

PENGARUH PENAMBAHAN *FOLLICLE STIMULATING HORMONE* PADA MEDIUM MATURASI TERHADAP KEMAMPUAN MATURASI OOSIT KAMBING LOKAL *IN VITRO*

Yanuar Achadri¹, Diah Tri Widayati², Sigit Bintara²

¹Staf pengajar Fakultas Pertanian, Universitas Islam Batik Surakarta

²Staf pengajar Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada

Email: yanuar.achadri13@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada medium maturasi terhadap kemampuan maturasi oosit kambing lokal *in vitro*. Ovarium diambil dari rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dalam larutan NaCl sebagai medium transport ovarium yang mengandung antibiotik pada suhu 31-34°C. Oosit diaspirasi menggunakan syringe 3 ml dan jarum 23G yang telah diisi 1 ml flushing medium. Pengamatan oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo. Oosit dicuci 2 kali pada *Dubelco's Phosphat Basa Saline* (DPBS) dan dicuci sekali di *Tissue Culture Medium* (TCM) kemudian dimasukkan ke dalam incubator CO₂ pada suhu 39.5°C, kelembaban 95%, dan kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Oosit dibedakan dalam tiga kelompok berdasarkan penambahan FSH (0 IU/mL, 50 IU/mL, dan 100 IU/mL). Data kemampuan maturasi *in vitro* dianalisis menggunakan oneway ANOVA dengan oosit mature, rusak, dan tidak mature sebagai faktor-faktor utama. Persentase mature oosit dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan immature mempunyai sel kumulus yang rapat mengelilingi zona pellucida, dan sedikit vesikel dalam ooplasma, sedangkan pada oosit yang mature tampak ekspansi sel-sel kumulus yang merenggang dan mengelilingi oosit. Persentase oosit mature berturut-turut adalah 73.33±6.29%, 74.35±5.73%, 64.72±6,58%, untuk masing-masing penambahan dosis FSH 100 IU/mL, 50 IU/mL, dan 0 IU/mL. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan FSH pada medium tidak memberikan pengaruh terhadap kemampuan maturasi oosit kambing lokal *in vitro*.

Kata kunci: *follicle Stimulating Hormone*, maturasi *in vitro*, oosit kambing lokal, persentase oosit mature

PENDAHULUAN

Ovarium merupakan salah satu limbah dari rumah potong hewan yang potensial dimanfaatkan untuk kepentingan penelitian. Ovarium mengandung oosit-oois yang berguna untuk menghasilkan embrio melalui teknik fertilisasi *in vitro*. Embrio yang dihasilkan berguna untuk penelitian dasar dan terapan seperti penelitian penentuan jenis kelamin, pembekuan embrio, *cloning* atau pembuatan *chimera*. Selain itu embrio yang dihasilkan dapat ditransfer ke ternak resipien untuk membantu mempercepat peningkatan populasi ternak. Keberhasilan kebuntingan dari teknologi fertilisasi *in vitro* dengan memanfaatkan ovarium dari rumah potong hewan bisa mencapai 56% (Herdis, 2000). Oosit dari ovarium yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) memiliki tingkat kematangan

yang berbeda-beda, sehingga diperlukan proses maturasi untuk menghasilkan oosit yang siap untuk fertilisasi. Salah satu faktor yang dapat meningkatkan keberhasilan maturasi adalah dengan penambahan hormon tertentu pada medium maturasi.

Hormon adalah substansi kimia yang dihasilkan oleh kelenjar endokrin tanpa saluran, sehingga hormon secara langsung disekresikan ke dalam aliran darah yang membawanya ke berbagai jaringan tubuh dimana ia berfungsi sebagai target organ sehingga mengakibatkan perubahan-perubahan aktivitas pada organ sasaran (Turner & Bagnara, 1988). Hormon-hormon reproduksi memegang peranan penting dalam aktivitas reproduksi ternak. Salah satunya adalah *Follitropin*. *Follitropin* merupakan *Follicle stimulating hormone* (FSH) yang mempunyai daya kerja untuk merangsang pertumbuhan dan pemasakan folikel dalam ovarium. *Follicle*

stimulating hormone (FSH) berfungsi menghasilkan estrogen untuk meningkatkan kerja sel folikuler. Selain itu, FSH diperlukan untuk proses maturasi oosit dan ekspansi sel kumulus.

