

Maturasi Oosit Domba secara *In Vitro* tanpa CO₂

Margawati, E.T¹., I. Supriatna², T.L. Yusuf², Y. Supriondo³, dan T. Hastuti¹

¹*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong*

²*Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Bogor*

³*Fakultas Peternakan dan Perikanan, UNDIP, Semarang*

ABSTRAK

Penelitian dimaksudkan untuk mengembangkan metode maturasi *in vitro* tanpa CO₂ pada oosit domba. Oosit domba dikoleksi dari ovarium Rumah Pemotongan Hewan (RPH) dengan cara aspirasi (penyedotan) dan semprot media menggunakan jarum suntik ukuran 18 gauge. Oosit dibagi ke dalam tiga perlakuan: (T1) Oosit dimaturasi di dalam eppendorf berisi medium IVM (Bikarbonat-199 + 10% FCS + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml hCG + 1 µg/ml Estrogen) dilapisi minyak mineral di atasnya, sebelum ditanam oosit, medium IVM diekuilibrasi selama ± 2 jam di inkubator 5% CO₂. (T2) Oosit dimaturasi di dalam drop medium IVM (T1) yang dilapisi dengan minyak mineral di atasnya. (T3) Oosit dimaturasi di dalam drop medium IVM (T1) dengan minyak mineral di atasnya, sebelum ditanam oosit, drop IVM diekuilibrasi ± 2 jam di inkubator 5% CO₂. Pada semua perlakuan, maturasi *in vitro* berlangsung 24 jam pada suhu 38°C dengan humiditas tinggi tanpa CO₂. Tahap pembelahan meiosis oosit (metaphase I, anaphase I, telophase I, dan metaphase II) diuji setelah dicat dengan lacmoid 1%, dan diamati di bawah *inverted microscope* dengan pembesaran 300 kali. Proporsi oosit muda mencapai metaphase II pada maturasi tanpa CO₂ tidak berbeda nyata (P>0,05) di antara ketiga perlakuan (39, 29, dan 48%, untuk T1, T2, dan T3). Namun demikian, proporsi masak telur pada T1 dan T3 cenderung lebih tinggi dari pada T2. Penelitian ini menyimpulkan, ada kemungkinan untuk melakukan maturasi *in vitro* oosit domba secara sederhana atau di dalam inkubator mini tanpa CO₂ selama transportasi berjarak jauh dari RPH ke laboratorium.

Kata kunci: Oosit domba, maturasi, tanpa CO₂, metaphase I, anaphase I, telophase I, metaphase II.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a method of *in vitro* maturation (IVM) for ovine oocytes in the absence of CO₂. Oocytes from abattoir ovaries were collected by methods of aspiration and spraying of media using a 18 gauge needle. Collected oocytes were divided into 3 treatments: (T1) Oocytes were cultured in an eppendorf containing IVM medium (Bicarbonate-199 + 10% FCS + 10 µg/ml FSH + 10 µg/ml hCG + 1 µg/ml Estradiol) overlaid with mineral oil. The IVM medium was equilibrated in a humidified incubator at 38°C with 5% CO₂ for two hours prior to culture. (T2) Oocytes were matured in IVM medium (as T1) drops overlaid with mineral oil. (T3) Oocytes were matured in IVM medium (as T1) drops overlaid with mineral oil, the IVM drops were equilibrated in a humidified incubator at 38°C with 5% CO₂ for two hours prior to culture of the oocytes. All treatments were maintained at 38°C in a humidified incubator without CO₂ for 24 hours. Oocytes were assessed for the stages of meiosis division (metaphase I, anaphase I, telophase I, and metaphase II) under an inverted microscope at x 300 magnification after staining with 1% lacmoid. In the absence of CO₂, the proportion of

immature oocytes achieved metaphase II (matured oocytes) was not significantly difference ($P>0.05$) among the treatments (39, 29, 48% for T₁, T₂, T₃ respectively). However, the proportion of matured oocytes derived from T₁ and T₃ tended higher than T₂. This study concludes that there is a possibility to mature ovine oocytes in a simple method or in a portable incubator without CO₂ during a longer transportation from abattoirs to the laboratory.

Key words: Ovine oocyte, maturation, without CO₂, metaphase I, anaphase I, telophase I, metaphase II.

