

PRODUKSI EMBRIO *IN VITRO* DARI OOSIT HASIL AUTOTRANSPLANTASI HETEROTOPIK OVARIUM MENCIT (*Mus musculus albinus*)

Nurlaila Susilawati Palenga¹

¹)Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian dan Peternakan
Universitas SatyaWiyata Mandala Nabire

Email:

¹)nurlailasusilawati356@gmail.com

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kemampuan oosit yang dikoleksi dari ovarium transplan heterotopik untuk produksi embrio *in vitro* dan mengetahui pengaruh induksi *pregnant mare's serum gonadofrophin* (PMSG) terhadap peningkatan jumlah oosit dan ovarium transplan heterotopik. Teknik transplantasi yang digunakan adalah heterotopik autotransplantasi pada kapsula ginjal mencit betina umur empat minggu dengan perlakuan oosit hasil transplan ovarium (OT) dan oosit hasil transplan ovarium dan induksi PMSG (OTP). Dilakukan perlakuan perbandingan tanpa transplantasi ovarium (OSO) dengan mencit yang diinduksi PMSG dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) masing-masing dengan dosis 5 IU intraperitoneal (i.p.) interval 48 jam untuk mendapatkan oosit matang *in vivo*. Induksi PMSG dilakukan 48 jam dan hCG 14 jam sebelum koleksi oosit. Koleksi oosit dan ovarium transplan dilakukan pada hari ke-21 setelah transplantasi kemudian dimatangkan secara *in vitro* selama 24 jam. Oosit hasil pematangan *in vivo* dan *in vitro* difertilisasi *in vitro* dengan sperma vas defren mencit jantan dilanjutkan dengan kultur perkembangan embrio. Pematangan dan fertilisasi oosit serta kultur embrio *in vitro* menggunakan medium *kalium simplex optimized medium* (KSOM) pada inkubator CO₂ 5% suhu 37°C. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah oosit yang dikoleksi dari perlakuan OT dan OTP tidak berbeda secara signifikan namun kedua perlakuan tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan perlakuan OSO. Oosit yang mencapai metafase II (Mt-H) pada perlakuan OT (52.38%) dan OTP (53.19%) secara signifikan tidak berbeda namun menunjukkan perbedaan signifikan dengan perlakuan OSO (84.85%). Tingkat fertilisasi tidak berbeda secara signifikan diantara ketiga perlakuan namun perkembangan embrio menunjukkan perbedaan signifikan antara perlakuan OSO (60.19%) dengan OT (30.43%) dan OTP (30%).

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh disimpulkan bahwa dari ovarium transplan heterotopik dapat dihasilkan oosit yang dapat digunakan untuk produksi embrio *in vitro*. Induksi dengan menggunakan PMSG tidak mempengaruhi perolehan jumlah oosit yang dikoleksi dan ovarium transplan. Oosit hasil transplantasi ovarium menunjukkan kemampuan untuk matang *in vitro* mencapai tahap Mt-II dan setelah difertilisasi mampu berkembang menjadi embrio.

Kata kunci: ovarium, oosit, embrio *in vitro*, autotransplantasi heterotopik, induksi PMSG.

ABSTRACT

This study aims to study the ability of oocytes collected from heterotopic transplanted ovaries for in vitro embryo production and to determine the effect of pregnant mare 's serum gonadotrophin (PMSG) induction on the increase in the number of oocytes and ovarian heterotopic transplants. The transplant technique used was heterotopic autotransplantation in the kidney capsules of four week old female mice treated with oocytes from ovarian transplants (OT) and oocytes from ovarian transplants and PMSG induction (OTP). A comparison treatment without ovarian transplantation (OSO) was performed with PMSG-induced mice and human chorionic gonadotrophin (hCG) each with a dose of 5 IU intraperitoneal (i.p.) 48 hours interval to obtain mature oocytes in vivo. PMSG induction was performed 48 hours and hCG 14 hours before oocyte collection. Collection of oocytes and ovarian transplants were performed on the 21st day after transplantation and then matured in vitro for 24 hours. In vivo and in vitro maturation of oocytes were fertilized in vitro with male mice's vas deferens sperm followed by culture of embryo development. Oocyte maturation and fertilization and in vitro embryo culture using potassium simplex optimized medium (KSOM) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The results obtained showed that the number of oocytes collected from the OT and OTP treatment did not differ significantly, but the two treatments showed significant differences with the OSO treatment. Oocytes that reached metaphase II (Mt-H) in the OT (52.38%) and OTP (53.19%) treatments were not significantly different but showed significant differences with OSO treatment (84.85%). Fertilization rates did not differ significantly among the three treatments but embryo development showed a significant difference between OSO (60.19%) and OT (30.43%) and OTP (30%) treatments.

Based on the results obtained, it was concluded that the heterotopic transplanted ovaries could produce oocytes that could be used for in vitro embryo production. Induction using PMSG did not affect the number of oocytes collected and ovarian transplants. Oocyte transplanted ovaries show the ability to mature in vitro to reach the Mt-II stage and after being fertilized are able to develop into an embryo.

Key words: ovaries, oocytes, in vitro embryos, heterotopic autotransplantation, PMSG induction.

PENDAHULUAN

Reproduksi merupakan aktivitas yang penting bagi keberlangsungan hidup suatu spesies. Aktivitas reproduksi dapat berhadapan dengan kendala yang menyebabkan prosesnya terganggu antara lain akibat campur tangan manusia pada suatu populasi spesies dan kematian mendadak pada hewan langka yang menyebabkan berkurangnya jumlah populasi suatu spesies hewan tertentu. Pada manusia, organ reproduksi dapat terganggu karena pengaruh efek samping dari kemo atau radioterapi pada pengobatan penyakit kanker yang dapat memperigaruhi ovarium sebagai organ reproduksi primer. Dalam fungsinya sebagai organ reproduksi primer, ovarium merupakan penghasil sel telur (oosit) dan hormon. Oosit pada ovarium berkembang bersamaan dengan perkembangan folikel. Saat lahir pada korteks ovarium mamalia terdapat banyak kumpulan folikel primordial sebagai sumber oosit yang akan berkembang dan dapat mencapai

tahap ovulasi saat pubertas (Fortune, 1994). Pada hewan langka yang mati atau hewan termak yang dipotong, pada korteks ovarium masih dapat ditemukan folikel primordial dalam jumlah banyak dan dapat digunakan lebih lanjut. Bahkan pada wanita muda pasien kanker yang akan menjalani kemo atau radioterapi dilakukan ovariectomi sebelum terapi agar ovarium dapat disimpan beku dan digunakan kembali kemudian hari pascaterapi. Koleksi jaringan ovarium yang mengandung folikel primordial dapat dilakukan setiap saat tanpa memperhatikan usia atau siklus estrus dan pemanfaatan folikel primordial merupakan salah satu cara untuk penyimpanan oosit dalam jumlah besar (Shaw *et al.*, 2000).