Berdasarkan hal tersebut di atas maka dipandang perlu untuk diteliti pengaruh penambahan hormon FSH pada medium maturasi terhadap kemampuan maturasi oosit kambing lokal *in vitro*.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai Oktober 2010 di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium kambing lokal yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) khusus kambing dan domba di daerah Babadan Baru, hormon Follitropin dengan dosis 0 IU/ ml, 50 IU/ ml, dan 100 IU/ ml, *Dubelco's Phosphat Basa Saline* (DPBS) atau *flushing medium* (Medicult, Denmark) yang mengandung 50.000 IU/ *penicillin* dan 50 mg/l *streptomycin*, TCM 0 %, *mineral oil*, NaCl (Wako, Jepang), *penicillin* (Meiji, Indonesia), *streptomycin* (Meiji, Indonesia), *aquadest*, dan *alcohol* 70 %.

Alat-alat yang digunakan adalah *Laminar Air Flow* (LAF) (Envair, Inggris), *incubator CO₂* (Cole Parmer, Amerika), timbangan analitik (Sartorius, Jerman), oven 50°-250°C (Jouan, Prancis), *syringe* 3 ml dan 10 ml *disposable tissue culture dish* (TSD) (Facon, Amerika Serikat) ukuran 35 x 10 mm, tabung *microhematocrit* (Brand, Wertheim), gelas ukur 250 ml, tabung *Erlenmeyer* 250 ml, kompor listrik, *stirer*, termos, *thermometer*, *micropipet*, penggaris (ukuran mm), lampu spiritus, pinset, kikir, kertas minyak, spatula, tisu, *disposable tip*.

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu tahap persiapan dan tahap pelaksanaan penelitian.

Tahap persiapan

Pembuatan pipet aspirasi oosit

Pipet aspirasi oosit digunakan untuk memindahkan oosit dari medium satu ke medium yang lain, dan dibuat dari tabung *microhematocrit* kosong. Proses pembuatannya

yaitu, kedua ujung tabung *microhematocrit* dipegang menggunakan pinset. Bagian tengah tabung *microhematocrit* dipotong menggunakan pinset, menjadi dua buah pipet aspirasi dengan salah satu ujungnya memiliki lubang yang lebih kecil. Ujung pinset yang kecil dihaluskan dengan kikir, karena ujung yang tidak rata dapat mengganggu proses pengambilan dan merusak oosit yang diambil.

Pembuatan NaCl sebagai medium transport ovarium

Aquadest sebanyak 250 ml dipanaskan di atas kompor listrik sampai suhu 40°C kemudian ditambahkan 2,25 gram NaCl, 2500 IU *penicillin* dan 0,025 gram *streptomycin*, selanjutnya dihomogenkan. Larutan yang telah homogen segera dimasukkan dalam termos dengan pemanasan 40°C diharapkan keesokan hari saat dipergunakan suhu larutan menjadi 31°C sampai 34°C yaitu suhu optimal penyimpanan ovarium.

Persiapan Laminar Air Flow (LAF)

LAF digunakan selama *handling* oosit. Lampu *ultra violet* (UV) pada LAF dihidupkan selama 30 menit sebelum penggunaan untuk sterilisasi, setelah disterilisasi maka lampu dan fan dihidupkan selama penggunaan.

Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan dipergunakan untuk penelitian disterilisasi dulu dengan cara disemprot dengan *alcohol* 70%, dibungkus dengan kertas aluminium foil lalu dimasukkan ke dalam LAF.

