



FMIPA
Universitas Jember

Jurnal ILMU DASAR

Terakreditasi: SK Dirjen Dikti No. 55/DIKTI/Kep/2005

Volume 7, Nomor 2

Juli 2006

Skining Aktivitas Antikanker Ekstrak Metanol dari Tanaman Familia Asteraceae dengan Molekul Target Enzim DNA Topoisomerase (*Screening of Anticancer Activity of Methanolic Extract from Plants of Familia Asteraceae with Molecule Target DNA Topoisomerase*) oleh Sukardiman, Hadi Poerwono, Sofia Mubarika dan Sismindari.

Model Spline dengan Knots Optimal (*Spline Model with Optimal Knots*) oleh I Nyoman Budiantara.

Kombinasi Resin Penukar Ion Basa Kuat dan Karbon Aktif Untuk Memperbaiki Warna Gula Cair (*Combination of Strong Base Anion Exchange Resins and Active Carbon for Decolorization of Liquid Sugar*) oleh Hendro Santoso dan Triantarti.

Pengaruh Annealing Terhadap Gejala Magnetoresistansi Lapisan Tipis Permalloy Ni₁₀₀Fe₂₀ Hasil Sputtering (*Annealing Effect on Magnetoresistance Ni₁₀₀Fe₂₀ Permalloy Thin Films Result of Sputtering*) oleh Fahru Nurosyid, Yofentina Iriani dan Catur Wedo Susilo.

Kinetika Reaksi Alkoholisis Minyak Dedak Padi dalam Metanol dengan Katalis KOH pada Proses Pembuatan Biodiesel (*A Kinetic Study of Alcohololysis of Rice Bran Oil With Methanol and KOH in Biodiesel Production*) oleh Boy Arief Fachri.

Penentuan Sulfida Secara Tidak Langsung dengan Menggunakan Pb(II) Kromat yang Diamobilisasikan pada Silika dengan Metode Injeksi Alir (*Indirect Determination of Sulphide Using Lead (II) Chromate that Immobilized on Silica with Flow-Injection Method*) oleh Asnawati.

Pembentukan Peroksida pada Selulosa dan Peruraiannya Sebagai Penginisiasi Polimerisasi Grafting Asam Akrilat (*Formation of Peroxide on Cellulose and Its Decomposition to Initiate Graft Copolymerization of Acrylic Acid*) oleh Irwan Ginting Suka.

Application of Seismic Technology for Reef Mapping in Ketapang Block, Offshore North Madura by Saifatur Rusli.

Hubungan Viabilitas Sel, Ekspresi Protein P53 dan Ki-67 pada Kultur Fibroblas Gingiva Manusia yang Dipajan Lipopolisakarida Bakteri Gram-Negatif (*The Correlation between Cell Viability, Expression of p53 Protein and Ki-67 on Cultured Human Gingival Fibroblasts Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide*) oleh Banun Kusumawardani.

Profil Transformasi Kromosom Oosit Sapi Bali dalam Media Pematangan *In Vitro* (*Transformation of Profile Oocytes Chromosom Bali Cattle in Media in Vitro Maturation*) oleh Enny Yuliani.

Analisis Pengaruh Medan Magnet Terhadap Tingkat Penguapan Air (*Analysis of Magnetic Field Influence to the Water Evaporation Level*) oleh Roniyus Marjunus.

Pendekatan Terbaik Diantara Distribusi Pareto, Pareto Tergeneralisir dan Mixture-Pareto dalam Pemodelan Reliabilitas (*The Best Approach belong Pareto, Generalized Pareto and Mixture-Pareto in Reliability Modelling*) oleh Toha Saifudin.

Statistik Uji Kesalahan Penduga Simetris pada Model Random Walk (*Symmetric Estimator Error Test Statistical on the Random Walk Model*) oleh Sediono.

Aktivitas Enzim Metabolisme Nitrat dan Sukrosa Daun Kedelai Fase Awal Berbunga (R₁) pada Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam (*Nitrate dan Sucrose Metabolism Enzyme Activity of Soybean Leaves at Flowering Initial Phase (R₁) on Nitrate Application in Salt Stress Condition*) oleh Miswar, Tri Agus Setiawan dan Kristiningrum Utami.

Pengembangan Sediaan Lepas Lambat Na Diklofenak Berbasis Polimer Hidrofilik PVP K 30 (*Development of Diclofenac Sodium Sustained -Release Dosage Form Base on Ethylcellulose Hydrophilic Polymer PVP K 30*) oleh Yudi Wicaksono.

Sintesis dan Karakterisasi Polieugenol dengan Katalis Bf₃ - Dietil eter (*Synthesis and Characterization of Polyeugenol with BF₃ - Diethyl ether Catalyst*) oleh Wuryanti Handayani.

