahkan GSH, maka diperoleh persentase pembelahan berturut-turut 88,5; 93,0 dan 89,5% dan persentase blastosis 51,0, 52,5 dan 42,5%.

WIJAYA (1996) menyatakan bahwa glutathione peroksidase (Gpx) termasuk antioksidan primer yang dapat merubah  $H_2O_2$  dan lemak peroksida menjadi molekul yang kurang berbahaya sebelum mereka membentuk radikal bebas.

DE MATOS dan FURNUS (2000) menyatakan bahwa glutathione (GSH) adalah komponen *non protein sulphhydryl*, yang menyimpan cysteine dan berperan penting dalam memproteksi sel dari kerusakan. GSH meningkat selama maturasi oosit dalam ovarium menjelang waktu ovulasi dan setelah fertilisasi, GSH berpartisipasi pada decondensasi sperma dan paralel dengan aktivitas oosit. Selanjutnya dikatakan bahwa penambahan 100  $\mu M$   $\beta$ -mercaptoethanol, 0,6 mM cysteine dan 0,6 cystine dalam medium maturasi dapat meningkatkan persentase blastosis (H7) menjadi berturut-turut 23,8%; 26,8% dan 30,8% dibandingkan tanpa GSH yang hanya menghasilkan 15,7% blastosis. Tingkat intraselular GSH yang tinggi membantu proses maturasi *in vitro*, dan tetap tersedia saat fertilisasi *in vitro* dan pada awal perkembangan embrio sampai 6-8 sel. Atas dasar pertimbangan tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan proses fertilisasi dan perkembangan awal embrio.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak (BALITNAK) Ciawi, Bogor, Jawa Barat.

Ovarium sapi dikoleksi dari RPH sebagai sumber sel telur (oosit), segera setelah sapi dipotong dengan menggunakan medium PBS bersuhu sekitar  $35^{\circ}C$  dalam termos air panas. Setibanya di laboratorium ovarium dicuci dengan PBS segar dan ditempatkan di gelas piala dalam penangas air bersuhu  $37^{\circ}C$ . Dari folikel

berukuran  $\leq 5$  mm oosit diaspirasi dengan medium TL Hepes dengan menggunakan spuit 10 cc dan jarum suntik berukuran 18 G. Oosit dan cairan folikel dikoleksi di dalam tabung kerucut berukuran 15 cc dan ditempatkan dalam penangas air. Setelah ovarium diaspirasi oositnya, maka dilakukan pengirisan untuk mencari oosit yang mungkin masih tertinggal didalamnya dengan cara mengiris-iris ovarium secara hati-hati dan kemudian disemprot dengan medium TL Hepes dan ditampung dalam cawan petri berdiameter 5 cm. Oosit dari tabung kerucut dipindahkan dalam cawan petri bergaris berdiameter 10 cm dengan menggunakan pipet pasteur steril. Oosit dikoleksi dan diseleksi dibawah stereo mikroskop, kemudian dikultur dalam medium maturasi TCM-199 yang diperkaya dengan FSH dan estradiol  $17\beta$  di dalam  $CO_2$  inkubator bersuhu  $38,5^{\circ}C$  dan kelembaban 90% selama 20 jam.

Pada medium fertilisasi (mTALP) dilakukan penambahan glutathione dengan konsentrasi 0; 0,25; 0,5; 0,75 dan 1,0 mM sebagai perlakuan A, B, C, D dan E. Semen beku sapi pejantan diperoleh dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari, Jawa Timur, *dithawing* dalam air bersuhu  $35^{\circ}C$  dan dikapitasi dengan menggunakan Percoll gradient 90% dan 45% masing-masing 0,5 ml (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2001 a).