Terdapat beberapa metoda pemanfaatan ovarium yang telah dikembangkan untuk penyelamatan fertilitas antara lain penyimpanan jaringan ovarium yang mengandung folikel primordial secara *in vitro* dalam bentuk beku untuk jangka waktu yang lama atau penyimpanan secara *in vivo* dengan teknik transplantasi (Sonmezer dan Oktay, 2004) dan kultur *in vitro* jaringan ovarium atau folikel preantral (Wu *et al.*, 2001). Transplantasi ovarium merupakan pemindahan sebagian atau seluruh jaringan ovarium. Prosedur transplantasi dilakukan untuk penyimpanan ovarium dan perkembangan folikel secara *in vivo*. Folikel preantral terutama folikel primordial dan primer dari ovarium beku atau segar dapat dipergunakan kembali dengan menumbuhkan secara *in vivo* menggunakan teknik transplantasi atau dikultur *in vitro* untuk perkembangan mencapai folikel antral dan menghasilkan oosit matang (Liu *et al.*, 2000; Newton dan Illingworth, 2001). Oosit yang dikoleksi dari folikel antral ovarium hasil transplantasi masih dapat dimatangkan, difertilisasi dan dikultur *in vitro* hingga diperoleh embrio selanjutnya embrio dapat ditransfer ke induk resipien untuk menghasilkan keturunan (Liu *et al.*, 2001). Selain itu beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan keberhasilan transplantasi ovarium ternyata dapat memulihkan fungsi reproduksi pada mencit (Candy *et al.*, 2000; Mohammad *et al.*, 2004), primata (Schnorr *et al.*, 2002) dan manusia (Silber *et al.*, 2005).

Berdasarkan hubungan donor dan resipien, transplantasi dapat dilakukan pada individu yang sama (autotransplantasi), individu yang berbeda tapi masih satu spesies (allograft) atau individu yang berbeda dan spesies yang berbeda (xenograft). Pada autotransplantasi hampir tidak ada penolakan jaringan oleh tubuh resipien karena ovarium yang ditransplantasikan merupakan jaringan individu sendiri. Berdasarkan tempat transplantasi, ovarium dapat ditransplantasikan di tempat semula (ortotopik) pada bursa ovarium (Candy *et al.*, 2000) dan di tempat lain (heterotopik) diluar bursa ovarium seperti subkutan (Mohammad *et al.*, 2003; Schnorr *et al.*, 2002), kapsula ginjal (Gook *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001) dan intraperitoneal (Rosendahi *et al.*, 2006; Salehnia, 2002). Transplantasi secara ortotopik umum dilakukan jika ingin melihat viabilitas ovarium sampai dihasilkan keturunan. Pada transplantasi heterotopik meskipun evaluasi tidak dapat dilakukan sampai dihasilkan keturunan karena tidak memungkinkan untuk terjadi ovulasi dan fertilisasi secara *in vivo*, akan tetapi masih dapat dikoleksi folikel atau oosit dan ovarium transplan dan dapat dikembangkan secara *in vitro*. Daerah kapsula ginjal merupakan salah satu tempat yang sering digunakan untuk transplantasi heterotopik. Pada daerah kapsula ginjal, besar dan jumlah potongan jaringan ovarium yang dapat ditransplantasikan terbatas akan tetapi tempat ini memiliki vaskularisasi yang baik (Cox *et al.*,

1996). Autotransplantasi ovarium pada kapsula ginjal dapat mengembalikan fungsi reproduksi pada hari ketujuh setelah transplantasi dengan kembalinya siklus estrus, morfologi dan jumlah folikel (Mohamad, 2003).

Hormon gonadotrophin eksogenous umum digunakan pada manusia dan hewan untuk menginduksi perkembangan folikel sehingga meningkatkan jumlah oosit yang dapat dipergunakan dalam bidang biologi dan teknologi reproduksi bantuan (Zudova *et al.*, 2004). Oleh karena itu penyuntikan *pregnant mare's serum gonadotrophin* (PMSG) sebelum pengambilan ovarium transplan heterotopik dapat mengoptimalkan perolehan oosit untuk digunakan dalam produksi embrio *in vitro*. Berdasarkan pengamatan histologis, perlakuan dengan induksi PMSG terhadap ovarium transplan heterotopik terbukti dapat meningkatkan jumlah folikel tersier (Setiadi, 2004). Namun demikian gambaran histologis hanya memberikan informasi tentang perkembangan folikel. Untuk dapat dipergunakan pada produksi embrio *in vitro* maka harus diketahui viabilitas oosit yang dapat diperoleh dan ovarium setelah transplantasi, sehingga diperlukan kajian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh induksi PMSG terhadap jumlah dan viabilitas oosit dan ovarium transplan heterotopik. Hal ini akan memberikan informasi tambahan potensi ovarium sebagai sumber oosit sehingga dapat digunakan untuk produksi embrio *in vitro*.

METODE PENELITIAN

1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli 2017 sampai dengan September 2017. Tempat Pelaksanaan Penelitian dan Pemeliharaan Hewan Percobaan dilakukan di Laboratorium Embriologi Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Pertanian Universitas Negeri Gorontalo.

2. Materi Penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus albinus*) betina strain DDY yang biasa dipakai dalam penelitian bidang reproduksi karena merupakan mencit fertil (*high ovulator*). Umur mencit yang digunakan empat minggu dan belum mencapai umur dewasa kelamin (prapubertas). Mencit dipelihara dalam kandang plastik yang diberi alas sekam dan dilengkapi dengan penutup kawat. Pakan dan air minum diberikan *ad libitum*.

3. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan yaitu (1) oosit hasil ovarium transplan (OT); (2) oosit hasil ovarium transplan dan induksi PMSG (OTP); (3) oosit hasil superovulasi *in vivo* (OSO) tanpa transpiantasi ovarium. Ovarium dan setiap mencit pada perlakuan transplantasi dikoleksi dengan cara ovariektomi dan dibelah menjadi dua bagian yang sama besar. Potongan ovarium kemudian ditransplantasi ke kapsula ginjal. Pada hari ke-19 transplantasi, mencit pada perlakuan OTP diinduksi dengan 5 IU/ekor PMSG intraperitoneal (i.p.). Pada hari ke-21 dilakukan pengkoleksian oosit dan ovarium

transplan dan dikultur untuk mengetahui tingkat pematangan, fertilisasi dan perkembangan embrio secara *in vitro*. Pada perlakuan kontrol tanpa transplantasi (OSO) dilakukan induksi PMSG dan hCG masing-masing dengan dosis 5 IU/ekor dengan interval waktu 48 jam. Setelah induksi hCG, 14 jam kemudian oosit yang matang *in vivo*. dikoleksi dengan menoreh ampula tuba Falopii dilanjutkan dengan fertilisasi dan kultur embrio *in vitro*.

4. Metode Penelitian

4.1 Koleksi Ovarium

Pengambilan ovarium atau ovariektomi dilakukan menurut metoda yang telah dilaporkan oleh Mohammad *et al.*, (2004), yaitu melalui bedah punggung. Sebelum pembedahan, mencit dibius dengan xylazine sebanyak 0.3 mg/ekor intraperitoneal (i.p.) dikombinasi dengan ketamine sebanyak 1.5 mg/ekor intramuscular (i.m.). Setelah mencit terbius, kulit daerah punggung dibersihkan dengan alkohol 70% dan rambut di daerah orientasi pembedahan dicukur sampai bersih. Kemudian kulit punggung di daerah orientasi pembedahan disayat sepanjang 1-1.5 cm secara horizontal sejajar dengan tulang punggung. Kulit jaringan subkutan dikuakkan dan daerah abdomen disayat dengan orientasi tepat di atas ginjal karena akan dilakukan transplantasi pada kapsula ginjal. Ovarium diambil dan dipisahkan dan bursa ovarium dengan bantuan pinset. Selanjutnya ovarium dicuci dalam medium *phosphate buffered saline* (PBS) dan dibelah menjadi dua bagian yang sama besar.

4.2 Autotransplantasi Ovarium Heterotopik

Autotransplantasi ovarium mencit dilakukan di kapsula ginjal berdasarkan metode yang telah dilaporkan oleh Mohammad *et al.*, (2004). Ginjal dikeluarkan dari ruang abdomen dengan cara menekan daerah perut dan arah ventral ke atas. Selanjutnya dengan menggunakan pinset berujung runcing, kapsula ginjal ditusuk tanpa melukai korteks ginjal dan diperlebar sebesar ovarium yang akan ditransplantasikan. Ovarium dimasukkan ke dalam kapsula ginjal dengan hati-hati dan didorong menjauhi daerah sayatan. Ginjal dimasukkan kembali ke dalam ruang abdomen. Abdomen dan kulit punggung dijahit dan diberi antibiotik *neomycin sulfate* (Nebacetin) untuk persembuhan.

4.3 Koleksi Oosit dan Ovarium Transplan Heterotopik

Setelah mengalami proses transplantasi, mencit dibiarkan pulih selama beberapa hari. Pada hari ke-19 setelah transplantasi, mencit perlakuan OTP disuntik dengan 5 IU PMSG per ekor secara intraperitoneal (i.p.). Pada hari ke-21 pascatransplantasi dilakukan pemanenan oosit dan ovarium. Mencit dikorbkan dengan cara *dislocatio cervicalis* kemudian ginjal diambil dan ovarium dan kapsula ginjal dipindahkan ke medium PBS. Isolasi oosit dan folikel ovarium dilakukan dibawah mikroskop stereo secara mekanik dengan cara menoreh folikel antral pada ovarium menggunakan jarum berukuran 27 G yang dihubungkan dengan spuit 1 cc. Oosit dikeluarkan dan folikel kemudian dicuci tiga kali berturut-turut dalam PBS dan dua kali di dalam medium kultur yang akan digunakan. Oosit yang digunakan untuk tahap selanjutnya adalah oosit yang dilapisi oleh sel-sel kumulus. Untuk perlakuan kontrol tanpa transplantasi (OSO), mencit diinjeksi PMSG dan hCG masing-masing 5 IU/ekor dengan interval 48 jam. Koleksi oosit dari tuba Falopii dilakukan dengan menoreh ampula tuba Falopii.

4.4 Pematangan Oosit *In Vitro*

Oosit yang berasal dan mencit pada perlakuan OT dan OTP yang digunakan dalam pematangan *in vitro* hanya oosit yang dikelilingi oleh sel-sel kumulus kompak. Selanjutnya setelah pencucian dalam PBS dan medium kultur, oosit yang dikoleksi dan mencit pada perlakuan OT dan OTP dimatangkan dalam 20 ul medium tetes *kalium simplex optimized*

Volume 1, Nomor 2, Desember 2020

medium (KSOM) yang telah ditambah dengan *follicle stimulating hormone* (FSH) 10 ug/ml, *gentamycin sulphate* 50 ug/ml, BSA 2% (w/v) dan ditutup dengan *mineral oil*. Pematangan oosit dilakukan dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.5 Fertilisasi Oosit *In Vitro*

Sperma yang digunakan berasal dari vas deferens jantan dewasa dari strain yang sama. Preparasi sperma dilakukan dalam medium KSOM yang telah ditambah dengan BSA 2% (w/v), kafein 2.5 mM dan *gentamycin sulphate* 50 ug/ml. Suspensi sperma 10 ul ditambahkan ke dalam 90 ul medium drop KSOM fertilisasi dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 30 menit untuk proses kapasitasasi. Oosit yang telah mengalami pematangan *in vitro* dan *in vivo* dicuci dua kali dalam medium fertilisasi dan digabungkan ke dalam 100 ul drop medium fertilisasi (konsentrasi sperma 2x10⁶/ml) kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 6 jam.

