

**PENGARUH SUPLEMENTASI FOLLICLE STIMULATING
HORMONE (FSH) DALAM TCM-199
TERHADAP PERKEMBANGAN OVARIUM KEPITING BAKAU
(SCYLLA SPP.) IN VITRO**

**THE EFFECT OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH)
SUPPLEMENTATION IN TCM-199
ON THE MUD CRAB (SCYLLA SPP.)
OVARIAN MATURATION IN VITRO**

Yushinta Fujaya¹, Arif Boediono² dan Adi Winarto²

Abstrak

Tujuan penelitian adalah untuk mengkaji pengaruh suplementasi follicle stimulating hormone (FSH) dalam TCM-199 terhadap pematangan ovarium kepiting bakau. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 0.01 mg FSH/ml dalam TCM-199 tidak efektif merangsang pematangan ovarium kepiting. Oosit mengalami perkembangan dan pertumbuhan setelah 24 jam inkubasi dalam TCM-199, baik dengan maupun tanpa FSH tetapi tidak signifikan nyata ($P>0.05$).

Kata kunci : pematangan ovarium, *Scylla spp.*, TCM-199, FSH, in vitro.

¹ Staf Pengajar pada Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin

² Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

Abstract

The aim of this research was to determine the effect of stimulating hormone (FSH) supplementation in TCM-199 on mud crab (Scylla serrata) ovarian maturation. This in vitro study showed that 0.01 mg FSH/ml in TCM-199 is ineffective to stimulate ovarian maturation of crab. The oosit develop and grow up after 24 hours incubation in TCM-199, both with and without FSH but not significantly different ($P>0.05$).

Keywords : ovarian maturation, Scylla spp., TCM-199, FSH, in vitro

PENDAHULUAN

Tahap awal dari proses reproduksi adalah terjadinya kematangan gonad, yaitu suatu fungsi dari interaksi antara beberapa faktor internal dan eksternal seperti: ukuran tubuh, umur, ketersediaan pakan, lingkungan fisik, sifat biokimiawi air, dan faktor neuroendokrin. Berdasarkan perubahan lingkungan, sistem saraf mengatur kelenjar hormonal untuk menghambat atau memacu pematangan gonad (Barnes, 1987). Menurut Sarojini dkk. (1995), neurotransmitter 5-hydroxytryptamine (5-HT) telah diidentifikasi memiliki pengaruh dalam pelepasan neurohormon pada krustase, antara lain: gonad stimulating hormone (GSH), crustacean hyperglycemic hormone dan molt-inhibiting hormone. Lebih lanjut dikemukakan bahwa GSH ditemukan pada otak dan thoracic ganglion kepiting.

Ada dua neurohormon yang mengatur pematangan gonad krustase, yakni gonad inhibiting hormone (GIH) dan gonad stimulating hormone (GSH). Gonad inhibiting hormone dilepaskan dari kelenjar sinus yang terdapat pada tangkai mata. Sedangkan, GSH dilepaskan dari organ-Y (Lockwood, 1967) yang terdapat pada otak dan thoracic ganglion (Sarojini dkk., 1995). Pelepasan GIH atau GSH dikontrol oleh sistem saraf. Saraf merupakan penerima rangsang dari lingkungan dan berdasarkan informasi perubahan lingkungan, saraf akan

merangsang kelenjar hormonal untuk menghambat atau memacu pematangan gonad melalui neurotransmitter yang dilepaskannya (Barnes, 1987).

Gonadotropin adalah hormon yang berperan dalam produksi telur dan sperma. Menurut Matty (1985), gonadotropin pada hipofisa ikan adalah FSH (Follikel Stimulating Hormone) dan semacam LH (Luteinizing Hormone) pada mamalia. Pada sturgeon, gonadotropin yang berperan dalam produksi telur dan sperma diidentifikasi sebagai gonadotropin hormone I (GTH I) dan gonadotropin hormone II (GTH II). Konsentrasi GTH I meningkat selama vitelogenesis, sedangkan pada saat ovarium matang, ovulasi, dan pemijahan konsentrasi GTH II lebih tinggi dibanding GTH I. Dengan demikian, diyakini bahwa GTH I berperan selama awal perkembangan dan GTH II lebih kuat menginduksi germinal vesicle breakdown (GVBD). Keadaan ini juga berlaku bagi jantan. Pada tahap spermatogenesis konsentrasi GTH I lebih tinggi dibanding konsentrasi GTH II. Sebaliknya, selama spermiasi konsentrasi GTH II melebihi level GTH I. Bila demikian, FSH dan LH yang dikemukakan oleh Matty (1985), adalah serupa dengan GTH I dan GTH II. FSH dan LH bekerja sama untuk menstimulir pematangan folikel dan pelepasan estrogen pada individu betina, serta menstimulasi pelepasan androgen oleh

sel-sel interstitial pada individu jantan untuk mematangkan sperma.