Classification of Construction Techniques of Large Directed Graphs by Slamir

Oksidasi Asam Lemak Daging Sapi dan Ikan pada Penggunaan Natrium Tripolifosfat : Pemasakan dan Penyimpanan (*Oxidation of Fat Acids Beef and Fish Muscle on Usage of Sodium Tripolyphosphate : Cooking and Storage*) oleh Leny Yuanita

Jurnal ILMU DASAR

Vol. 7

No. 2

Hlm. 71 - 200

Jember
Juli 2006

ISSN
1411-5735

Jurnal ILMU DASAR

DAFTAR ISI

Skринing Aktivitas Antikanker Ekstrak Metanol dari Tanaman Familia Asteraceae dengan Molekul Target Enzim DNA Topoisomerase (*Screening of Anticancer Activity of Methanolic Extract from Plants of Familia Asteraceae with Molecule Target DNA Topoisomerase*) oleh **Sukardiman, Hadi Poerwono, Sofia Mubarika dan Sismindari (71-76)**.

Model Spline dengan Knots Optimal (*Spline Model with Optimal Knots*) oleh **I Nyoman Budiantara (77-85)**.

Kombinasi Resin Penukar Ion Basa Kuat dan Karbon Aktif Untuk Memperbaiki Warna Gula Cair (*Combination of Strong Base Anion Exchange Resins and Active Carbon for Decolorization of Liquid Sugar*) oleh **Hendro Santoso dan Triantarti (86-93)**.

Pengaruh *Annealing* Terhadap Gejala Magnetoresistansi Lapisan Tipis Permalloy Ni₈₀Fe₂₀ Hasil *Sputtering* (*Annealing Effect on Magnetoresistance Ni₈₀Fe₂₀ Permalloy Thin Films Result of Sputtering*) oleh **Fahru Nurosyid, Yofentina Iriani dan Catur Wedo Susilo (94-97)**.

Kinetika Reaksi Alkoholisis Minyak Dedak Padi dalam Metanol dengan Katalis KOH pada Proses Pembuatan Biodiesel (*A Kinetic Study of Alcoholysis of Rice Bran Oil With Methanol and KOH in Biodiesel Production*) oleh **Boy Arief Fachri (98-105)**.

Penentuan Sulfida Secara Tidak Langsung dengan Menggunakan Pb(II) Kromat yang Diamobilisasikan pada Silika dengan Metode Injeksi Alir (*Indirect Determination of Sulphide Using Lead (II) Chromate that Immobilized on Silica with Flow-Injection Method*) oleh **Asnawati (106-113)**.

Pembentukan Peroksida pada Selulosa dan Peruraiannya Sebagai Penginisiasi Polimerisasi Grafting Asam Akrilat (*Formation of Peroxide on Cellulose and Its Decomposition to Initiate Graft Copolymerization of Acrylic Acid*) oleh **Irwan Ginting Suka (114-120)**.

Application of Seismic Technology for Reef Mapping in Ketapang Block, Offshore North Madura by **Saifatur Rusli (121-125)**.

Hubungan Viabilitas Sel, Ekspresi Protein P53 dan Ki-67 pada Kultur Fibroblas Gingiva Manusia yang Dipajan Lipopolisakarida Bakteri Gram-Negatif (*The Correlation between Cell Viability, Expression of p53 Protein and Ki-67 on Cultured Human Gingival Fibroblasts Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide*) oleh **Banun Kusumawardani (129-132)**.

Profil Transformasi Kromosom Oosit Sapi Bali dalam Media Pematangan *In Vitro* (*Transformation of Profile Oocytes Chromosom Bali Cattle in Media in Vitro Maturation*) oleh **Enny Yuliani (133-139)**.

Analisis Pengaruh Medan Magnet Terhadap Tingkat Penguapan Air (*Analysis of Magnetic Field Influence to the Water Evaporation Level*) oleh **Roniyus Marjunus (140-145)**.

Pendekatan Terbaik Diantara Distribusi Pareto, Pareto Tergeneralisir dan *Mixture-Pareto* dalam Pemodelan Reliabilitas (*The Best Approach belong Pareto, Generalized Pareto and Mixture-Pareto in Reliability Modelling*) oleh **Toha Saifudin (146-154)**.

Statistik Uji Kesalahan Penduga Simetris pada Model *Random Walk* (*Symmetric Estimator Error Test Statistical on the Random Walk Model*) oleh **Sediono (155-161)**.

Aktivitas Enzim Metabolisme Nitrat dan Sukrosa Daun Kedelai Fase Awal Berbunga (R₁) pada Pemberian Nitrat dalam Kondisi Cekaman Garam (*Nitrate dan Sucrose Metabolism Enzyme Activities in Soybean Leaves at Flowering Initial Phase (R₁) on Nitrate Application in Salt Stress Condition*) oleh **Miswar, Tri Agus Siswoyo dan Khristiningrum Utami (162-169)**.

Pengembangan Sediaan Lepas Lambat Na Diklofenak Berbasis Matrik Etilselulosa-PVP K 30 (*Development of Diclofenac Sodium Sustained - Release Dosage Form Base on Ethylcellulose-PVP K 30 Matrix*) oleh **Yudi Wicaksono (170-176)**.

Sintesis dan Karakterisasi Polieugenol dengan Katalis Bf₃ - Dietileter (*Synthesis and Characterization of Polyeugenol with Bf₃ - Diethylether Catalyst*) oleh **Wuryanti Handayani (177-187)**.