Oosit yang telah mengalami maturasi, dicuci dengan TL Hepes dua kali dan sekali dalam medium fertilisasi, kemudian ditempatkan dalam *micro drop* (44  $\mu l$ ) medium fertilisasi sesuai perlakuan dan diinseminasi dengan 2  $\mu l$  sperma yang sudah dikapitasi, kemudian ditambahkan 2  $\mu l$  PHE (*Penicillamine Hypotaurine Epinephrine*) dan 2  $\mu l$  heparin per drop, selanjutnya disimpan di dalam  $CO_2$  inkubator bersuhu  $38,5^{\circ}C$  dan kelembaban 90% selama 18-20 jam.

Setelah diinkubasi bersama sperma, oosit dicuci dengan TL Hepes sekali dan divortex selama 3 menit untuk menghilangkan sel-sel kumulus yang masih menempel di sekeliling oosit. Selanjutnya oosit dicuci kembali dalam medium TL Hepes sebelum dikultur dalam medium CR1aa dalam *micro drop* (50  $\mu l$ ) selama 8 hari sementara itu pada hari ke-6 ditambahkan FCS (*Fetal Calf Serum*) sebanyak 5  $\mu l$  per 50  $\mu l$  medium (TRIWULANNINGSIH *et al.*, 2001b), untuk menambah nutrisi pada embrio yang sedang berkembang.

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah: persentase oosit tidak terbuahi, % pembelahan, % morula, % blastosis dan % embrio degenerasi. Rumus yang digunakan untuk menghitung parameter yang diamati menggunakan metode yang telah digunakan oleh WOSIK dan STUBBINGS (1994) sebagai berikut:

$$\% \text{ Morula} = \frac{\sum \text{morula} + \sum \text{blastosis} + \sum \text{blastosis lanjut}}{\sum \text{oosit yang diinseminasi}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Blastosis} = \frac{\sum \text{blastosis} + \sum \text{blastosis lanjut}}{\sum \text{oosit yang diinseminasi}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Oosit yang tidak terfertilisasi} = \frac{\sum \text{oosit yang tidak terfertilisasi}}{\sum \text{oosit yang diinseminasi}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Degenerasi embrio} = \frac{\sum \text{embrio yang berdegenerasi}}{\sum \text{oosit yang diinseminasi}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Pembelahan} = \frac{\sum \text{embrio} > 2 \text{ sel}}{\sum \text{oosit yang diinseminasi}} \times 100 \%$$

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah RAK (Rancangan Acak Kelompok) dengan ulangan sebagai kelompok. Sebelum data diuji dengan ANOVA, terlebih dahulu data diuji kenormalan untuk mengetahui apakah data menyebar normal atau tidak. Uji kenormalan merupakan salah satu syarat asumsi ANOVA. Apabila ANOVA menunjukkan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji jarak Duncan (STEEL dan TORRIE, 1993).

Adapun model matematikanya adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = Peubah yang diukur

$\mu$  = Rata-rata umum

$\alpha_i$  = Pengaruh perlakuan konsentrasi glutathione ke- $i$   
( $i = 0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 \text{ mM}$ )

$\beta_j$  = Pengaruh ulangan atau kelompok ke- $j$  (1, 2 dan 3)

$\varepsilon_{ij}$  = Galat, karena faktor  $\alpha_i$  dan  $\beta_j$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pada metode pengambilan oosit sapi menunjukkan bahwa ada perbedaan rataan antara dua

metode pengambilan oosit yang digunakan (Tabel 1). Rataan oosit yang diperoleh per ovarium pada pengambilan oosit dengan menggunakan metode aspirasi dan pengirisan masing-masing adalah  $9,33 \pm 1,59$  dan  $7,33 \pm 2,74$ . Hal ini sesuai dengan penelitian TRIWULANNINGSIH *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa metode pengambilan dan pengumpulan oosit kerbau dengan metode aspirasi menghasilkan rataan pengambilan oosit yang lebih tinggi dan kualitas lebih baik dibandingkan dengan metode pengirisan. Hal ini terjadi karena pada metode aspirasi, oosit tersedot dengan sempurna sehingga tidak menimbulkan kerusakan pada sel kumulus maupun sel oosit. Sementara itu, penggunaan metode pengirisan menyebabkan terjadinya kerusakan pada massa sel dan bentuk sel menjadi tidak beraturan. Kondisi yang demikian memerlukan waktu yang lebih lama dalam pencarian dan koleksi oosit dalam cawan petri sebagai akibat terlalu banyak debris serta terkadang oosit menjadi terlepas dari zona pelucida (*denuded oocytes*). Namun dengan cara pengirisan, oosit yang tidak tersedot pada waktu aspirasi masih dapat dikoleksi sehingga diperoleh sejumlah oosit yang cukup bagus untuk menambah materi penelitian ini.

