

Tingkat Pematangan Inti Oosit Domba dari Ovarium dengan Status Reproduksi dan Medium Maturasi yang Berbeda

Maturation Rate of Ovine Oocytes from Different Reproductive Status and Maturation Medium

ARIEF BOEDIONO^{1*}, YULNAWATI², MOHAMAD AGUS SETIADI³

¹Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

³Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 13 Juni 2005/Disetujui 10 November 2006

The aim of the present study was to determine the number of follicles, oocyte quality and maturation rate of oocytes from pairs of ovary with different reproductive status in two maturation medium, TCM-199 as control and CR1aa as treatment. The pairs of ovary were classified into four groups: (i) ovaries with corpus luteum (CL) and dominant follicle (DF), (ii) ovaries with CL, without DF, (iii) ovaries with DF, without CL, (iv) ovaries without both CL and DF. Results of the experiment revealed that the greatest number of follicles was observed from ovary with CL without DF (15.88 ± 10.68), although not significantly different ($P > 0.05$) with other status of ovaries. The lowest number ($P < 0.05$) of A grade oocytes was found from ovary with DF without CL (1.20 ± 1.10). The percentage of Metaphase II was highest in TCM-199 (75.51%) with oocytes from ovaries with CL and DF, and the lowest with oocytes from ovaries with DF without CL in TCM-199 and CR1aa (42.86 and 30.95%). The study suggested that the number of oocytes with A grade were influenced by the reproductive status of ovaries. The maturation rate of A grade oocytes was influenced by the quality of oocytes and the composition of maturation medium.

Key words: reproductive status, corpus luteum, dominant follicles, TCM-199, CR1aa

PENDAHULUAN

Kegiatan produksi embrio secara *in vitro* telah banyak dilakukan terutama pada berbagai jenis hewan ruminansia. Produksi embrio *in vitro* secara tidak langsung dapat membantu meningkatkan populasi ternak. Dengan demikian dapat memenuhi kebutuhan masyarakat untuk protein hewani yang berasal dari ternak termasuk ruminansia besar (sapi dan kerbau) dan kecil (domba dan kambing). Selain itu, teknologi produksi embrio *in vitro* juga dapat melestarikan hewan langka dan satwa terancam punah, sehingga keseimbangan ekosistem dapat terjaga.

Dalam rangkaian proses produksi embrio (pematangan/maturasi, fertilisasi, dan kultur embrio) secara *in vitro*, dibutuhkan suatu lingkungan mikro yang dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi perkembangan embrio secara *in vitro* adalah pemilihan medium yang tepat. Secara umum, medium untuk produksi embrio *in vitro* dibedakan menjadi medium kompleks dan sederhana (Gordon 1994). *Tissue culture medium* (TCM)-199 merupakan medium kompleks yang bersifat komersial dan telah digunakan untuk produksi embrio sapi (Sumantri *et al.* 1998; Boediono *et al.* 2003), domba (Gomez *et al.* 1998; Jaswandi *et al.* 2001) dan babi (Wang *et al.* 1997).

Charles Rosenkrans (CR)1aa merupakan medium sederhana yang relatif mudah dibuat dan praktis. Berdasarkan komposisi bahan penyusunnya, diharapkan medium ini dapat digunakan sebagai medium alternatif dalam proses produksi embrio *in vitro*. Penggunaan CR1aa sebagai medium maturasi telah dilaporkan pada oosit kerbau (Abdoon *et al.* 2001), dan onta (Abdoon 2001). Medium CR1aa pada awalnya digunakan untuk kultur embrio sapi (Rosenkrans *et al.* 1993). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk membandingkan kemampuan medium CR1aa dengan TCM-199 dalam keseluruhan tahapan produksi embrio domba *in vitro*.