PENDAHULUAN

Untuk melakukan kegiatan IVF, salah satu persyaratan yang harus dipenuhi adalah komposisi campuran gas CO₂, O₂ dan N₂. Penggunaan campuran ketiga macam gas tersebut telah dicoba untuk mengkultur oosit domba dan sapi yang telah dibuahi (*fertilized ova*) untuk dikembangkan ke tahap morula atau blastosis (Tervit *et al.*, 1972; Tervit dan Rowson 1974; Thompson *et al.*, 1990). Secara khusus, konsentrasi O₂ juga telah diuji pada kultur *in vitro* embrio domba dan sapi (Thompson *et al.*, 1990). Whitten (1971) dan Tervit *et al.* (1972) melaporkan bahwa konsentrasi oksigen merupakan salah satu faktor penting untuk perkembangan normal embrio mencit, domba dan sapi yang dikultur secara *in vitro*, namun O₂ dengan konsentrasi tinggi akan menghambat perkembangan oosit yang telah dibuahi ke tahap morula maupun blastosis. O₂ dengan konsentrasi 0, 5, dan 10% (Tervit *et al.*, 1972) serta lebih rendah dari 5% (Thompson *et al.*, 1990) di dalam udara dianggap sesuai untuk perkembangan embrio domba maupun sapi.

Sampai saat ini belum dipelajari peran gas CO₂ pada pemotongan dan fertilisasi oosit ataupun perkembangan embrio secara *in vitro*. CO₂ diduga berperan untuk menjaga kestabilan pH media yang digunakan untuk mengkultur oosit maupun embrio. Seberapa jauh peran CO₂ dalam sistem IVF khususnya pada pemasakan oosit (IVM= *in vitro maturation*) belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui peran CO₂ pada IVM sebagai tahap awal untuk penelitian lanjutan pada perkembangan embrio secara *in vitro*.

Selama maturasi *in vitro*, konsentrasi CO₂ sebanyak 5% di dalam inkubator adalah yang sering digunakan untuk mematangkan oosit yang dikoleksi dari RPH. Namun demikian, tidak ada bukti atau laporan mengenai perlunya keberadaan CO₂ selama maturasi oosit *in vitro*. Adanya informasi ini sangat diperlukan terutama untuk menanggulangi persoalan lokal seperti di Indonesia atau mendatangkan oosit dari manca negara yang transportasinya memakan waktu sangat lama sampai dengan diproses di dalam laboratorium IVF. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengembangkan suatu metode maturasi *in vitro* tanpa CO₂ untuk oosit domba dan kemungkinan besar dapat diterapkan pada hewan ruminant lain.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Oosit

Oosit dikoleksi dari ovarium hewan yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) dengan dua cara, yaitu aspirasi (penyedotan) dengan menggunakan jarum suntik ukuran 18 G dan penyemprotan medium. Medium aspirasi yang digunakan yaitu Hepes buffered 199 (H199) + 0,4% Bovine Serum Albumin (BSA) + 50 µg/ml Heparin. Oosit kemudian dicuci dengan H199 + 10% Fetal Calf Serum (FCS); Buferred 199 (B199) + 10% FCS dan terakhir dengan medium IVM.

Maturasi *In Vitro*

Medium IVM yang digunakan yaitu Bikarbonat-199 + 10% FCS + 10 µg/ml Follicle Stimulating Hormone (FSH) + 10 µg/ml human Chorionic Gonadotropin (hCG) + 1 µg/ml Estradiol (E2). Tiga metode maturasi *in vitro* telah digunakan sebagai perlakuan dalam penelitian ini. T1= oosit dikultur di dalam medium IVM (di dalam eppendorf, di atas medium ditutup mineral oil) yang sebelumnya telah diekuilibrasikan di dalam inkubator dengan 5% CO₂ selama 2 jam, kemudian oosit dimatursasikan di dalam inkubator tanpa CO₂. T2= oosit dikultur di dalam drop medium IVM yang ditutup dengan mineral oil pada cawan petri (10 oosit per drop; 50 µl per drop) tanpa ekuilibrasikan dengan CO₂ sebelumnya. T3= oosit dikultur didalam drop medium IVM (seperti T2), sebelumnya telah diekuilibrasikan di dalam inkubator 5% CO₂ selama ± 2 jam kemudian dimatursasikan di dalam inkubator 5% CO₂. Lama maturasi untuk semua perlakuan yaitu 24 jam pada suhu 38°C dan humiditas tinggi.