**Tabel 1.** Rataan jumlah pengambilan oosit sapi dari ovarium melalui metode aspirasi dan pengirisan

Ulangan	Jumlah ovarium	Metode pengambilan oosit		Total oosit
		Aspirasi	Pengirisan	
1	6	57/6 (9,50)	63/6 (10,50)	120
2	12	130/12 (10,83)	70/12 (5,83)	200
3	6	46/6 (7,67)	34/6 (5,67)	80
Total	24	(233/24)	(167/24)	400
Rataan	-	$9,33 \pm 1,59$	$7,33 \pm 2,74$	133,33

Pengamatan dan penghitungan data perkembangan oosit setelah proses FIV yang ditambahkan glutathione dalam medium fertilisasi, dilakukan pada hari ke-8 (H8) setelah fertilisasi (inseminasi = hari ke-0). Persentase pembelahan oosit, morula dan blastosist H8 dikategorikan sebagai jumlah oosit yang berkembang, sedangkan persentase oosit yang tidak terbuahi dan oosit yang mengalami degenerasi dikategorikan sebagai jumlah oosit yang tidak berkembang. Tabel 2 dan Gambar 1 memperlihatkan hasil evaluasi penambahan glutathione pada medium fertilisasi terhadap rataan persentase perkembangan embrio *in vitro*.

Hasil analisa sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan penambahan glutathione (0; 0,25; 0,50; 0,75 dan 1,0 mM) pada medium fertilisasi tidak berpengaruh terhadap rataan persentase pembelahan oosit, morula, blastosist H<sub>8</sub>, oosit tidak terbuahi dan oosit yang mengalami degenerasi, sedangkan ulangan sebagai kelompok memberikan pengaruh yang cukup nyata (Tabel 2). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan individu sapi/ovarium sebagai sumber oosit. Sebab setiap kali koleksi ovarium dari RPH, tidak semua ovarium berasal dari sapi yang berumur sama, tetapi berasal dari sapi afkir atau terkadang dari sapi persilangan Brahman, sehingga kualitas oosit sebelum diberi perlakuan juga bervariasi yang mengakibatkan besarnya keragaman hasil. Hal ini dapat diatasi dengan memperbanyak ulangan.

