

# **SUPLEMENTASI *FETAL BOVINE SERUM* (FBS) TERHADAP PERTUMBUHAN *IN VITRO* SEL FOLIKEL KAMBING PE**

**S.N Rahayu dan S. Wahjuningsih**

Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

## **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan suplementasi FBS dengan berbagai konsentrasi pada medium kultur *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199) dengan variasi waktu inkubasi terhadap kompetensi pertumbuhan folikel kambing PE. Materi Penelitian adalah folikel kambing yang diperoleh melalui isolasi ovarium kambing, TCM-199 dan FBS. Analisa data menggunakan uji *t* berpasangan dengan menggunakan 3 perlakuan suplementasi FBS (0%, 0,1% dan 1%) dan inkubasi selama 6 hari. Folikel yang digunakan dalam kultur dikelompokkan menjadi 2 ukuran yaitu besar (4mm) dan kecil (2-<4mm). Variabel pengamatan yang digunakan adalah pertumbuhan folikel. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0 dan hari ke 6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi FBS pada kultur folikel secara IVG memberikan pengaruh nyata ( $P<0,05$ ) terhadap pertumbuhan folikel, yaitu pada folikel besar dengan suplementasi FBS 1% dan folikel kecil dengan suplementasi FBS 0,1%.

Kata Kunci : Fetal Bovine Serum, Folikel, Pertumbuhan In Vitro, Kambing

## **FETAL BOVINE SERUM (FBS) SUPPLEMENTATION WITH INCUBATION TIME VARIATION TO FOLLICLE GROWTH COMPETENCE OF PERANAKAN ETAWAH (PE) GOAT**

### **ABSTRACT**

The aims of this research was to know the effect of FBS supplements usage with any concentration of *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199) culture medium with incubation time variation to follicle growth competence of Peranakan Etawah (PE) goat. The material of this research were goat follicle, TCM-199 and FBS. The method of this research use *t* test which used 3 treatment with incubation 6 days. The follicle that used in culture were classified into 2 groups: large (>4mm) and small (2-<4mm). The observation variable were used follicle growth. The result of this research are showed that FBS supplements in follicle culture according to IVG gave the significant different into follicle growth ( $P<0,05$ ) that is large follicle with 1% FBS supplements and small follicle with 0,1% FBS supplements. It can be concluded that FBS supplements and length of culture in IVG follicle had the significant influence on the growth of follicles.

Keywords: Fetal Bovine Serum, Follicle, In Vitro Growth, Goat

### **PENDAHULUAN**

Tingkat keberhasilan Transfer Embrio (TE) masih cukup rendah. Hal

ini terlihat dari hasil kebuntingan embrio secara *in vitro* yang ditransfer ke resipien masih rendah. Banyak

faktor yang mempengaruhi antara lain kualitas embrio yang dihasilkan secara *in vitro* tidak cukup baik, demikian juga kuantitas embrio yang dihasilkan secara *in vitro* tidak tersedia dalam jumlah yang cukup, sehingga perlu dilakukan penelitian di tingkat laboratorium yang diharapkan dapat meningkatkan produksi embrio *in vitro* (IVP), meliputi proses maturasi *in vitro* (IVM), fertilisasi *in vitro* (IVF) dan kultur *in vitro* (IVC) serta pertumbuhan *in vitro* (IVG) (Sirard dan Blondin, 1996).

In Vitro Growth (IVG) sel folikel merupakan proses pertumbuhan sel folikel pada medium di luar tubuh dan di kultur secara *in vitro* yang menyerupai proses *in vivo*. Dalam proses tersebut diusahakan untuk memperoleh pertumbuhan oosit secara lengkap sehingga dalam proses pematangan dan pembuahan dapat berhasil. Tujuan *in vitro* folikel yaitu meniru proses folikulogenesis yang terjadi secara *in vivo*, untuk menghasilkan oosit yang sempurna yang memiliki kemampuan melanjutkan maturasi dan fertilisasi secara *in vitro* (Cecconi, 2004). IVG folikel merupakan pertumbuhan folikel yang mekanismenya berdasarkan pada folikulogenesis di dalam ovarium. Sistem kultur IVG telah dikembangkan pada ternak domestik, namun masih sangat perlu adanya perbaikan (Miyano dan Hirao, 2003; Wycherley *et al.*, 2004).