Berdasarkan penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Sarojini dkk. (1995) diketahui bahwa 5-Hydroxytryptamine berperan menstimulasi pelepasan GSH kepinging untuk merangsang pematangan gonad. Karena itu muncul hipotesa bahwa apabila FSH dan LH mamalia serupa dengan GTH pada ikan dan GSH pada kepinging maka FSH mamalia dapat digunakan untuk merangsang pematangan ovarium kepinging. Penggunaan FSH mamalia sebagai hormon eksogen untuk merangsang pematangan ovarium memiliki beberapa keuntungan, antara lain: harga lebih murah, tersedia dalam bentuk siap pakai, mudah disimpan, dan memiliki ukuran standard.

Perkembangan ovarium kepinging ditandai oleh bertambahnya deposisi kuning telur dalam oosit. Lipovitelin dan butiran minyak merupakan komponen kecil pada ovarium dan telur yang belum berkembang tetapi konsentrasinya meningkat menjadi komponen besar pada ovarium dan sel telur matang (Lee dan Walker, 1995). Vitelin krustase adalah gabungan pigmen dengan lipoprotein (high density lipoprotein) yang berwarna orange. Lipoprotein ini terdiri atas lipid (48%), protein (50%), dan karbohidrat (2%) (Lee, 1991). Selama perkembangan ovarium, akumulasi lipoprotein akan diikuti oleh akumulasi butiran minyak. Pada krustase, butiran-butiran minyak nampak pada vitelogenesis akhir.

Vitelin disintesa oleh jaringan ekstra ovarium dan dilepaskan ke dalam cairan tubuh (hemolimph) sebagai respon terhadap GSH (Meusy dan Payen, 1988; Sarojini dkk., 1995). Aparatus golgi dan retikulum endoplasma oosit juga diidentifikasi merupakan tempat sintesa butir-butir kuning telur, sedangkan butiran

minyak disintesa oleh hepatopankreas sedangkan sel-sel folikel memegang peranan penting dalam formasi butiran minyak (Lee dan Watson, 1995).

Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mendeterminasi pengaruh FSH dalam menstimulasi pematangan ovarium kepinging secara *in vitro*. Kajian pengaruh hormonal dalam menginduksi pematangan ovarium secara *in vitro* sebelum aplikasi secara *in vivo* memiliki beberapa keuntungan antara lain: mengurangi biaya penyediaan hewan uji dan menghindari kesalahan aplikasi secara *in vivo*, misalnya jenis hormon atau dosis hormon yang tidak tepat.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel dan Inkubasi Jaringan

Kepinging bakau diperoleh dari penyalur seafood lokal. Ukuran kepinging yang digunakan ± 10 cm (lebar karapas) dengan kondisi ovarium belum berkembang. Sebelum pengambilan jaringan ovarium, kepinging dibilas, dibersihkan dan dianestesi dalam refrigerator (4°C) (Shih dan Liao, 1998). Setelah tenang, kepinging dibedah pada cefalothoraks untuk memudahkan pengambilan jaringan ovarium. Jaringan ovarium dicuci dalam larutan fisiologis 0.85% yang mengandung 150 iu Penisilin-G/ml, dan dipotong kecil (± 5 mm). Semua jaringan ovari yang digunakan berasal dari satu kepinging. Potongan jaringan ovarium selanjutnya diinkubasi dalam vial kultur yang berisi 2 ml medium kultur. Jaringan diinkubasi pada suhu $\pm 24^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dalam kondisi gelap.

Rancangan percobaan

Percobaan terdiri atas dua perlakuan medium kultur dan lima ulangan.

Medium kultur yang digunakan adalah TCM-199 tanpa FSH dan TCM-199 dengan 0.01 mg FSH/ml (Boediono dkk., 1994). Pengaruh FSH dalam medium kultur terhadap perkembangan ovarium dianalisis menggunakan uji t-student. Perkembangan gonad didasarkan pada persentase folikel yang berkembang dan deposisi kuning telur dalam oosit.