Tahap pelaksanaan

Koleksi oosit

Ovarium kambing lokal yang diperoleh dari rumah potong hewan segera dimasukkan ke dalam larutan NaCl fisiologis dalam termos. Pengoleksian oosit dilakukan dalam LAF. Cairan folikel dan oosit disedot menggunakan *syringe* dengan ukuran 3 ml dan jarum 23G. Setelah semua folikel dalam ovarium diaspirasi, dipindahkan ke TSD secara perlahan.

Pencucian oosit

Pencucian oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo. Oosit hasil aspirasi diambil dari TSD penampungan menggunakan pipet *microhaematocrit* dan dicuci pada DPBS sampai 2 kali kemudian dicuci di TCM 0% sekali. Pada saat pengambilan oosit hasil aspirasi dan pencucian oosit dilakukan penyeleksian oosit

yang akan dimaturasi, yaitu dipilih oosit dari kelas satu dan dua.

Maturasi in vitro

Pada maturasi *in vitro* disiapkan TSD kemudian digaris menggunakan silet menjadi tiga bagian. Pada tiap-tiap bagian tersebut ditulis hormon Folltropin 0 IU/ ml, 50 IU/ ml, dan 100 IU/ ml. *Mineral oil* dituangkan dalam TSD sehingga seluruh permukaan TCM dan hormon Folltropin terendam. Pengamatan yang dilakukan sebelum maturasi adalah melihat kualitas oosit dengan mikroskop stereo, meliputi kekompakan *cumulus oophorus* dan kondisi *sitoplasma* atau *ooplasma*. Pemasakkan oosit dilakukan dengan membiakkan oosit dalam medium TCM dan hormon Folltropin dalam inkubator CO₂ pada suhu 39,5°C, kelembaban 95%, dan kadar CO₂ 5% selama 24 jam.

Pengamatan maturasi oosit

Pengamatan maturasi oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo setelah 24 jam dimasukkan dalam inkubator. Pengamatan yang dilakukan setelah proses maturasi meliputi, ekspansi sel-sel *cumulus oophorus* dan munculnya *first polar body*.

Analisis statistik

Data yang diamati dalam proses maturasi *in vitro* adalah pengaruh medium oosit kambing lokal berupa TCM 0% dan penambahan hormon Folltropin 0 IU/ ml, 50 IU/ ml, dan 100 IU/ ml. Selain itu pengamatan kualitas oosit sebelum maturasi dan setelah maturasi. Data kemampuan maturasi *in vitro* semua perlakuan tersebut dianalisis menggunakan *oneway ANOVA* dengan program SPSS 16.

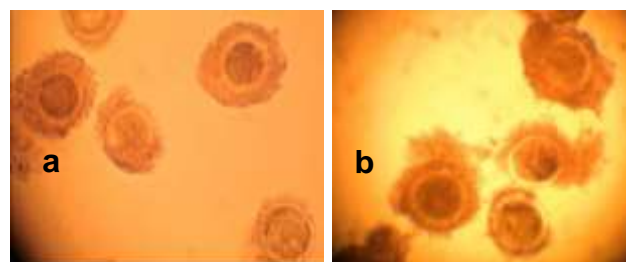
HASIL DAN PEMBAHASAN

Maturasi oosit adalah proses perkembangan oosit mulai dari *diplotene* ke tingkat *metaphase II* (maturasi nukleus). Maturasi oosit *in vitro* merupakan rangkaian kegiatan teknologi fertilisasi *in vitro* menggunakan medium khusus. Medium yang digunakan untuk pematangan oosit *in vitro* umumnya ditambahkan dengan hormon antara lain: FSH, LH, *hormone chorionic gonadotrophin* (HCG), dan serum. Pada penelitian ini menggunakan Folltropin-V yang

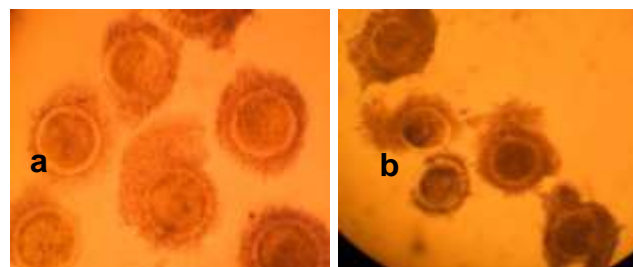
merupakan ekstrak Folltropin murni diperoleh dari hasil seleksi *porcine pituitary glands*.