4.6 Perkembangan Embrio *In Vitro*

Oosit yang telah terfertilisasi *in vitro* dicuci dan dipindahkan ke dalam medium drop KSOM 20 ul yang telah ditambah dengan BSA 3% (w/v), *gentamycin sulphate* 50 ug/ml dan ditutup dengan *mineral oil*. Kemudian dikultur dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C untuk melihat perkembangan embrio.

5. Evaluasi Data

Jumlah dan kualitas oosit yang diperoleh dan ovarium transplan heterotopik setelah isolasi secara mekanik dan folikel antral diamati dengan mikroskop inverted. Evaluasi dilakukan terhadap pematangan inti oosit yang telah mengalami pematangan *in vitro*. Oosit yang telah matang adalah oosit pada tahap metafase II (Mt-II) yang ditandai dengan terbentuknya polar bodi I. Untuk mengetahui tingkat pematangan oosit dilakukan penghitungan terhadap jumlah oosit yang mencapai tahap Mt-II per jumlah oosit yang dikultur. Selanjutnya dilakukan fertilisasi *in vitro* pada oosit yang telah matang *in vitro* dan *in vivo*. Pengamatan terhadap keberhasilan fertilisasi *in vitro* ditandai dengan terbentuknya pronukleus jantan dan betina. Tingkat fertilisasi dihitung dan jumlah oosit yang terfertilisasi per jumlah oosit yang diinseminasi. Hasil fertilisasi *in vitro* dikultur untuk mengetahui perkembangan embrio. Tingkat perkembangan embrio *in vitro* diperoleh dengan menghitung jumlah embrio yang berhasil membelah dibandingkan dengan jumlah yang dikultur.

6. Analisis Data

Data yang diperoleh dan hasil penelitian dianalisis dengan sidik ragam menggunakan *general linear model procedure* (GLM). Perbedaan antar perlakuan diuji dengan *Duncan multiple range test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Koleksi Oosit dan Ovarium Transplan Heterotopik

Keberhasilan transplantasi ovarium di kapsula ginjal ditandai dengan terjadinya pertumbuhan dan perkembangan folikel serta dibuktikan dengan terdapatnya oosit yang berhasil dikoleksi dan folikel antral. Secara alamiah oosit yang dapat diovulasikan oleh mencit tanpa induksi gonadotrophin adalah sejumlah 8-12 oosit tergantung strain (Hogan et al. 1994). Pada

penelitian ini diperoleh rata-rata jumlah oosit yang berhasil dikoleksi dan mencit dengan perlakuan ovarium transplan heterotopik menggunakan induksi PMSG (OTP) sebesar 10.9 ± 5.10 per ekor dan 5.45 ± 2.55 per ovarium sedangkan pada perlakuan tanpa induksi PMSG (OT) adalah sebesar 9 ± 2.83 per ekor dan 4.5 ± 1.41 per ovarium, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 1). Namun jumlah oosit dan kedua perlakuan tersebut (OTP, OT) menunjukkan perbedaan yang nyata jika dibandingkan dengan oosit superovulasi dan ovarium non transplantasi (OSO) sebesar 17.6 ± 5.69 per ekor dan 8.77 ± 2.84 per ovarium. Hasil tersebut menunjukkan bahwa induksi PMSG tidak meningkatkan jumlah oosit pada ovarium transplan heterotopik. Namun dengan perlakuan transplantasi ovarium heterotopik masih memungkinkan dihasilkan oosit yang dapat dikoleksi.

Tabel 1 Jumlah oosit terkoleksi dan ovarium transplan dengan dan tanpa induksi PMSG

Perlakuan	Jumlah Ovarium	Jumlah Oosit	Mean \pm SD Per ekor	Mean \pm SD Per ovarium
OT	20	90	9 ± 2.83^a	4.5 ± 1.41^a
OTP	20	109	10.9 ± 5.10^a	5.45 ± 2.55^a
OSO	22	193	17.6 ± 5.69^b	8.77 ± 2.84^b

Ket. OT: Oosit hasil transplan, OTP: Oosit hasil transplan dan induksi PMSG, OSO: Oosit hasil superovulasi. Huruf superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0.05$).

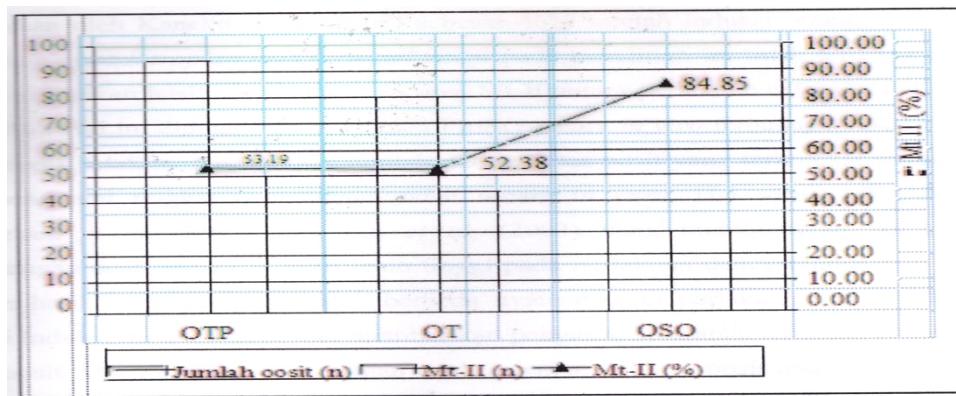
Penggunaan PMSG umum dilakukan dalam produksi embrio *in vivo* untuk meningkatkan perolehan oosit. Penggunaan PMSG yang banyak mengandung unsur kerja FSH secara biologik merangsang perkembangan folikel ovarium dan bersama dengan LH berfungsi dalam pematangan folikel dan proses ovulasi. Dan gambaran histologis jumlah folikel tersier pada ovarium transplan kapsula ginjal yang diinduksi PMSG menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan yang tanpa induksi PMSG (Setiadi, 2004). Namun dalam penelitian ini, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa induksi PMSG tidak mempengaruhi jumlah perolehan oosit yang dapat dikoleksi dari ovarium transplan heterotopik seperti terlihat pada Tabel 1.