Classification of Construction Techniques of Large Directed Graphs by **Slamin (188-193)**

Oksidasi Asam Lemak Daging Sapi dan Ikan pada Penggunaan Natrium Tripolifosfat : Pemasakan dan Penyimpanan (*Oxidation of Fatty Acid's Beef and Fish Muscle on Usage of Sodium Tripolyphosphate : Cooking and Storage*) oleh **Leny Yuanita (194-200)**

200
240
480
690
940
1180

210

Profil Transformasi Kromosom Oosit Sapi Bali dalam Media Pematangan
In Vitro
(Transformation of Profile Oocytes Chromosom Bali Cattle in Media
In Vitro Maturation)

Enny Yuliani
Staf Pengajar UPT MIPA Universitas Mataram

ABSTRACT

The objective of this study observed influence of addition of Estrous Cow Serum (ECS), Estrous Mare Serum (EMS), Estrous Goat Serum (EGS), and non addition of Estrous Serum (K) on oocyte maturation in Bali cattle. Bali cattle oocytes were collected from the ovaries of slaughtered animals. By using completely randomized design 432 ECS, and 110 oocytes was treated. The first group, TCM- 199 supplemented with 10% involved in this treatment. The second groups was supplemented with 10 % EMS and 180 oocytes were the fourth group was no supplemented with oestrus female serum and 116 oocytes was treated. All of these media and oocytes were incubated at 38.5°C in 5% CO₂ incubator for 24 hours. The fixed oocytes were stained with Aceto Orcein 1% for 2 minutes, and Germinal vesicle, metafase I, anafase I, telofase I, polar body I formation and methaphase II stage were evaluated under a compound microscope at x 1000 magnification. The result of Anova analysis showed that oocyte maturation in treatment group was significantly different ($p < 0.05$), compared with control group. These researchs demonstrate a role for estrous female serum (ECS, EMS and EGS) in increasing production and the quality of *in vitro* oocyte maturation. However, there was no difference ($p > 0.05$) between addition of ECS with EMS and EGS on oocyte maturation in treatment group.

Keywords : *in vitro* maturation, oocyte, chromosome, estrous serum, Bali cattle

PENDAHULUAN

Sapi Bali dikenal sebagai salah satu ternak asli atau ternak eksotik Indonesia. Dalam upaya menjaga kemurnian genetis sapi Bali, sekaligus membantu upaya peningkatan peran sapi Bali sebagai salah satu pemasok sapi pedaging dan pengembangan bibit unggul jenis ternak tersebut, melalui teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) merupakan salah satu alternatif.

Teknologi FIV terdiri dari beberapa tahapan, yaitu koleksi oosit, pematangan oosit, preparasi sperma, kapasitasi sperma, proses fertilisasi dan biakan embrio hasil fertilisasi, dilanjutkan dengan transfer embrio kepada resipien. Proses pematangan oosit *in vitro*, diperlukan oosit yang dikumpulkan dalam keadaan oosit primer atau masih dalam stadium pre-anthrum untuk berkembang menjadi oosit tertier. Pada saat oosit primer menjadi tertier *in vivo*, biasanya hewan dalam keadaan proestrus lalu menjadi estrus. Pada saat ini hormon yang diperlukan pematangan dan ovulasi oosit *in vivo* pada individu yang sudah mempunyai siklus estrus adalah FSH, LH dan Estrogen (Hafez, 1995).

Sampai saat ini keberhasilan teknologi FIV, khususnya di Indonesia masih berbeda antar berbagai laboratorium. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh perbedaan beberapa faktor

yang membentuk lingkungan yang sesuai untuk pematangan oosit yaitu kandungan gonadotropin, faktor penumbuh, hormon steroid, media pematangan, kualitas oosit dan faktor yang disekresikan oosit dan molekul-molekul yang belum diketahui (Lorenzo, *et al.*, 1994). Dalam proses pematangan oosit maupun perkembangan embrio *in vitro*, media yang digunakan harus mempunyai fungsi mekanis, fisik dan kimiawi artinya media dapat memberikan lingkungan yang optimum untuk menjamin kelangsungan hidup oosit. Penggunaan media kultur lengkap TCM-199 dan bicarbonate atau HEPES dan tambahan berbagai macam serum, dan atau gonadotropin (FSH dan LH) dan steroid (Estradiol -17 B) telah banyak digunakan untuk mempelajari maturasi oosit *in-vitro* sapi (Brackett dan Zuelke, 1993).

Serum selain banyak mengandung kelengkapan protein, asam lemak, zat organik, enzim, imunoglobulin juga banyak mengandung hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam konsentrasi tertentu yang penting untuk pematangan oosit. Serum betina birahi merupakan satu bahan suplementasi yg berperan penting untuk pematangan oosit, karena serum betina birahi banyak mengandung protein dan glukosa yang penting

untuk metabolisme oosit. Di samping itu juga banyak mengasah hormon gonadotropin dan estrogen untuk penyempurnaan pematangan oosit dan perkembangan embrio selanjutnya. Namun informasi penambahan berbagai macam serum hewan betina berahi untuk meningkatkan pematangan oosit *in vitro* pada sapi Bali belum pernah dilakukan.

