

**DETEKSI AKTIVITAS GLUKOSA 6 PHOSPHAT
DEHIDROGENASE (G6PD) UNTUK MENENTUKAN
KUALITAS OOSIT DOMBA PADA PRODUKSI EMBRIO
*IN VITRO***

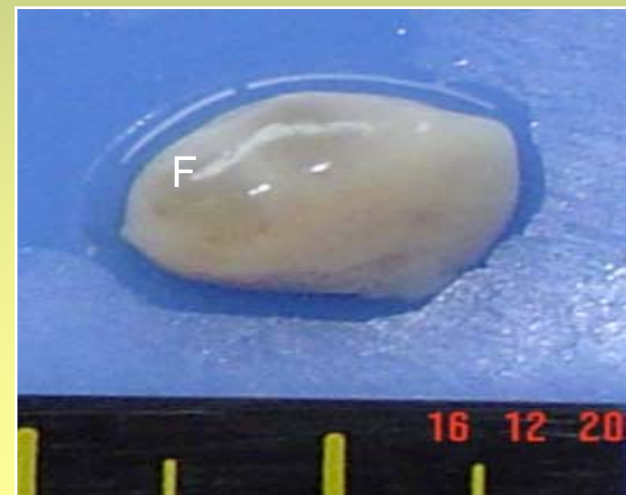
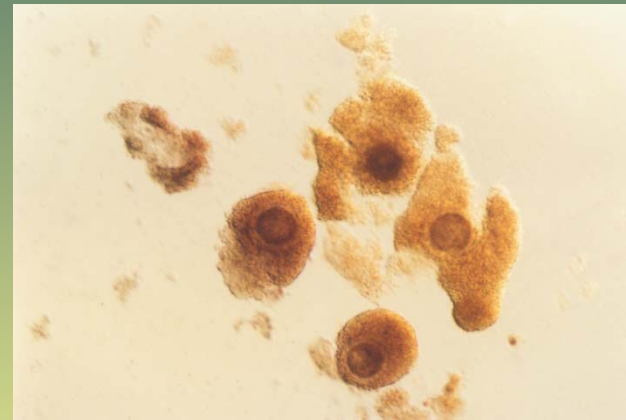


Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi
Prof. Dr. drh. Iman Supriatna

Bagian Reproduksi dan Kebidanan
Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

LATAR BELAKANG PENELITIAN

- Produksi embro in vitro hasilnya masih rendah
- Oosit sumber tidak seragam
- Kesulitan menseleksi oosit yang seragam secara mikroskopis
- Pemilihan satu per satu berdasarkan diameter (Folikel dan oosit) tidak efektif (time consuming)
- Diperlukan metoda non invasive pemilihan oosit: kualitas baik dan seragam