Lingkungan dan medium yang digunakan dalam IVM mempengaruhi kualitas dan kuantitas oosit yang dihasilkan. *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199) sering digunakan sebagai medium dasar untuk pematangan oosit secara *in vitro* karena mengandung

unsur-unsur biokimia yang berperan dalam pematangan oosit. Penambahan serum sebagai sumber protein dalam TCM-199 dibutuhkan untuk mendukung proses pertumbuhan oosit. *Fetal Bovine Serum* (FBS) salah satu suplemen medium IVM berasal dari darah fetus sapi yang dibekukan dan dikoleksi secara aseptik. FBS digunakan untuk merangsang pertumbuhan dalam jumlah yang besar dari kultur jaringan sel. Konsentrasi serum dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan sel. Untuk pertumbuhan sel yang terbaik digunakan konsentrasi berkisar dari 5 % sampai 10 % (Mc Dowall *et al.*, 2004)).

Pertumbuhan folikel juga dipengaruhi oleh lama kultur. Kultur folikel (*in vitro*) dilakukan selama 6 hari dikarenakan dengan dimensi ukuran folikel yang besar dan lapisan yang menyelimuti folikel sangat tipis, bila kurang dari 6 hari dimungkinkan akan terjadinya kontaminasi pada daerah sekitar folikel yang dikultur (Cecconi, 2004). Lama kultur pada folikel preantral lebih dari 4 hari dapat digunakan untuk menghasilkan folikel yang baik untuk melanjutkan ke fase miosis secara *in vitro* (Jiude, 2002).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penggunaan suplementasi FBS dengan berbagai konsentrasi pada medium kultur TCM-199 dengan variasi waktu inkubasi terhadap kompetensi pertumbuhan folikel dan kualitas oosit kambing PE.

## **MATERI DAN METODE**

Materi penelitian yang digunakan adalah folikel kambing PE dengan cara koleksi ovarium dari Rumah Potong Hewan (RPH) Sukun

Malang yang selanjutnya dilakukan isolasi folikel ovarium.

### Koleksi Ovarium

Setelah kambing dipotong, ovarium dibersihkan dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi NaCl fisiologis 0,9% (MERCK; 1.06404.1000) yang ditambah penicillin(MEIJ) 0,006 g dan streptomycin (MEIJ) 0,01g. Botol dimasukkan dalam termos yang berisi air hangat dengan suhu 38°C dan dibawa ke laboratorium.

### Isolasi folikel

Ovarium diambil dengan pinset steril kemudian dilakukan pengukuran ovarium (awal), dan dilakukan isolasi dengan membedah ovarium dan diambil folikel, kemudian folikel dimasukkan kedalam petri dish (kecil) yang telah diisi cairan NaCl fisiologis 0,9%

### Pengukuran ovarium dan folikel

Pengukuran ovarium dan diameter folikel dilakukan dengan cara meletakkan ovarium di atas petri dish, kemudian dilakukan pengukuran dengan menempatkan kertas ukur (millimeterblok) dengan skala ukuran (mm).

### Seleksi folikel

Folikel (sampel) hasil isolasi, diambil secara acak dengan kriteria ukuran besar ( $\geq 4$ mm) dan kecil (2mm - < 4mm) yang terdiri dari tiga perlakuan yaitu penambahan suplementasi FBS(MP BIOMEDICALS, Inc 1.800.854.0530) dengan kadar 0,1%, 1% dan 0% FBS pada medium kultur TCM-199 (SIGMA; M 5017:IL) selanjutnya dikultur dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38° C selama 6 hari.

### Variabel Pengamatan

Pertumbuhan folikel IVG dengan penggunaan suplementasi FBS dengan berbagai konsentrasi pada medium kultur TCM-199 dengan variasi waktu inkubasi terhadap pertumbuhan ukuran folikel hasil kultur IVG dari hari ke 0 sampai hari ke 6. Pengulangan sebanyak 10 kali dengan waktu inkubasi yaitu 0 hari dan 6 hari. Variabel yang diamati adalah pertumbuhan folikel. Analisa data menggunakan uji *t* berpasangan.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Ovarium mempunyai variasi ukuran dan bentuk untuk setiap spesies ternak. Koleksi ovarium kambing PE mempunyai berbagai variasi ukuran, hal ini mempengaruhi jumlah folikel yang ada didalamnya (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata ukuran ovarium dan ukuran folikel hasil isolasi