Guna keberhasilan proses produksi embrio secara *in vitro*, perlu juga diperhatikan sumber oosit yang digunakan. Oosit tumbuh dalam lingkungan folikel yang berada pada ovarium dan mengikuti suatu siklus pertumbuhan tertentu. Pada sapi dan domba, dapat terjadi beberapa kali gelombang folikel dalam satu siklus estrus. Menurut Souza *et al.* (1998) dan Evans *et al.* (2002), umumnya pada domba terjadi dua hingga tiga kali gelombang folikel yang masing-masing dapat menghasilkan lebih dari satu folikel dominan (FD). Keberadaan FD dapat menurunkan konsentrasi *follicle stimulating hormone* (FSH) (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2004). Hal ini menyebabkan terjadinya tekanan terhadap pertumbuhan folikel lain yang tumbuh pada gelombang yang sama, sehingga akan mengalami regresi (Varishaga *et al.* 1998). Selanjutnya, FD akan mengalami ovulasi, dan sisa FD yang telah mengalami ovulasi akan membentuk corpus luteum (CL). Corpus luteum

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-421823,
E-mail: ab1@cbn.net.id

terdiri dari sel-sel yang dapat menghasilkan hormon progesteron yang berfungsi untuk implantasi dan pemeliharaan kebuntingan. Pasangan ovarium yang memiliki CL dikatakan berada dalam status reproduksi aktif, karena pertumbuhan folikel subordinat tetap berlangsung walaupun terdapat CL. Keberadaan FD dan CL dalam ovarium akan memberikan pengaruh terhadap perkembangan folikel dan menyebabkan terjadinya perbedaan status reproduksi ovarium. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi jumlah folikel dan kualitas oosit yang dikoleksi dari pasangan ovarium dengan status reproduksi berbeda. Selain itu bertujuan untuk mengevaluasi tingkat kematangan inti oosit domba yang berasal dari pasangan ovarium dengan status reproduksi berbeda tersebut dalam dua jenis medium pematangan (TCM-199 dan CR1aa).

BAHAN DAN METODE

Koleksi Oosit. Oosit dikoleksi dari ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) dengan membedakan status reproduksi dari setiap pasangan ovarium individu. Pasangan ovarium dikelompokkan sebagai berikut: (i) pasangan ovarium dengan corpus luteum (CL) dan folikel dominan (FD), (ii) pasangan ovarium dengan CL tanpa FD, (iii) pasangan ovarium dengan FD tanpa CL, serta (iv) pasangan ovarium tanpa CL dan FD. Pengamatan mengenai jumlah folikel dan kualitas oosit yang terkoleksi menggunakan tujuh pasang ovarium pada setiap kelompok status reproduksi berbeda. Ovarium ditempatkan dalam medium NaCl fisiologis pada suhu 30 °C dan dibawa ke laboratorium dalam waktu kurang dari lima jam setelah pemotongan. Koleksi oosit dengan teknik *slicing* dilakukan menggunakan larutan *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 5% dan campuran penisilin dengan streptomisin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Oosit yang digunakan adalah oosit yang memiliki sitoplasma yang homogen, kompak dan memiliki lebih dari dua lapis sel kumulus (kualitas A dan B; Gambar 1). Oosit yang memiliki sitoplasma yang tidak homogen dan tanpa sel kumulus (kualitas C) tidak digunakan untuk pematangan *in vitro*. Oosit hasil koleksi dicuci dalam medium koleksi dan medium maturasi masing-masing sebanyak dua kali.

Pematangan Oosit *In Vitro*. Oosit dari keempat kelompok pasangan ovarium dimatangkan dalam medium TCM-199 atau CR1aa yang keduanya mendapatkan suplementasi FBS 10%, FSH (Antrin, Denka Pharmaceutical Co., Kawasaki, Japan) 10 IU/ml, *Luteinizing Hormone* (LH; Chorulon®; Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) 10 IU/ml, Estradiol (Oestradiol Benzoate®, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) 1 µg/ml dan campuran penisilin dengan streptomisin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Pematangan oosit dilakukan dalam medium maturasi dalam bentuk tetesan (*drop*) masing-masing 50 µl untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan mineral oil (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) dalam inkubator CO₂ 5%, 38 °C selama 24 jam. Jumlah keseluruhan oosit yang digunakan untuk pematangan inti adalah 371 oosit

yang berasal dari empat kelompok pasangan ovarium dengan status reproduksi berbeda dan dimatangkan dalam dua jenis medium pematangan.