Pengamatan Histologi

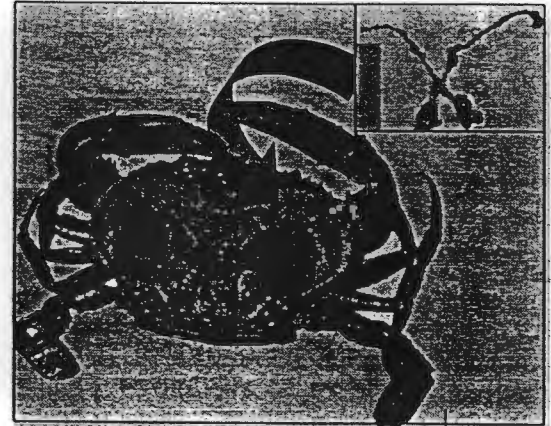
Sediaan histologi disiapkan sesuai prosedur standar yang telah dilakukan oleh Sarojini dkk (1995), yakni setelah 24 jam inkubasi, jaringan ovarium difiksasi dalam larutan Bouin's selama 24 jam. Setelah itu, jaringan didehidrasi dalam seri larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari alkohol 70% sampai 100%. Setelah dehidrasi, jaringan diclearing atau dijernihkan lalu diinfiltrasi. Penjernihan dilakukan dengan silol, sedangkan infiltrasi dilakukan dalam parafin cair. Selanjutnya, jaringan diembedding dalam parafin (m.p. 56-58°C). Jaringan dipotong setebal 5 μ m dan diwarnai dengan hematoxilin-eosin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik kultur jaringan untuk mempelajari pengaruh hormonal dalam menginduksi pematangan gonad belum banyak dilakukan meskipun disadari teknik ini sangat penting dilakukan sebelum aplikasi secara *in vivo*. Terbukti dalam penelitian ini, aplikasi hormonal secara acak mungkin akan menghasilkan respon tidak sesuai yang diharapkan.

Kondisi awal ovarium, berdasarkan pengamatan morfologi berbentuk filamen berwarna putih kekuningan (Gambar 1). Ovarium berbentuk filamen berwarna putih kekuningan menunjukkan bahwa

ovarium berada pada tahap belum berkembang.

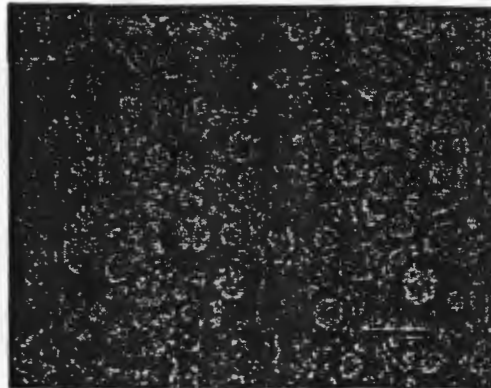
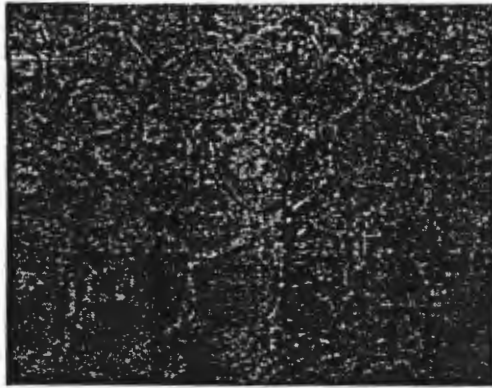


Gambar 1. Ovarium kepiting bakau TKG I (belum berkembang)

Setelah inkubasi selama 24 jam dalam TCM-199, jaringan ovarium masih nampak segar dan berdasarkan pengamatan histologi diketahui bahwa kondisi oosit tetap hidup sebagaimana sebelum kultur. Karakteristik jaringan ovarium tersebut nampak serupa pada perlakuan TCM-199, tanpa dan dengan suplementasi FSH, yakni terjadi perkembangan folikel yang ditandai dengan terbentuknya *vesicle* (Gambar 2). Billard (1992) mengemukakan bahwa secara umum perkembangan telur ikan meliputi empat tahap, yakni: awal pertumbuhan, tahap *vesicle yolk*, tahap vitelogenesis dan tahap pematangan. Tahap *vesicle yolk* dicirikan dengan terbentuknya *vesicle* yang akhirnya akan membentuk kantung korteks (*cortical alveoli*). *Vesicle* ini tidak mengandung kuning telur yang sebenarnya (Hibiya, 1982). Adanya perkembangan folikel setelah inkubasi menunjukkan bahwa TCM-199 cukup baik digunakan sebagai medium kultur jaringan ovarium kepiting bakau. TCM-199 terdiri atas garam-garam anorganik, asam-asam amino,

vitamin-vitamin, dan beberapa komponen lain seperti Adenin sulfat, Adenosin-5-trifosfat, dan kholesterol. Bahan-bahan

tersebut penting demi mendukung berlangsungnya metabolisme sel.