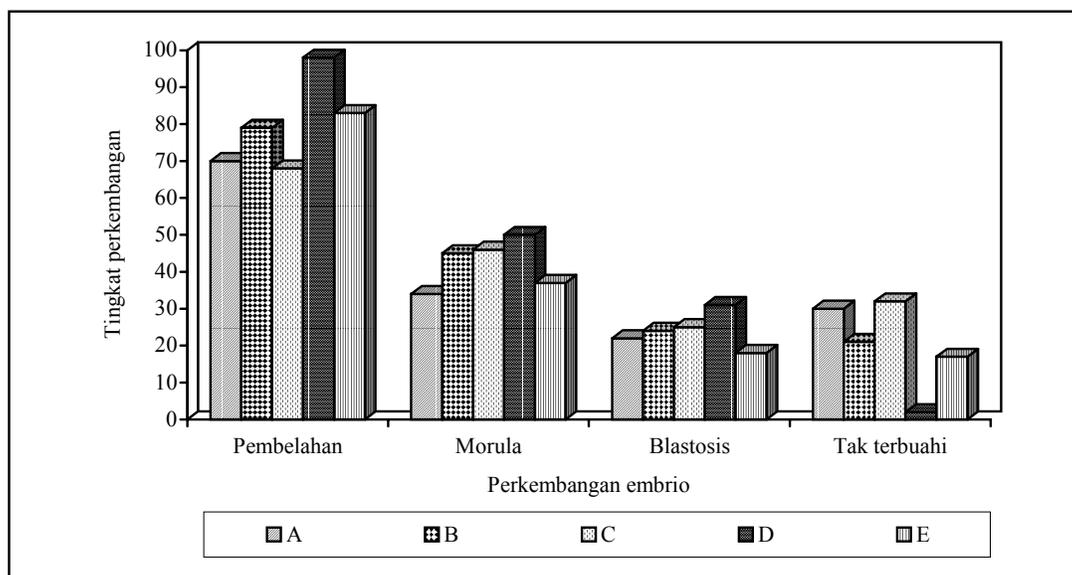
Keberhasilan FIV terhadap rataan persentase pembelahan oosit terjadi pada perlakuan penambahan glutathione 0,75 dan 1,00 mM (perlakuan D dan E) yaitu  $98,10 \pm 3,30\%$  dan  $82,62 \pm 24,19\%$  dengan rataan persentase morula dan blastosis sebesar  $50,45 \pm 42,64\%$

dan  $31,28 \pm 24,28\%$  untuk perlakuan D; serta  $36,55 \pm 24,13\%$  dan  $17,74 \pm 17,86\%$  untuk perlakuan E. Rataan oosit yang tidak terbuahi sebesar  $1,90 \pm 3,30\%$  dan  $17,38 \pm 24,19\%$  masing-masing untuk perlakuan penambahan glutathione 0,75 mM dan 1,00 mM pada medium fertilisasi, walau tidak berbeda secara statistik ( $P \geq 0,05$ ). HAFEZ (1993) menyatakan bahwa persentase pembelahan oosit dan persentase oosit tidak terbuahi pada fertilisasi *in vitro* yang baik, masing-masing sebesar 80% dan 20%. Nilai yang dilaporkan HAFEZ (1993) tersebut mengindikasikan bahwa penelitian ini sudah optimal.

Pada perlakuan penambahan glutathione 0; 0,25 dan 0,50 mM (perlakuan A, B dan C) dihasilkan rataan persentase pembelahan oosit dan rataan oosit yang tidak terbuahi kurang optimal dibandingkan perlakuan D dan E. Hasil ini diduga dengan penambahan glutathione 0,75mM sampai 1,00 mM akan lebih memperbaiki kondisi medium fertilisasi sehingga dapat meningkatkan kemampuan sperma melakukan penetrasi terhadap oosit. Keadaan ini terbukti dengan tingginya persentase oosit yang mengalami pembelahan dan rendahnya persentase oosit yang tidak terbuahi pada perlakuan penambahan glutathione sebanyak 0,75 mM dan 1,00 mM (perlakuan D dan E). Kemungkinan glutathione sebagai antioksidan perlu ditambahkan dalam medium kultur disamping pada medium fertilisasi, sebagaimana yang telah dilakukan oleh LIM *et al.* (1996) yang menambahkan  $\beta$ -mercaptoethanol pada medium kultur tapi tidak pada medium fertilisasi dapat menghasilkan persentase blastosis dari 17% (0  $\mu$ M 2-ME) meningkat menjadi 30% (6,25  $\mu$ M 2-ME).

