

## EFEKTIFITAS PENAMBAHAN HORMON GONADOTROPHIN PADA MEDIUM MATURASI mSOF TERHADAP TINGKAT MATURASI OOSIT

Ciptadi G.<sup>1</sup>, T. Susilawati<sup>1</sup>, B. Siswanto<sup>2</sup> dan Helly N. Karima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, <sup>2</sup>. Fakultas kedokteran UB/RSSA, Malang, <sup>3</sup>. Lab. Sentral Ilmu Hayati (LSIH-UB)

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas suplementasi hormon gonadotrophin pada medium kultur maturasi sel terhadap tingkat pematangan oosit kambing secara *in vitro*. Materi yang digunakan adalah oosit kambing immature, FBS (GIBCO), NaCL Fisiologis 0,9%, mSOF, FSH, LH, hCG, PMSG (Intervet) *Streptomycin*, *Penicillin* (Meiji). Oosit kambing diperoleh dengan aspirasi ovarium kambing dari RPH Sukun – Malang. Ovarium dibawa dalam termos suhu 38 °C, diaspirasi folikel berdiameter 2 – 6 mm. Evaluasi didasarkan ekspansi cumullus oophorus dan keberadaan first polar body. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan dilanjutkan dengan uji BNT, pada masing-masing perlakuan penambahan hormon. Hasil menunjukkan bahwa tingkat maturasi oosit kambing berdasarkan pengamatan ekspansi cumullus oophorus adalah 54% (FSH + LH) dan 44% (PMSG + hCG). Tidak ada pengaruh penambahan hormon yang berbeda terhadap tingkat maturasi. Tingkat maturasi berdasarkan *first polar body* adalah 64,5% (FSH + LH) dan 68 % (PMSG + hCG). Hasil analisa statistika tidak menunjukkan pengaruh penambahan hormon yang berbeda. Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan hormon FSH + LH dan PMSG + hCG tidak berbeda nyata. Disarankan menambahkan hormon PMSG + hCG untuk maturasi *in vitro* pada medium mSOF karena harga hormon tersebut lebih murah dan perlu dilakukan mengenai ukuran penambahan dosis hormon yang sesuai.

**Kata Kunci:** medium m SOF, IVM, Gonadotrophin, Oosit, Kambing

### THE EFFICIENCY OF GONADOTROPHIN SUPPLEMENTATION OF MSOF MEDIUM ON THE MATURATION RATE OF IMMATURE OOCYTE IN VITRO.

#### ABSTRACT

The aims of the research is to study effectivity of gonadotrophin supplementation on maturation rate of immature oocyte of goat *in vitro*. Immature oocyte was isolated from 2-6 mm diameter of follicles. Medium stock was supplemented with different treatment of Gonadotrophin : mSOF, FSH, LH, hCG (Intervet), PMSG (Intervet) *Streptomycin* (Meiji), *Penicillin* (Meiji), Maturation rate was evaluated base on the cumulus oocyte expansion and first polar body extraction. Result showed that there are no significant effect of hormonal supplementation on mSOF medium, with cumulus expansion of 54% (FSH + LH) dan 44% (PMSG + hCG). Meanwhile base on extraction of *first polar body* was 64,5% (FSH + LH) dan 68 % (PMSG + hCG). It was concluded that hormonal treatment resulted in not different effect to maturation rate .

Suggested to, for practical purposes, using PMSG + hCG for IVM for the reason of in expensive and feasibility of hormone.

**Key words:** medium m SOF, IVM, Gonadotrophin, Oosit, Goat

## **PENDAHULUAN**

Fertilisasi normal bisa terjadi dengan menggunakan ovum yang siap untuk dibuahi. Ovum yang belum matang bisa dipergunakan untuk fertilisasi dengan mematangkannya terlebih dahulu secara external (metafase II) atau hal ini sering disebut dengan In vitro maturation. Perubahan morfologi Oosit meliputi germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metafase I, dan Metafase II. Pada tahap GV ooplasma dipisahkan oleh membran inti yang jelas, perkembangan metafase I kromosom berjajar dibidang equator siap untuk membelah dan kromosom memisah kearah kutub – kutub yang berlawanan yang disebut anafase I, telofase I, setelah itu kromosom mengalami metafase II saat ini kromosom berjajar pada bidang equator dan terbentuklah *first polar body* (Yadav *et al.* 1997).

