

Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Serum terhadap Tingkat Maturasi Oosit Domba *In Vitro*

(The Influence of Type and Serum Concentration to Oocyte Maturation Level on Sheep *In Vitro*)

J. Wattimena¹⁾, T.R. Tagama²⁾ dan B. Hadisutanto³⁾

¹⁾ Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura, Ambon.
Jln. Ir. M. Putuhena Poka-Ambon 97233, Tel. 0911-315984.

²⁾ Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

³⁾ Jurusan Peternakan Politeknik Pertanian Negeri Kupang.

Abstract

The objective of the research was to know the effect of serum type and concentration on *in vitro* maturation ovine oocyte. The result was expected to give information about the effect of serum type and concentration on *in vitro* maturation ovine oocyte, in order to find an alternative serum to reduce the use of serum from pharmacy industry. The result of research shows that concentration and type of serum significantly ($P < 0,05$) influenced the maturation rate *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metaphase-I* (M-I) and *metaphase-II* (M-II) phase. The result of research shows that concentration and type of serum has no significant ($P > 0,05$) influence on cumulus expansion rate grade 0, 1 and 2.

Key Words : Oocyte, maturation, sheep

Pendahuluan

Maturasi oosit secara *in vitro* merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan proses fertilisasi *in vitro*. Aplikasi teknologi FIV belum diterapkan secara meluas di bidang peternakan, karena berbagai kendala yang dihadapi diantaranya kualitas media. Serum dapat dipakai sebagai bahan suplementasi dalam media kultur, karena memiliki komponen esensial seperti; protein, hormon, faktor-faktor pertumbuhan, mineral, lipid yang diperlukan untuk maturasi, fertilisasi maupun perkembangan embrio (Eckert and Niemann 1994; Bavister, 1995). Selama ini serum yang digunakan sebagai bahan suplementasi berasal dari serum industri farmasi seperti; *estrus cow serum* (ECS), *bovine serum* (BS), *fetal calf serum* (FCS), *bovine serum albumin* (BSA), *sheep serum* (SS) dengan harga relatif mahal, kemasan besar dan pada daerah

tertentu sulit didapat. Mengingat faktor tersebut maka perlu diupayakan serum alternatif seperti; *estrus sheep serum* (ESS) dan *pregnant sheep serum* (PSS) yang dapat diadakan di laboratorium dan digunakan sebagai bahan suplementasi untuk meningkatkan kualitas media. Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. Tujuan penelitian untuk untuk mengkaji dan mengetahui jenis dan konsentrasi serum yang memberikan pengaruh terbaik terhadap keberhasilan maturasi oosit domba *in vitro*.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap proses maturasi oosit secara *in vitro*. Manfaat praktis penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan tingkat maturasi oosit dengan serum alternatif yang relatif murah, mudah proses pembuatan, efektif dan mengurangi ketergantungan terhadap serum industri farmasi.

Metode Penelitian

Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Jatinangor Bandung. Ovarium domba dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) di jalan Soekarno-Hatta Bandung, domba yang dipotong adalah domba lokal (domba garut) umur 1,5 sampai 3,5 tahun.

Media Koleksi Ovarium, Oosit dan Maturasi *In Vitro*

Media koleksi ovarium adalah NaCl fis.+penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml. Media koleksi oosit adalah *modified phosphate buffered saline*(+) (mPBS+). Media maturasi adalah *Charles Rosenkrans-1aa* (CR1aa) + penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml dan *follicle stimulating hormone*/FSH (Sigma USA) 0,01 mg/ml. Media Maturasi disuplementasi dengan *sheep serum* (SS, Sigma USA) *estrus sheep serum* (ESS) dan *pregnant sheep serum* (PSS) dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% sebagai perlakuan.