**Tabel 2.** Pengaruh penambahan glutathione pada medium fertilisasi terhadap rataan persentase perkembangan embrio *in vitro*

Perlakuan (mM)	Jumlah oosit	Jumlah oosit yang berkembang			Jumlah oosit yang tidak berkembang	
		pembelahan (%)	morula (%)	blastosist (%)	tak terbuahi (%)	degenerasi (%)
A (kontrol)	53	$69,35 \pm 29,40$ (35/53)	$33,71 \pm 0,66$ (18/53)	$22,06 \pm 10,11$ (9/53)	$30,65 \pm 29,40$ (18/53)	$35,63 \pm 29,95$ (17/53)
B (0,25)	67	$79,07 \pm 13,17$ (49/67)	$44,76 \pm 19,22$ (25/67)	$24,31 \pm 17,83$ (13/67)	$20,93 \pm 13,17$ (18/67)	$34,31 \pm 12,60$ (24/67)
C (0,50)	68	$67,88 \pm 10,65$ (45/68)	$45,81 \pm 32,63$ (29/68)	$24,95 \pm 19,25$ (15/68)	$32,12 \pm 10,65$ (23/68)	$20,40 \pm 20,01$ (16/68)
D (0,75)	69	$98,10 \pm 3,30$ (67/69)	$50,45 \pm 42,64$ (29/69)	$31,28 \pm 24,28$ (19/69)	$1,90 \pm 3,30$ (2/69)	$46,37 \pm 41,25$ (38/69)
E (1,00)	74	$82,62 \pm 24,19$ (55/74)	$36,55 \pm 24,13$ (27/74)	$17,74 \pm 17,86$ (12/74)	$17,38 \pm 24,19$ (19/74)	$42,02 \pm 38,08$ (28/74)



Gambar 1: Pengaruh penambahan glutathione terhadap perkembangan embrio

Pada penelitian ini diperoleh embrio yang mencapai stadium morula tertinggi pada perlakuan D demikian pula pada stadium blastosist, walau tidak berbeda nyata secara statistik. Perbedaan yang tidak nyata kemungkinan disebabkan oleh kurangnya ulangan atau kualitas oosit yang berbeda sebelum diberi perlakuan yang tepat guna meningkatkan kualitas dan kuantitas blastosis embrio *in vitro*. Oosit yang baik akan mengalami metaphase II setelah dikultur selama 20 – 24 jam dan siap untuk difertilisasi. Kemungkinan tidak semua oosit telah mencapai stadium metaphase II, sehingga pada saat setelah difertilisasi tidak semua oosit dapat melakukan pembelahan dengan sempurna. Menurut DE MATOS dan FURNUS (2000), glutathione dapat meningkatkan laju pembelahan atau *cleavage rate* dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis, selanjutnya dijelaskan bahwa penggunaan glutathione pada medium fertilisasi dapat meningkatkan penetrasi spermatozoa pada saat fertilisasi *in vitro*, sehingga diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan fertilisasi *in vitro* yang pada akhirnya dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas blastosis yang dihasilkan.

Rataan persentase embrio yang mengalami degenerasi cukup tinggi (Tabel 2), baik dari pembelahan ke morula maupun dari morula ke blastosist. Hal tersebut kemungkinan disebabkan medium yang digunakan kurang mendukung pertumbuhan embrio. Kemungkinan lain disebabkan adanya radikal bebas dalam medium kultur, seperti telah dikemukakan oleh LIM *et al.* (1996) bahwa pada penggunaan medium kultur dalam 5% CO<sub>2</sub> inkubator dan kelembaban 90%, gamet dan embrio, akan mengalami keracunan akibat kehadiran oksigen dengan

konsentrasi yang tinggi. ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti halnya *superoxide anions*, *hydroxyl radicals* dan hidrogen peroksida meningkat pada keadaan kultur *in vitro* tersebut. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut, terutama dengan memberikan glutathione pada medium maturasi ataupun pada medium kultur dengan konsentrasi yang tepat dengan harapan dapat menekan timbulnya radikal bebas yang mungkin akan mengganggu perkembangan oosit hingga blastosist. TRIWULANNINGSIH *et al.* (2001b) mendapatkan persentase blastosist dan *expanded blastosist* masing-masing sebesar 57,48 dan 27,26%, dengan medium CR1aa yang sama dalam penelitian ini. Hal ini diduga kualitas air atau karena osmolaritas medium yang tidak diukur. Osmolaritas medium yang optimum untuk FIV adalah 280 – 300 mOSM. Apabila tekanan osmose tidak sesuai mengakibatkan cairan dalam sel menjadi terganggu yang mempengaruhi perkembangan embrio lebih lanjut.

