

Perbandingan Tingkat Kematangan Inti Oosit Sapi Pasca Maturasi *In Vitro* dengan Penambahan Serum Buatan 10 % dan *Fetal Bovine Serum* 10 %

(Comparison Nuclear Maturation of Bovine Oocyte after In Vitro Maturation Supplemented with 10% Home-made Serum and 10 % Fetal Bovine Serum)

Rini Widyastuti¹, Rangga Setiawan¹, Siti Darodjah Rasad¹

¹Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan, Departemen Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran

Email: widyastuti25@gmail.com

Abstrak

Serum merupakan salah satu suplemen yang diperlukan pada media untuk maturasi *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan tingkat kematangan inti oosit maturasi *in vitro* selama 24 jam dalam media maturasi yang ditambahkan serum buatan 10% dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. Oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dalam media *modified phosphate buffer saline*. Oosit yang digunakan adalah oosit yang masih dilapisi dua lapis sel kumulus dan mempunyai sitoplasma homogen. Oosit dikultur menggunakan media maturasi dalam inkubator CO₂ suhu 38⁰C dan CO₂ 5%. Setelah 24 jam oosit difiksasi untuk mengevaluasi tingkat kematangan inti. Hasil analisis menunjukkan bahwa tingkat kematangan inti oosit sapi yang dimaturasi secara *in vitro* dengan penambahan FBS 10% nyata lebih tinggi apabila dibandingkan dengan yang ditambahkan dengan serum buatan 10% (78,5% vs 62,5% ; $P < 0,05$)

Kata kunci: maturasi *in vitro*, tingkat kematangan inti, serum.

Abstract

Serum is one of the important component that supplemented to *in vitro* maturation media. The objective of the research was to investigate their meiotic competence or nuclear maturation of bovine oocytes matured *in vitro* in maturation media were added with home made serum 10% and Fetal Bovine serum (FBS) 10%. Oocytes were collected by slicing the ovaries in modified phosphate buffer saline. Selected cumulus-oocyte complexes (COCs) homogenous ooplasm were cultured in maturation medium at 38⁰C in humidified atmosphere of 5% CO₂ incubator. After 24 hours, oocytes stained for nuclear maturation's evaluation. The result showed that the proportion of oocytes at metaphase II was higher and significantly difference on oocytes that supplemented with Fetal Bovine Serum 10 % than supplemented with home- made serum 10% (78,5% vs 62,5% $P < 0,05$)

Keyword: *in vitro* maturation, nuclear maturation, serum.

Pendahuluan

Berdasarkan hasil sensus penduduk, laju pertumbuhan penduduk 1,5 persen per tahun sehingga kebutuhan daging sapi akan lebih dari 500.000 ton pada akhir 2019. Dalam rangka mendorong pertumbuhan ternak sapi baik dari segi kuantitas maupun kualitas maka diperlukan adanya suatu pendekatan yang inovatif yang mampu memberikan solusi pemenuhan permintaan produk peternakan yang tinggi dan

terus tumbuh dengan cepat. Revolusi serta inovasi ilmu pengetahuan dan teknologi (Iptek) terutama dalam bidang bioteknologi menjadi pilihan yang rasional dan diterima dengan baik di bidang peternakan. Salah satu inovasi bioteknologi di bidang peternakan adalah bioteknologi reproduksi yang meliputi: pengelolaan semen cair, pengolahan semen beku, sexing spermatozoa, pengelolaan oosit dan embrio. Penerapan teknologi reproduksi di

bidang peternakan akan mampu membantu meningkatkan populasi hewan, menjaga ketahanan genetik dan mampu meningkatkan produktivitas ternak dalam waktu yang cepat dengan kualitas maksimal. Dengan penerapan teknologi yang tepat, maka peternak dapat meningkatkan populasi dan kualitas ternak sehingga pemerintah dapat mengurangi kebutuhan impor produk pangan asal hewan dan mewujudkan ketahanan dan keamanan pangan nasional.