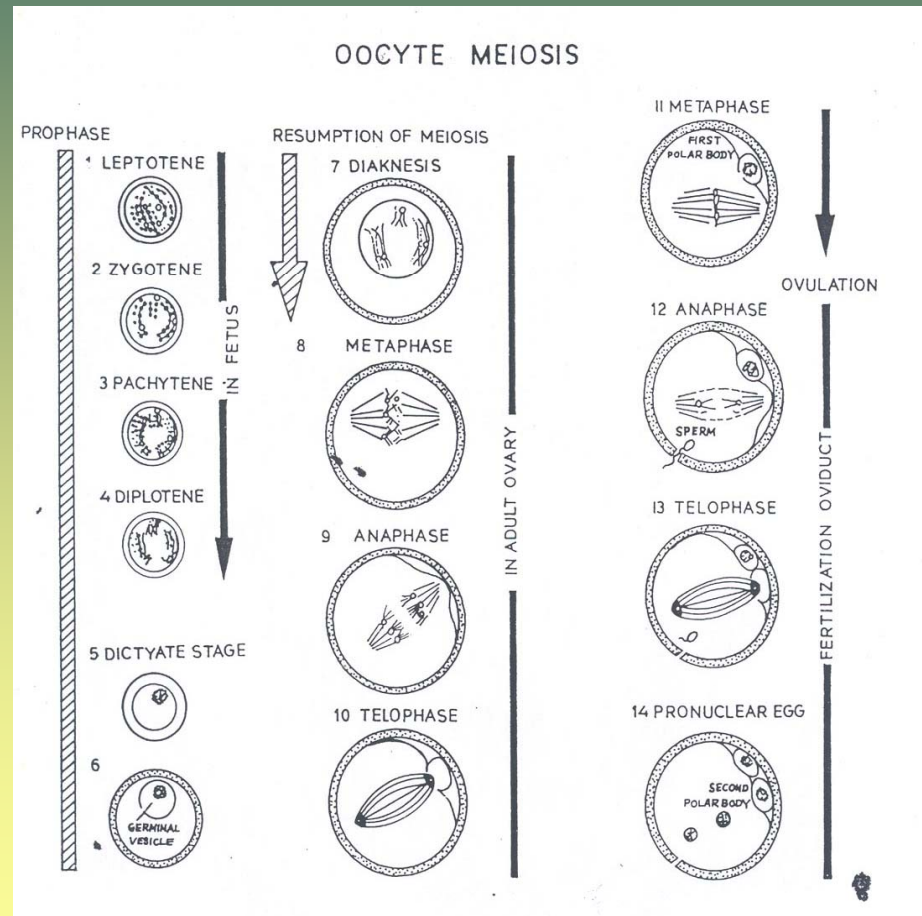
DASAR PEMIKIRAN PENELITIAN

- **G6PD merupakan enzim yang disintesa selama pertumbuhan oosit dan menurun aktivitasnya setelah oosit mencapai pertumbuhan yang sempurna (Rodriguez-Gonzalez et al. 2003; Pujol et al. 2004; Alm et al. 2006)**
- **Oosit yang sedang tumbuh (growing oocyte), G6PD tinggi, pewarna brilliant cresyl blue mudah dimetabolisir, oosit tidak berwarna (BCB-)**
- **Oosit yang sudah tumbuh sempurna (fully grown oocyte), G6PD rendah, pewarna brilliant cresyl blue tidak mudah dimetabolisir, oosit berwarna biru (BCB+)**

HYPOTHESA PENELITIAN

- Oosit BCB+ lebih kompeten berkembang dibandingkan dengan BCB- baik pada:
 1. Tingkat Pematangan oosit (Tahun I)
 2. Kemampuan mencapai tahapan perkembangan embrio (Tahun II)

PERKEMBANGAN MEIOSIS OOSIT



TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

- TUJUAN

1. Mendapatkan metoda terbaik seleksi oosit
2. Mendapatkan bukti aktivitas G6PD sebagai indikator kriteria oosit

- MANFAAT

1. Diperoleh teknik termudah dan akurat penentuan kualitas oosit
2. Teknik produksi embrio in vitro efektif dan efisien

TARGET PENELITIAN

PERIODE PENELITIAN	TOPIK PENELITIAN	TARGET
TAHUN I	KOMPETENSI OOSIT DOMBA YANG TERSELEKSI DENGAN BRILIANT CRESYL BLUE UNTUK MENCAPAI PEMATANGAN INTI	METODA TERBAIK SELEKSI OOSIT UNTUK PRODUKSI EMBRIO IN VITRO (Kemampuan mencapai pematangan)
TAHUN II	UJI KEMAMPUAN OOSIT SETELAH PEWARNAAN BRILIANT CRESYL BLUE TERHADAP PERKEMBANGAN AWAL EMBRIO IN VITRO	PEMBUKTIAN OOSIT KOMPETEN UNTUK BERKEMBANG LEBIH BAIK DENGAN INDIKATOR PEMBENTUKKAN PRONUCLEUS

METODE PENELITIAN TH I

Koleksi Oosit :

- Ovarium RPH

SELEKSI OOSIT:

BCB+
BCB-
KONTROL

**Analisa:
Tahapan Meiosis
GV-MII**

Maturasi
TCM199+Hormon
+10%FBS
39°C, 5%CO₂, 24h

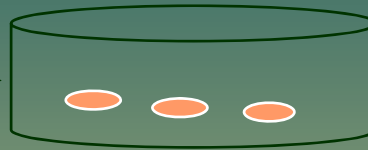
**Pewarnaan
Aceto Orcein
2%**

**Fiksasi preparat
Etanol:As Asetat**

METODA PENELITIAN TH 2

MEDIA KULTUR

**Koleksi Oosit :
Ovarium RPH**

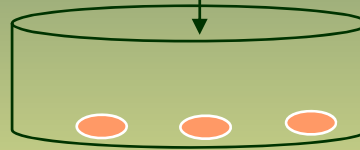


TCM 199, HORMON
DAN SERUM

Maturasi

24 jam

**Spermatozoa
(semen beku)**



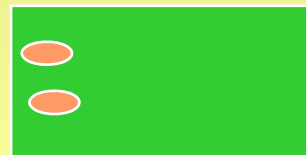
TALP MEDIUM

Fertilisasi

24 jam

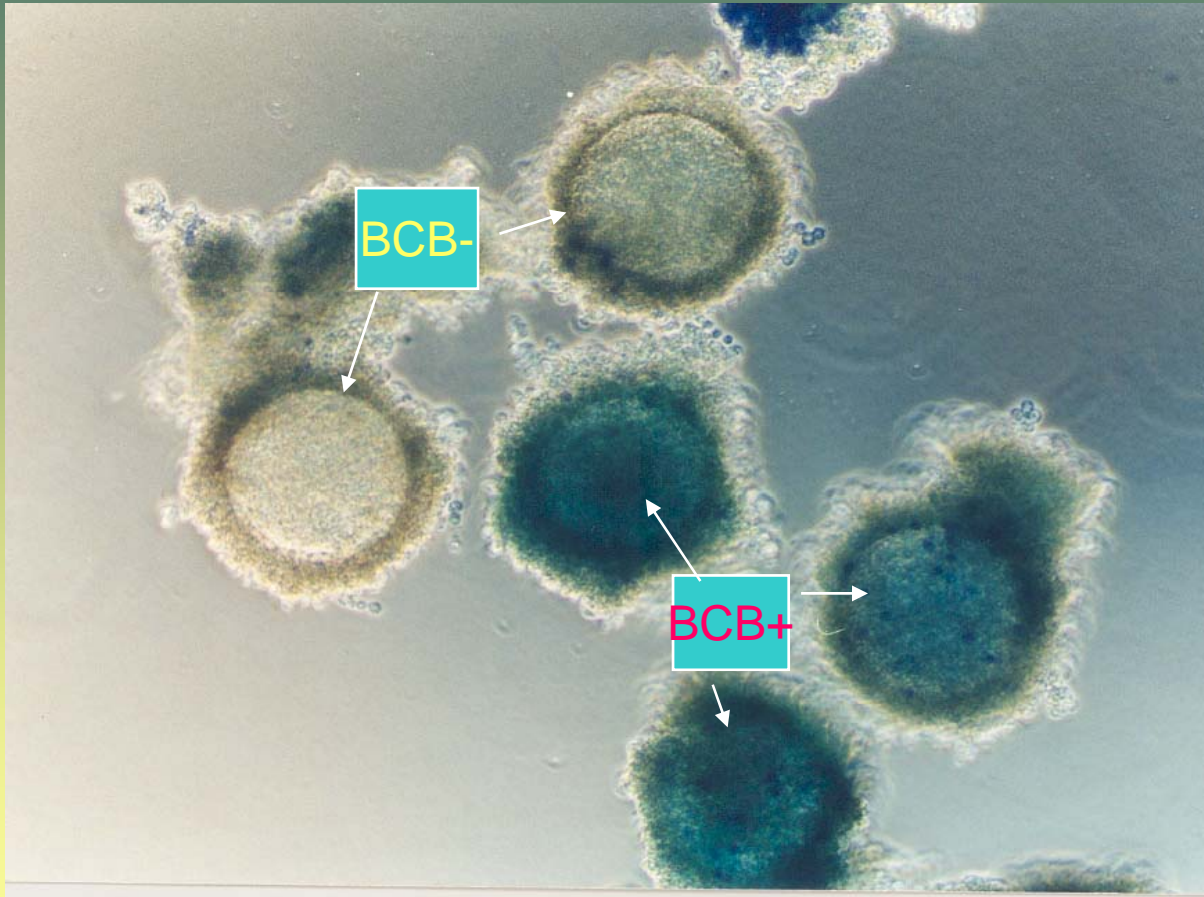
Pengamatan

1. Jumlah pronukleus
(Pewarnaan
Aceto orcein)

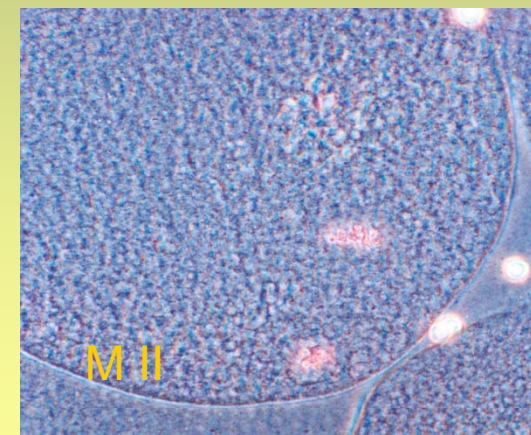
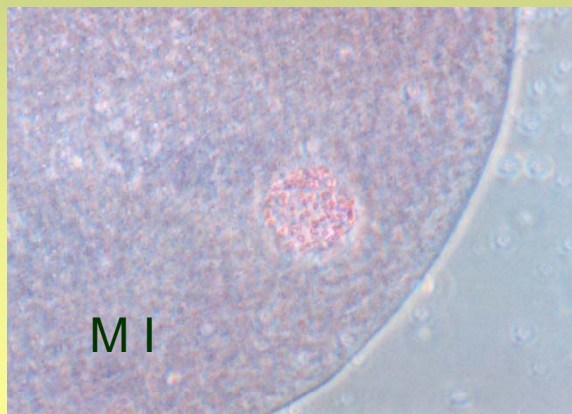
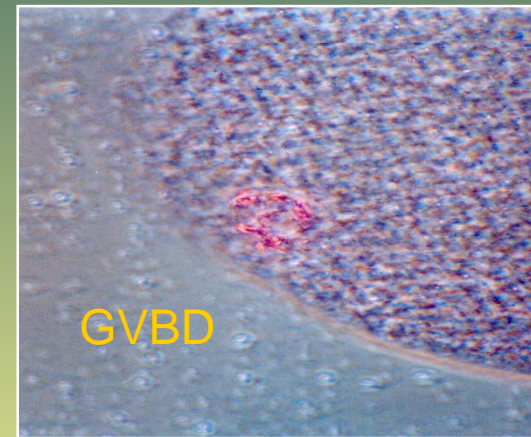
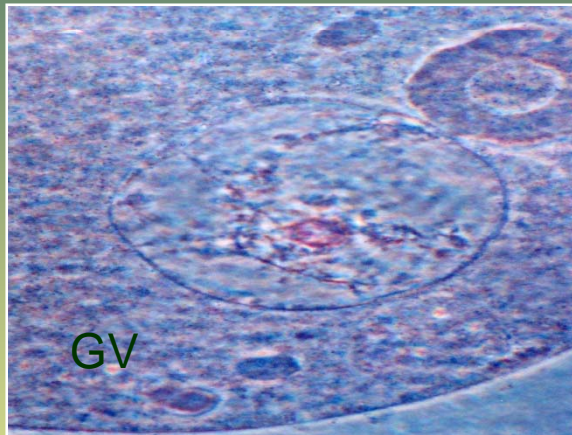