Hal ini disebabkan pada gambaran histologis folikel tersier yang terhitung meliputi semua folikel yang memiliki antrum folikuli, sedangkan pada penelitian ini oosit yang diperoleh hanya terbatas pada folikel yang memiliki antrum penuh sehingga memungkinkan oosit terkoleksi. Namun hasil penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Waterhouse *et al.*, (2004) yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan jumlah oosit dan ovarium transplan heterotopik yang diinduksi gonadotrophin (PMSG atau PMSG dan hCG) dengan yang tanpa diinduksi. Hal ini disebabkan kemungkinan lokasi transplantasi ovarium (heterotopik) tidak dapat memberikan respon terhadap induksi gonadotrophin secara normal seperti yang telah dilaporkan oleh Yang *et al.*, (2006). Selain itu salah satu sumber utama variasi pengaturan respon ovarium terhadap gonadotrophin adalah perbedaan genetik (Spearow dan Barkley, 1999) yaitu strain mencit dan juga respon superovulasi dapat berbeda-beda tergantung pada spesies, umur dan berat badan (Hogan *et al.*, 1994, Kon *et al.* 2005). Namun demikian, dengan teknik transplantasi ovarium heterotopik memungkinkan ovarium digunakan sebagai sumber oosit untuk dapat dipergunakan lebih lanjut.

2. Pematangan Oosit *In Vitro*

Dalam produksi embrio *in vitro* diperlukan oosit yang matang sehingga oosit yang berhasil dikoleksi harus melalui suatu tahap pematangan *in vitro*. Hasil yang diinginkan dan proses pematangan *in vitro* adalah oosit haploid yang diharapkan mampu terfertilisasi sehingga dapat melanjutkan perkembangan menjadi embrio. Tahapan pematangan inti yang diamati dalam penelitian ini adalah metafase II (Mt-II) dicirikan dengan terbentuknya polar bodi I.

Oosit yang telah berhasil dikoleksi dan ovarium transplan heterotopik kemudian dimatangkan secara *in vitro* dan ternyata mampu mencapai tahap Mt-II. Hasil pematangan *in vitro* oosit dan ovarium transplan heterotopik seperti terlihat pada Gambar 1.



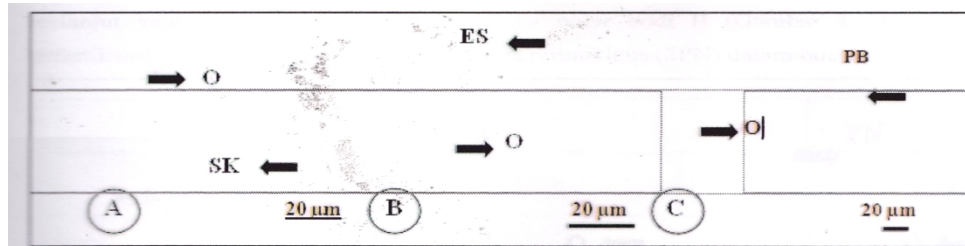
Gambar 1. Oosit yang Mampu Mencapai Kematangan Tahap Metafase II (Mt-II)

Persentase jumlah oosit matang yang mencapai tahap Mt-II pada perlakuan OT (52.38%) dan OTP (53.19%) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, sedangkan jika kedua perlakuan dibandingkan dengan perlakuan OSO (84.85%) menunjukkan perbedaan yang nyata. Namun demikian, keberhasilan diatas menunjukkan bahwa oosit dan ovarium transplan heterotopik memiliki viabilitas untuk matang *in vitro* mencapai Mt-II. Beberapa peneliti terdahulu melaporkan hasil yang serupa pada spesies lain seperti pada babi (Kaneko *et al.*, 2003,2006) dan manusia (Kim *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini digunakan teknik autotransplantasi heterotopik kapsula ginjal dilanjutkan dengan induksi PMSG (OTP) dan diperoleh hasil sebanyak 53.19% oosit yang mampu mencapai Mt-II, hasil ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan yang telah dilaporkan oleh Kaneko *et al.*, (2003), sebesar 46% setelah induksi menggunakan *equine chorionic gonadotrophin* (eCG). Akan tetapi pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan secara signifikan hasil oosit yang mencapai Mt-II antara perlakuan OT (52.38%) dan OTP (53.19%). Hal ini diduga bahwa induksi PMSG secara *in vivo* terhadap ovarium transplan heterotopik tidak mempengaruhi jumlah dan kualitas oosit yang terkoleksi sehingga tidak mempengaruhi tingkat pematangan oosit secara *in vitro*. Hal serupa dilaporkan oleh Mikkelsen *et al.*, (1999) dan Lin *et al.*, (2003), yang membuktikan bahwa tingkat pematangan oosit secara *in vitro* lebih tinggi pada perlakuan dengan induksi *in vivo* FSH namun hasil yang diperoleh tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa FSH, hal ini berarti induksi *in vivo* FSH tidak memberikan pengaruh tambahan terhadap pematangan *in vitro* oosit. Dalam kultur pematangan oosit *in vitro*, kualitas oosit mempengaruhi tingkat pematangan oosit. Oosit yang dikoleksi dan perlakuan OT dan OTP hanya oosit yang dikelilingi oleh sel-sel kumulus kompak, karena keberadaan sel-sel kumulus dapat mendukung proses pematangan *in vitro* oosit sehingga inti oosit dapat mencapai tahap Mt-II (Rahman *et al.*, 2003; Hinrichs dan Schmidt, 2000). Sel-sel kumulus berfungsi untuk mensuplai zat-zat nutrisi yang dibutuhkan untuk mendukung pematangan oosit. Berlangsungnya

proses pematangan oosit yang dimatangkan secara *in vitro* dapat dikenali dengan terjadinya ekspansi sel-sel kumulus dan terbentuk polar bodi I (Rodriguez dan Farm, 2004).