Salah satu metoda teknologi reproduksi yang rutin dilakukan di bidang peternakan adalah dengan teknologi transfer embrio. Teknologi ini meliputi serangkaian proses yang cukup kompleks yaitu: superovulasi betina, sinkronisasi estrus, produksi embrio secara *in vivo* maupun secara *in vitro* dan proses transfer embrio. Produksi embrio secara *in vitro* akan lebih efektif apabila dapat memanfaatkan ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH), namun demikian sebagian besar oosit yang diperoleh dari RPH masih berada pada tahap *metaphase I* (MI) dan tahap *Germinal Vesicle* (GV). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa oosit tersebut perlu dimatangkan secara *in vitro* hingga mencapai tahap Metafase II (MII) agar dapat difertilisasi dan berkembang lebih lanjut. Pada proses maturasi *invitro* diperlukan media pematangan yang mampu mendukung perkembangan oosit immature menjadi oosit matur yang siap untuk fertilisasi dan dapat berkembang ke tahap blastosis. Keberhasilan maturasi oosit secara *in vitro* sangat tergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro* (Hammam *et al.*, 2010), kualitas oosit yang digunakan (Lonergan *et al.*, 2003; Anguita *et al.*, 2007), serta resiko kontaminasi dan kondisi kultur (Sagirkaya *et al.*, 2007). Salah satu komponen media kultur yang paling krusial adalah penambahan serum. Selama ini, serum yang digunakan sebagai suplementasi untuk media kultur pada maturasi *in vitro* adalah *Bovine Serum Albumine* (BSA), *Fetal Calf Bovine Serum* (FBS) dan *Newborn Calf Bovine Serum* (NCBS). Semua jenis serum tersebut merupakan hasil dari industri dan harganya relative mahal (Wattimena,

2006). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji dan mengetahui pengaruh penambahan FBS dan serum buatan terhadap tingkat kematangan inti oosit sapi setelah maturasi *invitro*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan informasi mengenai sumber serum yang mudah diperoleh dan lebih ekonomis untuk media maturasi oosit secara *in vitro*.

Materi dan Metode

Materi yang digunakan

Ovarium diambil dari sapi yang diperoleh dari RPH setempat. Serum yang digunakan dibuat dengan mengambil darah yang berasal dari induk sapi. Darah diambil menggunakan *venojack* sebanyak 3 cc pada *vena jugularis* kemudian disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 5°C selama 1 jam. Darah kemudian disentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit, supernatant dibuang dan lakukan kembali sentrifugasi 1000 rpm selama 5 menit. Serum disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 5°C. Serum yang akan digunakan terlebih dahulu deaktivasi kitin.

Media yang Digunakan

Media koleksi ovarium adalah NaCl fisiologis ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml. Media koleksi oosit adalah *modified phosphate buffered saline* (mPBS). Media dasar yang digunakan untuk maturasi *in vitro* adalah (*Tissue Culture Media*) TCM 199 ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml dan *follicle stimulating hormone* (FSH (Sigma, USA) 0,01 mg/ml. Media maturasi dibedakan menjadi dua yaitu; (a) media dasar yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 %, Sigma, USA (b) media dasar yang disuplementasi dengan serum buatan yang telah disiapkan sebelumnya.

Koleksi ovarium dan koleksi Oosit

Ovarium sapi yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) lokal disimpan dalam termos dengan media koleksi (NaCl fisiologis) suhu 30-35°C. Ovarium dicuci dengan media koleksi, oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dan dicuci 3 kali, pencucian terakhir dengan media maturasi. Selanjutnya oosit dibagi menjadi dua bagian, kelompok pertama digunakan untuk

perlakuan maturasi dengan menggunakan media dasar yang disuplementasi dengan FBS 10% sedangkan kelompok oosit kedua digunakan untuk perlakuan maturasi menggunakan media dasar yang disuplementasi dengan serum buatan 10%. Hanya oosit dengan sitoplasma homogen yang digunakan sebagai penelitian.

Maturasi oosit

Oosit dicuci sebanyak 3 kali dengan media dPBS kemudian oosit dipindahkan ke dalam 100 μ L drop media maturasi yang dibuat pada petridish steril lalu ditutup dengan mineral oil. Setiap drop media maturasi berisi sekitar yaitu 10-15 oosit. Selanjutnya oosit diinkubasi selama 24 jam dalam incubator pada suhu 38,5°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%.