Koleksi Ovarium, Oosit dan Maturasi *In Vitro*

Ovarium yang digunakan dalam penelitian bersumber dari ovarium domba lokal, dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) dan disimpan dalam termos dengan media koleksi (NaCl fis.) suhu 30-35°C. Ovarium dibilas dengan media koleksi dan oosit dikoleksi dengan metode *slicing*, oosit dicuci 3 kali pencucian terakhir dengan media maturasi (CR1aa). Hanya oosit kualitas A dan B yang digunakan sebagai sampel penelitian. Tiga spot media maturasi oosit (CR1aa) dibuat pada petri-dish (100 µl/drops), ditutup dengan mineral oil (Sigma, USA). Oosit dipindahkan ke dalam spot media maturasi (10-15 oosit) sesuai perlakuan diinkubasi selama 24 jam, suhu 38,50°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%.

Evaluasi Hasil Maturasi

Evaluasi hasil maturasi dengan metode pewarnaan *aceto-orcein* (Pawshe *et al.*, 1994; Byrd *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2001). Setelah penggundulan sel-sel kumulus, oosit difiksasi dalam larutan *asam asetat* dan *ethanol* (1:3) pada suhu kamar selama 24 jam. Oosit diwarnai dengan 1% *orcein* dalam 45% *asam asetat* dan dievaluasi dengan mikroskop fase kontras. Evaluasi tingkat ekspansi sel kumulus dilakukan melalui pengamatan langsung dibawah mikroskop terdiri dari; grade 0, sel kumulus tidak berekspansi; grade 1, sel kumulus berekspansi sebagian dan grade 2, sel kumulus berekspansi sempurna.

Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 9 kombinasi perlakuan dengan 6 kali ulangan. Perlakuan yang dicobakan adalah; SS10%, SS15%, SS20%, ESS10%, ESS15%, ESS20%, PSS10%, PSS15% dan PSS20% (SS = *sheep serum*; ESS = *estrus sheep serum*; PSS = *pregnant sheep serum*; 10%, 15% dan 20% adalah konsentrasi serum). Parameter yang diamati adalah; tingkat maturasi tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metafase-I* (M-I) dan *meta-fase-II* (M-II), tingkat ekspansi sel kumulus grade 0, 1 dan 2. Data dianalisis berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dan diuji dengan uji wilayah berganda Duncan's (Gaspersz, 1994).

Hasil dan Pembahasan

Tingkat Maturasi

Oosit matang (*mature*) merupakan salah satu faktor penting dalam menunjang keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Oosit yang telah mengalami maturasi ditandai oleh adanya benda kutub-I

(polar bodi-I), hasil penelitian (Tabel 1) memberikan gambaran adanya perbedaan pengaruh jenis dan konsentrasi serum yang dicobakan dalam penelitian ini terhadap rataan oosit maturasi. Analisis ragam menunjukkan bahwa jenis dan konsentrasi serum berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap rataan maturasi. Selanjutnya hasil uji menunjukkan ESS meningkatkan tingkat maturasi nyata ($P < 0,05$) lebih baik dibanding SS dan PSS, hal ini berarti media maturasi yang disuplementasi dengan ESS memiliki komposisi dan komponen penyusun yang lebih sesuai untuk merangsang dan menunjang proses maturasi. Menurut Sanbuissho and Threlfall, (1989); Younis *et al.* (1989). serum yang dikoleksi pada waktu estrus memberikan respons sangat baik terhadap tingkat maturasi, disebabkan karena serum mengandung hormon dan faktor-faktor lain yang potensial untuk perkembangannya. Fallon *et al.* (1988) mengatakan bahwa efektivitas serum dalam IVM dan IVF sangat bervariasi, hal ini disebabkan karena bervariasinya konsentrasi substansi serum

seperti; hormon, faktor pertumbuhan, asam amino, cytokinesis, vitamin dan faktor lainnya.