Pada Gambar 2, terlihat penyebaran sel-sel kumulus yang kompak sebelum inkubasi dan kemudian mengalami ekspansi setelah pematangan *in vitro*. Sztein *et al.*, (2000), menyatakan bahwa 78% inti oosit menciut mencapai tahap Mt-II setelah 16-17 jam pematangan *in vitro*. Pada penelitian ini oosit yang mencapai Mt-II sebesar 52.38% (OT) dan 53.19% (OTP) setelah 24 jam pematangan *in vitro*. Namun menurut Rinendyaputri (2002), pematangan inti oosit menciut secara optimum dicapai setelah 16 jam pematangan *in vitro* dan penambahan waktu pematangan tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan 16 jam pematangan *in vitro*. Diduga perbedaan tersebut di atas disebabkan oleh perbedaan kondisi kultur pematangan oosit seperti medium yang digunakan mempengaruhi pematangan oosit *in vitro*.

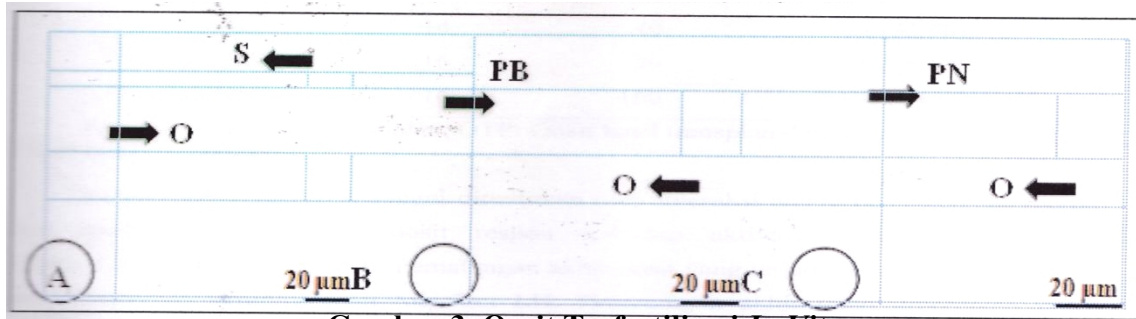


Gambar 2. Pematangan Oosit Secara *In Vitro*. A: Oosit Sebelum Pematangan *In Vitro* dengan Kumulus Kompak (B dan C) Setelah Pematangan *In Vitro* O: Oosit, Sk: Sel Kumulus, Es: Ekspansi Set Kumulus, Pb: Polar Bodi I.

Medium yang digunakan dalam pematangan oosit *in vitro* dapat memberikan pengaruh bukan hanya pada oosit tapi juga terhadap perkembangan embrio. Medium pematangan oosit *in vitro* harus dapat mendukung proses pematangan oosit dengan cara meniru kondisi *in vivo* sehingga pemberian hormon gonadotrophin, serum dan bahan tambahan lain ke dalam medium diduga dapat membantu proses pematangan oosit *in vitro*. Penambahan FSH dalam medium pematangan oosit *in vitro* akan meningkatkan proliferasi sel-sel granulosa dan membantu transformasi inti (Sztein *et al.*, 2000). Penggunaan serum dalam medium pematangan *in vitro* dapat mendukung pematangan oosit *in vitro* karena serum mengandung komponen yang bervariasi seperti faktor pertumbuhan, asam amino atau vitamin (Fisher *et al.*, 1999) sehingga penambahan serum dalam medium pematangan *in vitro* akan melengkapi komponen-komponen penting yang tidak terdapat dalam medium pematangan *in vitro* (Bavister, 1995).

1. Fertilisasi *In Vitro*

Untuk mengetahui tingkat fertilisasi, oosit hasil pematangan *in vivo* dan *in vitro* selanjutnya difertilisasi secara *in vitro*. Oosit yang matang secara *in vivo* dan *in vitro* berada dalam keadaan istirahat pada meiosis tahap metafase II sampai terjadi penetrasi oleh sperma. Aktivasi oosit oleh penetrasi sperma akan menyebabkan proses meiosis berlanjut yang ditandai dengan terbentuknya polar bodi II. Oosit yang terfertilisasi ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (2PN) dalam oosit.



Gambar 3. Oosit Terfertilisasi *In Vitro*.

(A) Penetrasi Spermatozoa Pada Oosit, (B) Pelepasan Polar Bodi II, (C) Tahap Dua Pronukleus. O: Oosit, S: Sperma, PB: Polar Bodi II, PN: Pronukleus.

Jumlah oosit yang terfertilisasi in vitro (tingkat fertilisasi) pada perlakuan OT (52.50%), OTP (66.67%) dan OSO (64.38%) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa oosit yang diperoleh dan ovarium transplan heterotopik dan matang secara in vitro mampu terfertilisasi. Pada Tabel 2 terlihat bahwa tidak semua oosit yang telah matang baik secara in vitro maupun in vivo mampu terfertilisasi. Kegagalan fertilisasi dapat dipengaruhi oleh tingkat pematangan oosit (baik inti dan sitoplasma), kemampuan sperma membuahi oosit (kapasitas dan reaksi akrosom) dan kegagalan sperma mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit sehingga terjadi kegagalan pembentukan pronukleus (PN) jantan (Bever *et al.*, 1997). Oleh karena itu walaupun oosit yang berasal dan pematangan in vivo (OSO) telah mengalami pematangan inti dan sitoplasma namun tingkat fertilisasi in vitro juga dipengaruhi oleh kualitas dan kemampuan sperma yang digunakan. Sperma yang digunakan dalam fertilisasi in vitro harus mengalami kapasitas agar mampu membuahi oosit. Sistem kapasitas in vitro yang tidak sesuai akan mempengaruhi proses fertilisasi in vitro karena rendahnya penetrasi sperma terhadap oosit.

Tabel 2 Tingkat Fertilisasi oosit secara in vitro

Perlakuan	Jumlah Ovarium	Jumlah Oosit	Jumlah Oosit terfertilisasi (%)
OT	14	40	21 (52.50)
OTP	15	39	26 (66.67)
OSO	16	160	103 (64.38)

Ket: OT: Oosit hasil transplan, OTP: Oosit hasil transplan dan induksi PMSG, OSO: Oosit hasil superovulasi.