Evaluasi hasil maturasi

Evaluasi hasil maturasi oosit dengan metode pewarnaan aceto-orcein 2 %. Oosit yang telah dimaturasi, dilepaskan dari sel-sel cumulus yang mengelilinginya dengan menggunakan enzyme hyaluronidase 0,25 %. Oosit yang telah bebas dari sel cumulus diletakkan pada drop KCl 0.90% di atas kaca objek, lalu difiksir dengan kaca penutup yang memiliki bantalan paraffin dan vaselin (1 :9) pada keempat sudutnya. Kaca objek yang berisi oosit tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan ethanol (1:3) selama 3-4 hari. Satu jam sebelum diwarnai, kaca object yang berisi oosit direndam terlebih dahulu dalam larutan ethanol absolut. Setelah itu oosit diwarnai dengan pewarnaan aceto-orcein 2 % selama lima menit. Larutan pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi kaca penutup dilapisi cairan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi inti dengan menggunakan mikroskop fase kontras. Evaluasi tingkat kematangan inti yang diamati pada penelitian ini adalah dengan

cara menghitung jumlah oosit pada setiap pembelahan meiosis mulai dari *Germinal Vesicle*(GV), *Germinal Vesicle Break Down*(GVBD) Metafase I (MI) dan metafase-II (M-II).

Analisis data

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium. Perlakuan yang dicobakan adalah maturasi *in vitro* dengan menggunakan media dasar yang disuplementasi dengan FBS 10% dan maturasi *in vitro* dengan menggunakan media dasar yang disuplementasi dengan serum buatan 10%. Parameter yang diamati adalah: tingkat kematangan inti oosit yang terdiri dari tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), metafase-I (M-I) dan metafase-II (M-II). Data dianalisis dengan menggunakan *Chi-Square*.

Hasil dan Pembahasan

Maturasi *invitro* merupakan tahapan krusial pada fertilisasi secara *in vitro*, karena pada tahap ini oosit akan melanjutkan perkembangan sampai tahap metaphase II sehingga dapat difertilisasi dan mampu berkembang ke tahap lebih lanjut. Pada proses IVM diperlukan media pematangan yang tepat sehingga nutrisi dan komponen yang diperlukan untuk proses perkembangan oosit tersebut. Salah satu komponen utama yang diperlukan dalam media pematangan adalah serum. Serum mengandung beberapa komponen esensial seperti: protein, hormone, faktor-faktor yang mendukung pertumbuhan (*growth factor*) yang sangat diperlukan oosit pada proses maturasi, fertilisasi, maupun perkembangan embrio (Bavister, 1995). Hasil observasi tingkat kematangan inti oosit yang ditambahkan FBS 10 % dan serum buatan 10% dapat diamati pada Tabel 1 di bawah:

Tabel 1.Tingkat kematangan inti oosit sapi

Perlakuan	Tingkat Kematangan Inti (%)				
	jml oosit	GV	GVBD	M-I	M-II
Serum Buatan 10%	27	0,00 ± 0,00	7,50± 3,54 ^a	25,00 ± 7,07 ^c	62,50 ± 3,50 ^d
FBS 10%	46	0,00 ± 0,00	0,00± 0,00 ^b	21,50 ± 2,12 ^c	78,50 ± 2,12 ^e

GV: *Germinal Vesicle*, GVBD: *Germinal Vesicle Break Down*, M-I : Metafase I, M-II : Metafase II, TI : Tidak teridentifikasi. Huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0.05)

Oosit yang berada pada tahap MII merupakan sel yang telah matang dan siap untuk dilakukan fertilisasi. Berdasarkan tabel di atas, dapat diamati bahwa penambahan FBS 10 % pada media pematangan memberikan hasil yang lebih baik apabila dibandingkan dengan penambahan serum buatan 10% dan secara statistik berbeda nyata (78,5% vs 62,5 %). Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Sagirkaya *et al.* (2004) dan Abdel-Razik 2007 (76,8%) dalam Gabr 2012, yang menunjukkan efektivitas penggunaan 10% FCS jika dibandingkan dengan serum lain dan atau tanpa serum. Namun demikian, hasil yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah apabila dibandingkan hasil yang diperoleh Gabr 2012 (81,3%). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan media kultur yang digunakan.