Evaluasi Tingkat Pematangan Inti. Sebelum dilakukan evaluasi, oosit yang telah dimaturasi, perlu dilepaskan dari sel-sel kumulus yang mengelilinginya dengan menggunakan enzim hyaluronidase (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) 0.25% dan dilanjutkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan pipet berdiameter yang sesuai dengan ukuran oosit. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus diletakkan pada *drop* KCl 0.90% di atas kaca objek, lalu difiksir dengan kaca penutup yang memiliki bantalan parafin dan vaselin (1:9) pada keempat sudutnya. Kaca objek yang berisi oosit tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan etanol dengan perbandingan 1:3 selama 3-4 hari. Satu jam sebelum diwarnai, kaca objek yang berisi oosit direndam terlebih dahulu dalam larutan etanol absolut. Setelah itu preparat oosit diwarnai dengan aceto-orcein 2% selama lima menit. Larutan pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi kaca penutup dilapisi cairan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi inti dengan mikroskop fase kontras. Evaluasi tingkat kematangan inti yang diamati pada penelitian ini dinilai dengan cara menghitung jumlah oosit pada setiap tahap pembelahan meiosis, mulai dari *germinal vesicle break down* (GVBD), Metafase I (M I) dan Metafase II (M II). Tahap GVBD ditandai dengan robeknya membran inti dan inti sudah tidak terlihat jelas; M I ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berpasangan dan paralel dengan bidang ekuator dan M II (oosit matang) ditandai dengan adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan tahap M I (Gambar 2).

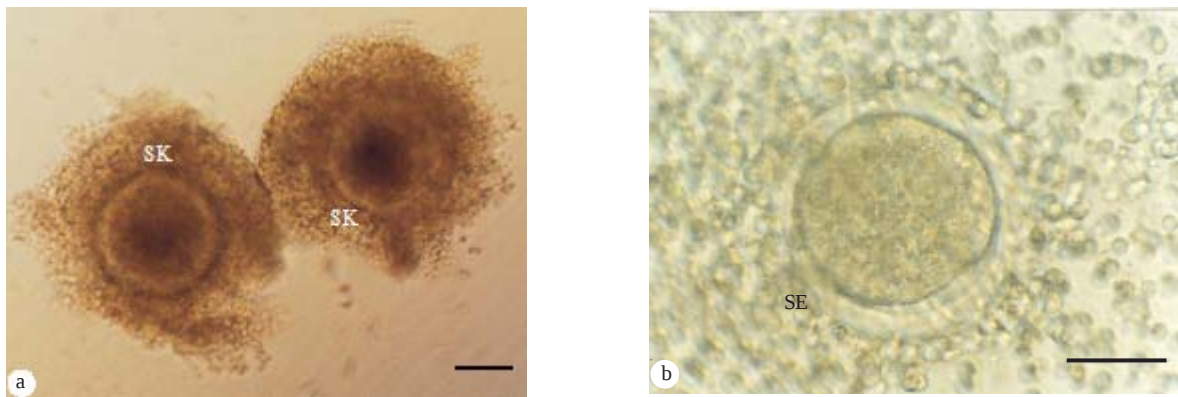
Rancangan Penelitian. Penelitian mengenai pengaruh status reproduksi ovarium terhadap jumlah folikel dan kualitas oosit dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tujuh kali ulangan. Setiap pasangan ovarium dianggap sebagai ulangan.

