PENGARUH SERUM HOMOLOG DAN HETEROLOG TERHADAP PROSES PEMATANGAN DAN PEMBUAHAN OOSIT DOMBA DI DALAM MEDIUM BIAKAN *in vitro*

THE INFLUENCE OF HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS SERA IN CULTURE MEDIUM ON *in vitro* MATURATION AND FERTILIZATION OF SHEEP OOCYTES

Ita Djuwita[1], Yohan Rusyiyantono[2], Kusdiantoro Muhamad[1], Bambang Purwantara[3] dan Yuhara Sukra[1]

[1]Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151 INDONESIA

[2]Mahasiswa Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151 INDONESIA

[3]Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Jl. Cilibende Bogor 16151 INDONESIA

ABSTRAK

Media Veteriner. 1998. 5(1): 7-10

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai macam serum yaitu serum fetus sapi (*Fetal Calf Serum* - FCS), serum induk sapi pasca estrus (*Bovine Post-Estrous Serum* - BPES) sebagai serum heterolog, dan serum fetus domba (*Ewe Fetal Serum* - EFS) serta serum domba (*Ewe Serum* - ES) sebagai serum homolog terhadap proses pematangan dan pembuahan oosit domba secara *in vitro* dalam Tissue Culture Medium 199™ (TCM 199, Gibco). Serum induk sapi diperoleh pada masa 7 hari pasca estrus, sedangkan serum induk domba diperoleh pada masa estrus (ES-H0) dan enam hari pasca estrus (ES-H6). Hasil penelitian menunjukkan tingkat pematangan oosit secara *in vitro* dalam medium yang diimbuhi EFS, ES-H0, dan ES-H6 dengan persentase masing-masing 32,9 %, 68,7 %, dan 67,6 % lebih tinggi dibandingkan dengan yang diimbuhi FCS dan BPES dengan persentase masing-masing 22,2 % dan 28,9 %. Tingkat pembuahan *in vitro* pada oosit yang dimatangkan dalam medium dengan pengimbuhan ES-H0 dan ES-H6 dengan persentase 65,4 % dan 65,8 % menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) dibandingkan yang diimbuhi dengan BPES dengan persentase 31,7 %. Namun demikian, tidak terdapat perbedaan yang nyata antara yang diimbuhi EFS dan FCS baik terhadap proses pematangan dengan persentase masing-masing 32,9 % dan 22,2 % maupun pembuahan dengan persentase masing-masing 30,7 % dan 25,6 %. Disimpulkan bahwa ES dapat dipakai sebagai imbuhan pengganti serum fetal untuk mendukung proses pematangan dan pembuahan oosit domba secara *in vitro*.

Kata-kata kunci: serum domba, pematangan dan pembuahan *in vitro*, TCM 199, oosit domba

ABSTRACT

Media Veteriner. 1998. 5(1): 7-10

The influence of various types of sera i.e. Fetal Calf Serum (FCS), Bovine Post Estrous Serum (BPES) as heterolog sera; and Ewes Fetal Serum (EFS) and *Ewes Serum* (*ES*) as homologue sera on *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes was investigated using Tissue Culture Medium 199™ (TCM 199, Gibco). Bovine sera were collected from cow at seven days post-estrus, while ewes sera were collected during estrous (ES-H0) and six days post estrous (ES-H6). The result shows that the maturation rate of oocytes cultured in medium supplemented with EFS, ES-H0 and ES-H6 at concentrations of 32.9 %, 68.7 %, and 67.6 % respectively is better than those supplemented with FCS and BPES at concentrations of 22.2 % and 28.9 %, respectively. *In vitro* fertilization rate were significantly higher in medium supplemented with ES-H0 and ES-H6 at concentration of 65.4 % and 65.8 % ($P < 0.05$) than that supplemented with BPES at concentration of 31.7 %. In conclusion, ewes sera could be used in culture medium for promoting both *in vitro* maturation and fertilization rate of sheep oocytes.

Key words: ewes serum, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, TCM 199, sheep oocytes

PENDAHULUAN

Sebagai salah satu teknik alternatif untuk memproduksi embrio, teknik pembuahan *in vitro* (in vitro *fertilization* - IVF) dapat diandalkan karena mampu menghasilkan embrio dalam jumlah banyak dan seragam tanpa mempengaruhi fungsi faal dari induk. Akan tetapi, mahalnya bahan-bahan biologis seperti serum fetus sapi (*Fetal Calf Serum* - FCS) merupakan kendala tersendiri dalam menerapkan dan melakukan penelitian bidang bioteknologi reproduksi. Sehingga penelitian-penelitian yang dilakukan di bidang ini diarahkan ke usaha-usaha peningkatan jumlah dan mutu embrio dengan menekan biaya produksi serendah mungkin.

