

REVIEW FISIBILITAS KULTUR ANTHRAL FOLIKEL SEBAGAI SUMBER SEL OOSIT *IN VITRO* KAMBING DARI PRODUK SAMPING RUMAH POTONG HEWAN

*Ciptadi, G. , **Budi Siswanto , ***Sri Rahayu , ****M. Z.Fadli dan ****N. Humaidah***

* Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan UB, Malang
, **Fak. Kedokteran RSSA-Syaiful Anwar, Malang '*** Fakultas MIPA-Biologi UB, ****.Fakultas Peternakan UNISMA, Malang.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ketersediaan sumber sel gamet betina (oosit) *immature* kambing yang diperoleh dari rumah potong hewan yang dapat dimanfaatkan untuk *in vitro* maturasi (IVM). Isolasi oosit *immature* menggunakan preantral folikel untuk selanjutnya dilakukan kultur *in vitro* folikel dan kemudian dievaluasi perolehan ovari, folikel dan perkembangan oosit *in vitro*..

Metode Penelitian adalah percobaan laboratorium. Materi yang digunakan adalah folikel yang diisolasi dari ovarium yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kambing. Perlakuan adalah P0: kultur folikel kambing pra pubertas medium TCM199 tanpa +FSH, P1: kultur folikel kambing pra pubertas , medium TCM 199 + FSH. P2: folikel kambing dewasa , TCM 199 tanpa suplementasi FSH.dan P3: folikel kambing dewasa , TCM 199 + suplementasi FSH. Variabel yang diamati adalah; (1) perolehan jumlah ovarium/hari, (2) jumlah folikel terisolasi/ovarium dan % kebergasilan oosit yang mature.

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa rata-rata perolehan rata-rata per ovary pada pra pubertas adalah 4.32 ± 0.54 sedangkan pada kelompok kambing dewasa adalah 5.19 ± 1.99 . Nilai perolehan folikel masing-masing kelompok umur adalah pra pubertas $21.00 + 7.14$ sedangkan dewasa kelamin adalah $42.29 + 5.77$. Kesimpulan sistem kultur folikel *in vitro* merupakan system yang sangat rumit, dengan problem paling besar adalah masalah kontaminasi sel, mengingat waktu kultur yang sangat lama. Disarankan perlu dilakukan penelitian-penelitian pendahuluan untuk optimasi sistem kultur dan masih diperlukan pencarian medium dan suplemen hormonal yang lebih sesuai untuk kultur folikel ternak kambing lokal.

Kata-kata Kunci: Oosit, Maturasi *in vitro* (IVM), Preantral folikel, kambing.

THE FEASIBILITY OF PREANTHRAL FOLICLE CULTURE SYSTEM AS AN ALTERNATIVE SOURCE OF GOAT OOCYTES MATURED IN VITRO

ABSTRACT

The culture system of antral follicles may provides the means not only of how producing a number of competence oocytes but also of investigating the physiology of follicular development and ovulation. Different culture systems have been developed. The cultured of isolated antral follicle may produce many fertile oocytes in the possible high numbers .

The aim of this research is to study and develop a reliable follicle culture system of goat. In vitro follicle culture system was used in this research. Research was focused in antral follicle on oocyte potential and producing using in vitro system of goat follicle ovary isolated from local slaughtered house. The mammalian ovary contains a huge number of small follicle of various sizes.

The research was conducted using experimental methods with 3 kind of treatment : P1. In vitro culture (IVC) system using pre pubertal goat follicle with FSH supplementation in culture medium P2. (IVC system using pre pubertal goat, F3. IVG system using pre sex matures goat with FSH supplementation in culture medium and P4 , IVG system using matured goat.

The result showed that different age of goat (pre puberty and sex matured goat resulted in different potential of follicle isolated. for each ovary (4.32 vs. 5.19). with Total Follicle isolated from each group of ages were 21.00 ± 7.14 and 42.29 ± 5.77 . IVG. The main problem of IVG system is contamination during isolation and culture cells. It was concluded that IVG culture system was very complex method and result in low potential of oocyte resources

.Key words: Oocyte, In vitro Maturation, antral follicle, Goat.