Rancangan percobaan untuk tingkat kematangan inti oosit yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial 4 x 2 dengan tujuh kali ulangan. Faktor yang diuji adalah faktor status reproduksi ovarium dan jenis medium. Faktor status reproduksi ovarium terdiri dari empat kelompok yaitu pasangan ovarium yang memiliki CL dan FD, pasangan ovarium yang memiliki CL tanpa FD, pasangan ovarium yang memiliki FD tanpa CL, dan pasangan ovarium yang tidak memiliki CL dan FD. Sedangkan faktor jenis medium yang digunakan terdiri dari dua jenis, yaitu TCM-199 sebagai kontrol dan CR1aa sebagai perlakuan.

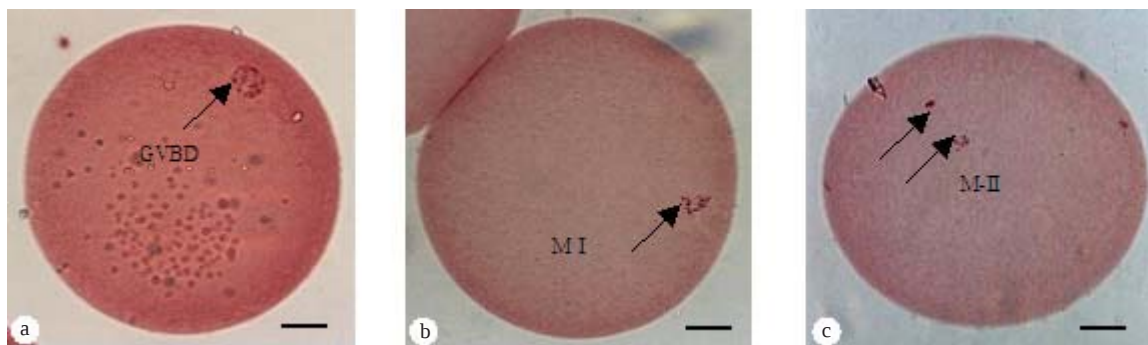
Analisis Statistik. Data dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan dengan tingkat kepercayaan 5% (Steel & Torrie 1981). Data diolah menggunakan program SAS system.

HASIL

Evaluasi Jumlah Folikel Berdasarkan Status Reproduksi Ovarium Individu. Dari keempat kelompok pasangan ovarium yang diamati, terlihat bahwa pertumbuhan folikel terjadi pada



Gambar 1. Perkembangan oosit domba *in vitro*. a. Oosit sebelum mengalami pematangan yang ditandai dengan adanya sel-sel kumulus yang kompak, garis skala = 100 µm; b. Oosit domba setelah 24 jam pematangan *in vitro*, ditandai dengan terjadinya ekspansi sel-sel kumulus, garis skala = 50 µm.



Gambar 2. Status inti oosit setelah pematangan *in vitro*. Tanda panah menunjukkan status inti pada tahap: a. *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), b. Metafase I (M I), c. Metafase II (M II). Garis skala = 50 µm.

Tabel 1. Jumlah folikel dan oosit yang terkoleksi dari pasangan ovarium dengan status reproduksi yang berbeda

Status ovarium		Jumlah pasangan ovarium	Jumlah folikel	Jumlah oosit terkoleksi dengan kualitas		
CL	FD			A	B	C
+	+	7	15.75 ± 4.95a	3.93 ± 1.20b	4.00 ± 2.15a	12.38 ± 5.64a
+	-	7	15.88 ± 10.68a	3.13 ± 1.82b	4.13 ± 2.53a	9.00 ± 6.47a
-	+	7	11.00 ± 7.58a	1.20 ± 1.10a	3.20 ± 1.47a	11.07 ± 3.26a
-	-	7	12.13 ± 12.13a	3.40 ± 1.58b	3.47 ± 2.33a	10.80 ± 5.97a