Keberhasilan teknik IVF dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah kondisi medium biakan. Serum sebagai sumber protein, hormon, dan faktor pertumbuhan lainnya, mampu mendorong proses pematangan oosit dan perkembangan embrio di medium biakan (Kathleen dan Brackett, 1993). Untuk keperluan tersebut umumnya digunakan serum asal fetus sapi (*Fetal Calf Serum*) yang saat ini banyak digunakan dan banyak dijual secara komersil. Upaya pemakaian serum induk sebagai pengganti serum fetus diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan pematangan dan pembuahan oosit serta perkembangan embrio domba secara *in vitro*. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pengimbuhan serum induk yang diambil pada fase-proestrus (Younnis *et al.*, 1989), serum-estrus (Schellander *et al.*, 1989) dan serum pasca estrus (Boediono *et al.*, 1990) ke medium biakan mampu merangsang pembuahan dan perkembangan embrio secara *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan meneliti pengaruh serum fetus sapi (*Fetal Calf Serum* - FCS), serum induk sapi pasca estrus (*Bovine Post-Estrous Serum* - BPES) sebagai serum heterolog, dan serum fetus domba (*Ewe Fetal Serum* - EFS) dan serum domba (*Ewe Serum* - ES) sebagai serum homolog terhadap tingkat pematangan dan pembuahan oosit domba secara *in vitro*

BAHAN DAN METODE

Ovarium, Sperma, Serum dan Medium Biakan

Ovarium yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari domba lokal yang diambil dari rumah pemotongan hewan (RPH) dan sperma segar diperoleh dari domba jantan lokal. Medium pematangan oosit menggunakan Tissue Culture Medium™ 199 (TCM 199, Gibco) yang diimbuhi 10 % serum yang telah diinaktifkan, Penicillin-G (1.000 IU/ml) dan Streptomycin Sulfat (0,2 μg/ml). Medium fertilisasi menggunakan medium BO (Brackett dan Oliphant, 1975) yang telah diberi kafein (0,2 mM) dan Heparin (5 μg/ml). Empat jenis serum yang digunakan yaitu FCS dan BPES sebagai serum heterolog, dan EFS dan ES sebagai serum homolog.

Perlakuan

Ovaria diambil dalam jangka waktu dua jam dan disimpan dalam medium NaCl 0,9 %, suhu 30-35 C. Folikel-folikel yang berdiameter antara 2-5 mm diaspirasi menggunakan jarum 20G yang dihubungkan dengan penyuntik 5 ml yang berisi larutan garam penyangga fosfat (*Phosphat Buffer Saline* - PBS, Gibco). Hanya oosit yang bersel kumulus utuh dan kompak yang dipakai untuk penelitian ini. Setelah dicuci berturut-turut dengan medium PBS dan TCM-199, setiap 20 oosit dibiakan dalam 100 μl medium tetes TCM-199 yang telah diimbuhi serum dan ditutupi dengan cairan parafin™ (Squibb). Pembiakan dilakukan dalam inkubator CO_2 5 %-modifikasi, pada suhu 38,5 °C selama 22-24 jam. Penilaian terhadap pematangan oosit yang mencapai tahap metafase-II dilakukan dengan pewarnaan aceto-orcein.

Semen segar dicuci dengan delapan mililiter larutan BO-Kafein (BO-K) yang diberi imbuhan 0,3 % albumin serum sapi (*Bovine Serum Albumine* - BSA, SIGMA). Sperma diencerkan dengan medium BO-K yang diberi imbuhan BSA dan Heparin hingga konsentrasi akhir sperma mencapai 20 sperma/ml. Sebelum membuahi, sperma dipreinkubasi selama 30 menit dalam inkubator CO_2.