PENDAHULUAN

Prospek dari pengembangan sistem kultur *in vitro*, khususnya sel gamet sangat besar. Teknik ini akan banyak mengatasi permasalahan-permasalahan fertilitas pada manusia dan hewan yang menghadapi problem infertilitas. Disisi lain, teknologi ini juga memungkinkan dikembangkannya kriopreservasi atau simpan beku sel gamet. Selama ini beberapa teknologi bantu seperti *In vitro maturasi* (IVM) oosit, *In vitro fertilisasi* (IVF) dan embrio transfer yang berbasis pada sistem kultur sel *in vitro*, telah banyak dikembangkan dan berhasil diaplikasikan dengan hasil yang cukup memuaskan.

Kultur *preantral* folikel merupakan metode kultur yang sedang banyak dikembangkan akhir-akhir ini di berbagai laboratorium reproduksi di beberapa negara maju. Metode yang dikembangkan ini dipandang akan mampu menyediakan sumber oosit yang relatif seragam dalam kompetensi

perkembangan oosit dan ovulasi . Berbagai sistem kultur telah dikembangkan pada beberapa spesies seperti mencit (Smitz and Cortvrint (2002), Bisonga *et al*, (2001), Nayudu and Osbon (1992) dan hewan domestik (Miyano, 2005).

Preantral folikel juga telah dilakukan kriopreservasi baik sebelum atau sesudah isolasi dari *stroma cell* yang mengelilinginya, dan kemudian dilakukan kultur *in vitro* agar mencapai ovulasi dan akhirnya mempunyai kemampuan fertilisasi (Ceconi, 2002). Metode kultur sel folikel ini sangat bermanfaat dalam memahami mekanisme folikulogenesis, pertumbuhan oosit, dan disfungsi ovarium (Bisonga *et al*, 2001). Oogenesis pada mamalia mempunyai tujuan utama untuk memproduksi oosit yang bisa difertilisasi. Pada ovarium lebih dari 99 % oosit mengalami proses degenerasi yang dikenal sebagai atresia. Pada umumnya untuk bisa menghasilkan kebuntingan yang

normal, oosit harus mampu berkembang untuk memenuhi persyaratan dasar yaitu terjadinya meiosis lengkap hingga mencapai metafase 2 (maturasi inti), mampu fertilisasi dan embriogenesis (Cecconi, 2002).

Sumber oosit mamalia yang digunakan untuk kultur produksi embrio *in vitro* selama ini diperoleh dari aspirasi *ovum pick up* (OPU) pada individu yang telah di superovulasi secara hormonal dan kemudian dipanen oosit yang telah mengalami ovulasi. Sumber lain adalah melakukan kultur *in vitro* maturasi dari *immature* oosit yang diperoleh dari aspirasi dari antral folikel. Kedua jenis metode ini mempunyai keterbatasan dalam hal jumlah oosit yang diperoleh untuk keperluan produksi embrio. Bahkan pada perlakuan superovulasi (*in vivo*) bisa menyebabkan resiko *hyperstimulation* yang akan menyebabkan kerugian ekonomis.

Kultur preantral folikel, jumlahnya jauh lebih banyak dan selama ini belum banyak dieksploitasi sebagai sumber oosit yang sangat potensial secara *in vitro*. Permasalahan yang ada adalah bahwa karena ukuran diameternya yang masih sangat kecil dan folikel ini belum mempunyai kompetensi untuk terjadinya fertilisasi, maka perlu dilakukan kultur *in vitro* sampai mencapai metafase-II (mature) agar bisa digunakan dalam fertilisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui *survival rate*, perkembangan dan kompetensi dari oosit yang diperoleh dari kultur *in vitro* preantral folikel yang merupakan sumber sangat potensial sebagai sumber sel gamet betina serta bermanfaat untuk sebagai sarana

penelitian untuk memperoleh data bagi keperluan memahami mekanisme dasar dari oogenesis/folliculogenesis dalam ovarium.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Lokasi dan Materi Penelitian.