CL: Corpus Luteum, FD: Folikel Dominan, +: ada, -: tidak ada. Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$). A: Oosit dengan sitoplasma homogen, seluruh permukaan oosit dikelilingi oleh lebih dari dua lapis sel kumulus; B: Oosit dengan sitoplasma homogen, sebagian permukaan oosit dikelilingi oleh lebih dari dua lapis sel kumulus (lapisan sel kumulus tidak utuh); C: Oosit dengan sitoplasma tidak homogen, tidak dikelilingi oleh sel kumulus

setiap ovarium dengan berbagai status reproduksi (Tabel 1). Jumlah folikel terbanyak (15.88 ± 10.68) ditemukan pada pasangan ovarium yang memiliki CL tanpa FD ($P > 0.05$). Jumlah oosit kualitas A yang terkoleksi paling banyak berasal dari pasangan ovarium yang memiliki CL dan FD sebanyak 3.93 ± 1.20 dan berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan pasangan ovarium yang memiliki FD tanpa CL sebanyak 1.20 ± 1.10 (Tabel 1).

Evaluasi Tingkat Kematangan Inti Oosit. Hasil pematangan inti oosit dari pasangan ovarium dengan status reproduksi berbeda dalam medium TCM-199 dan CR1aa dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat interaksi antara status reproduksi ovarium dengan jenis medium yang digunakan terhadap tingkat kematangan inti oosit. Oosit yang berasal dari pasangan ovarium yang memiliki CL dan FD dimatangkan dalam medium TCM-199

mencapai tahap M II sebesar 75.51%, lebih tinggi ($P < 0.05$) daripada dalam medium CR1aa sebesar 46.81%. Terlihat adanya kecenderungan tingkat pematangan inti oosit yang lebih baik dalam medium TCM-199 daripada CR1aa.

PEMBAHASAN

Evaluasi Jumlah Folikel Berdasarkan Status Reproduksi Ovarium. Setelah memasuki usia pubertas, gelombang pertumbuhan folikel (folikulogenesis) pada ovarium menjadi aktif dan akhirnya akan membentuk folikel de Graaf yang siap untuk diovulasikan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gelombang pertumbuhan folikel selalu terjadi, baik pada fase folikular maupun luteal. Namun, kehadiran folikel dominan pada kedua fase ovarium tersebut dapat menghambat pertumbuhan folikel subordinat. Pada Tabel 1 terlihat bahwa

Tabel 2. Tingkat kematangan inti oosit dalam medium TCM-199 dan CR1aa dari pasangan ovarium dengan status reproduksi yang berbeda

Status ovarium		Media IVM	Jumlah pasangan ovarium	Jumlah oosit	Status inti (%)			
CL	FD				GVBD	M I	M II	TI
+	+	TCM-199	7	49	4/49 (8.16)dc	7/49 (14.29)a	37/49 (75.51)a	1/49 (2.04)a
		CR1aa	7	47	14/47 (29.79)abc	10/47 (21.27)a	22/47 (46.81)bc	1/47 (2.13)a
+	-	TCM-199	7	44	2/44 (4.55)d	12/44 (27.27)a	29/44 (65.91)ab	1/44 (2.27)a
		CR1aa	7	49	19/49 (39.78)a	9/49 (18.37)a	20/49 (40.82)bc	1/49 (2.04)a
-	+	TCM-199	7	49	14/49 (28.57)abc	13/49 (26.53)a	21/49 (42.86)bc	1/49 (2.04)a
		CR1aa	7	42	18/42 (42.86)a	9/42 (21.43)a	13/42 (30.95)c	2/42 (4.76)a
-	-	TCM-199	7	43	7/43 (16.28)bcd	9/43 (20.93)a	26/43 (60.47)abc	1/43 (2.33)a
		CR1aa	7	48	15/48 (31.25)ab	15/48 (31.25)a	17/48 (35.42)bc	1/48 (2.08)a

