

**ANGKA MATURASI IN VITRO OOSIT DAN ASPEK EKSPANSI
SEL KUMULUS DALAM MEDIUM TCM-199 YANG MENGANDUNG
BERBAGAI LEVEL HEPES¹**

Tinda Afriani, Zaituni Udin, Firda Arlina²

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan level optimal HEPES dalam medium TCM-199 dalam proses pematangan oosit in vitro.

Oosit dengan kumulus kompak dan mempunyai sitoplasma yang homogen dimatangkan dengan menggunakan empat macam media TCM-199 yang di buffer dengan 0, 10, 20, 30 mM HEPES. Oosit dalam masing-masing medium dikultur dalam incubator CO₂ dan incubator tanpa CO₂. Kultur dilakukan selama 24 jam pada suhu 39°C. Angka pematangan oosit dievaluasi dengan pewarnaan osein, dimana tingkat pematangan dibagi atas 5 kategori. Data kematangan oosit dianalisa secara statistik dengan analysis of variance dan data kumulus dengan Chi-square (Steel and Torrie, 1984).

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa angka pematangan oosit pada medium tanpa HEPES dan di incubator tanpa CO₂ lebih rendah dari perlakuan lain ($P > 0.05$). Disamping itu terdapat interaksi antara penambahan HEPES dan keberadaan CO₂ di incubator. Tingkat perkembangan sel kumulus pada kondisi dengan tanpa CO₂ dan tanpa penambahan HEPES paling rendah diantara perlakuan dan tertinggi adalah pada tanpa CO₂ dan mendapat 20 mM HEPES.

Dapat disimpulkan bahwa proses pematangan in vitro dapat dilakukan pada kondisi tanpa CO₂ dengan menambahkan 20 mM HEPES dalam medium pematangan.

Kata kunci: CO₂, HEPES, maturasi in vitro

1 Dibiayai dana SPP/DPP Universitas Andalas tahun 2001

2 Staf Pengajar Fakultas Peternakan Universitas Andalas

PENDAHULUAN

Produksi embrio secara *in vitro* telah banyak dilakukan pada berbagai jenis ternak seperti sapi, domba, kambing dan kerbau. Namun masih dihadapkan kepada tingkat efisiensi yang masih rendah baik dari segi hasil maupun biaya yang diperlukan untuk produksi embrio. Untuk produksi embrio secara *in vitro* oosit dapat diperoleh dari ovarium hewan yang dipotong maupun dari hewan yang masih hidup. Pemanfaatan ovarium hewan yang dipotong sebagai sumber oosit akan lebih murah karena tidak dimanfaatkan lagi. Namun demikian pemanfaatannya masih dibatasi karena pemotongan hewan ternak yang tersebar dalam jumlah kecil terutama ternak kecil seperti domba dan kambing. Disamping itu masa viabilitasnya terbatas. Untuk ini diperlukan teknologi yang dapat memungkinkan proses produksi embrio *in vitro* sesegera mungkin.

Proses produksi embrio *in vitro* dilakukan dalam kondisi lingkungan yang terkontrol yaitu pada suhu 39 °C dan udara mengandung 5% CO₂ dan 20% O₂. Keberadaan CO₂ dalam inkubator sangat penting karena berperanan dalam mempertahankan pH medium yang optimum bagi pertumbuhan embrio yaitu sekitar 7.2 – 7.4. Selama proses *in vitro* CO₂ disuplai dari tabung gas, hal ini merupakan salah satu pembatas penerapan produksi embrio *in vitro* diluar laboratorium. Untuk meningkatkan fleksibilitas diperlukan teknologi yang memungkinkan untuk mengganti sumber atau peranan CO₂ dalam mempertahankan medium.

Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan granul dapat digunakan sebagai sumber CO₂ untuk pematangan, fertilisasi dan kultur embrio pada sapi (Suzuki, *et al.*, 1995, Suzuki, *et al.*, 1996 dan Khan, *et al.*, 1999). Selain dengan cara tersebut pH medium dapat dipertahankan dengan menambahkan suatu buffer atau penyangga seperti hepes, tricine, dan lain-lain (Freshney, 1987). Hepes merupakan penyangga yang sangat efektif untuk mempertahankan pH pada kisaran 7.2-7.6. Hasil pematangan oosit kambing (Le Gal, 1992, Martino, *et al.*, 1995) dan sapi (Byrd, *et al.*, 1995) menunjukkan bahwa penambahan penyangga ini dalam medium dapat memberikan kondisi optimal bagi pematangan oosit. Salah satu factor pembatas penggunaannya dalam medium adalah karena Hepes dapat menurunkan proporsi zigot yang berkembang sampai tahap blastosis. Oleh karena itu diperlukan konsentrasi optimal penggunaannya dalam medium.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan level terbaik Hepes dalam medium TCM-199 untuk pematangan oosit tanpa CO₂. Dari hasil yang diperoleh diharapkan dapat membantu produksi embrio *in vitro* pada laboratorium yang belum memiliki fasilitas CO₂ atau selama transportasi dalam upaya penyelamatan hewan langka (*endangered species*)