Evaluasi tingkat pematangan oosit dilakukan dengan pengamatan transformasi inti dan pemekaran (ekspansi) sel-sel kumulus. Pada tingkat seluler, pematangan oosit diawali dengan terjadinya diferensiasi pada inti, sitoplasma dan membran yang kemudian diikuti dengan terjadinya perubahan struktur protein inti dan membran inti. Pada saat yang sama terjadi pembengkakan kromosom yang dinamakan *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD). Setelah terjadinya pecburan membran inti, kromosom menyusun diri pada suatu equator diperifer sitoplasma untuk memulai pembentukan metafase I, Anafase I, dan telofase I yang selanjutnya diikuti dengan pelepasan polar bodi dari sitoplasma oosit. Setelah pelepasan polar bodi kromosom akan bergerak untuk menyusun diri di daerah perifer sitoplasma dan equator untuk menyelesaikan tahap metafase II. Dengan demikian proses pematangan oosit berakhir setelah tercapainya pembelahan meiosis sampai tahap metafase II dan terbentuknya polar bodi I.

Kelompok I	: 110 oosit mendapat suplemen 10% ECS (<i>Estrus Cow Serum</i>)
Kelompok II	: 100 oosit mendapatkan suplemen 10% EMS (<i>Estrus Mare Serum</i>)
Kelompok III	: 106 oosit mendapatkan suplemen 10% EGS (<i>Estrus Goat Serum</i>)
Kelompok IV	: 116 oosit tidak mendapatkan suplemen serum hewan berahi (Kontrol)

Koleksi Serum Betina Berahi

Serum betina berahi digunakan dalam penelitian ini diperoleh dengan cara pengambilan darah melalui vena yugularis dari sapi berahi, kuda berahi dan kambing berahi sebanyak 25 ml. Kemudian sampel darah dimasukkan dalam tabung reaksi dan disimpan di dalam refrigerator 4°C selama 24 jam. Serum diambil dan disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm, kemudian dinaktivasi dengan memanaskan 56°C selama 30 menit dalam inkubator. Tambahkan gentamisin dosis 25 mg/ml, lalu saring dengan *milipore* berdiameter 0.22 µm. Selanjutnya serum dimasukkan dalam vial 1 ml dan disimpan dalam freezer suhu 4°C sebagai stock. Serum tersebut sebelum digunakan diukur kadar hormon estrogen dan progesteronnya

Secara visual berbagai pengembangan kumulus oophorus dapat diamati. Pada oosit yang belum matang nampak kumulus oophorus tidak mengembang dan mengembang sebagian, karena pematangan sitoplasma kurang sempurna dan pembelahan inti tidak berlanjut sampai metafase II. Kumulus oophorus yang tidak mengembang menunjukkan bahwa pembelahan sel hanya sampai pada tahap *Germinal Vesikel* (GV), sedangkan kumulus yang berkembang sebagian menunjukkan bahwa pembelahan sel sampai pada fase GVBD, metafase I dan anafase, telofase pada meiosis I.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis profil transformasi kromosom oosit dalam media TCM 199 yang dilengkapi serum hewan berahi. Fakta tersebut membuktikan bahwa, hewan berahi dapat menggantikan hormon LH, FSH, dan estrogen yang harganya relatif mahal dan sulit di dapat di pasaran. Selanjutnya dapat dibukukan pemanfaatannya pada media kultur pematangan oosit *in vitro* dan penelitian pengembangannya, khususnya pada sapi Bali.

METODE

Oosit sapi Bali (422 buah) diperoleh dari hasil aspirasi dari jaringan ovarium dibagi dalam 4 kelompok secara acak untuk dilakukan maturasi dalam TCM 199 (Sigma).

dengan teknik Radio Immunoassay (RIA) fase padat.

Pematangan Oosit

Pematangan oosit dilakukan dalam setiap 50 µl TCM 199 berisi 5-6 oosit, kemudian ditutup dengan mineral oil (Sigma) dalam cawan petri plastik berpenampang 36 mm disposable (Nuncion, Denmark). Pengeraman dilakukan selama 24 jam di dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 38,5 °C kelembaban 95-100%. Evaluasi pematangan oosit dilakukan dengan analisis profil transformasi inti dan pemekaran (ekspansi) sel-sel kumulus. Transformasi kromosom dikelompokkan dalam 4 fase yaitu GV, metafase I, anafase I, telofase I, polar bodi I dan metafase II.

Teknik Pewarnaan Oosit

Evaluasi transformasi ini dilakukan dengan metoda *staining* memakai pewarnaan aceto orcein 1% dan pemekaran (ekspansi) sel-sel kumulus (Niwa *et al.*, 1991). Kriteria yang digunakan untuk menentukan pematangan oosit adalah telah mencapai tahap metafase II dan terbentuk polar bodi. Oosit yang sudah dimatangkan, selanjutnya ditempatkan pada objek gelas dan ditutup dengan gelas penutup. Kemudian celupkan dalam cairan fiksasi (Asam asetat 90% : ethanol 70 % = 3 : 1) selama 2-3 hari. Pewarnaan aceto orcein 1% selama 2 menit, kemudian cuci dengan larutan asam asetat 90%, gliserin dan ethanol 70% (1:1:3). Oosit diamati dengan menggunakan mikroskop stereo pembesaran 400 x.