Proses pematangan oosit(ovum) secara invitro ditandai dengan adanya *cumulus oophorus* yang mengelilingi oosit (Goto, *etal.* 1995). Spermatozoa yang telah berkapasitasi tidak bisa membuahi ovum yang belum matang dan penetrasi spermatozoa ke dalam ovum akan menghasilkan fertilisasi abnormal. Untuk keperluan riset dan pengembangan serta optimalisasi sumber genetik dari sisi ternak betinamaka immature oosit yang merupakan produk sampingan dari RPH bisa dilakukan isolasi dan pematangan secara in vitro,

menggunakan berbagai medium kultur.

Suplementasi hormon dalam medium IVM misalnya FSH dan LH, atau PMSG dan hCG tidak bermanfaat bagi embrio tetapi bermanfaat bagi ekspansi *cumulus oophorus*. Pemberian hormon ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas oosit, dan hal ini tergantung pada jenis hormonnya. Hormon yang berbeda akan memberikan efek yang berbeda pula.

## **MATERI DAN METODE**

### **Materi Penelitian**

Materi penelitian yang digunakan adalah oosit kambing *immature* yang diperoleh dengan melakukan aspirasi ovarium kambing yang diambil dari RPH Sukun Malang, FBS (GIBCO BRI), NaCL Fisiologis 0,9% (Merck), mSOF, FSH, LH, hCG (Intervet), PMSG (Intervet), *Streptomycin* (Meiji) *Paraffin oil* (Merck).

### **Metode Penelitian**

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan dengan pengambilan sampel secara acak yang terdiri dari dua perlakuan penambahan hormon masing masing adalah FSH + LH + dan PMSG +hCG dan satu perlakuan tanpa penambahan hormon yang digunakan sebagai kontrol. Masing masing 5 ulangan. Analisa data menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan

uji BNT dan dianalisa dalam bentuk persentase. Perlakuan yang dicobakan :

1. mSOF 10 ml + 10 FBS + PMSG 10 IU + hCG 10 IU
2. mSOF 10 ml + 10 FBS + FSH 10 ul + LH 10 IU
3. mSOF 10 ml + 10 FBS (kontrol)

### **Tahap Pelaksanaan Penelitian**

Ovarium yang diperoleh dari RPH dibawa laboratorium dengan dimasukan dalam larutan NaCL fisiologis yang telah ditambah dengan antibiotik, kemudian dibersihkan dari jaringan lemak yang melekat. Dimasukan ke dalam NaCL fisiologis yang telah ditempatkan didalam *water bath* dengan suhu 38 C. Pemanenan Oosi, Ovarium ditempatkan didalam *water bath* 38 C sambil dilakukan aspirasi. Pencucian Oosit , hasil aspirasi didalam tabung diendapkan selama 10 menit kemudian bagian atas dibuang, ditambah lagi dengan sedikit *wasing medium*, diendapkan selama 10 menit, bagian atasnya dibuang dan sisa dituangkan ke dalam cawan petri.

Pemilihan oosit dilakukan dibawah mikroskop *inverted*. Oosit yang dimaturasi adalah oosit kualitas A saja yaitu oosit yang dikelilingi oleh multilayer sel folikel baik sel *cumullus oophorus* maupun sel *corona radiata* yang kompak. Menurut Greeve and Madison (1993) kualitas oosit *immature* didasarkan atas penilaian visual dari kekompakan sel folikel dan diklasifikasikan menjadi tiga kategori yaitu : (1) kualitas A, oosit yang dikelilingi oleh *multilayer* sel folikel, baik *cunulus oophorus* atau *coorona radiata* yang kompak, (2) kualitas B, oosit hanya dikelilingi oleh multilayer sel folikel *corona radiata* yang kompak sedangkan *cumulus oophorus* yang

mengelilinginya kurang kompak, (3) kualitas C, oosit dengan *multilayer* sel folikel, baik sel *corona radiata* maupun sel *cumulus oophorus* yang kurang kompak..

Pengambilan oosit dengan pipet *pasteur*, oosit dipindah ke medium maturasi yang telah diinkubasi minimal 2 jam sebelumnya, kemudian diinkubasi dengan kadar CO<sub>2</sub> 5 %, suhu 38 C selama 24 jam. Evaluasi Keberhasilan Maturasi Oosit secara *In vitro*. Oosit yang telah dimaturasi diamati perkembangan *cumullus oophorus*nya. Keberhasilan maturasi oosit yang dikultur secara *in vitro* diketahui dari perkembangan *cumullus oophorus* yang mengelilinginya. Morfologi perkembangan *cumullus oophorus* terdiri atas tiga tingkat, yaitu: tingkat 0 dengan tingkat kualitas *cumullus oophorus* tidak berkembang sama sekali, tingkat 1 dengan kualitas *cumullus oophorus* mengembang, tingkat2 dengan kualitas *cumullus oophorus* mengembang seluruhnya. Setelah diamati ekspansi *cumullus oophorus* maka dilanjutkan dengan pengamatan keberadaan *first polar body* dengan cara menggunduli oosit terlebih dahulu secara mekanis yaitu dengan cara pipeting berulang-ulang pada oosit dengan *cumullus oophorus*.