Rataan persentase blastosist H8 yang dihasilkan dalam penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian KIM *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa glutathione yang ditambahkan dalam medium fertilisasi sejumlah 0 – 1,0 mM akan membantu pembentukan blastosist dari 20,10% menjadi 27,30%. Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan penambahan glutathione pada medium fertilisasi membantu mempertahankan perkembangan embrio dari stadium pembelahan oosit ke stadium morula dan sampai pembentukan blastosist H8 dengan cara mencegah kemungkinan terjadinya radikal bebas akibat perubahan kimiawi pada medium fertilisasi serta membantu

detoksifikasi dari kemungkinan kontaminasi jasad renik yang masuk ke dalam medium.

Pada seluruh sel hewan terdapat glutathione dalam konsentrasi tinggi, dimana salah satu fungsi glutathione adalah sebagai kofaktor dalam beberapa reaksi enzimatik tetapi tidak bertindak sebagai ko-enzim. Glutathione juga berfungsi dalam transport asam amino ke membran sel. Pada jaringan hati terdapat banyak glutathione dan glutathione peroksidase, yang merupakan enzim yang sangat berperan dalam mencegah terjadinya oksidasi. Enzim ini dapat mencegah dekomposisi ROOH dan menghentikan terjadinya reaksi berantai selama proses oksidasi, sehingga dengan adanya glutathione dapat mencegah terjadinya kerusakan protein membran.

HAMMERSTEDT *et al.* (1993) menyatakan bahwa kemungkinan adanya radikal bebas dalam medium fertilisasi *in vitro* sering terjadi yang disebabkan oleh adanya oksigen radikal bebas hasil dari proses transport elektron dari mitokondria. Keadaan tersebut ditandai dengan terjadinya reaksi peroksidasi lemak yang dapat mematikan spermatozoa. Sementara itu, KIM *et al.* (1999) menyatakan bahwa glutathione juga penting dalam dekondensasi khromatin sperma yang terjadi saat penetrasi spermatozoa ke oosit. Kerusakan yang ditimbulkan oleh serangan radikal bebas terhadap lemak menyebabkan reaksi peroksidasi yang akan menstimulasi proses otokatalitik yang akan menjarak sampai jauh dari asal reaksi semula. Hasil peroksidasi lemak membran oleh radikal bebas berefek langsung terhadap kerusakan membran sel, antara lain dengan mengubah fluiditas, struktur dan fungsi membran serta dalam keadaan yang lebih ekstrim yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel (GITAWATI, 1995). Selanjutnya dijelaskan bahwa radikal bebas dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, gugus tiol non-protein, lemak, karbohidrat dan nukleotida. Kemungkinan lain yaitu adanya kontaminasi jasad renik pada medium fertilisasi *in vitro* dapat terjadi karena kondisi aseptik, baik dari ruangan maupun peralatan yang digunakan. Guna menghindari dan menekan sekecil-kecilnya kontaminasi jasad renik, penggunaan antibiotika penisilin dan glutathione secara bersamaan pada medium fertilisasi *in vitro*, cukup efektif untuk membantu detoksifikasi.

MUHILAL (1991) menyatakan bahwa pemusnahan radikal bebas secara sempurna hanya dapat dilakukan bila dosis antioksidan yang digunakan tepat, pada waktu dan tempat yang tepat pula. Selanjutnya dijelaskan bahwa senyawa radikal bebas dapat dihilangkan dengan cara menambahkan senyawa antioksidan, namun demikian efisiensi penghilangan senyawa ini tidak pernah mencapai 100%.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Penambahan glutathione sebagai antioksidan sebesar 0,75 mM – 1,0 mM cenderung dapat mencegah terjadinya radikal bebas dan membantu detoksifikasi dan kontaminasi jasad renik serta meningkatkan kualitas medium fertilisasi dan meningkatkan kemampuan spermatozoa melakukan penetrasi pada sel telur, sehingga menghasilkan persentase pembelahan oosit, walau tidak berbeda nyata antar perlakuan.