Oosit yang berada pada tahap Metafase I, tidak berbeda nyata antara maturasi yang menggunakan FBS 10% dan serum buatan 10%. Selain itu pada penambahan serum buatan 10% di media maturasi, masih ditemukan oosit yang berada pada tahap GVBD. Hal ini kemungkinan ini menunjukkan bahwa FCS masih lebih efektif digunakan sebagai suplemen pada media maturasi apabila dibandingkan dengan serum buatan. Menurut Mao *et al.*, 2002 penggunaan FCS masih jauh lebih efektif untuk kultur folikel pre antral dan COC dibandingkan dengan serum yang berasal dari pre pubertas. Hal ini disebabkan karena FCS merupakan serum fetus sapi yang banyak mengandung zat yang dibutuhkan oleh oosit selama proses kultur *in vitro*. Mucci *et al.* (2006) menyatakan bahwa FCS dapat menyediakan substrat energi, asam amino, vitamin, growth factor dan antioksidan. Zat-zat tersebut merupakan zat yang bermanfaat selama proses kultur *in vitro*. *Fetal calf serum* juga

dapat bersifat sebagai *biosecurity* yang dapat menghambat resiko kontaminasi patogen selama kondisi kultur *in vitro* (Moore dan Bonilla, 2006).

Kesimpulan

Penambahan *Fetal Calf Serum* 10 % dalam media maturasi oosit, memberikan hasil yang lebih baik apabila dibandingkan dengan penambahan serum buatan 10 %.

Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melihat perbandingan tingkat perkembangan embrio secara *in vitro* pada media kultur yang menggunakan *Fetal Calf Serum* 10 % dengan serum buatan 10 %.

Daftar Pustaka

- Abd El-Razik, H.M. 2007. Factors affecting developmental competence of buffalo oocytes. M. Sc. Thesis, Faculty of Vet. Med., Suez Canal University, Egypt
- dalam Gabr, S.A. 2012. Effect of maturation media with hormonal supplement on *in vitro* maturation of buffalo oocytes with different qualities. *Egyptian J. Anim. Prod.* 49:1-10
- Anguita, B., L. Vandaele., B. Mateusen., D. Maes and A. Van Soom. 2007. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*.67: 37-49.
- Bavister, B.D. 1995. Culture of Preimplantation Embryo: Fact and Artifact. *Hum. Rep. Update* 1(2): -98-148.
- Gabr, S.A. 2012. Effect of maturation media with hormonal supplement on *in vitro* maturation of buffalo oocytes with

- different qualities. *Egyptian J. Anim. Prod.* 49:1-10
- Hammam, A. M., C. S. Whisnant, A. Elias., S. M. Zaabel., A. O. Hegab and E. M. Abu-El Naga. 2010. Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffallos (*bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 27-31.
- Lonergan, P., D. Rizos, A. G. Adan, T. Fair and M. T. Boland. 2003. Oocyte and embryo quality: affect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 59-67.
- Mao, J., Wu, G., Smith, MF., McCauley, TC., Cantley, TC., Prather, RS., Didion, BA., Day, BN. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. 2002. *Biology of Reproduction*. 67: 1197–1203.
- Mucci, N. J. A., G. G. Kaiser., F. Hozbor., J. Cabodevila and R. H. Alberio. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 65: 15-26.
- Moore, K and A. Q. Bonilla. 2006. Cryopreservation of mammalian embryo. *Biomed. Sci.* 8: 19-32.
- Sagirkaya, H., M. Yaúmur, Z. Nur and M. K. Soylu. 2004. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the *in vitro* maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *Vet. Anim. Sci.* 28: 779-784.
- Wattimena, J., Tagama., T.R., Hadisusanto, B. 2006. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Serum terhadap Maturasi Oosit Domba In Vitro. *Animal Production*. 8(2):94-99.
- Sagirkaya, H., M. Misirlioglu., A. Kaya, N. L. First., J. J. Parrish and E. Memili. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Wu ,J., Emery., B.R and Carrell., DT. 2001. In Vitro Growth, Maturation, Fertilization, and Embryonic Development of Oocytes from Porcine Preantral Follicles. *Biol of Reprod.* 64: 375–381