### **Analisis Data**

Analisa data untuk uji tingkat maturasi oosit pada perlakuan penambahan hormon yang berbeda (FSH, LH, PMSG, dan hCG) pada medium maturasi (mSOF) dilakukan dengan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan apabila terdapat perbedaan dilanjutkan BNT (Sumarto, 1991).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**  
**Evaluasi Maturasi Terhadap**  
**Ekspansi *Cumullus Oophorus***

Setelah mengalami proses maturasi *in vitro* maka dilakukan evaluasi keberhasilan maturasi terhadap

oosit berdasarkan ekspansi sel *cumullus oophorus*. Berikut tabel persentase maturasi oosit berdasarkan perkembangan *cumullus oophorus (cumullus oocyte complex)* (Tabel 1.).

Tabel 1. Persentase maturasi oosit didasarkan pada ekspansi *cumullus oophorus*

Perlakuan	Tingkat Maturasi			
	$\sum$ Oosit	Grade 0	Grade I	Grade 2
mSOF + 10 % FBS + PMSG 10 IU + hCG 10 IU	50	24 %	32 %	44 %
mSOF + 10 % FBS + FSH 10 ul + LH 10 IU	50	10 %	36 %	54 %
mSOF + 10 % FBS (kontrol)	50	40 %	40 %	20 %

Perlakuan kontrol persentase maturasi yang dicapai termasuk rendah yaitu 20 % bila di dibandingkan dengan tingkat maturasioosit sapi pada medium TCM 199 dengan perlakuan yang sama (tanpa penambahan hormon) sebesar 74 % (Susilawati, dkk. 2000). Rendahnya tingkat maturasi yang dicapai oleh perlakuan kontrol kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adanya glukosa yang berlebihan sehingga mengakibatkan adanya akumulasi asam yang menyebabkan terganggunya kestabilan pH medium sehingga hal ini pada akhirnya akan mengakibatkan terganggunya metaolisme oosit dan mengganggu perkembangan *cumullus oophorus* (Malole, 1990), sedangkan menurut Freshney (1987) faktor lain yang turut mempengaruhi adalah bahwa dalam medium TCM 199 terdapat asam amino yang berfungsi membantu menginduksi perkembangan sel (*cumullus oophorus*) sehingga dengan adanya asam amino pada medium TCM 199 ini sel *cumullus*

*oophorus* akan terinduksi dan terekspansi.

Penambahan hormon FSH + LH dan PMSG + hCG pada medium mSOF menunjukkan peningkatan ( $F_{hitung} > F_{0,05}$ ) terhadap tingkat maturasi oosit kambing dari segi ekspansi sel *cumullus oophorus* masing-masing sebesar 54% dan 44%. Pemilihan ekspansi *cumullus oophorus* sebagai indikator keberhasilan maturasi sesuai dengan pendapat Goto *et al.*(1995) yang menyatakan bahwa proses maturasi *in vitro* ditandai dengan adanya ekspansi *cumullus oophorus* yang mengelilingi oosit. Hal ini berkaitan dengan fungsi *cumullus oophorus* dalam merespon rangsangan *endocrine* dan fungsi sebagai fasilitas untuk memproduksi zat zat nutrisi yang dibawa ke oosit dan mengontrol serta mengatur metabolisme oosit yang pada gilirannya berperan dalam maturasi inti dan sitoplasma (Greeve and Madison, 1993), selanjutnya Mc Donald and Pineda (1989) menyatakan bahwa FSH dan LH sebahagi *endocrine*

golongan *gonadotrophin* merupakan hormon *glycoprotein*. FSH bersama dengan *growth factor* dapat merangsang *cumulus oophorus* untuk memproduksi dan mensekresikan asam *hyaluronic* yang akan mendispersikan sel yang mana proses ini disebut ekspansi atau mucifikasi (Gordon, 1994), lebih lanjut Kennedy, *et al* (1994) dalam Wahyuningsih, dkk (2000) dan Cole and Cupps (1977) menyatakan bahwa LH dapat melengkapi aksi FSH dalam meangsang perkembangan folikel, sel granulosa dan sel *theca* sehingga sekresi estrogen menjadi meningkat, yang akan turut merangsang maturasi oosit.