Oosit yang telah dimatangkan dicuci dengan medium BO-BSA-Heparin sebanyak tiga kali ulangan, kemudian dimasukkan ke 100 μl suspensi sperma yang telah dipreinkubasi. Pembuahan dilakukan dalam inkubator CO_2 5 % pada suhu 38,5 °C selama delapan jam. Lima jam setelah pembuahan, oosit dicuci dengan larutan PBS, kemudian difiksasi dengan larutan Carnoy's selama 2-3 hari. Oosit diwarnai dengan pewarna aceto-orcein 1 % dan dicuci dengan *aceto-glycerol*.

Preparat oosit diamati dengan mikroskop fase kontras. Tingkat pematangan dihitung dari banyaknya oosit yang mencapai metafase-II per jumlah oosit yang dimatangkan; sedangkan tingkat pembuahan dihitung dari jumlah oosit yang terbuahi per jumlah oosit yang dimatangkan. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga kali ulangan dengan masing-masing ulangan sebanyak 20-30 oosit. Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan metode Chi-Square.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ES-H0 dan ES-H6 ke medium pematangan memberikan perbedaan yang nyata ($P<0,05$) terhadap tingkat pematangan oosit dibandingkan FCS, EFS dan BPES. Hal ini juga tampak pada berbedaan perluasan (*expansion*) sel-sel kumulusnya (Gambar 1). Sel-sel kumulus tampak mengalami ekspansi yang sempurna pada perlakuan dengan ES dibandingkan dengan FCS, EFS dan BPES. Namun demikian, EFS menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan FCS terhadap pematangan oosit domba. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa penambahan ES-H0 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan ES-H6.

(a) (b)

Gambar 1. Oosit yang Belum Matang (a) dan yang Sudah Dimatangkan (b). Preparat natif. Pembesaran 20 x 10.

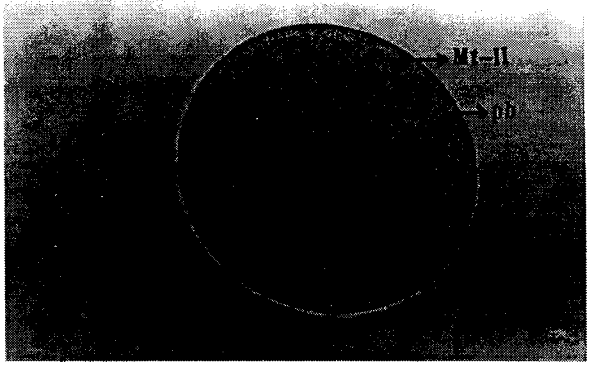
Tabel 1. Pengaruh Serum Homolog dan Heterolog dalam Medium Biakan terhadap Proses Pematangan Oosit Domba secara *in vitro*.

Jenis serum	Jumlah oosit	Jumlah dan persentase oosit yang mencapai metafase-II (%)
SFS	176	39 (22.2)^{a}
BPES-H7	93	26 (28.0)^{a}
EFS	76	25 (32.9)^{a}
ES-H0	80	55 (68.7)^{b}
ES-H6		50 (67.6)^{b}

Keterangan: Huruf superskrip yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5 %.

Tingkat pematangan yang cukup tinggi pada biakan yang mengandung serum induk menunjukkan bahwa serum tersebut mengandung komponen yang dapat menunjang proses pematangan oosit (Gambar 2). Salah satu faktor yang mempertinggi tingkat pematangan oosit adalah antara lain kandungan hormon yang dikandung dalam serum tersebut.

Hafez (1987) menyatakan bahwa gambaran kadar hormon LH pada domba yang menunjukkan peningkatan menjelang hari pertama estrus dan menurun pada hari kedua. Sementara itu dari hasil pengujian Boediono *et. al.* (1994) terhadap kadar hormon LH serum induk sapi pada hari ke-5 estrus menunjukkan adanya peningkatan dibandingkan hari ke-0.