Disarankan agar penelitian dilanjutkan dengan memperbanyak jumlah ulangan perlakuan untuk mendapatkan dosis konsentrasi glutathione pada medium fertilisasi yang tepat dan efisien guna menghasilkan persentase pembentukan blastosist yang optimal dan berkualitas. Penambahan glutathione pada medium maturasi ataupun medium kultur dengan konsentrasi yang tepat untuk melindungi embrio dari serangan radikal bebas yang mungkin terjadi saat gamet atau embrio tersebut dikultur dalam 5% CO<sub>2</sub> inkubator dengan kelembaban 90%, agar diperoleh blastosist yang berkualitas, perlu dipertimbangkan untuk penelitian yang akan datang.

## DAFTAR PUSTAKA

- DE MATOS D.G. and C.C.FURNUS. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development. Effect of beta-mercaptoethanol, cystein and cystine. *Theriogenology*. 53:761-771.
- EARL, C.R., J.KELLY, J.ROWE, and D.T ARMSTRONG. 1997. Glutathione treatment of bovine sperm enhances *in vitro* blastocyst production rates. *Theriogenology*. 47:255 (Abstract).
- GANDOLFI F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*. 41:95-100.
- GITAWATI, R. 1995. Radikal bebas – sifat dan peran dalam menimbulkan kerusakan/kematian sel. Cermin Dunia Kedokteran. No.102.
- HAFEZ, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia, USA.
- HAMMERSTEDT, R.H., A.D.KEITH, W. SNIPES, R.P. AMANN, D. ARRUDA, and L.C.GRIEL. 1993. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity on sperm. *J. Biol. Reprod.* 18:686 – 696.
- KIM I.H., A VAN LANGENDOCKT, A. VAN SOOM, G. VAN ROOSE, A.L.CASI, P.J.M. HENDRIKSEN. and M. BEVERS. 1999. Effect of exogenous glutathione on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 52:537-547.

- LIM, J.M., S.S. LIOU, and W. HANSEL. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*. 43:429-439.
- LUVONI, G.C., L. KESKINTEPE and B.G. BRACKETT. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Molecular Reprod. and Develop.* 43: 437-443.
- MUHILAL. 1991. Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. Cermin Dunia Kedokteran. No.73.
- STEEL R.G.D and R.A TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Penerbit Gramedia. Jakarta.
- TAKAHASHI M., T. NAGAI, S.HAMANO, M.KUMAYAMA, N.OKAMURA, and A. OKANO. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49: 228-232.
- TRIWULANNINGSIH, E., A. LUBIS, dan P. SITUMORANG. 1995. Fertilisasi *in vitro* pada kerbau. Kumpulan Hasil-Hasil Penelitian APBN T.A.1994/1995. p. 109-113.
- TRIWULANNINGSIH, E., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, K .DIWIYANTO, dan J.J. RUTLEDGE. 2001a. Seleksi dan kapasitas sperma dengan metode Percoll gradient untuk fertilisasi oosit dan produksi embrio *in vitro* sapi. *Unpublished*.
- TRIWULANNINGSIH, E., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, K .DIWIYANTO, dan J.J. RUTLEDGE. 2001b. Peningkatan persentase blastosist melalui berbagai metode *feeding* serum dalam produksi embrio sapi *in vitro*. *Unpublished*.
- YOUNIS, A.I., B.G.BRACKETT, and R.A.FAYRE-HOSKEN. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*. 23:189-201.
- WOSIK C.P. and R.B. STUBBINGS 1994. The effect on embryonic development of changing culture system of bovine embryos. New Zeland Embryo Transfer Workshop. 14-15 january 1994. Hamilton. p. 80-81.
- WIJAYA, A. 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. Forum Diagnos-tikum No.1. Lab.Klinik prodia.