GVBD: *Germinal Vesicle Break Down*, M I: Metaphase I, M II: Metaphase II, TI: Tidak teridentifikasi. Angka yang diikuti oleh huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$)

jumlah folikel pada pasangan ovarium yang memiliki FD tanpa CL cenderung sedikit dan lebih rendah dibandingkan dengan pasangan ovarium dari kelompok lainnya. Kehadiran CL pada pasangan ovarium sapi perah memberikan korelasi positif terhadap jumlah folikel. Pada pasangan ovarium yang memiliki CL dan FD, keberadaan CL yang menghasilkan progesteron dalam sirkulasi tubuh. Hal ini menyebabkan hambatan pertumbuhan folikel dominan mencapai ovulasi sehingga akan mengurangi pengaruh negatif dari inhibin dan estradiol yang dihasilkan oleh folikel dominan dalam menghambat pertumbuhan folikel subordinat. Dengan demikian, jumlah folikel subordinat yang terbentuk lebih banyak dengan kualitas oosit yang lebih baik (Taylor & Rajamahendran 1991). Selain itu, nilai standar deviasi yang diperoleh pada jumlah folikel dan oosit yang terkoleksi sangat tinggi (Tabel 1). Hal tersebut menggambarkan perkembangan oosit dan folikel berbeda pada setiap individu, walaupun berada pada status reproduksi yang sama.

Oosit tumbuh dalam lingkungan folikel pada ovarium dengan mengikuti suatu siklus pertumbuhan tertentu. Jumlah oosit dengan kualitas A yang terkoleksi dari kelompok pasangan ovarium yang memiliki FD tanpa CL sangat rendah dan berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan kelompok lainnya. Hambatan terhadap perkembangan folikel yang dihasilkan oleh FD ternyata juga mempengaruhi kualitas oosit yang dihasilkan.

Pertumbuhan folikel dan oosit selama siklus estrus dipengaruhi oleh konsentrasi beberapa jenis hormon reproduksi, seperti progesteron, estradiol, dan inhibin. Konsentrasi progesteron dalam cairan folikel dari FD sangat rendah (Hazeleger *et al.* 1995) dan berbanding terbalik dengan konsentrasi inhibin (Gandolfi *et al.* 1997) dan estradiol (Fortune *et al.* 2001). Sekresi FSH yang mendukung pertumbuhan folikel tidak dipengaruhi oleh progesteron melainkan oleh estradiol dan inhibin yang diproduksi oleh folikel selama periode siklus (Souza *et al.* 1998). Makin besar ukuran folikel maka konsentrasi estradiol dan inhibin yang dihasilkan makin tinggi. Konsentrasi estradiol yang tinggi dalam cairan FD akan mempertahankan konsentrasi FSH pada level basal. Inhibin dan estradiol akan menyebabkan terjadinya efek negatif dan menurunkan konsentrasi FSH sehingga pertumbuhan folikel subordinat akan terhambat dan selanjutnya mengalami regresi dan atresi (Adams *et al.* 1992; Machatkova *et al.* 1996; McGee & Hsueh 2000). Ginther *et al.* (1989) menyatakan bahwa FD menghasilkan efek penekanan terhadap folikel lain dengan

menekan pelepasan FSH. Inhibin memperlihatkan pengaruh terhadap sirkulasi FSH selama tahap awal fase luteal. Inhibin dan estradiol mengontrol pengeluaran FSH selama gelombang folikular pertama. Disebutkan pula bahwa perbedaan efek yang ditimbulkan oleh masing-masing hormon yang ikut dalam aliran darah (secara sistemik) tersebut ternyata memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan folikel dan oosit selama periode gelombang pertumbuhan folikel (Vassena *et al.* 2003).