Serum sapi yang dikoleksi pada saat estrus (*estrus cow serum/ECS*) dalam media maturasi menghasilkan respons lebih baik terhadap tingkat maturasi dibanding serum lainnya. Hal ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi hormon steroid dan gonadotrophin dalam serum yang dikoleksi pada berbagai fase siklus estrus (Lu *et al.*, 1987).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat sejumlah oosit yang belum mengalami maturasi {terdiri dari tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD) dan *metafase-I* (M-I)}. Pada Tabel 1 perlakuan yang disuplementasi ESS dan PSS masih terdapat 17,42%-29,08% tertahan pada tahap metafase-I lebih baik dibanding perlakuan yang disuplementasi SS (27,66%-30,21%). Tertahannya sejumlah oosit pada tahap M-I diduga oleh lama waktu maturasi yang dalam penelitian ini dilakukan selama 24 jam. Hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa

Tabel 1. Pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat maturasi tahap GV, GVBD, M-I dan M-II (%)

Perlakuan	Jumlah Oosit	Tahap Perkembangan (Jml Oosit)			Total Blm. Maturasi	Maturasi (M-II)
		GV	GVBD	M-I		
SS10%	70	8,42(6)	13,12(9)	27,66(20)	49,20(35) ^a	50,80(35) ^a
SS15%	76	6,73(5)	9,02(7)	30,21(23)	45,96(35) ^a	54,04(41) ^a
SS20%	73	5,36(4)	8,22(6)	28,65(21)	42,22(31) ^a	57,78(42) ^{ab}
PSS10%	70	4,43(3)	8,26(6)	28,41(20)	41,11(29) ^{ab}	58,89(41) ^b
PSS15%	67	2,90(2)	4,09(3)	29,08(19)	36,08(24) ^{ab}	63,92(43) ^b
PSS20%	71	1,04(1)	4,22(3)	25,77(18)	31,03(22) ^c	68,97(49) ^c
ESS10%	77	2,50(2)	3,78(3)	21,86(17)	28,14(22) ^c	71,86(55) ^{cd}
ESS15%	75	2,71(2)	4,89(4)	17,42(13)	25,02(19) ^c	74,98(56) ^{cd}
ESS20%	76	0,00(0)	2,30(2)	17,71(13)	20,02(15) ^c	79,98(61) ^d
Total	655					

SS = *sheep serum*, PSS = *pregnant sheep serum*, ESS = *estrus sheep serum*

10%, 15% dan 20% adalah konsentrasi serum

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0,05$

Tabel 2. Pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat ekspansi sel kumulus grade 0, 1 dan 2 (%)

Perlakuan	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Sel Kumulus (Jml Oosit)		
		Grade 0	Grade 1	Grade 2
SS10%	70	13,83 (10) ^a	27,27 (19) ^a	58,90 (41) ^a
SS15%	76	11,30 (9) ^a	25,54 (19) ^a	63,16 (48) ^a
SS20%	73	12,10 (9) ^a	24,68 (18) ^a	63,21 (46) ^a
PSS10%	70	14,21 (10) ^a	31,47 (22) ^a	54,32 (38) ^a
PSS15%	67	9,66 (7) ^a	30,26 (20) ^a	60,08 (40) ^a
PSS20%	71	9,93 (7) ^a	24,25 (18) ^a	65,82 (46) ^a
ESS10%	77	11,51 (9) ^a	29,75 (23) ^a	58,74 (45) ^a
ESS15%	75	11,02 (8) ^a	31,00 (24) ^a	57,97 (43) ^a
ESS20%	76	5,16 (4) ^a	32,46 (25) ^a	62,38 (47) ^a
Total	655			

SS= *sheep serum*, PSS=*pregnant sheep serum*, ESS= *estrus sheep serum*

10%, 15% dan 20% adalah konsentrasi serum

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0.05$

tingkat maturasi oosit kambing (tahap M-II) yang dikultur selama 26 jam (88,00%) lebih besar dibanding 22 jam (68,00%) dan 18 jam (42,50%) (Rusyantono, 2001). Dikatakan pula rataan oosit tidak maturasi (tahap M-I) untuk lama waktu maturasi 26 jam (10,00%) lebih kecil dibanding lama waktu maturasi 22 jam (16,00%) dan 18 jam (27,50%). Ciptadi *et al.* (1999) mengatakan bahwa terdapat interaksi antara waktu maturasi oosit kambing dengan tingkat maturasi inti dan tingkat maturasi tahap M-II terbesar 62,00% diperoleh pada lama waktu maturasi 30 jam.