Kriteria-kriteria oosit yang dipergunakan dalam penelitian antara lain: oosit kelas satu yaitu oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus yang berlapis-lapis, dan oosit kelas dua yaitu oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus yang tidak utuh. Motik dan Fulka (1986); Gordon (1990); Putro (1993) dalam Widayati (1999) menambahkan, dengan masih utuhnya sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit *immature*, dapat tercipta lingkungan seluler yang sesuai untuk proses maturasi oosit, karena metabolisme bersama antara oosit dan sel-sel kumulus menghasilkan nutrisi yang berperan penting selama maturasi oosit.

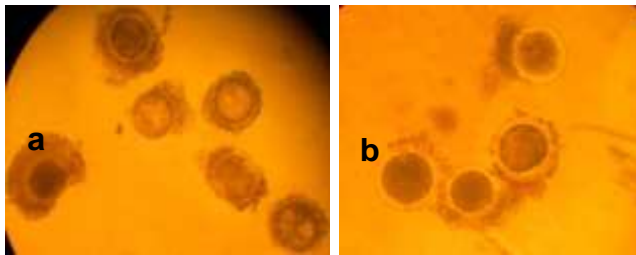
Hasil penelitian yang telah diamati tampak oosit *immature* mempunyai sel kumulus yang rapat mengelilingi zona *pellucida*, sedangkan pada oosit *mature* tampak ekspansi sel-sel kumulus yang merenggang dan mengelilingi oosit (Gambar 1, 2, 3).



Gambar 1 Oosit kambing lokal *immature* tanpa penambahan FSH (a) dan oosit kambing lokal *mature* (b). Perbesaran 40x.

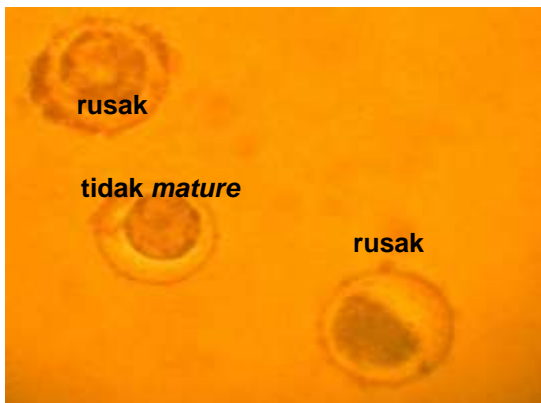


Gambar 2 Oosit kambing lokal *immature* penambahan FSH 50 IU/ml (a) dan oosit kambing lokal *mature* (b). Perbesaran 40x.



Gambar 3 Oosit kambing lokal *immature* penambahan FSH 100 IU/ml (a) dan oosit kambing lokal *mature*. Perbesaran 40x.

Pada Gambar 1, 2, 3 oosit kambing lokal *immature* sel-sel kumulus tampak rapat mengelilingi oosit sedangkan oosit kambing lokal yang telah dimaturasi tampak ekspansi sel-sel kumulus yang merenggang, menandakan oosit *mature*. Gordon (1994) menyatakan bahwa tanda oosit *mature* adalah adanya ekspansi sel-sel kumulus. Sel-sel kumulus distimulasi oleh FSH dan *growth factor* untuk memproduksi dan mensekresikan *hyaluronic acid* yang menyebabkan ekspansi. Widayati (1999) menyatakan bahwa ekspansi sel-sel kumulus sangat penting bagi keberhasilan fertilisasi, karena dapat membantu migrasi spermatozoa diantara sel-sel kumulus.



Gambar 4 Oosit kambing lokal yang rusak dan tidak *mature* setelah proses maturasi. Perbesaran 40x.