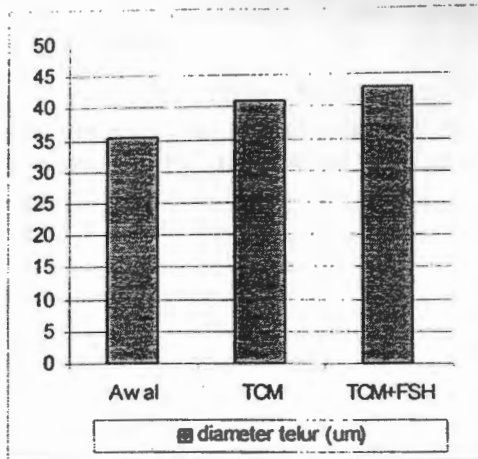
Gambar 2. Karakteristik jaringan ovarium setelah inkubasi selama 24 jam dalam TCM-199, tanpa (A) dan dengan suplementasi FSH (B). Bar setara dengan 25 μ m.

Selain terjadi pembentukan vesicle, diameter telur juga berkembang. Berdasarkan hasil pengukuran diameter telur didapatkan bahwa telur yang diinkubasi dalam TCM-199 selama 24 jam, baik dengan ataupun tanpa FSH menunjukkan peningkatan meskipun tidak signifikan ($P > 0.05$) (Gambar 3).

Beberapa faktor yang diduga mempengaruhi tidak terjadinya percepatan pematangan ovarium secara signifikan pada perlakuan dengan suplementasi FSH, adalah: dosis FSH yang digunakan kurang efektif, waktu inkubasi yang relatif singkat, dan atau reseptor GSH pada keping tidak mengenali FSH mamalia. Hal ini juga terjadi pada ikan mas, aplikasi 100 iu HCG/ml medium kultur memiliki pengaruh yang sama dengan kontrol, namun setelah dilakukan kombinasi antara human chorionic gonadotropin (HCG) dan carp pituitary homogenate (CPH) maka terjadi percepatan pematangan ovarium secara signifikan (Epler dkk., 1986). Kehadiran CPH bersama-sama dengan HCG diduga dapat mengakselerasi bio-

sintesis steroid yang dibutuhkan untuk menginisiasi pematangan oosit.

Hasil studi in vitro yang didapatkan ini belum mampu menjelaskan apakah FSH efektif digunakan untuk menginisiasi pematangan oosit atau tidak. Namun, adanya kecenderungan perbedaan diameter telur antara ovarium yang diinkubasi hanya dengan TCM-199 dan yang disuplementasi dengan FSH serta hasil penelitian yang dilakukan oleh Epler dkk. (1986), besar kemungkinan peningkatan konsentrasi FSH atau kombinasi FSH dan *crab thoracic ganglion homogenate* (CTGH) dapat menginisiasi percepatan pematangan oosit keping.



Gambar 3. Diameter telur (μm) sebelum dan setelah inkubasi selama 24 jam dalam TCM, tanpa dan dengan FSH

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan perkembangan folikel dan diameter telur maka disimpulkan bahwa 0.01 mg FSH/mg dalam TCM-199 tidak efektif merangsang perkembangan ovarium secara signifikan. Namun, adanya kecenderungan perkembangan ovarium yang lebih besar pada perlakuan dengan penambahan FSH dibandingkan tanpa FSH disarankan melakukan penelitian lanjutan dengan dosis FSH yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes RD. 1987. Invertebrate Zoology. USA. Sounders College Pub.
- Biliard R. 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservations of gametes. Aquaculture 100:263-98.
- Boediono A, Takagi M, Saha S, Suzuki T. 1994. The influence of day 0 and day 7 superovulated cow serum during in vitro development of bovine oocytes. Reprod. Fertil. Dev. 6:261-264
- Epler P, Sokolowska M, Popek W, Bieniarz K. 1985. Joint action of carp (*Cyprinus carpio* L.) pituitary homogenate and human chorionic gonadotropin (HCG) in carp oocytes maturation and ovulation: in vitro and In vivo studies. Aquaculture 51:133-142.
- Hibiya T. 1982. An Atlas of Fish Histology; Normal and Pathological Features. Kodansha.
- Lee CY, Watson RD. 1995. In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. J. Exp. Zool. 271:364-372.
- Lee RF. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. Adv. Comp. Environ. Physiol. 7:187-289.
- Lee RF, Walker A. 1995. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab (*Callinectes sapidus*). J. Exp. Zool. 271:401-412.
- Lockwood APM. 1967. Aspects of the Physiology of Crustacea. San Fransisco: W.H.Freemans.
- Matty AJ. 1985. Fish Endocrinology. Croom Helm London & Sydney Timber.
- Meusy JJ, Payen GG. 1988. Female reproduction in malacostracan crustacea. Zool. Sci. 5:217-265.
- Sarojini R, Nagabushanam R, Fingerman M. 1995. Mode of action of the neurotransmitter 5-Hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: an in

vivo and *in vitro* study. J. Exp. Zool.
271:395-400.

brevidactylus in vitro. Zool. Stud.
37(2):102-110.

Shih JT, Liao CF. 1998. Conversion of
cholesterol to sex steroid-like
substances by tissues of *Mictyris*.