MATERI DAN METODA PENELITIAN

Koleksi oosit

Ovarium dari Rumah Potong Hewan dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi media NaCl fisiologis (0.9%) pada temperatur 35 0C. Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara menyayat ovarium (*slicing*) dan oosit yang terlepas

diamati dibawah mikroskop. Oosit yang digunakan dalam pematangan adalah oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus dan mempunyai sitoplasma yang homogen.

Pematangan oosit in vitro

Oosit yang diperoleh dicuci tiga kali dalam medium PBS Dan dilanjutkan dalam medium pematangan TCM-199. Pematangan oosit menggunakan empat macam medium yaitu medium TCM-199 yang mengandung 0 mM, 10 mM, 20mM dan 30mM Hepes. Masing-masing medium juga disuplementasi dengan 10 ug FSH/ml, 10% Calf Serum (CS) dan 50 ug gentamisin/ml. Pematangan oosit dilakukan dalam 100 ul (drop) dari masing-masing medium pematangan yang ditutup dengan minyak mineral dalam petridish 30 mm. Masing-masing perlakuan medium kemudian diinkubasi dalam incubator CO₂ dan tanpa CO₂ pada temperatu 39 °C selama 24 jam. Oosit setelah pematangan diamati tingkat perkembangan sel-sel kumulusnya. Sel-sel kumulus dikelompokkan atas lima kelompok dan diberi Skore 0 untuk sel kumulus yang tidak ekspansi, 1 untuk sel kumulus yang ekspansi satu lapis, 2 untuk sel kumulus yang ekspansi dua lapis, 3 untuk sel kumulus yang ekspansi lebih dari tiga lapis dan 4 untuk sel kumulus yang ekspansi lebih tiga lapis diikuti oleh ekspansi zona pellucida.

Evaluasi Pematangan

Pematangan oosit ditentukan berdasarkan keberadaan Metafase plate II (M II) yang diamati setelah pewarnaan orcein. Prosedur pewarnaan dilakukan menurut yang dikemukakan oleh Mermillod, *et al.*, (1993). Oosit selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan orcein 1% selama 10 menit lalu dicuci dengan gliserol asetat dan dikeringkan. Keberadaan Metafase plate II (MII) diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10.

Peubah yang Diamati

1. Persentase oosit yang matang (mencapai metafase II, MII) dari masing-masing perlakuan level hepes dalam medium TCM-199
2. Persentase oosit yang mencapai metafase II (MII) dari masing perlakuan inkubasi (inkubator CO₂ dan tanpa CO₂)
3. Persentase oosit dengan tingkat ekspansi sel kumulus 3 sampai 4 lapis untuk masing medium dan incubator.
4. Interaksi level Hepes dalam medium pematangan dengan sistim inkubasi

Analisis Data.

Data angka pematangan oosit diolah secara statistik dengan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial 4 x 2 (4 level Hepes dalam medium) dan jika terdapat perbedaan antara perlakuan dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test.*

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Angka Maturasi

Angka maturasi oosit setelah pematangan oosit selama inkubasi 24 jam menggunakan 4 macam media yang berbeda yaitu TCM-199 dengan 30 mM

penyangga Hepes yang diinkubasi dalam 2 macam inkubator yaitu inkubator CO₂ dan tanpa CO₂ dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Angka Pematangan Oosit Menurut Perlakuan Medium dan Inkubasi (%)

Sistem Inkubasi	Konsentrasi Hepes				Rata-rata
	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM	
CO ₂	61.36 (27/41)	64.10 (25/39)	60.00 (24/40)	51.61 (16/31)	59.27
Tanpa CO ₂	32.35 (11/34)	53.65 (22/41)	64.10 (25/39)	58.33 (16/31)	52.11
Rata-rata	93.71	117.75	124.10	109.94	111.38