Peningkatan konsentrasi serum pada ketiga jenis serum yang dicobakan akan meningkatkan rataan maturasi tahap M-II (Tabel 1). Hal ini berarti semakin meningkat konsentrasi serum diduga akan meningkatkan konsentrasi berbagai komponen pemicu terjadinya proses maturasi yang terkandung di dalam serum seperti hormon, protein, energi dan berbagai faktor lainnya sehingga memberikan hasil optimal pada proses maturasi. Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian sebelumnya Djati *et al.* (1999), mengatakan bahwa tingkat maturasi oosit kambing tahap M-II dalam TCM 199+20% EGS (*estrus goat serum*) (68,00%) lebih baik dibanding TCM199+10% EGS (50,00%). Rao *et al.* (2002),

mengatakan bahwa suplementasi ESS20% dalam media maturasi TCM199 menghasilkan tingkat maturasi tahap M-II oosit domba sebesar 86,00%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi serum 20% dalam media maturasi memberikan pengaruh yang positif terhadap peningkatan angka maturasi, hal ini diperkuat oleh pernyataan Lonergan (1992) dan Monaghan (1993) dikutip Gordon (1994) bahwa konsentrasi serum terbaik untuk maturasi oosit *in vitro* bervariasi antara 10-20%.

Tingkat Ekspansi Sel Kumulus

Hasil penelitian pengaruh perlakuan terhadap tingkat ekspansi sel kumulus grade 0, 1 dan grade 2 dapat dilihat pada Tabel 2. Kombinasi perlakuan dengan tingkat ekspansi sel kumulus grade 2 tertinggi untuk masing-masing jenis serum: PSS konsentrasi 20% (65,82%); SS konsentrasi 20% (63,21%) dan ESS konsentrasi 20% (62,38%). Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap rataan tingkat ekspansi sel kumulus grade 0, 1 dan 2. Informasi sebelumnya menyatakan bahwa hormon memegang peranan penting dalam mengatur dan menginduksi ekspansi sel kumulus. Ekspansi sel kumulus

sangat dipengaruhi oleh aktivitas hormon gonadotrophin yaitu FSH dan LH (Hillensjo and Channing, 1980). Djati (1999) mengatakan bahwa tingkat ekspansi sel kumulus secara sempurna pada media TCM199+FCS sebesar 57,10% dan pada media TCM199+FCS+PMMSG+hCG sebesar 96,70%. Suplementasi FSH, LH dan hCG dalam media maturasi oosit kambing menghasilkan tingkat ekspansi sel kumulus secara sempurna sebesar 97,50% (Keskintepi *et al.*, 1994).

Mengacu pada uraian di atas dapat dipahami bahwa dalam penelitian ini jenis dan konsentrasi serum berpengaruh tidak nyata terhadap rataan ekspansi sel kumulus, sebab secara *in vivo* sekresi hormon FSH dan LH dihasilkan dari kelenjar pituitari anterior sementara pada maturasi *in vitro* hal ini tidak terjadi. FSH diperlukan untuk merangsang maturasi dan ekspansi sel kumulus melalui regulasi dan akumulasi konsentrasi cAMP (Salustri *et al.*, 1985; Lu *et al.*, 1987).

Kesimpulan

Jenis serum ESS konsentrasi 10-20% dan PSS konsentrasi 20% nyata meningkatkan tingkat maturasi oosit domba dibanding PSS konsentrasi 10-15% dan SS konsentrasi 10-20%, dengan demikian ESS dan PSS konsentrasi 20% dapat dipakai sebagai serum alternatif menggantikan serum industri farmasi SS pada proses maturasi oosit domba secara *in vitro*. Jenis dan konsentrasi serum berpengaruh tidak nyata terhadap tingkat ekspansi sel kumulus grade 0, 1 dan 2.