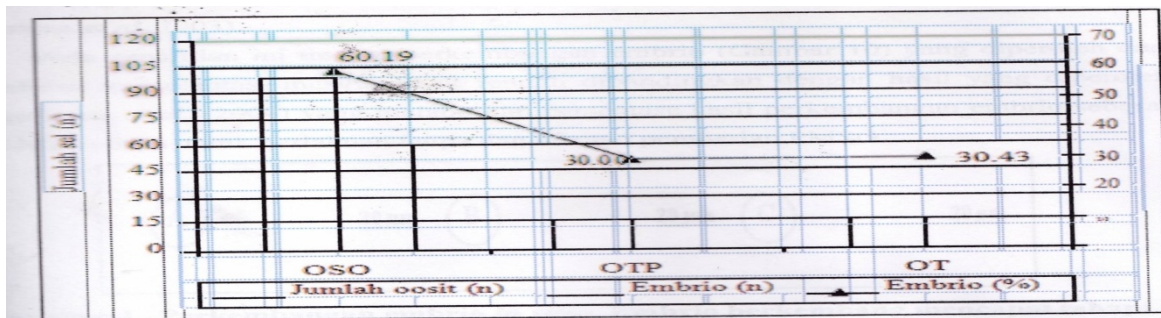
Keberhasilan fertilisasi sangat ditentukan oleh interaksi antara oosit dengan sperma dan medium. Kemampuan oosit respon terhadap aktivasi sperma menunjukkan keberhasilan pematangan oosit. Pematangan akhir oosit yang terjadi pada folikel ovulatoris setelah adanya stimulus oleh lonjakan LH. Pematangan akhir oosit diperlukan untuk menghasilkan oosit sekunder yang haploid dan mempunyai kemampuan untuk berhasil difertilisasi dan mendukung perkembangan embrio selanjutnya (Hyttel *et al.*, 1997). Sehingga meskipun sperma mampu memasuki oosit namun ketidak cukupan pematangan pada oosit akan menyebabkan proses selanjutnya terhambat sehingga menyebabkan kegagalan fertilisasi.

Berdasarkan hasil analisis sitologi terlihat bahwa pada oosit yang mengalami kegagalan fertilisasi in vitro karena terjadi blok 2PN, kromosom masih pada tahap Mt-II tanpa ada tanda penetrasi spermatozoa dan kromosom spermatozoa mengalami kondensasi prematur (Liu *et al.*,

2002). Kemampuan oosit untuk merespon penetrasi sperma diperoleh secara bertahap sebelum ovulasi ketika oosit mengalami pematangan inti dan sitoplasma. Kematangan inti ditunjukkan oleh kemampuan oosit menyelesaikan meiosis dan kematangan sitoplasma ditunjukkan oleh kemampuan oosit melepaskan dan respon terhadap kalsium intraseluler (Zudova *et al.*, 2004). Menurut Kidson (2005), sistem fertilisasi *in vitro* yang ideal harus mendukung tingginya penetrasi spermatozoa ke dalam oosit namun menekan rendahnya kejadian polispermi.

3. Perkembangan Embrio *In Vitro*

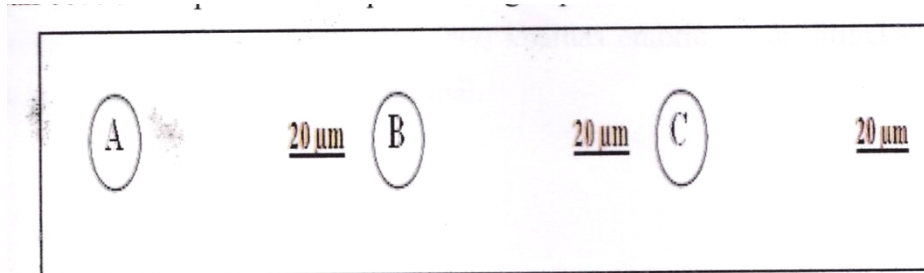
Oosit hasil fertilisasi *in vitro* selanjutnya dikultur untuk mengetahui perkembangan anbrrio. Persentase perkembangan embrio yang mencapai tahap pembelahan 2-4 sel padaperlakuan OT (30.43%) dan OTP(30.00%) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, namun jika kedua perlakuan (OT dan OTP) dibandingkan dengan perlakuan OSO (60.19%) menunjukkan perbedaan yang signifikan (Gambar 3).



Gambar 3. Perbandingan Perkembangan Embrio *In Vitro* dan Perlakuan Transplantasi dan Tanpa Transplantasi.

Pada Gambar 3, menunjukkan perbedaan persentase antara perlakuan OT (30.43%) dan OTP (30.00%) akan tetapi setelah diuji secara statistik perkembangan embrio yang diperoleh secara signifikan tidak berbeda. Hal ini diduga karena oosit yang diperoleh pada perlakuan OT dan OTP berasal dan pematangan *in vitro*. Hasil penelitian ini sejalan dengan yang telah dilaporkan oleh Waterhouse *et al.*, (2004) dan Yang *et al.*, (2006), bahwa kemampuan perkembangan embrio lebih rendah pada perlakuan transplantasi dibandingkan kontrol tanpa transplantasi karena oosit dan hasil transplantasi mengalami pematangan *in vitro*. Kemampuan perkembangan embrio dan oosit yang dimatangkan dan difertilisasi *in vitro* lebih rendah dibandingkan oosit yang diperoleh dan pematangan *in vivo* dan difertilisasi *in vitro* (Demeestere *et al.*, 2002). Diduga bahwa dalam proses pematangan oosit *in vitro* terjadi ketidak sempurnaan pematangan terutama pematangan oplasma. Pematangan inti dapat diamati secara jelas yang ditandai dengan pengeluaran polar bodi namun pematangan sitoplasma dapat diketahui dan kemampuan oosit terfertilisasi dan kemampuan perkembangan embrio. Ketidak cukupan proses pematangan sitoplasma pada oosit akan mempengaruhi perpindahan atau pertukaran kontrol perkembangan maternal ke embrio dan akan mempengaruhi perkembangan embrio (Vassena *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini tingkat perkembangan embrio yang diperoleh dan perlakuan transplantasi masih sangat rendah dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Waterhouse *et al.* (2004) yang melaporkan persentase hasil perkembangan embrio sebesar 52.4% dan 60% untuk perlakuan tanpa dan dengan pemberian PMSG.



Gambar 4. Perkembangan embrio in vitro.

Embrio berkembang mencapai tahap: A. 2 sd; B. 3 sd; C. 4 sd.