Analisis Data

Melalui Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 10 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis varian satu arah pada taraf nyata 5 %. Data dari masing-masing perlakuan sebelumnya ditransformasi terlebih dahulu dengan transformasi sudut (Arcsin akar Y). Bila terdapat perbedaan, maka data selanjutnya diuji dengan menggunakan uji Boda Nyata Terkecil (BNT) Fisher.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Kadar Progesteron

Rata-rata hasil pemeriksaan kadar progesteron dan estrogen dalam serum 8 jam setelah berahi pada kuda, kambing dan sapi yang digunakan untuk perlakuan dalam penelitian ini seperti tertera dalam Tabel 1.

Rendahnya kadar hormon progesteron menunjukkan bahwa hewan betina tersebut berada dalam keadaan fase berahi. Kadar progesteron akan meningkat setelah fase berahi, hal ini dibuktikan dengan pengujian hari ke 7 setelah berahi kadar progesteron > 1 ng/ml (Mahaputra, 1999). Selanjutnya ditegaskan pula bahwa, kadar hormon

progesteron yang lebih kecil dari 0,75 ng/ml maka sapi tersebut berada pada status folikuler atau hipofungsi ovarium. Sedangkan kadar progesteron yang lebih besar dari 0,75 ng/ml sapi berada pada fase luteal. Pada kuda, pada fase luteal kadar progesteronnya adalah > 3,2 nMol/Li (Yuliani dan Mahaputra, 1997, Mahaputra *dkk.*, 1999). Kadar progesteron pada saat estrus 0,23 nMol/Li. Kadar ini sangat mendekati kadar basal yaitu 0 (nol). Karena pada saat ini aktivitas CI, tidak ada dan yang menonjol adalah aktivitas folikel sebagai penghasil hormon estrogen. Hal ini menunjukkan hormon progesteron turun secara drastis sejak fase luteal dan mencapai basal pada saat kuda dalam keadaan berahi.

Tabel 1. Kadar hormon progesteron dan estrogen dalam serum hewan berahi

Serum Betina Berahi	Progesteron ng/ml	Estrogen Pg/ml
Sapi	0,015	53,25
Kuda	0,024	190
Kambing	0,017	58,16

Pematangan Oosit

Data yang diperoleh pada percobaan ini adalah persentase polar bodi I yang terbentuk dan tercapainya tahap metafase II dari pembelahan meiosis inti. Selain itu juga dihitung persentase tahap pembelahan meiosis dan perubahan inti lainnya seperti GV, Metafase I, anafase I dan Telofase I. Rata-rata persentase polar bodi I yang terbentuk setelah pematangan oosit dalam TCM 199 dengan penambahan ECS, EMS, EGS dan kontrol (tanpa penambahan serum berahi) dapat dilihat pada Tabel 2.

Rata-rata persentase tahap metafase II dan tahap pembelahan meiosis inti lainnya yang ditemukan setelah pematangan oosit pada TCM 199 dengan penambahan ECS, EMS dan EGS serta kontrol selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Persentase rata-rata polar bodi I setelah pematangan oosit dalam media TCM 199 dengan penambahan berbagai serum hewan berahi

Media	Jumlah oosit	Ulangan	Polar Bodi I
TCM 199 + ECS	110	10	74,56 ± 2,25 ^a
TCM 199 + EMS	100	10	76,43 ± 4,23 ^a
TCM 199 + EGS	106	10	72,15 ± 4,10 ^a
TCM 199	116	10	55,22 ± 5,24 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$)

Tabel 3. Persentase rata-rata tahap pembelahan meiosis inti oosit sapi bali setelah pematangan selama 24 jam dalam media TCM 199 yang dilengkapi dengan serum hewan berahi

Media	Jumlah Oosit	Ulangan	Metafase II	Metafase I	Germinal Vesikel	Anafase I dan Telofase I
TCM 199 + ECS	110	10	74,20±3,48 ^b	8,90±4,22 ^a	6,62±3,14 ^d	8,28±3,44 ^a
TCM 199 + EMS	100	10	76,32±4,20 ^b	9,64±2,28 ^a	7,36±2,82 ^d	6,68±2,44 ^a
TCM 199 + EGS	106	10	72,40±2,20 ^b	10,34±3,42 ^a	10,20±4,42 ^d	7,06±3,64 ^a
TCM 199	116	10	54,39±5,24 ^a	20,10±3,26 ^d	18,34±2,32 ^a	7,17±4,26 ^a

Keterangan : Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$)

Analisis statistik terhadap rata-rata persentase polar bodi I dan tahap metafase II setelah pematangan oosit selama 24 jam dalam media TCM 199 dengan penambahan ECS, EMS dan EGS memperlihatkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) dibandingkan tanpa penambahan serum hewan berahi. Namun tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$) antara ketiga perlakuan penambahan serum hewan betina berahi terhadap pembentukan polar bodi I dan metafase II. Hal ini memperlihatkan bahwa penambahan serum betina berahi dalam media TCM 199 dapat menunjang proses pematangan oosit sapi Bali. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil peneliti sebelumnya, bahwa penambahan serum betina berahi dalam media TCM 199 dapat mempercepat proses peleburan germinal vesikel guna mencapai tahap metafase II pada sapi (Schellander *et al.*, 1990).