Penelitian akan dilaksanakan di laboratorium sentral ilmu hayati UB (LSIH-UB). Materi yang digunakan adalah antral folikel yang diisolasi dari ovarium yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kambing Sukun” Malang. Kambing yang diambil adalah kambing betina kelompok dewasa kelamin dan kelompok Prapubertas, berdasarkan umur yang dilihat dari pergantian gigi. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam termos air hangat 38 °C, maksimal 3 jam setelah dilakukan pembedahan hewan.

Metode Percobaan

Metode Isolasi dan Kultur Folikel

Ovarium yang diperoleh dari RPH dilakukan pencucian 3 kali dalam PBS – Phosfat buffer Saline + Antibiotik Gentamisin. Isolasi preantral folikel mengacu pada Adam *et al* (2004); Miyano and Hirao (2003). Preantral folikel diisolasi secara mekanis dengan melakukan *microdissection* mekanik dengan menggunakan jarum 26-G dengan spuit 1-ml atau dilakukan pencincangan dengan menggunakan pisau operasi. Folikel yang diperoleh dilakukan seleksi berdasarkan ukuran folikelnya, yaitu 150 – 200 um dengan kenampakan morfologi yang normal. Folikel dikategorikan dalam dua kelompok ukuran yaitu : (besar 175 – 200 um dan kecil (150 – 174 um).

Folikel dilakukan kultur secara individual didalam drop medium kultur 25 ul yang dikover dengan parrafin oil (Merck) dalam 35 mm palstik dish (Falcon). Medium yang digunakan adalah Minimal Essential Medium (Gibco) yang disuplementasi dengan 5 % Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma) dan 50 ug/ml gentamysin sulfat. Kultur dilakukan pada inkubator CO₂ 5 % pada kelembaban maksium dan suhu 38 °C. Penggantian medium kultur dilakukan setiap 24 jam, dengan memindahkan folikel ke dalam drop medium yang baru. Induksi ovulasi in vitro dilakukan pada akhir kultur dengan memindahkan folikel dalam medium kultur tang mengandung 5 IU/ml hCG. Setelah 15 jam inkubasi, maka folikel dilakukan pengamatan terjadinya folikel yang mengalami ruptur, oosit yang mengalami maturasi (metafase –II).

Perlakuan Percobaan dan Variable Pengamatan.

Perlakuan percobaan adalah:

Po: folikel kambing **pra-pubertas** , dikultur dalam TCM199 + tanpa FSH.

P1: folikel kambing **pra-pubertas** , dikultur dalam medium TCM199 + FSH

P2: folikel diperoleh dari kambing dewasa dikultur dalam medium dasar TCM199 + tanpa FSH

P3: folikel kambing dewasa. dikultur dalam medium TCM199 + FSH

Data ditabulasikan dalam nilai rataaan dan standart deviasi dari masing masing 10 kali ulangan dan dianalisis secara .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Potensi Pemanfaatan anthral Folikel

Potensi penggunaan preantral folikel selama hidup individu/ spesies ini bisa dilihat dari tabel berikut ini Tabel 1. Pada masing-masing spesies ini hanya sebagai kecil saja yang mampu tumbuh, mengalami maturasi dan diovulasikan sebelum terjadinya suatu fertilisasi secara alamiah.

Tabel.1. Jumlah folikel ovarium pada beberapa spesies hewan dan manusia (Miyano, 2005)

No	Spesies	Jumlah primordial folikel	Jumlah folikel yang mampu berkembang
1	Mencit	4.270	676
2	Domba	195.450	475
3	Sapi	120.000	300
4.	Babi	420.000	84.000
5	Manusia	302.000	12.090

Percobaan awal pada ternak kambing pada berbagai kelompok umur menunjukkan variasi jumlah folikel yang diperoleh berdasarkan

pada kelompok umur ternak kambing sebagaimana disajikan pada Tabel 2.. Metode Isolasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolasi dengan

melakukan pencacahan ovary yang telah dipebrihkan dari jaringan ikat disekitarnya dan di lakukan pencucian dalam PBS beberapa kali (3 kali) untuk memperkecil kemungkinan kontaminasi pada saat kultur.