Pada Gambar 4, menunjukkan oosit kambing lokal yang rusak dan tidak *mature*. Pada oosit kambing lokal yang tidak *mature*

setelah proses maturasi tampak tidak terjadi ekspansi sel-sel kumulus dan pada oosit kambing lokal yang rusak tampak sedikit bergranula dan sitoplasma mengkerut. Hasil penelitian Kumalawati (2008) menjelaskan bahwa kerusakan oosit setelah maturasi terbesar didapatkan pada oosit domba yang berasal dari folikel yang berukuran lebih kecil (1,0-3,0 mm) dibandingkan oosit domba yang berasal dari folikel besar (3,1-6,0 mm). Pada folikel yang berukuran kecil lingkungan intrafolikuler tidak sebaik yang berasal dari folikel besar. Padahal dalam lingkungan folikel tersebut terdapat hormon gonadotropin/ FSH dan *growth factor* yang memproduksi dan mensekresikan *hyaluronic acid* yang mempengaruhi kelangsungan perkembangan oosit dan ekspansi sel-sel kumulus. Dalam penelitian tidak digunakan oosit dari folikel yang lebih besar dari 6 mm, karena menurut Hozumi (2001), fibrin dari folikel besar mengentalkan sedimen cair yang dikoleksi dan menyebabkan beberapa masalah, antara lain kesulitan pada saat pengamatan.

Menurut Gall *et al.*, (2005) faktor yang mempengaruhi maturasi *in vitro* pada kambing lokal antara lain: ukuran oosit kambing, ukuran folikel, hormon, serum, dan perbedaan medium IVM untuk pertumbuhan. Gordon (1994) menyatakan bahwa oosit yang didapatkan dari folikel kambing berukuran kecil (1-3 mm) memiliki *meiotic competence* yang rendah. *Meiotic competence* adalah kemampuan oosit untuk menyempurnakan meiosis. Pada kambing, folikel yang lebih besar (3-6 mm) menyediakan lingkungan mikro yang meningkatkan kualitas oosit. Lingkungan interfolikular terdiri atas hormon steroid dan peptida, *growth factor*, dan molekul-molekul lain.

Hasil persentase oosit yang *mature*, rusak, dan tidak *mature* setelah dilakukan maturasi *in vitro* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Persentase oosit yang *mature*, rusak, dan tidak *mature* setelah dilakukan maturasi *in vitro* selama 24 jam

Variabel yang diamati (%)	Perlakuan dosis FSH ^(ns)		
	0 IU/ml	50 IU/ml	100 IU/ml
Persentase oosit <i>mature</i>	64,72±6,58	74,35±5,73	73,33±6,29
Persentase oosit rusak	15,74±4,03	10,33±5,34	15,37±4,21
Persentase oosit tidak <i>mature</i>	19,54±5,93	15,32±4,45	11,57±4,58

Keterangan: ^{ns} = non signifikan

Rata-rata persentase oosit *mature* berturut-turut mulai dari yang terbesar adalah oosit dengan perlakuan dosis 50 IU/ml sebesar 74,35±5,73%, perlakuan dosis 100 IU/ml sebesar 73,33±6,29%, dan perlakuan dosis 0 IU/ml sebesar 64,72±6,58%. Penambahan hormon FSH pada medium maturasi tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata (non signifikan) terhadap kemampuan maturasi *in vitro* oosit kambing lokal.