Fiksasi dan Pewarnaan Oosit

Maturasi dihentikan setelah 24 jam proses pematangan di dalam inkubator. Oosit dicuci dengan larutan pencuci Phosphate Buffered Saline (PBS), dibersihkan dari sel cumulus yang menempel dan dicetak di atas objek gelas dan ditutup dengan gelas penutup. Antara objek dan gelas penutup direkatkan dengan cat kuku pada kedua sisi, kemudian direndam di dalam larutan fiksasi (asam asetat:ethanol= 1:3) selama 48 jam. Pengecatan oosit dilakukan dengan Lacmoid 1% selama 1-2 menit setelah perendaman 48 jam dan dicuci dengan 45% larutan asam asetat. Keempat sisi gelas penutup dan gelas objek ditutup dengan cat kuku. Pengamatan tahap pemasakan oosit (*meiosis division*) dilakukan di bawah mikroskop terbalik (*inverted microscope*) dengan pembesaran 300 kali. Tahap maturasi yang diamati yaitu metaphase I, anaphase I, telophase I, dan metaphase II, menurut kriteria yang digambarkan oleh Tsafrii (1978).

Analisis Data

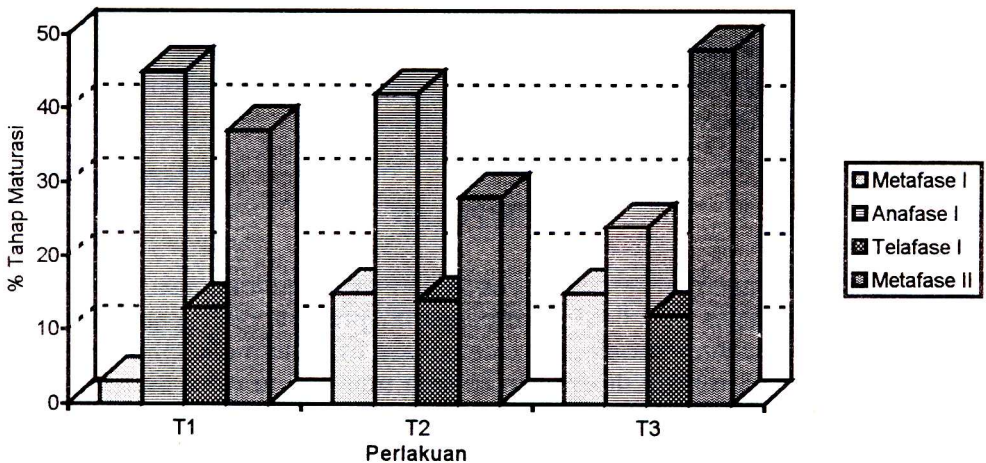
Data yang terkumpul diproporsikan ke dalam persentase (%) untuk semua tahap (metaphase I, anaphase I, telophase I, dan metaphase II). Persentase metaphase II (masak telur) dianalisis secara statistik menggunakan rancangan acak lengkap menurut Steel dan Torrie (1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Kematangan (Maturasi)

Penyebaran tingkat maturasi oosit domba setelah 24 jam maturasi *in vitro* tanpa CO₂, ditunjukkan seperti pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa pola penyebaran persentase tingkat kematangan oosit domba sedikit berbeda antara ketiga perlakuan, namun persentase tahap anaphase I (45, 42, dan 24%, masing-masing untuk T1, T2, dan T3) dan Metaphase II (39, 29, dan 48%, masing-masing untuk T1, T2, dan T3) cenderung lebih tinggi dari metaphase I (3, 16, dan 15%, masing-masing untuk T1, T2, dan T3) dan telophase I (12, 13, dan 12%, masing-masing untuk T1, T2, dan T3). Telophase I menunjukkan persentase yang relatif serupa pada semua perlakuan dan proporsi ini relatif lebih tinggi dijumpai dari laporan studi sebelumnya (tidak lebih dari 10%) pada oosit sapi dengan lama maturasi berbeda dan pengaruh *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF), (Margawati, 1996).



Gambar 1. Tingkat kematangan oosit domba setelah maturasi *in vitro* dengan atau tanpa CO₂.

Tabel 1. Persentase Metaphase II oosit domba setelah 24 jam maturasi di dalam inkubator dengan atau tanpa CO₂.