Daftar Pustaka

- Bavister, B.D., 1995. Culture of Preimplantation Embryos: Facts and Artifacts. In: Human Reproduction Update. Vol. 1(2). Oxford University Press. New York. p.91-148.
- Butler, M., 1996. *The Basic Animal Culture and Technology*. I.R.L. Press. New York.
- Byrd, S.R., G.F. Foxworth, A.A. Applewhite and M.E. Westhusin. 1997. *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology* 47: 857-864.
- Ciptadi, G., S. Djati, M. Fatchiyah, S. Wahyuningsih, N. Isnaini dan A. Sadiyah. 1999. Profil Transformasi Kromosom Oosit Kambing Peranakan Etawah Pada Sistem Kultur *In Vitro*. *Abstrak*. Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia, Forum Komunikasi Reproduksi, Malang.
- Djati, S. 1999. Pengaruh suplementasi PMMSG dan hCG Pada Proses Fertilisasi *In Vitro* dan Kultur Klon Embrio Sapi Dengan IGF-I. *Disertasi*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Djati, S., Fatchiyah, G. Ciptadi, N. Isnaini, S. Wahyuningsih, S. Rahayu dan L. Anggraini, 1999. Tingkat Transformasi Inti Oosit Kambing Pada Medium TCM199 dengan Berbagai Konsentrasi Estrus Goat Serum. *Abstrak*. Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia, Forum Komunikasi Reproduksi, Malang.
- Eckert, J. and H. Niemann, 1994. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.
- Fallon, M.N., C.G. Rammel and J.J.L. Hoogenboom, 1988. Amino acids in bovine sera. *N.Z. Vet. Journal* 36: 96-98.
- Funashi, H. and B.N. Day, 1993. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 98: 179-185.
- Gaspersz, V., 1994. *Metode Perancangan Percobaan*. Armico. Bandung.
- Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International. Ireland.
- Hillensjo, T., and C.P. Channing, 1980. Gonadotrophin stimulation of steroidogenesis and cellular dispersion in cultured porcine cumuli oophori. *Gamete Research* 3: 233-240.
- Keskintepi, L., G.M. Darwis, A.I. Younis and B.G. Brackett, 1994. *In vitro* development of morulae from immature caprine. *Zygote* 2: 97-102.

- Lorenzo, P.L., J.C. Illera, G. Silvan, M.J. Illera, C.J. Munro and M. Illera, 1997. Determination by EIA of progesteron and 17β -estradiol in culture medium from rabbit oocytes matured *in vitro* with epidermal growth factor. *Theriogenology* 47: 192.
- Lu, K.H and I. Gordon, 1987. Effect of Serum, Hormone and Cumulus Cells on the *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes. *Proceedings of the Society for the Study of Fertility (Abs.)*.p. 81.
- Lu, K.H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern, 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Res.* 121: 259-260.
- Pawshe, C.H., S.M. Totey and S.K. Jain, 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 42: 117-125.
- Rao, B.S., K.S. Naidu, D. Amarnoth, R. Vagdevi, A.S. Rao, K.V. Brahmaiah and V.H. Rao, 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Ruminant Research* 43: 31-36.
- Rusiyantono, Y., 2001. Pemakaian Medium CR1aa Untuk Produksi Embrio Kambing *In Vitro* dan Upaya Kriopreservasi Dengan Metode Vitrifikasi. *Desertasi*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Salustri, A., S. Petrungaro, M. DeFelici, M. Conti and G. Siracusa, 1985. Effect of follicle stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 33: 797-802.
- Sanbuissho, A., and W.R. Threlfall, 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31: 693-699.
- Sharma, G.T., A. Teotia and A.C. Majumdar, 2001. Meiotic competence of caprine oocytes during IVM on granulosa cell monolayers developed from small and large follicles in comparison to the granulosa cell coculture. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14 (6): 777-784.
- Toelihere, M.R, 1985. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. C.V. Angkasa. Bandung.
- Trounson, A and D.K.Gardner, 1993. *Handbook of In Vitro Fertilization*. CRC Press. London.
- Younis, A.I., B.G. Brackett and R.A.F. Hosken, 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 23: 189-201.