Keterangan	Rataan
Ovarium (31 buah)	
Ukuran Ovarium (cm) :	
X (panjang)	1,81 ± 0,37
Y (lebar)	1,32 ± 0,35
Jumlah Folikel (131 buah)	6 ± 3
Ukuran Folikel (mm)	5,5 ± 2,4

Isolasi folikel dari masing-masing ovarium menghasilkan jumlah folikel yang diperoleh berbeda. Dapat diketahui bahwa rata-rata untuk tiap ovarium menghasilkan jumlah yang hampir beragam, dari satu ovarium didapatkan hasil isolasi berkisar 3-6 folikel. Folikel-folikel yang masuk kriteria ukuran dan folikel hasil isolasi

yang bersih yang digunakan dalam kultur IVG. Ukuran ovarium juga mempengaruhi jumlah folikel yang didapatkan dari proses isolasi. Shimada et al., (2002) menyatakan bahwa folikel antral kambing adalah folikel dengan ukuran 2-8 mm. Ukuran folikel berpengaruh terhadap ukuran ovarium. Semakin banyak folikel antral maka semakin besar volume ovarium. Cole dan Cupp (1997) menyatakan bahwa ovarium mempunyai variasi ukuran dan bentuk untuk setiap spesies ternak.

Hasil pertumbuhan folikel selama 6 hari setelah dilakukan analisa dengan uji *t* berpasangan menunjukkan bahwa terjadi pengaruh yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) pada pertumbuhan folikel yaitu terdapat pada kultur sel folikel dengan suplementasi serum FBS (1%) pada folikel besar dan suplementasi serum FBS 0,1% pada folikel kecil. Pada perlakuan penambahan serum FBS 0,1% dan FBS 1% pengaruh yang berbeda nyata, sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi suplementasi FBS dalam medium TCM-199 dan lama kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan folikel yang dikultur. FBS kaya akan protein yang mengatur sistem kultur sel di dalam medium dimana protein tersebut dapat mempertahankan hidup sel lebih lama, tumbuh dan membelah. Jiude et al., (2002) menyatakan bahwa kultur folikel dalam medium kompleks seperti TCM 199 dapat memberikan pertambahan diameter yang sangat cepat pada hari ke 4 kultur, sehingga lama kultur folikel lebih dari 4 hari dapat digunakan untuk menghasilkan folikel yang baik untuk melanjutkan ke fase meiosis secara *in vitro*.

Pada kultur IVG folikel yang digunakan dikelompokkan menjadi dua yaitu folikel dengan ukuran kecil (2mm - <4mm) dan folikel ukuran besar (>4 mm). Persentase pertumbuhan folikel hasil kultur dengan ukuran kecil lebih menunjukkan pertumbuhan lebih besar daripada folikel dengan ukuran besar. Hal ini terjadi berkaitan dengan proses perkembangan folikel (folikulogenesis), mulai dari folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier dan folikel de *Graff*. Folikel dengan ukuran besar sudah terbentuk sempurna bagian-bagiannya sehingga tingkat pertumbuhannya rendah daripada folikel dengan ukuran kecil. Shimada et al., (2002) menyatakan bahwa folikel besar tingkat pertumbuhannya rendah karena antrum sudah terbentuk sempurna sehingga respon terhadap medium rendah.

Dari data persentase pertumbuhan folikel dapat diketahui bahwa folikel dengan ukuran kecil dalam kultur mengalami pertumbuhan yang lebih baik dari pada folikel dengan ukuran besar. Tabel diatas menunjukkan bahwa folikel kecil dengan penambahan FBS (0% dan 0,1%) mempunyai persentase pertumbuhan yang sama yaitu sebesar 80% sedangkan pada penambahan FBS 1% persentase pertumbuhan folikel sebesar 70%, untuk folikel besar persentase tertinggi terdapat pada perlakuan FBS (0,1%) yaitu sebesar 70% sedangkan persentase sebesar 30% pada perlakuan FBS dengan konsentrasi (0% dan 1%).