Evaluasi Tingkat Kematangan Inti Oosit. Tidak terdapat interaksi antara status reproduksi ovarium dengan jenis medium pematangan yang digunakan menunjukkan tingkat kematangan inti oosit domba *in vitro* lebih dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan. Oleh karena jumlah oosit dengan kualitas A dari pasangan ovarium yang memiliki FD tanpa CL lebih rendah daripada pasangan ovarium dari kelompok lainnya. Secara umum terlihat bahwa tingkat pematangan inti oosit dari pasangan ovarium tersebut juga lebih rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa status reproduksi ovarium secara tidak langsung dapat mempengaruhi tingkat kematangan inti oosit domba *in vitro*.

Perbedaan tingkat kematangan inti oosit dalam dua jenis medium dalam penelitian ini, disebabkan perbedaan komposisi bahan penyusun medium tersebut. Komposisi bahan penyusun TCM-199 lebih kompleks dibandingkan dengan komposisi CR1aa, yaitu terdiri dari sumber energi, garam anorganik, bufer, asam amino, dan vitamin yang akan mendukung pematangan oosit secara *in vitro*. Perbedaan komponen penyusun kedua jenis medium tersebut berpengaruh pada tekanan osmotik medium serta metabolisme sel secara keseluruhan. Hal ini menyebabkan persentase tingkat kematangan inti oosit dalam medium TCM-199 lebih baik daripada medium CR1aa. Penelitian Yang *et al.* (1995) menyatakan bahwa tidak diketahui secara pasti keseluruhan komponen yang terdapat dalam TCM-199 tersebut dibutuhkan atau bahkan memberikan efek inhibitor pada konsentrasi tertentu.

Komposisi medium CR1aa terdiri dari NaCl dan KCl sebagai garam anorganik, sodium piruvat, asam laktat, dan glutamina sebagai sumber energi dan NaHCO_3 sebagai bufer serta asam amino esensial dan nonesensial. Zat-zat tersebut merupakan bahan dasar yang dibutuhkan oleh perkembangan sel, baik oosit maupun embrio sehingga CR1aa diharapkan dapat digunakan sebagai medium alternatif untuk maturasi oosit domba. Sodium piruvat diketahui berguna untuk meningkatkan

kemampuan pematangan oosit sapi (Geshe *et al.* 2000) yang dikultur tanpa sel kumulus. Sedangkan glutamina dapat dimetabolisme oleh oosit yang dimatangkan dengan ataupun tanpa sel kumulus (Rieger 1996). Glutamina merupakan substrat sumber energi sebagai pengganti glukosa yang berguna bagi perkembangan embrio sapi tahap awal (Moore & Bondioli 1993) dan berguna untuk mengatasi hambatan perkembangan tahap dua sel pada embrio hamster (Barnett & Bavister 1996). Pada pematangan oosit sapi *in vitro*, metabolisme piruvat, glutamina, dan glisina meningkat secara nyata setelah 12-18 jam kultur. Disamping itu metabolisme glutamina semakin meningkat bersamaan dengan adanya suplementasi LH ke dalam medium (Rieger 1996).

Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa jumlah oosit yang tertahan pada fase GVBD dalam medium CR1aa lebih tinggi dan berbeda nyata dengan TCM-199 ($P < 0.05$) dan jumlah oosit yang mencapai tahap M II dalam medium CR1aa masih lebih rendah dibandingkan TCM-199. Hasil penelitian ini berbeda dengan beberapa laporan penelitian sebelumnya yang memperoleh tingkat kematangan inti oosit kerbau (Abdoon *et al.* 2001) dan onta (Abdoon 2001) yang lebih baik dalam medium CR1aa daripada TCM-199. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan kebutuhan metabolisme oosit dari masing-masing hewan selama proses maturasi *in vitro*.