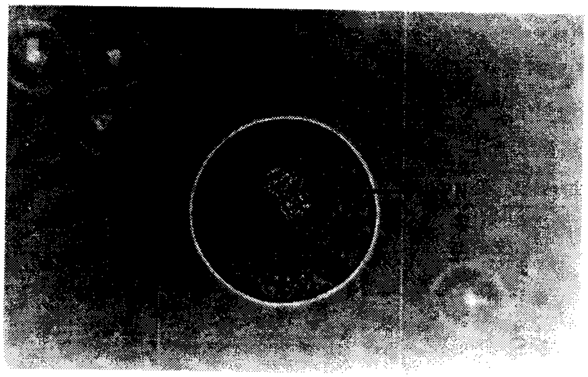
Gambar 2. Oosit pada Metafase-II. Mt-II = Metafase-II, pb = badan kutub (*polar body*) I. Pewarnaan Aceto-Orcein 1 %. Pembesaran 40 x 10.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa oosit yang dimatangkan dalam medium dengan penambahan ES-H0 dan -H6 menunjukkan tingkat pembuahan yang cukup tinggi dibandingkan dengan serum lainnya. Hal ini disebabkan tingkat pematangan sangat berpengaruh terhadap tingkat pembuahan yang dibuktikan dengan derajat polispermia yang tinggi pada perlakuan dengan FCS dan BPES (Gambar 3). Bahkan beberapa peneliti menyatakan bahwa tingkat pembuahan secara *in vitro* dapat dirangsang dengan penambahan berbagai jenis serum hewan betina pada fase proestrus (Younnis *et al.*, 1989) ataupun serum estrus (Schellander *et al.*, 1989).

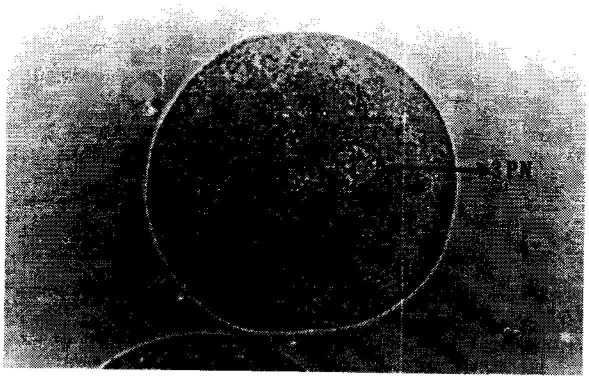
Tabel 2. Tingkat Pembuahan Oosit Domba Hasil Pematangan *in vitro* dalam Medium Biakan yang Mengandung Serum Homolog dan Heterolog

Jenis serum	Jumlah oosit	Jumlah dan persentase oosit yang dibuahi pada metafase-II (%)
SFS	139	32 (25,6)^{a}
BPES-H7	90	26 (31,7)^{a}
EFS	75	23 (30,7)^{a}
ES-H0	78	51 (65,4)^{b}
ES-H6	76	50 (65,8)^{b}

Keterangan: Huruf superskrip yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5 %



(a)



(b)

Gambar 3. Oosit pada Tahap Pronuklei (Monospermia) (a) dan oosit dengan tiga pronuklei (Polispermia)(b). PN = pronuklei. Pewarnaan Aceto-Orcein 1 %. Pembesaran 40 x 10.

KESIMPULAN

Serum induk homolog dapat dipakai sebagai pengganti serum fetus dalam proses pematangan maupun pembuahan oosit secara *in vitro* yang memperlihatkan tingkat pematangan dan pembuahan oosit domba secara *in vitro* yang lebih baik (P<0,05) dibandingkan dengan penambahan EFS, FSD dan BPES. Tidak ada perbedaan yang nyata (P>0,05) antara ES-H0, ES-H6, EFS dan FCS terhadap tingkat pematangan dan pembuahan oosit domba secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi III/1995-1996 Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Direktorat Pendidikan, Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Departtemen Pendidikan dan Kebudayaan yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Boediono,A. , M. Takagi, S. Saha dan T. Suzuki. 1994. Influence of Day-0 and Day-7 Superovulated Cow Serum during Development of Bovine Oocytes *in* vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:261 - 264.

Brackett, B.G. dan G. Oliphant. 1975. Capacitation of Rabbit Spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260 - 274.

Hafez. 1987. Reproduction in Farm animals. 2th ed. Lea & Febiger. London.

Kathleen, M., dan B.G. Brackett. 1993. Bovine Blastocysts Development after *in vitro* Maturation in a Defined Medium with Epidermal Growth Factor and Low Concentration Gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48:409 - 416.

Schellander,K., F. Fuhrer, B.G. Brackett, H. Korb dan W. Echleger. 1989. *In* vitro Fertilization and Cleavage of Bovine Oocytes Matured in Medium Supplemented with Estrous Cow Serum. *Theriogenology* 33:476 - 485.

Younnis, a.I., B.G. Brackett dan R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of Serum and Hormones on Bovine Oocytes Maturation and Fertilization *in vitro*. *Gamete Research*. 23:189 - 201.