Selain fungsi diatas Susilawati, dkk (2000) berpendapat bahwa penambahan FSH, LH atau kombinasinya akan memperlancar spermatozoa dalam memfertilisasi ovum. Hal ini dikarenakan dengan terjadinya ekspansi *cumulus oophorus* turut menghasilkan asam hyaluronic yang dapat dilarutkan enzim hyaluronidase yang terkandung dalam spermatozoa, selain itu adanya ekspansi *cumulus oophorus* turut memperluas daerah corona radiata sehingga menciptakan keleluasaan bagi spermatozoa dalam memfertilisasi ovum (Gordon, 1994).

Tabel 2. uji BNT 5% terhadap maturasi oosit didasarkan pengamatan ekspansi *cumullus oophorus*.

Perlakuan	Rata - Rata
mSOF + 10 % FBS (kontrol)	24,98 <sup>a</sup>
mSOF + 10 % FBS + FSH 10 ul + LH 10 IU	41,82 <sup>b</sup>
mSOF + 10 % FBS + PMSG 10 IU + hCG 10 IU	47,98 <sup>b</sup>

\*notasi yang berbeda menunjukkan adanya penaruh antar perlakuan

Tidak terdapat perbedaan antara perlakuan penambahan hormon PMSG + hCG dan FSH + LH, hal ini berarti tingkat maturasi yang dicapai paa dasarnya sama. Kesamaan encapaian tingkat maturasi tersebut disebabkan oleh kesamaan fungsi biologis dari hormon – hormon tersebut. Seperti yang telah diketahui bahwa hCG dan PMSG adalah merupakan sumber gonadptraphin selain FSH dan LH. PMSG mempunyai kesamaan fungsi dengan FSH yaitu sangat aktif menyebabkan pertumbuhan folikel yang akan membanu proses maturasi oosit, sedangkan hCG mempunyai

persamaan fungsi dan struktur dengan LH yaitu menstimulir ovulsi sehingga akan membantu ekspansi *cumullus oophorus* pada oosit (Anonymus, 2002).

**Evaluasi Tingkat Maturasi Oosit Berdasarkan Keberadaan *First polar body***

Keberadaan *first polar body* dapat dijadikan sebagai bukti bahwa oosit tersebut sudah memasuki tahap metafase II. Proses pembentukan *first polar body* terjadi setelah oosit primer pada divisi I meiosis II (metafase II) memebentuk 2 sel kembar dan salah

satunya berukuran lebih kecil yang disebut sebagai *first polar body*

(Gordon, 1994), Tabel 3.

Tabel 3. Persentase maturasi oosit didasarkan pada keberadaan *first polar body* .

Perlakuan	$\Sigma$ Oosit	Persentase
mSOF + 10 % FBS + PMSG 10 IU + hCG 10 IU	45	68 %
mSOF + 10 % FBS + FSH 10 ul + LH 10 IU	48	64,5%
mSOF + 10 % FBS (kontrol)	42	23,5%

Evaluasi berdasarkan *first polar body* (PB1) diketahui bahwa tingkat maturasi tertinggi dicapai oleh perlakuan penambahan PMSG + hCG ditunjukkan dengan persentase *first polar body* sebesar 68 % sedikit lebih tinggi dari persentase *first polar body* pada perlakuan FSH + LH yaitu 64,5%.

Berdasarkan persentase keberadaan PB1, maturasi tertinggi dicapai oleh perlakuan PMSG + hCG dan hal ini bertolak belakang dengan hasil pengamatan berdasarkan *cumulus oophorus* yang menunjukkan bahwa tingkat maturasi tertinggi dicapai oleh perlakuan FSH + LH, tabel 4

Tabel 4. Perbandingan maturasi oosit didasarkan ekspansi *cumulus oophorus* dan PB1 *r body*

Perlakuan	$\Sigma$ Oosit <i>grade</i> 2 (COC)/ $\Sigma$ oosit	$\Sigma$ Oosit <i>grade</i> 2 (COC)/ $\Sigma$ oosit	% perbandingan oosit <i>grade</i> 2 (COC) dengan 1 <sup>st</sup> <i>polar body</i>
mSOF + 10 % FBS + PMSG 10 IU + hCG 10 IU	22/ 50 (44%)	31/45 (68%)	44% : 68%
mSOF + 10 % FBS + FSH 10 ul + LH 10 IU	27/50 (54%)	31/48 (64%)	54% ; 64,5%
mSOF + 10 % FBS (kontrol)	10/ 50 (20%)	10/ 42 (23,5%)	20% ; 23,5%