Tingkat pematangan oosit secara *in vitro* juga dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan. Bilodeau-Goeseels dan Panich (2002) menyatakan persentase tingkat pembelahan sel yang berasal dari oosit yang memiliki lebih dari lima lapis sel kumulus mencapai angka yang lebih tinggi dan berbeda nyata daripada tingkat pembelahan sel yang berasal dari oosit dengan lapisan sel kumulus kurang dari lima lapis, walaupun sitoplasmanya homogen. Keberadaan sel kumulus dapat mendukung pematangan oosit melalui zat metabolit yang dihasilkan dan disekresikan melalui mekanisme *gap junction* ke sel oosit. Ekspansi kumulus dapat didukung oleh penambahan sel granulosa dari folikel, walaupun menurut penelitian Setiadi (2002) tidak terdapat perbedaan nyata pada tingkat pematangan inti antara oosit yang dimatangkan dengan *co-culture* sel granulosa folikel dengan yang tidak.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan folikel dapat berlangsung terus menerus pada setiap status reproduksi ovarium. Hal ini terlihat dari jumlah folikel dan oosit yang tumbuh pada ovarium dengan berbagai status reproduksi. Namun oosit dengan kualitas A terbanyak diperoleh dari ovarium yang memiliki CL dan FD. Tingkat kematangan inti oosit lebih dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan dan kondisi mikro selama proses pematangan, dalam hal ini medium TCM-199 menghasilkan persentase metafase II lebih baik daripada CR1aa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini didanai oleh Proyek Hibah Penelitian Tim Pascasarjana Angkatan III, kontrak nomor: 026/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005. Terima kasih kepada Herdis dan M. Rizal yang telah banyak membantu untuk kelancaran kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdoon ASS. 2001. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedaries*) ovary with special reference to maturation time *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 66:71-79.
- Abdoon ASS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. 2001. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotrophins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci* 65:215-223.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Rep Fert* 94:177-188.
- Barnett DK, Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev* 43:105-133.
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 71:143-155.
- Boediono A, Suzuki T, Godke R. 2003. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. *Anim Reprod Sci* 78:1-11.
- Evans AC, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP. 2002. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 123:59-66.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65:648-654.
- Gandolfi F *et al.* 1997. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology* 48:1153-1160.
- Geshe M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 63:1730-1734.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 32:787-795.
- Gomez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WMC. 1998. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 49:1143-1154.
- Gonzalez-Bulnes A, Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. 2004. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim Reprod Sci* 84:107-119.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Dublin: CAB Int.
- Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 43:509-522.
- Jaswandi, Boediono A, Setiadi MA. 2001. *In vitro* maturation and fertilization of ovine oocytes in system with absence of 5% CO₂. *Reprotech* 1:19-22.
- Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45:801-810.
- McGee EA, Hsueh AJW. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinol Rev* 21:200-214.
- Moore K, Bondioli KR. 1993. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod* 48:833-840.
- Rieger D. 1996. The metabolic activity of cattle oocytes and early embryos. *J Rep Dev* 42:85-89 (Suppl).
- Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49:459-462.

- Setiadi MA. 2002. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes *in vitro*. *Reprotech* 1:87-91.
- Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. 1998. Follicular waves and concentrations of steroid and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 156:563-572.
- Steel RGD, Torrie JH. 1981. *Principles and Procedures of Statistic*. London: Mc Graw-Hill Book Co. Inc. Pub. Ltd.
- Sumantri C, Murakami M, Varisanga MD, Fakhrudin M, Suzuki T. 1998. The relationship of the number of follicles present in an ovary and developmental competence of bovine IVF embryos derived from individual cows. *Jpn J Fertil Steril* 43:165-169.
- Taylor C, Rajamahendran R. 1991. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci* 74:115-123.
- Varishaga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. 1998. Morphology classification of the ovaries in relation to the subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology* 50:1015-1023.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Stefano A, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60:923-932.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Rep Fert* 111:101-108.
- Yang BK, Giles JR, Yang X, Foote RH. 1995. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes in a simple defined (KSOM) medium. *J Reprod Dev* 41:213-218.