Pada ternak kambing isolasi pada hewan pra pubertas lebih rumit dilakukan mengingat ukuran ovary yang lebih kecil dari kambing dewasa yaitu rata-rata 0.8 x 1.5 cm. Dibandingkan dengan dewasa 3.0 x 1.4 cm.

Tabel 2. Jumlah folikel yang diperoleh dari isolasi ovary ternak kambing pada kelompok umur prapubertas dan dewasa kelamin

Isolasi ke:	Jumlah Ovary (n)		Jumlah folikel (n)	
	Pra pubertas	Dewasa	Pra pubertas	Dewasa
1	5	6	14	37
2	4	4	20	36
3	8	10	32	50
4	4	8	12	38
5	6	10	24	41
6	3	8	18	49
7	4	11	27	45
Jumlah	34	57	147	296
Rataan/ kelmp. Umur + SD	4.86 + 1.68	8.14 ± 2.48	21.00 ± 7.14	42.29 ± 5.77
Rataan folikel /ovary	-	-	4.32	5.19

Jika dihitung berdasarkan kelompok umur, maka rata-rata perolehan rata-rata per ovary pada pra pubertas adalah 4.32 sedangkan pada kelompok kambing dewasa adalah 5.19. Nilai yang diperoleh ini sebenarnya akan lebih tinggi lagi mengingat bahwa ada kelemahan isolasi folikel menggunakan pembedahan (pencacahan) dengan pisau operasi (scalpel), yaitu dalam proses isolasi atau pembersihan dari jaringan yang melekat, maka folikel sering mengalami pecah sehingga tak

bisa digunakan dalam proses kultur selanjutnya.

5.2. Sistem Kultur Folikel Ternak

Pada ternak penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa oosit yang dihasilkan dari IVG telah dibuktikan mempunyai kompetensi untuk mencapai maturasi dan fertilisasi secara in vitro (IVM dan IVF). Sebagaimana disajikan pada Tabel 3. Tabel 3. Kompetensi IVG system pada hewan mamalia (Miyano, 2005). yang dilaporkan mampu mencapai hasil yang baik untuk IVM dan IVF.

Spesies	Jumlah Oosit (n)	Fase folikel	Diameter oosit (u)	Lama kultur (hari)/ matriks
Babi	27	Preantral	70 – 90	(16) collagen gen
Sapi (1999)	35	Early antral	90 – 99	(14) collagen gen
Sapi (2004)	36	Early antral	90 – 99	(14) collagen

Hasil percobaan penelitian ini pada kambing masih menghadapi kesulitan yang sangat tinggi, terutama disebabkan oleh waktu kultur yang sangat lama, sehingga menimbulkan munculnya problem kontaminasi kultur

yang sangat tinggi. Kejadian kontaminasi ini sangat sulit untuk dicari sebabnya, meskipun kultur telah dilakukan secara standart kerja laboratorium steril (Tabel 4)

Tabel. 4. Frekuensi kejadian kontaminasi pada sistem kultur in vitro folikel kambing

Perlakuan (n)	prapubertas (Jumlah kultur kontaminasi/total = %)	dewasa kelamin (Jumlah kultur kontaminasi/total= %)	Rataan dari total (%)
Prapubertas+FSH	8/10 = 80.00	7/9 = 77.78	78.89
Pra pubertas	6/7 = 85.71	4/6 = 66 .66	76.18
Dewasa +FSH	6/8 = 75.00	8/9 = 88.88	81.90
Dewasa	8/9 = 88.88	7/8 = 87.50	88.19
Rataan dari total	82.39	80.20	81.29