Tingginya persentase oosit dengan polar bodi I dan tahap metafase II setelah pematangan oosit dalam media TCM 199 dengan penambahan serum hewan berahi disebabkan serum betina berahi selain banyak mengandung protein, glukosa, asam lemak dan zat organik yang diperlukan untuk metabolisme dan pertumbuhan oosit juga banyak

mengandung hormon gonadotropin (FSH dan LH), estrogen dan faktor penumbuh seperti EGF, TGF dan IGF yang penting untuk proses pematangan oosit. Hormon-hormon tersebut sangat penting dalam proses pematangan oosit baik *in vivo* maupun *in vitro*. Beberapa penambahan serum telah dicoba meningkatkan perolehan oosit matang pada berbagai spesies hewan Mahapatra (1997), melakukan pematangan oosit sapi Madura dalam inkubator CO₂ selama 24 jam menggunakan media TCM-199 dengan penambahan 10 % kuda berahi menghasilkan persentase oosit matang sebesar 87,3 % lebih tinggi dibandingkan penambahan FSH-LH-E₂ (78,9%) maupun penambahan serum sapi berahi yaitu 85,4%. Pada kerbau dilaporkan maturasi yang dapat dicapai hanya 60 % (Pavasuthipaisit *et al.*, 1992) dan meningkat menjadi 80-81 % dengan penambahan gonadotropin dan steroid dengan konsentrasi yang berbeda (Totey *et al.*, 1993). Margawati (1996) melaporkan bahwa pematangan oosit sapi selama 22 jam dengan penambahan LH 10 µg/ml, 10µg/ml FSH dan 1µg/ml E₂ mendapatkan oosit matang hanya 62 %. Fukui *et al.* (1992) menyatakan bahwa pembelahan awal oosit mamalia dapat berlangsung kembali secara spontan pada

media TCM 199 yang dilengkapi dengan FCS, hormon gonadotropin dan estrogen dapat dibuat dan mampu berkembang ke tahap blastosis. Variasi kisaran angka pematangan oosit sapi yang terjadi dipengaruhi oleh lama waktu pematangan, serta konsentrasi gonadotropin dan steroid yang ditambahkan dalam media.

Beberapa penelitian terdahulu melaporkan pematangan oosit mamalia dapat dipercepat dengan penambahan serum foetal (Pinyopumitr dan Bavister, 1994) serum sapi estrus (Pukui *et al.*, 1992) serum sapi ovulasi (Boediono *et al.*, 1994) pada media TCM. Selanjutnya Schellender *et al.*, 1990 melaporkan bahwa penambahan serum sapi pada media TCM 199 dapat mempercepat pembelahan meiosis inti dan memperbaiki pronukleus betina inti dan dapat meningkatkan penetrasi spermatozoa pada sel telur dan perkembangan embrio. Boediono *et al.*, (1994) melaporkan bahwa serum selain banyak mengandung protein, asam lemak, glukosa, vitamin, zat organik dan imunoglobulin juga banyak mengandung hormon dan faktor penumbuh (*Growth Factor*) dalam konsentrasi tertentu. Penambahan serum betina berahi dapat mempercepat proses pembelahan meiosis inti sel untuk mencapai tahap metaphase dan proliferasi sel-sel kumulus oosit.

Serum betina berahi mengandung FSH dan LH yang cukup tinggi, diharapkan dapat menggantikan penggunaan hormon kombinasi FSH-LH-E₂ dalam media maturasi yang menyebabkan semakin mahalnya pemanfaatan teknik FIV. Hormon LH pada proses pematangan berfungsi meningkatkan penggunaan hasil glikolisis disertai dengan peningkatan oksidasi glukosa pada mitokondria oosit, di samping itu dapat meningkatkan aktivitas siklus *Tricarboxylic Acid* (TCA) dan menambah persediaan ATP yang diperlukan oosit selama proses pematangan. FSH berfungsi menstimulir aktivitas aromatase pada sel granulosa yang mengubah lingkungan dari androgenik menjadi estrogenik dan perluasan sel-sel kumulus. Adanya estradiol 17 β dalam serum hewan berahi akan memperbaiki kelengkapan pematangan inti, termasuk sintesis faktor pertumbuhan pronukleus betina pada sitoplasma oosit mamalia (Pukui dan Fukuhima, 1995). Faktor pertumbuhan seperti EGF, IGF dan TGF penting dalam proses pembelahan reduksi pada inti oosit selama pematangan oosit. Penambahan kombinasi

faktor pertumbuhan dengan hormon gonadotropin dalam media TCM 199 memberikan kerja sinergis untuk merangsang produksi cAMP dan mempercepat pembelahan meiosis inti untuk mencapai tahap metafase II dan merangsang proliferasi dan ekspansi sel-sel kumulus oosit. Selain itu hormon dan senyawa yang tertentu yang diperlukan untuk pembelahan sel tidak dapat masuk dengan lancar ke dalam oosit karena dibatasi oleh kumulus oophorus. Namun FSH atau PMSG akan merangsang terus menerus produksi cAMP pada kumulus oophorus yang bertumpukan disekeliling oosit. LH atau HCG dan steroid dapat masuk ke dalam oosit untuk menginduksi pembelahan sel, sehingga pembelahan inti dan pematangan sitoplasma tidak terhambat.