Tabel 2. Pertumbuhan Kultur Folikel

Kelompok ukuran Folikel	Konsentrasi FBS	% Pertumbuhan Folikel
Besar (> 4mm)	0%	30%
	0,1%	70%
	1%	30%
Kecil (2-< 4mm)	0%	80%
	0,1%	80%
	1%	70%

Tabel 3. Rataan Pertumbuhan Kultur Folikel (IVG)

Kriteria Ukuran Folikel	Perlakuan FBS (%)	Pengamatan Ukuran (mm)	
		Hari ke 0	Hari ke 6
Besar (> 4 mm)	0	5,2 ± 0,8	4,8 ± 1,1
	0,1	4,6 ± 0,4	4,7 ± 0,5
	1	4,9 ± 0,8	4,2 ± 0,5
Kecil (2mm-<4mm)	0	3,1 ± 0,6	3,2 ± 0,5
	0,1	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,4
	1	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,2

Dari hasil rataan pertumbuhan folikel diatas menunjukkan bahwa folikel besar dengan perlakuan penambahan FBS konsentrasi 0,1% terjadi kenaikan rataan ukuran folikel dari 4,6 ± 0,4 (hari ke 0) meningkat menjadi 4,7 ± 0,5 (hari ke 6), sedangkan folikel besar dengan konsentrasi FBS 0% dan 1% tidak mengalami kenaikan rataan ukuran folikel yaitu pada FBS 0% dari 5,2 ± 0,8 (hari ke 0) menurun menjadi 4,8 ± 1,1 (hari ke 6) dan pada FBS 1% dari

4,9 ± 0,8(hari ke 0) menurun menjadi 4,2 ± 0,5 (hari ke 6). Untuk rataan pertumbuhan folikel kecil pada semua perlakuan menunjukkan kenaikan rataan ukuran folikel yaitu pada perlakuan penambahan FBS konsentrasi 0% dari 3,1 ± 0,6 (hari ke 0) meningkat menjadi 3,2 ± 0,5 (hari ke 6), pada FBS 0,1 % dari 3,1 ± 0,3 (hari ke 0) meningkat menjadi 3,3 ± 0,4 (hari ke 6) dan pada FBS 1 % dari 3,0 ± 0,4 (hari ke 0) menjadi 3,1 ± 0,2 (hari ke 6). Pertumbuhan folikel ada yang

mengalami kenaikan dan penurunan. Hal ini dapat dipengaruhi oleh ukuran dari folikel yang di kultur, lama kultur, dan konsentrasi penambahan FBS yang digunakan pada penelitian. Goto *et al* (1995) menyatakan bahwa kondisi kultur yang terdiri dari medium, konsentrasi *Growth* Hormon dan penggunaan inkubator CO<sub>2</sub> (lama waktu kultur) mendukung pertumbuhan dari kultur folikel.

Serum merupakan cairan biologis yang terbukti dapat menunjang pertumbuhan sel diluar tubuh. Konsentrasi serum dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan sel. Untuk pertumbuhan sel yang terbaik digunakan konsentrasi FBS berkisar dari 5 % sampai 10 % (Bin Hang *et al.*, 2007). Dalam penelitian suplementasi FBS yang digunakan adalah 0,1% dan 1% serta tanpa adanya penambahan FBS (0%).

Rataan pertumbuhan folikel besar mengalami kenaikan pada perlakuan dengan penambahan FBS sebesar 0,1% yaitu dari ukuran folikel  $4,6 \pm 0,4$  (hari ke 0) meningkat menjadi  $4,7 \pm 0,5$  (hari ke 6), sedangkan folikel besar dengan konsentrasi FBS 0% dan 1% tidak mengalami kenaikan rata-rata ukuran folikel yaitu pada FBS 0% dari  $5,2 \pm 0,8$  (hari ke 0) menurun menjadi  $4,8 \pm 1,1$  (hari ke 6) dan pada FBS 1% dari  $4,9 \pm 0,8$  (hari ke 0) menurun menjadi  $4,2 \pm 0,5$  (hari ke 6).

Cecconi (2004) menyatakan bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel folikel secara *in vitro* diantaranya : umur ternak, ukuran folikel, metode isolasi (enzimatik, mekanik atau gabungan dari keduanya), bentuk folikel ( bulat utuh atau tidak bulat), tekanan oksigen dan suhu, lama waktu kultur dan

medium kultur.