Pada tabel diatas terlihat bahwa rata-rata dari angka pematangan oosit untuk perlakuan medium TCM-199 tanpa penyangga Hepes , TCM dengan 10 mM penyangga Hepes, TCM-199dengan 20 mM penyangga Hepes dan TCM-199 dengan 30 mM penyangga Hepes dalam incubator CO₂ berturut-turut adalah 61.36, 64.10, 60.00 dan 51.61 %. Sedangkan angka pematangan oosit untuk perlakuan medium TCM-199 tanpa penyangga Hepes , TCM199 dengan 10 mM penyangga Hepes, TCM-199 dengan 20 mM penyangga Hepes dan TCM-199dengan 30 mM penyangga Hepes dalam inkubator CO₂ berturut-turut adalah 32.35, 53.65, 64.10 dan 58.33 %. Angka rata-rata pematangan untuk perlakuan incubator CO₂ dan tanpa CO₂ masing-masing adalah 59.27 dan 52.11 %. Angka pematangan oosit dalam penelitian ini lebih rendah dari angka pematangan oosit kambing menggunakan 20 mM Hepes yaitu 86 % yang dilaporkan oleh De Smedt, *et al* (1992), 69 % (Le Gal, 1996) dan 76.5 %(Martino, *et al.*, 1995).

Hasil analisa statistik angka maturasi diantara kedua faktor perlakuan yang diuji tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$). namun terdapat interaksi ($P > 0.05$) antara kedua faktor yang diuji tersebut. Hal ini berarti bahwa penambahan Hepes pada level 10 mM sampai 30 mM dalam medium pematangan TCM-199 tidak menyebabkan pengaruh terhadap angka pematangan oosit. Meskipun demikian angka pematangan tertinggi pada inkubator tanpa CO₂ dicapai pada penggunaan 20 m Hepes, pada perlakuan 10 mM Hepes pada incubator tanpa CO₂, kemungkinan penggunaan Hepes pada level tersebut belum mampu untuk mempertahankan pH optimal, sementara penggunaan 30 mM Hepes menyebabkan penurunan yang dibawah kondisi optimal bagi pematangan oosit. (Guler, *et al*, 2000) yang menambahkan 35 mM Hepes dalam medium menyebabkan meningkatnya oosit yang mengalami fragmentasi.

Interaksi yang berbeda ($P > 0.05$) antara faktor inkubasi dan penambahan Hepes menunjukan bahwa untuk pematangan oosit diperlukan keberadaan CO₂. Hasil uji beda terkecil (LSD) menunjukan bahwa angka pematangan lebih rendah dari oosit yang dimatangkan dalam medium tanpa Hepes pada inkubator tanpa CO₂ dibandingkan dengan medium yang ditambah Hepes 10 mM, 20 mM dan 30 mM serta dibandingkan dengan angka pematangan oosit pada medium kontrol pada inkubator CO₂. Hal ini membuktikan bahwa untuk proses pematangan oosit *in vitro* yang optimal diperlukan

kondisi medium yang spesifik yaitu mempunyai pH sekitar 7.1-7.6. Dalam hal ini penambahan HEPES dalam medium pematangan dapat menggantikan peranan dari gas CO₂ yang disuplai dari luar inkubator. Dalam hal ini penambahan HEPES dalam medium pematangan dapat menggantikan peranan dari gas CO₂ yang disuplai dari incubator menurut Freshney (1987) HEPES menggunakan buffer yang cukup kuat pada kisaran pH 7.2-7.6. Suatu rentangan pH dimana sel-sel akan berkembang biak.

2. Tingkat Perkembangan Sel Kumulus

Selain berdasarkan angka pematangan oosit, efektif medium pematangan juga dapat diketahui dari perkembangan sel-sel kumulus. Sel kumulus mempunyai peranan penting dalam pematangan oosit, karena juga mensekresikan protein yang berguna dalam pematangan oosit in vitro disamping sebagai mediator dari substrat medium dan oosit (Chian dan Sirard, 1995).

Tingkat perkembangan sel kumulus oosit yang dimatangkan dalam media pematangan yang mengandung berbagai konsentrasi HEPES dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Perkembangan sel kumulus pada berbagai level HEPES dalam medium Pematangan pada inkubasi dengan CO₂ (%)

Tingkat Perkembangan Sel Kumulus	Konsentrasi HEPES			
	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
1	25.29	50.72	24.37	16.07
2	33.91	15.72	6.51	6.70
3	44.49	8.57	6.51	20.54
4	8.17	0.00	15.34	23.66
5	16.8	25.00	47.27	33.04