Walaupun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ketiga macam penambahan serum hewan berahi, namun ada suatu kecenderungan oosit yang dimatangkan dengan penambahan EMS tingkat kematangannya lebih tinggi. Hal ini kemungkinan disebabkan perbedaan kandungan hormon LH, FSH dan estrogen dari ketiga jenis serum tersebut. Hasil pengukuran kadar estrogen pada EMS lebih tinggi dibandingkan dengan ECS atau EGS. Kadar estrogen yang tinggi akan memberikan umpan balik positif terhadap kadar hormon LH, hal ini berarti tingginya kadar estrogen dalam serum akan diikuti pula dengan tingginya kadar LH dalam serum. Kadar gonadotropin (LH) yang tinggi dalam media buakan dapat mempercepat pelobusan germinal vesikel dan pembelahan reduksi inti oosit mamalia yang dibiakan *in vitro*. Lebih lanjut Keefer *et al.*, (1995) melaporkan bahwa penambahan kombinasi 100 IU/ml LH, 20 μ g/ml FSH, 1,0 μ g/ml estradiol 17 β pada media TCM 199 yang mengandung FCS dan privat menghasilkan oosit yang matang sebesar 72% lebih tinggi dari pada penambahan 10 IU/ml LH, 20 μ g/ml FSH dan 1,0 μ g/ml estradiol 17 β hanya menghasilkan oosit matang 52%.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan masih terdapat oosit yang tidak matang dengan sempurna, yaitu oosit masih berada dalam fase metafase I, anafase I dan telofase I. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kondisi oosit yang tidak seragam waktu dikoleksi dari folikel antral ovarium. Oosit yang dimatangkan secara *in vitro* tidak semuanya dapat mencapai tahap metafase II, karena ada beberapa faktor yang mempengaruhi, diantaranya adalah

ketidakmampuan oosit untuk tumbuh atau tidak mampu mempertahankan kelangsungan hidupnya dalam media biakan. Pada penelitian ini juga dapat diamati adanya ekspansi sel kumulus oosit setelah pematangan 24 jam dalam media TCM 199 yang dilengkapi serum hewan berahi. Ekspansi sel kumulus yang paling kompak dan rapat ditemukan pada oosit yang dimatangkan dalam media biakan yang dilengkapi dengan ECS. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kobayashi *et al.* (1997) dan Lorenzo *et al.* (1997) pada oosit sapi yang dimatangkan dalam media TCM 199 yang ditambahkan dengan kombinasi gonadotropin dan faktor pemumbuh EGF dan IGF-1. Penambahan kombinasi FSH, LH, Faktor pemumbuh selain dapat merangsang perluasan ekspansi sel kumulus juga akan memperkuat pematangan inti oosit sapi. Di sisi lain, kualitas oosit *immature* umumnya ditentukan berdasarkan penilaian visual dari kekompakan banyaknya sel folikel dan tingkat pematangan oosit yang sempurna dipengaruhi dengan keberadaan sel kumulus yang mengelilingi oosit. Oosit yang terbaik apabila dikelilingi oleh multilayer sel folikel baik sel kumulus oophorus maupun sel korona radiata yang kompak. Oosit yang berkualitas baik oosit yang hanya dikelilingi oleh multilayer sel korona radiata yang kompak, sedangkan sel kumulus oophorus yang mengelilingi kurang kompak. Selanjutnya oosit yang tidak dapat digurukan apabila multilayer sel folikel, baik sel kumulus oophorus maupun sel korona radiata yang kurang kompak (Yuliani, 1999).

Oosit yang dihilangkan sel kumulusnya tingkat kematangannya menjadi rendah dan akan berpengaruh terhadap pembentukan pronukleus dan perkembangan embrio selanjutnya (Chian *et al.*, 1994). Pinyopumistrot dan Bavister (1994) melaporkan bahwa setain sel-sel kumulus, pematangan oosit juga dipengaruhi oleh suhu inkubasi, lamanya inkubasi, media yang digunakan selama pematangan. Martino *et al.* (1995) menyatakan bahwa pembentukan tahap metafase II dan pelepasan polar bodi I terjadi setelah 20-26 jam pematangan dalam media biakan. Namun, Chian *et al.* (1994) melaporkan bahwa oosit yang dimatangkan lebih lama akan meningkatkan kejadian lebih sempurna bila dibuahi.