Tingginya maturasi oosit berdasarkan ekspansi *cumulus oophorus* seharusnya diikuti oleh tingginya persentase maturasi oosit berdasarkan keberadaan PB1, karena ekspansi *cumulus oophorus* berperan dalam menciptakan lingkungan mikro untuk oosit dalam proses maturasi inti maupun sitoplasma, tetapi jika yang

terjadi adalah hal sebaliknya, maka hal ini berarti terdapat oosit *grade* I yang mengandung *first polar body*, hal ini dibuktikan oleh penelitian Spirolous dan Long (1989) dalam Gordon (1994) yang menyatakan bahwa oosit setengah gundul dan oosit gundul lebih cepat mencapai metafase II dibandingkan *cumulus oocyte complex* (COC),

sedangkan Freshney (1987) menambahkan bahwa oosit bisa menalami maturasi inti meskipun tingkat *cumullus oophorus* nya rendah karena adanya asam pyruvate dalam medium. Pada medium mSOF terdapat asam pyruvate tyang berfungsi sebagai sumber energi yang akan membantu menginduksi GVBD dalam proses meiosis. Berikut gambar oosit dengan PB-1.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil penelitian tentang pengaruh penambahan beberapa jenis hormon terhadap in vitro maturation oosit kambing pada medium mSOF diperoleh kesimpulan bahwa : Penambahan hormon ke dalam medium maturasi berpengaruh terhadap tingkat maturai oosit. Pengaruh penambahan hormon FSH 10 ul + LH 10 IU dibandingkan dengan penambahan PMSG 10 IU + hCG 10 IU terhadap maturasi oosit berdasarkan ekspansi cumullus oophorus dan terhadap keberadaan PB-1 adalah sama.

### Saran

Disarankan untuk menambahkan hormon PMSG dn hCG pada maturasi oosit dengan menggunakan medium mSOF karena harga hormon tersebut lebih murah, selain itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ukran penambah hormon yang sesuai agr dihasilkan tingkat maturasi yang lebih baik.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonimous, 2002, Ovulation. [www.Fertility.Network.com/articles.html](http://www.Fertility.Network.com/articles.html).

Freshney RI, 1987. *Culture of Animals Cell*. Willey-Liss, Inc.

Gordon I, 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Departement of Animal Science and Production. University College. Dublin. Ireland.

Goto K, Yasuzuki T, Watani F, and Shiniciro T, 1995. *In vitro Development of Bovine Oocytes Collected Ovaries of Individual Cows After Fertilization*. Animal Reproduction Science 36:110-113

Grave T, and Madison VG, 1993. *Selection of Immature Oocyte for Development Potention In Vitro*. Animal Reproduction Science. 27:1-9

Malole MB, 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Depdikbud Dirjen Dikti Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB. Bogor.

Mc. Donald LE, and Pineda MH, 1989. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia. London.

Sumarto SY, 1991. *Percobaan, Perancangan, Analisis, dan Interpretasinya*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Susilawati T, Ciptadi G, Djati MS, dan Sumitro SB, 2000. *Keberhasilan PeIn Vitro dmatangan Oosit Sapi Secara In Vitro dengan Variasi Waktu Aspirasi oosit, Kadar Serum dan Hormon dalam Medium*. Jurnal Ilmu – Ilmu Peternakan 3 : 24 -28. Universitas Brawijaya Malang.

- Takahashi Y, and First NL, 1992. *In Vitro Culture of Bovine One Cell Embryos Fertilized In Vitro Using Synthetic Oviduct Fluid Medium With and Without Glucose and Supplemented With Fetal Calf Serum*. *Animal Reproduction Science* 31 : 33 – 37
- Totey SM, Pawse CH, and Sing GP, 1993. *In Vitro Maturation and Fertilization of Buffalo Oocyte (Bubalus Bubalis) : Effect of Media, Hormon, and Sera*. *Theriogenology* 18 : 1153 – 1167.
- Wahyuningsih S, Ciptadi G, dan Djati MS, 2000. *Pematangan In Vitro Oosit Kambing Menggunakan Interspecies Serum Hewan Birahi dengan Memanfaatkan Estrus Goat Serum (EGS)*. *Jurnal Ilmu – Ilmu Peternakan* 3 : 51-56. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yadav BR, Katiya DK, Haucan MR, and Madam MI, 1997, *Chromosome Configuration During In Vitro in Goat, Sheep, and Buffalo Oocyte*. *Theriogenology* 47 : 947-951.