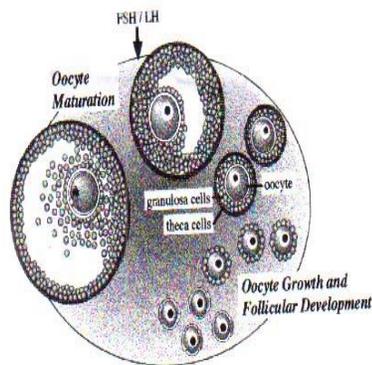
Permasalahan besar yang dihadapi penelitian ini adalah masih sangat tingginya frekuensi kejadian kultur sel yang mengalami kontaminasi yaitu sebesar 81.29 %. Hal ini juga ditambah bahwa sel yang tak terkontaminasi setelah dievaluasi perkembangan kemampuan maturasi secara IVM masih sangat rendah yaitu 2 sel / 20 sel oosit (2 drop) yang menunjukkan mencapai M-II, berdasarkan pada perkembangan ekspansi kumulus. Ada beberapa sel yang kemudian setelah di

kultur mengalami gundul, dengan faktor penyebab yang belum diketahui (Tabel 5).

Salah satu penyebab yang diduga akan rendahnya hasil yang diperoleh mungkin juga bahwa sistem kultur yang dikembangkan belum optimal, terutama pada suplementasi aditif hormonal. Padahal, bahkan secara in vivo, peran hormon FSH atau LH ini sangat penting terhadap perkembangan folikel dan kualitas oosit yang dihasilkan (Miyano dan Hirao, 2003). Gambar 1.

Table 5. Kualitas oosit hasil kultur folikel melalui Invitro growth Culture System (IVG) , pada perlakuan suplementasi konsentrasi FBS (Ciptadi, 2010).

Perlakuan	Jumlah total Oosit	Kualitas oosit (% , <i>Expanded comulus</i>)		
		KW. 2 Berkembang bagus	KW.1 Kurang berkembang	KW.0 Tidak berkembang/gundul
0 % FBS	180	5 (0.02)	85	90
5 % FBS	165	15 (0.09)	80	70
10 % FBS	152	17 (0.11)	80	55



Gambar 1. Skema deskripsi pertumbuhan oosit dan sel folikel mamalia dalam ovarium yang menunjukkan peran dari hormon FSH/LH.

KESIMPULAN DAN SARAN

Rataan perolehan hasil isolasi sel folikel kambing pada masing-masing kelompok umur adalah pra pubertas: 4.32 buah dan dewasa kelamin 5.19 buah . Sistem kultur IVG merupakan system yang sangat rumit, dengan problem paling besar adalah masalah kontaminasi sel, mengingat waktu kultur yang sangat lama. Potensi kultur IVG cukup bagus , namun masih menghadapi hambatan problem kontaminasi yang tinggi

Saran dari hasil penelitian adalah bahwa perlu dilakukan penelitian-penelitian pendahuluan untuk optimasi sistem kultur sel dengan IVG. 2. Masih diperlukan pencarian medium dan suplemenantasi hormonal yang lebih sesuai untuk kultur IVG.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, AAG, Y. Takahashi, S. Katagiri and M Nagano. 2004. In vitro culture of mouse preantral folikel using membrane inserts and developmental competence of in vitro ovulated oocytes. J. of Reproduction and Development Vol. 50: 579 – 586.
- Bishonga C, Y, Takahashi, S. Katagiri, M Nagano and A.Ishikhawa. 2001. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocys stage. Journal veterinairy Medicine Sciences Vol 63: 619 – 624.
- Boland NI, PG Hunperson, HJ leese and RG Gosden. 1993. Pattern of lactat production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian

- follicles in vitro. *J. Biol Reprod* Vol 48: 798 – 806.
- Ciptadi. 2010. The Quality of Oocyte resulted from IVG culture system of Indonesia Local Cattle .. Paper 3 AAAP Pingtung Taiwan .
- Cecconi,S. 2002. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 48: 431 – 445.
- Izquierdo, D., P Villamediana, M. Lopez-Bejar, and MT Paramio. 2002. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Journal of Theriogenology* 57: 1431 – 1441.
- Miyano, T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 51: 169 – 176..
- Miyano, T. and Y. Hirao. 2003. In vitro growth of oocytes from domestic species. *Journal mammalian Ova Research* Vol 20 : 78 – 85.
- Nuyudu,PL, and SM Osborn. 1992. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicle in vitro. *Journal reprod Fertil* Vol 95: 349 – 362.
- Smitz JEJ, and RG. Cortvindt. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *J. Reproduction* 123: 185 – 202.