Konsentrasi FSH 50 IU/ml memiliki pengaruh dalam maturasi meskipun tidak berbeda nyata. Pengaruh yang tidak berbeda nyata juga terlihat pada persentase oosit kambing lokal yang rusak dan tidak *mature*. Hal tersebut disebabkan TCM-199 merupakan medium standar yang sudah sesuai untuk maturasi oosit *in vitro*, akan tetapi untuk meningkatkan angka maturasi diperlukan penambahan hormon tertentu sehingga maturasi lebih efektif. Menurut Boediono *et al.*, (2006), TCM-199 merupakan medium kompleks yang mempunyai komposisi bahan penyusun terdiri dari sumber energi, garam anorganik, *buffer*, asam amino, dan vitamin yang akan mendukung pematangan oosit *in vitro*.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Oktay *et al.*, (1997) dalam Rahman *et al.*, (2008) dengan menggunakan hormon FSH (0,5 ìg/ml), LH (5 ìg/ml) dan estradiol (1 ìg/ml) yang ditambahkan serum 10% didapatkan angka pematangan oosit meningkat dibandingkan dengan medium yang tidak ditambahkan hormon, tetapi diantara ketiga perlakuan hormon angka maturasi oosit tidak berbeda nyata. Selanjutnya Choi *et al.*, (2001) dalam Rahman *et al.*, (2008) menambahkan beberapa dosis FSH dan LH dapat meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus, tetapi tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap tahap perkembangan embrio berikutnya/angka blastosis. Menurut Bearden dan Fuquay (1997), FSH dan LH diketahui sebagai gonadotropin karena keduanya

menstimulasi gonad. Pada hewan betina, FSH mendukung pertumbuhan folikel dan produksi estrogen, sedangkan LH mendukung proses maturasi folikel.

Magalhaes *et al.*, (2009) melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan *pituitary* FSH (Folltropin dan Stimufol) pada awal *folliculogenesis* kambing *in vitro*. Penambahan dosis folltropin sebesar 10, 50, 100 IU/ml sedangkan Stimufol sebesar 50 IU/ml. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa penambahan Folltropin 100 IU/ml dapat meningkatkan pertumbuhan folikel lebih tinggi daripada Stimufol. *Follicle Stimulating Hormone* mempunyai pengaruh berbeda pada kultur *in vitro* folikel preantral kambing. Stimufol lebih efisien untuk morfologi folikel sedangkan Folltropin untuk meningkatkan pertumbuhan folikel. Pertumbuhan folikel yang baik berpengaruh pada oosit, sel-sel granulosa, dan *theca* yang dapat mendukung proses maturasi oosit *in vitro* yang sempurna.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan hormon Folltropin pada medium maturasi dapat meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus, tetapi tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap kemampuan maturasi oosit kambing lokal *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Boediono, A., Yulnawati, & Setiadi, M. A. (2006). Tingkat pematangan inti oosit domba dari ovarium dengan status reproduksi dan medium maturasi yang berbeda. *Hayati* 13 (4), 131-136.
- Bearden, H. J & Fuquay, J. W. (1997). *Applied Animal Reproduction*. Virginia: Reston Publishing Company, Inc.

- Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, D., and Germain. (2005). EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 489-494.
- Gordon, I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryo*. UK: CAB International.
- Herdis. (2000). Pemanfaatan ovarium sebagai limbah rumah potong hewan untuk meningkatkan produksi ternak melalui teknologi fertilisasi *in vitro*. *Jurnal Saintek Indonesia* 2(2).
- Hozumi, T. (2001). *Reproductive Biology and Biotechnology*. Indonesia: Japan International Cooperation Agency.
- Kumalawati, D. S. (2008). Pengaruh ukuran folikel dan waktu inkubasi oosit domba terhadap kemampuan maturasi *in vitro*. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada.
- Magalhaes, D. M., Araujo, V. R., & Matos, M. H. T. (2009). Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. *Biocell* 33(2), 91-97.
- Rahman, A. N. M. A., Abdullah, R. B., & Wan-Khadijah, W. E. (2008). *In vitro* maturation of oocytes with special reference to goat: A Review. *Biotechnology* 7(4), 599-611.
- Turner, C. D. & Bagnara, J.T. (1988). *General Endocrinology*. Saunder Company Dalam Harsojo. Endokrinologi Umum. Surabaya: Airlangga University Press.
- Widayati, D. T. (1999). Pengaruh penambahan sel-sel kumulus pada media terhadap kemampuan maturasi oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio Sapi Peranakan Ongole *in Vitro*. *Thesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.