Rata-rata persentase sel-sel kumulus dalam berbagai level HEPES dalam medium pematangan pada system inkubasi dalam incubator CO₂ 5% hampir sama, kecuali pada level 10 mM HEPES. Pengecualian ini kemungkinan disebabkan faktor lain selain pengaruh level HEPES, seperti kualitas oosit atau pengaruh lingkungan lainnya. Pada sel-sel kumulus yang berekspansi terdapat suatu kecenderungan diantara medium yang mendapat penambahan HEPES dan tanpa HEPES. Sebaliknya persentase sel-sel kumulus yang berekspansi dengan skor 2 dan 3 lebih tinggi dalam medium tanpa HEPES dari medium yang mendapat penambahan HEPES. Fenomena ini kemungkinan sebagai respon sensitifitas terhadap pH. Dengan kata lain ekspansi maksimal sel-sel kumulus cenderung diperoleh pada medium dengan pH yang lebih.

Pada kondisi inkubasi tanpa CO₂ pada Tabel 3 terlihat bahwa oosit yang memperlihatkan perkembangan sel-sel kumulus untuk medium yang dapat 0, 10, 20 dan 30 mM HEPES adalah 50.00, 18.18, dan 33.33 %. Hasil ini menunjukkan bahwa pada kondisi tanpa CO₂ tanpa penambahan HEPES hanya 50% yang dapat berkembang sel-sel kumulusnya. Kondisi ini mungkin disebabkan karena sebagian lagi belum berkembang sel-sel kumulusnya sementara pH medium diluar pH optimal bagi pertumbuhan sel. Menurut Freshney (1987) pH optimal bagi perkembangan sel

adalah 7.4. Selanjutnya Shamsudin, *et al* (1996) mengemukakan bahwa sel kumulus mulai berkembang 12 jam setelah kultur.

Tabel 3. Perkembangan Sel Kumulus Pada Berbagai Level Hapes Dalam Medium Pematangan Pada Inkubasi Tanpa CO₂ (%)

Tingkat Perkembangan Sel Kumulus	Konsentrasi Hapes			
	0 mM	10 mM	20 mM	30 mM
1	50.00	18.18	0.00	33.33
2	19.33	27.77	20.00	14.81
3	23.08	27.27	5.00	14.81
4	7.69	0.00	20.00	14.81
5	0.00	27.27	55.00	22.22

Persentase oosit dengan kumulus yang tidak berkembang yang relatif tinggi pada penggunaan Hapes 30 mM diduga disebabkan karena tingginya konsentrasi Hapes dalam medium. Menurut Iwasaki *et al* (2000) menyatakan bahwa penggunaan Hapes pada level tinggi akan mendorong terjadinya defragmentasi oosit.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa penambahan Hapes dalam medium TCM-199 menghasilkan angka pematangan oosit baik yang diinkubasi pada kondisi CO₂ maupun tanpa CO₂. Untuk pematangan oosit pada kondisi tanpa CO₂ angka pematangan yang optimal dapat diperoleh dengan menambahkan 20 mM Hapes dalam medium TCM-199

DAFTAR PUSTAKA

- Chian, R.C. and M.A. Sirard. 1995. Effect of cumulus cells and hormones during in vitro maturation on pater nogenetic activation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 43 : 186
- De Smedt, Crozet, N., M. Ahmed-ali, A. Martino and Y. Cognie. 1992. In vitro maturation and fertilization goat oocytes. *Theriogenology*. 37 : 1049-1066
- Freshney, I.R. 1987. *Culture of Animal Cells, A manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Khan, N.A., Y. Kikkawa, C. Soemantri, S. Saha, M.S. Murakami, A. Boediono and T. Suzuki. 1996. Effect of gas atmosphere on development of bovine embryos using a simple portable incubator. *Japan Embryo Transfer Soc.* 113-123
- Le Gal, F. 1996. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*. 45 : 1147-1185.
- Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo and M.T. Paramio. 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goats oocytes. *Theriogenology*. 43 : 473-485.
- Shamsuddin, M., Rodriguez-Martinez, and B. Larson. 1998. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture condition. *Anim. Reprod. Sci.* 31 : 49-60.

- Steel, R.G.D. and Torrie. 1984. *Prosedur dan Metode Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik*. Alih bahasa B. Soemantri. Gramedia, Jakarta.
- Suzuki, T., C. Sumantri, and A. Boediono. 1995. Development of simple portable carbon dioxide incubator for in vitro of bovine IVF embryos. *Theriogenology*, 41 : 307.
- Suzuki, T., C. Sumantri, N.H.A. Khan, M. Murakami and S. Saha. 1999. Development of simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro of bovine IVF embryos. *Anim Reprod. Sci* 54 : 149-157.
- Thompson, J.G. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 45 : 97-100.