Oosit yang telah matang cumulus oophorus akan mengembang dan ikatan sesama cumulus oophorus menjadi longgar serta menghasilkan

asam hyaluronik yang dapat dilarutkan oleh enzim hyaluronidase yang terkandung dalam spermatozoa. Pelarutan ini memberikan kemudahan bagi spermatozoa melalui zona pelusida dan membran vitelin oosit (Hafez, 1994). Alberts (1994) melaporkan bahwa, suatu organ yang mengalami pematangan, maka kondisi selnya berada disekitar atau permukaan organ, dan sel tersebut akan lepas atau bergerak menjauhi organ. Pergerakan sel tersebut disebabkan karena organ mengeluarkan suatu cairan kimia yang menyebabkan sel lepas dari permukaan organ dan terjadi perumatan daya perlekatan antara sel dengan melonggarnya ikatan antara cumulus oophorus, maka hubungan antara cumulus oophorus dengan oosit juga berkurang, sehingga aliran c AMP yang menuju oosit juga kecil. Mekanisme kontrol cAMP terhadap pembelahan inti berkaitan dengan kecilnya aliran cAMP yang masuk dalam oosit, hal ini meliputi sintesa ATP menjadi adenosin 5 monophospat yang akhirnya memstimulus pembelahan inti. Apabila cAMP yang masuk dalam oosit semakin meningkat maka efek fisiologis yang menghasilkan akan menghambat proses pembelahan inti (Down, 1993).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan serum betina berahi dalam media TCM 199 menghasilkan persentase oosit dengan polar bodi I dan tahap metafase II yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan media TCM 199 tanpa serum. Hal ini memperlihatkan bahwa penambahan serum betina berahi dalam media TCM 199 dapat menunjang proses pematangan oosit sapi Bali. Dengan demikian hasil penelitian dapat membuka peluang untuk pemanfaatan pemakaian serum berahi, kuda berahi dan kambing berahi pada media maturasi oosit TCM-199 pada *In Vitro Maturation*. Pada akhirnya dapat membuat media *in vitro* yang tepat untuk maturasi oosit dalam proses FIV sapi, khususnya sapi Bali. Serum betina berahi mengandung FSH dan LH yang cukup tinggi, diharapkan dapat menggantikan penggunaan hormon kombinasi FSH-LH-E₂ dalam media maturasi *in vitro*. Selanjutnya dapat mengatasi biaya dan sulitnya keberadaan hormon FSH-LH-E₂ dipasaran.

DAFTAR PUSTAKA

- Chan, R.C., K. Okuda dan K. Niwa, 1994. Influence of cumulus cell on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *J. Anim. Reprod. Sci.*, 38: 37-48.
- Fukui, Y., M. Fukushima dan H. Ono, 1989. Effect of Sera, hormones and granulosa cell added to culture media for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. And Fert.*, 86: 501-506.
- Keefer, C.L., S.L. Stice dan J.A. M. Paprocki 1993. Effect of Follicle Stimulating Hormon and Luteinizing Hormone during bovine In Vitro Maturation on Development Following in vitro fertilization and nuclear transfer. *J. Mol. Reprod. And Dev.*, 36: 469-474.
- Mahapatra, L. 1999. Teknik pembuatan embrio beku, kembar identik dan viabilitasnya, dalam upaya merintis pembangunan bank embrio sapi perah. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Mahapatra L. 1997. The Effect of Supplementation of FSH-LH-E₂, Estrous Cow Serum and Estrous Mare Serum on In Vitro maturation for Bovine in vitro Fertilization. 4th International Meeting of Biotechnology in Animal reproduction, Bogor, Indonesia, August, 6-9. 1997.
- Margawati, E.T. 1996. Effect Maturation Periods and Leukaemia inhibitory Factor (LIF) on Bovine Oocyte Maturated in vitro. *Annales Bogorieneses*, 4: 19-25.
- Martino, A., M. J. Palomo, T. Migas dan M.T. Paramio, 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *J. Theriogenology*, 43: 473-485.
- Pinyopunmistr, T. dan B.D. Bavister, 1994. Development of Bovine embryos in a Cell-free culture medium effects of type of serum, timing of its inclusion and heat in activation. *J. Theriogenology*, 41: 1241-1249.
- Pavasuthipaisit, K., Y. Katiyanant, C. C. Thonabulsombat, C. Tocharus. 1992. In vitro Maturation and fertilization of swamp buffalo Oocyte and Their Subsequent development. *Theriogenology*, 38: 545-555.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1989. *Analisa ragam, dalam Prinsip dan Prosedur Statistika : Suatu Pendekatan Biometrik*. P.T. Gramedia, Jakarta hal 168-205.
- Totey, S.M., C.H. Pawshe and G.P. Singh. 1993. In Vitro Maturation and Fertilization of Buffalo Oocyte : Effect of Media, hormones and Sera. *Theriogenology*, 39: 1153-1171.
- Thibout, C.D. Scolloni dan M. Genard, 1987. Mammalian oocyte maturation. *J. Reprod. Nutrition, Dev.* 27: 865-896.
- Yuliani E. 1999. Daya Fertilitas Spermatozoa Sapi Bali dan Keberhasilan Fertilisasi In Vitro. Seminar Penelitian aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia. Forum Komunikasi Reproduksi.
- Yuliani, E dan L. Mahapatra. 1998. Pengaruh Penambahan Serum Kuda Bunting dalam Media Buakan Terhadap Perkembangan Embrio Sapi. *Jurnal Pascasarjana Universitas Airlangga*, 7(1) Januari.