Folikel yang mengalami penurunan ukuran dapat terjadi dikarenakan folikel ini sudah mendekati masa puncak pertumbuhannya (*folikel de graff*). Pahl, *et al*, (2004) menyatakan bahwa folikel besar tingkat pertumbuhannya rendah karena antrum sudah terbentuk sempurna sehingga respon terhadap medium rendah. Folikel dengan ukuran kecil lebih berpotensi untuk mengalami pertumbuhan karena folikel kecil dengan ukuran (2-<4mm) dalam masa pertumbuhan sedangkan folikel besar hampir mencapai tahap puncak pertumbuhan (*folikel de graff*). Folikel besar tingkat pertumbuhannya rendah karena antrum sudah terbentuk sempurna sehingga respon terhadap medium rendah.

Folikel kecil mempunyai persentase pertumbuhan yang lebih baik dari folikel besar. Sirard dan Coenen (1995) menyatakan bahwa medium kultur, tipe serum yang berinteraksi dalam medium mempengaruhi pertumbuhan folikel dan pembentukan kelompok antrum secara *in vitro*. Lama waktu yang dibutuhkan untuk kultur folikel preantral selama > 4 hari, ini bertujuan untuk menghasilkan folikel dan produksi oosit lebih baik dari proses meiosis secara *in vitro*.

Folikel terdiri dari beberapa inti sel yang dilapisi oleh membran sel. Inti sel ini mempunyai potensi untuk berkembang dan terjadi pematangan menjadi sel telur, apabila folikel berkembang secara sempurna, tetapi ada beberapa folikel tidak mengalami perkembangan dan mati kemudian akan digantikan dengan folikel yang baru.(Adam *et al.*,2004)

## KESIMPULAN

1. Penambahan *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebesar 1% memberikan pengaruh pertumbuhan pada folikel besar (>4mm) dan penambahan FBS sebesar 0,1 % memberikan pengaruh pada folikel kecil (2-<4 mm)
2. Kultur folikel selama 6 hari memberikan pengaruh pada pertumbuhan folikel besar (>4mm)

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, A A G, Y. Takahashi, S. Katagiri and M. Nagano. 2004. In Vitro Culture Of Mouse Preantral Follicles Using Membrane Inserts and Developmental Competence of In Vitro Ovulated Oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 50: 579-586.
- Bin Han, Z, Cheng Lan G, Guang Wu Y, Han D, Guo Feng W, Zuo Wang J and He Tan J. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Journal Reproduction* 132: 749-758
- Cecconi, S. 2002. Growth and Differentiation of Small Ovarian Follicles in Mamals: Problem and Future Prespectives. *Journal of Reproduction and Development*. 48: 431-445.
- Cole, H.H. dan Cupps, P.T, 1997. *Reproduction Domestic Animal*. Third Edition. Academic press. Inc. London.
- Goto K, Yasuzuki T, Wataru F, Shinichiro T, 1995. In Vitro Development of Bovine Oocytes Collected Ovaries of Ovidual Cows After Fertilization. *Anim. Repro. Sci.* 36: 110-113.
- Jiude, M.. 2002. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro<sup>1</sup>. <http://www.bioreprod.org/cgi/content/abstract/67/4/1197>. Diakses : 26 Mei 2008.
- Mc Dowall, M L S, Gilchrist R B and Thompson J G. 2004. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation, the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Journal Reproduction* 128: 313-319
- Miyano, T and Hirao, Y. 2003. In Vitro Growth of Oocytes from Domestic Species. *Journal Mamm. Ova Res.* 20. 78-85
- Pahl, M, Hohlagschwandtner M, Obruca A, Phaschhalfo G, Wigert M and Feichinger W. 2004. Number and size of antral follicles as predictive factors in vitro fertilization and embryo transfer. *Journal Assist. Reprod. Gene* 17(6) : 315-318
- Shimada, M, Kawano N and Terada T. 2002. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of in vitro maturation media. *Journal Reproduction* 124(4) : 557-564
- Sirard, M.A and Coenen, K. 1995. Effect of Inhibitions of Meiotic Resumption Upon the Subsequent

- Development of Bovine Oocyte In Vitro. The Journal of Reproductions and Development. 41 : 4.
- Sirard, M.A and Blondin, P. 1996. Oocytes Maturation and IVF in Cattle. Animal Reproduction Science, 42: 417-426.
- Wycherley G, Downey D, Kane, M. T. and Hynes, A. C. 2004. Number and Size of Antral Follicles as Predictive Factors in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Journal Assisted Reproduction 17(6): 315-318.