Seperti hasil dan koleksi oosit, pematangan dan fertilisasi in vitro pada penelitian ini, pemberian PMSG pada ovarium transplan heterotopik tidak memberikan pengaruh yang berbeda termasuk dalam perkembangan embrio. Hal ini diduga karena perkembangan embrio in vitro dipengaruhi oleh kualitas oosit dan medium yang digunakan. Menurut Cobo *et al.*, (1999) perbedaan kondisi kultur mempengaruhi faktor-faktor sitoplasma hingga mempengaruhi kemampuan oosit untuk terfertilisasi dan keberhasilan embriogenesis.

Hambatan perkembangan embrio in vitro merupakan hal yang umum terjadi hingga sering dalam sistem kultur in vitro ditambahkan bahan yang memperkaya komposisi medium kultur dan dapat mendukung perkembangan embrio in vitro. Dalam penelitian ini medium yang digunakan adalah kalium simplex optimize medium (KSOM) merupakan defined medium atau medium sederhana yang umum digunakan dalam sistem kultur rodentia. Medium KSOM terdiri dari NaCl dan KCJ sebagai garam anorganik untuk mengatur osmolaritas medium, sodium piruvat, sodium laktat, glukosa dan glutamine sebagai sumber energi, NaHCO₃ sebagai buffer yang akan mempertahankan pH medium serta asam amino esensial dan nonesensial yang diperlukan bagi metabolisme embrio. Penambahan bovine serum albumin (BAS) pada medium kultur dilakukan untuk meningkatkan perkembangan embrio in vitro. Namun hasil perkembangan embrio in vitro dan perlakuan transplantasi pada penelitian ini masih rendah.

Perkembangan tahap awal embrio tergantung pada lingkungan pematangan oosit (Kidson, 2005), ketika sistem pematangan in vitro tidak memberikan lingkungan yang cocok bagi oosit walaupun dapat terbentuk kematangan inti dan terjadi fertilisasi namun hasil akhir adalah rendahnya perkembangan embrio yang diperoleh (Lucidi *et al.*, 2003). Oleh karena itu menurut Cobo *et al.*, (1999), kualitas embrio dapat ditingkatkan dengan kultur pada kondisi lingkungan yang optimal.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari ovarium transplan heterotopik dapat dihasilkan oosit yang memiliki potensi untuk digunakan dalam produksi embrio *in vitro*. Induksi dengan menggunakan PMSG tidak mempengaruhi perolehan jumlah oosit yang dikoleksi dan ovarium transplan heterotopik. Oosit hasil transplantasi ovarium menunjukkan kemampuan untuk matang *in vitro* mencapai tahap metafase II dan setelah difertilisasi mampu berkembang menjadi embrio.

2. Saran

Dalam penelitian ini superovulasi dilakukan dengan induksi PMSG yang berfungsi dalam perkembangan folikel sehingga disarankan untuk dapat dilakukan penelitian lanjutan dengan

induksi PMSG dan hCG untuk mengetahui pengaruh superovulasi lebih lanjut terhadap oosit yang dapat dikoleksi dari ovarium transplan heterotopik. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan sistem kultur atau medium yang berbeda untuk mengetahui perkembangan oosit sehingga dapat menghasilkan embrio yang dapat digunakan dalam produksi embrio In vitro

DAFTAR PUSTAKA

- Alberior R, Zakhar'tchenko V, Motlik J, Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implication for nuclear transfer. *int J Dev Biol* 45:797-809.
- Bagis H, Keskin'tepe L, Sagirkaya H, Odaman H, Cetin S. 2001. Influences of cumulus cells during in vitro fertilization of mouse oocytes in different mouse strain. *Turk J Vet Anim SCI* 25:777-782.
- Barnes FL. 2000. In vitro maturation and developmental competence of human primary oocytes. Di dalam: Troimson AO, Gardner DK, editor. *Handbook of In Vitro Fertilization*. Ed ke-2. Florida: CRC Press. hlm 85-97.
- Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Lailia JM, Balasch J. 2001. Long term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrin Metab* 86:4489-4494.
- Candy CL Wood MJ, Whittingham DG. 2000. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 15:1300-1304.
- Cox SE, Shaw J, Jenkin G. 1996. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil* 107:315-322.
- Crozet N, Dahirel M, Gall L. 2000. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J Reprod Fertil* 118:367-373.
- Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, Van den Bergh M, Devreker F, Englert Y. 2002. Effect of preantral follicles isolation technique on in vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod* 17:2152-2159.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. 2003. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 18:1294-1298.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. fertilization and cleavage. Di dalam: Hafez B, Hafez ESE, editor. *Reproduction in Farm Animal*. Ed ke-7. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. Hlm 117.
- Hendri. 1997. Efektivitas penambahan berbagai jenis dan konsentrasi serum serta ko-kultur sel-sel epitel tuba fallopii dan kumulus dapa TCM-199 dalam produksi embrio sapi in vitro [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Hinrichs K, Schmidt AL. 2000. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus. morphology and season. *Biol Reprod* 62:1402-1408.

Volume 1, Nomor 2, Desember 2020

- Liu J, Van der Elst J, Van de Broecke R, Dhont M. 2001. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Blot Reprod* 64:171-178.
- Liu J, Rybouchkin A, Van der Elst J, Dhont M. 2002. Fertilization of mouse oocytes from in vitro- matured preantral follicles using classical in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Biol-Reprod*. 67:575-579.
- Lucidi P, Bernabo N, Turriani M, Barboni B, Mattioli M. 2003. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod Biol Endocrin* 1(45):1-9 [terhubung berkala]. <http://www.RBEj.com>.
- Malekshah AK, Moghaddam AE. 2005. Follicular fluid and cumulus cells synergistically improve mouse embryo development in vitro. *J Reprod Dev* 51(2):195-199.
- Quirk SM, Cowan RG, Horman RM, Hu CL, Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 82:40-52.
- Rahman MGM, Goswami PC, Khndoker Yahia MAM, Tareq KMA, Ali SZ. 2003. Collection of bovine cumulus-oocytes-complexes (COCs) from slaughterhouse ovaries in Bangladesh. *Pakistan Biol Sci* 6:2054-2057.
- Rinendyaputri R. 2002. Tingkat pematangan inti dan fertilisasi in vitro sel telur mencit (*Mus musculus albinus*) yang dikoleksi dan folikel antral [skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.