Perlakuan	Jumlah oosit	Metaphase II (%)
T1	33	13 (39,40) ^a
T2	38	11 (28,95) ^a
T3	33	16 (48,49) ^a

Keterangan: Tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antara ketiga perlakuan terhadap persentase Metaphase II.

Metaphase II (Masak Telur)

Persentase oosit muda mencapai masak telur (metaphase II) setelah 24 jam maturasi *in vitro* pada ketiga perlakuan, diperlihatkan pada Tabel 1.

Persentase oosit muda (*immature*) yang mencapai tahap metaphase II (masak telur) pada maturasi *in vitro* tanpa CO₂ tidak menunjukkan perbedaan nyata di antara ketiga perlakuan ($P>0,05$). Hal ini sesuai dengan laporan Byrd *et al.* (1995) yang menggunakan inkubator mini (*portable incubator*) tanpa CO₂ pada pemasakan oosit domba. Namun, oosit yang dikultur pada medium IVM yang sebelumnya diekuilibrasikan dengan CO₂ (T1) dan bahkan juga dimaturasi dengan pengaruh CO₂ (T3), menunjukkan persentase metaphase II lebih tinggi dari yang sama sekali tidak diintroduksi dengan CO₂ (T2), yaitu masing-masing 39, 48%, dan 29%. Pola penyebaran tingkat kematangan oosit domba pada T3 (dengan CO₂) yang dimaturasi selama 24 jam, tidak berbeda dengan penelitian sebelumnya dengan lama maturasi 18, 22, dan 28 jam (Margawati, 1996). Dilaporkan, sebanyak 80% dari oosit sapi yang dimaturasi secara *in vitro* akan muncul *polar body* pertama setelah 12-18 jam maturasi (Van der Westerlaken *et al.*, 1994). Dari penelitian ini, peran CO₂ selama maturasi *in vitro* belum nampak jelas kecuali untuk mempertahankan pH medium selama di dalam inkubator. Hasil diskusi pribadi dengan H.R. Tervit (January, 1997), peran CO₂ diperkirakan akan muncul apabila oosit dilanjutkan perkembangannya ke tahap morula atau blastosis setelah fertilisasi *in vitro*.

KESIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa oosit domba yang dimaturasi secara *in vitro* selama 24 jam tanpa gas CO₂, tidak mempengaruhi proporsi pencapaian oosit muda (*immature oocytes*) ke tahap masak telur (metaphase II). Belum diketahui secara pasti bahwa peran gas CO₂ mutlak diperlukan selama maturasi *in vitro*. Pertanyaan yang muncul dari penelitian ini yaitu apakah CO₂ nantinya akan berperan pada tahap perkembangan embrio secara *in vitro* setelah fertilisasi? Menjawab pertanyaan ini, penelitian lanjutan mengenai perkembangan embrio domba secara *in vitro* dari oosit hasil maturasi tanpa CO₂ sedang diteliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Byrd, S.R., G. Flores-Foxworth, and M.E. Westhusin. 1995. Developmental following *in vitro* oocyte maturation in a portable incubator in the absence of CO₂. *Theriogenology* 43:179 (Abstract).
- Margawati, E.T. 1996. Effect of maturation periods and Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) on the bovine oocyte matured *in vitro*. *Annales Bogorienses* 4(1): 19-25.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. *Principles and Procedures of Statistics*. 2nd Ed. McGraw-Hill Inc. New York.
- Tervit, H.R., D.G. Whittingham, and L.E.A. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 30: 493-497.
- Tervit, H.R. and L.E.A. Rowson. 1974. Birth of lambs after culture of sheep ova *in vitro* for up to 6 days. *J. Reprod. Fert.* 38: 177-179.
- Thompson, J.G.E., A.C. Simpson, P.A. Pugh, P.E. Donnelly, and H.R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 89: 573-578.
- Tsafiri, A. 1978. Oocyte maturation in mammals. *In* R.E. Jones (Ed.). *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press, New York. p. 409-442.
- Van der Westerlaken, L.A.J., A. Van der Schans, W.H. Eyestone, and H.A. de Boer. 1994. Kinetics of first polar body extrusion and the effect of time of stripping of the cumulus and time of insemination and developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 42: 361-370.
- Whitten, W.K. 1971. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. *Adv. Biosc.* 6: 129-141.