Asam Asetat: Ethanol
1;3

HASIL PEWARNAAN BCB



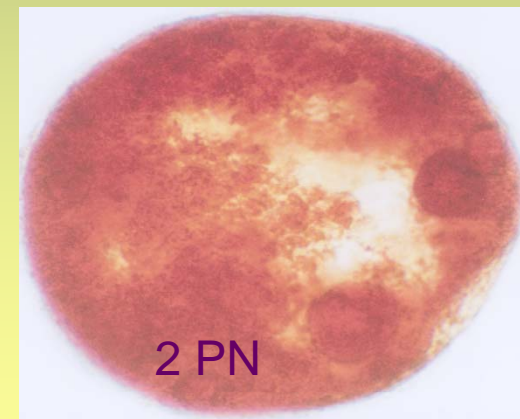
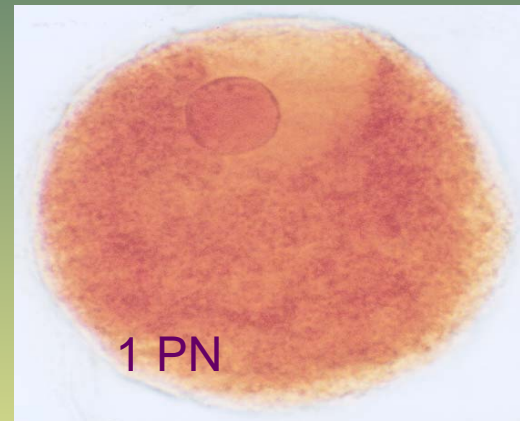
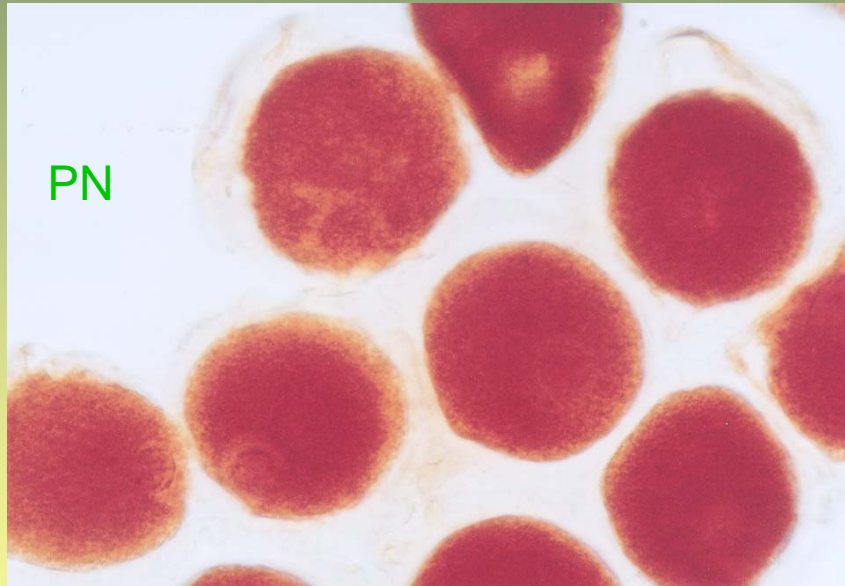
TAHAPAN MEIOSIS OOSIT



TINGKAT PEMATANGAN INTI

Perlakuan	Jumlah Oosit	Status Inti Oosit (%)					Tidak Terdeteksi
		GV	D (GVBD)	MI	AI-TI	MII	
BCB+	57	8(14)	7(12) ^a	1(2)	-	31(54) ^a	10
BCB-	60	9(15)	32(53) ^b	5(8)	-	5(8) ^b	10
Kontrol	52	-	5(10) ^a	1(2)	-	42(81) ^a	4

PRONUKEUS SETELAH FERTILISASI



TINGKAT FERTILISASI DAN PRONUKLEUS

Perlakuan	Jumlah Oosit	Tidak Terbuahi	Oosit Terbuahi dan Jumlah Pronukleus		Tidak Terdeteksi	Tingkat Fertilisasi (%)
			1 PN	2 PN		
BCB +	23	-	16	4	3	86,95
BCB -	12	1	5	1	5	50,00
Kontrol	14	9	5	-	-	35,71

PEMBAHASAN

- Pewarnaan BCB mampu membedakan kriteria oosit
- Kecenderungan mengalami apoptosis pd oosit terpapar BCB, meskipun tidak terbukti (Opiele et al, 2008)
- Perbedaan tingkat molekuler dan subseluler oosit terpapar BCB (Torner et al, 2008)

KESIMPULAN

- Deteksi aktivitas G6PD dengan BCB dapat dipakai untuk menseleksi oosit yang kompeten dan inkompeten
- Oosit dengan BCB+ mempunyai kompetensi mencapai pematangan lebih baik dari BCB-
- Oosit BCB+ mempunyai kompetensi perkembangan awal embrio (pronukleus) lebih baik dari BCB-



TERMAKASH

16 7 2006

PUBLIKASI ILMIAH

- Setiadi, M.A. dan I. Supriatna. 2010. Kemampuan pematangan inti oosit domba setelah pengujian aktivitas glukosa 6 phosphat dehidrogenase. J. Veteriner (in Press)