

PENGARUH KONSENTRASI ETILEN GLIKOL DAN LAMA PAPARAN TERHADAP TINGKAT FERTILITAS *IN VITRO* OOSIT SAPI

Effect of Ethylene Glycol Concentration and Length of Exposure on In Vitro Fertility of Bovine Oocyte

Sri Wahjuningsih¹, Suhartojo Hardjopranjoto², dan Sutiman Bambang Sumitro³

¹Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

³Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: yuningyuning208@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh konsentrasi etilen glikol (EG) dan lama paparan terhadap tingkat fertilitas *in vitro* oosit sapi. Dalam penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 5x3 dengan 7 kali ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi krioprotektan EG yakni 10, 20, 30, 40, dan 50%. Faktor kedua adalah lama paparan yakni 1, 3, dan 5 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi EG dan lama paparan berpengaruh terhadap oosit terfertilisasi ($P < 0,05$). Tingkat fertilitas *in vitro* oosit setelah vitrifikasi dalam EG 30% dan lama paparan 3 menit tidak berbeda ($P > 0,05$) dibandingkan oosit segar yang tidak mengalami vitrifikasi, sedangkan perlakuan EG 10, 20, 40, dan 50% secara nyata ($P < 0,05$) menunjukkan tingkat fertilitas yang lebih rendah dibandingkan EG 30%. Disimpulkan bahwa konsentrasi EG dan lama paparan berpengaruh terhadap oosit terfertilisasi. Tingkat fertilitas oosit *in vitro* tertinggi dicapai pada konsentrasi EG 30% dan lama paparan 3 menit.

ABSTRACT

The purpose of the study was to determine the influence of the concentration of ethylene glycol (EG) and length of exposure to levels of bovine oocytes *in vitro* fertility. This research was conducted using a completely randomized design factorial 5x3 with 7 replicates. The first factor was the concentration of cryoprotectants EG 10, 20, 30, 40, and 50%. The second factor was the length of exposure 1, 3, and 5 minutes. The results showed that the concentration of EG and the length of exposure were effect on fertilized oocytes ($P < 0.05$). The level of oocytes *in vitro* fertility after vitrification in 30% EG and long exposure to 3 minutes did not different ($P > 0.05$) compared to fresh oocytes, while the EG treatment 10, 20, 40, and 50% significantly showed a lower fertility rate than the 30% EG ($P < 0.05$). It was concluded that the concentration of EG and length of exposure were effect on fertilized oocytes. The highest oocytes *in vitro* fertility level were found in 30% EG concentration with 3 minutes exposure time.

Keywords: ethylene glycol, length of exposure, fertility *in vitro*, bovine oocytes

PENDAHULUAN

Teknologi fertilisasi *in vitro* (IVF) saat ini masih dilakukan dengan memanfaatkan oosit segar, namun kendala yang dihadapi adalah oosit mamalia memiliki daya tahan hidup yang sangat terbatas sehingga tidak dapat disimpan dalam waktu yang lama pada suhu kamar (Vieira *et al.*, 2002).

Keterbatasan waktu simpan ini dapat diatasi dengan teknik penyimpanan beku atau kriopreservasi oosit untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel sehingga viabilitas oosit dapat dipertahankan dengan cara mereduksi fungsi dan aktivitas metabolik tanpa terjadinya kerusakan membran maupun

Teknologi rekayasa reproduksi khususnya kriopreservasi telah cukup banyak dikembangkan untuk spermatozoa dan embrio, namun sejauh ini keberhasilan kriopreservasi oosit yang telah dilaporkan masih sangat terbatas dan variatif. Keberhasilan kriopreservasi oosit akan memungkinkan tersedianya oosit beku sehingga mempermudah pengaturan waktu di dalam produksi embrio *in vitro* dan secara umum merupakan upaya penyimpanan dan pemeliharaan plasma nutfah. Selain itu, keberhasilan kriopreservasi oosit akan memperbaiki teknik penyediaan embrio sehingga oosit segar tidak diperlukan lagi.

Penggunaan prosedur kriopreservasi oosit secara komersial masih sangat terbatas

salah satu tantangan adalah membuat metode kriopreservasi oosit yang menjamin viabilitas tinggi. Terdapat dua metode kriopreservasi yaitu metode konvensional dan vitrifikasi. Kedua metode ini mempunyai kelebihan dan kekurangan. Pada awal studi tentang kriopreservasi, dilakukan kriopreservasi menggunakan metode konvensional, namun saat ini metode vitrifikasi lebih sering diaplikasikan. Kelebihan dari metode vitrifikasi adalah pemadatan cairan tanpa melalui pembentukan kristales (Shaw *et al.*, 2000). Metode tersebut sederhana, murah, dan tidak memerlukan alat khusus untuk menurunkan suhu secara bertahap sehingga mudah diaplikasikan ditempat yang memiliki kontainer nitrogen cair.

Selama proses kriopreservasi diperlukan suatu krioprotektan. Krioprotektan selain dapat melindungi sel juga ternyata diduga dapat menimbulkan kerusakan pada sel akibat pengaruh toksisitasnya. Derajat proteksi dari bahan krioprotektan terhadap proses kristalisasi pada masa pembekuan tergantung dari jenis dan konsentrasi krioprotektan yang dipakai serta lama paparan (Kasai, 2002). Dari beberapa penelitian tentang kriopreservasi oosit, diketahui ada bermacam-macam krioprotektan yang dapat dipergunakan untuk vitrifikasi oosit, namun demikian telah diketahui bahwa etilen glikol (EG) mempunyai efek toksik yang lebih rendah dibandingkan krioprotektan yang lain (Gordon, 1994; Hoshi *et al.*, 1996). Hasil penelitian Wani *et al.* (2004) menunjukkan bahwa tingkat fertilisasi *in vitro* oosit setelah proses vitrifikasi menggunakan DMSO sebesar 12,3%. Tingkat fertilisasi oosit menggunakan EG belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan adalah mengkaji pengaruh konsentrasi EG dan lama paparan terhadap tingkat oosit terfertilisasi.

MATERI DAN METODE

Koleksi Oosit

Ovarium dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan dalam keadaan segar dan dimasukkan dalam medium berisi NaCl 0,9% + Penisilin (Meiji) 100 IU + Streptomisin (Meiji) 100 IU pada suhu 35 °C. Dalam waktu tidak lebih dari 3 jam maka dilakukan koleksi oosit dengan metode aspirasi. Medium aspirasi yang digunakan TCM 199 powder (GIBCO, St. Louis, MO, USA) ditambahkan Hepes (Sigma Grand Island, NY, USA) dan NaHCO₃ (Sigma Grand Island, NY, USA). Media ini difiltrasi dengan menggunakan membran filter berukuran diameter 0,22 µm. Medium aspirasi

mengambil sampel. Aspirasi dilakukan dengan menggunakan jarum 18 G. Evaluasi kualitas oosit *immature* dilakukan berdasarkan kriteria Hozumi (2001). Oosit kualitas A (sitoplasma kompak secara sempurna dengan sel-sel kumulus beraturan menempel di keseluruhan bagian oosit) digunakan dalam penelitian ini.

Maturasi Oosit *In Vitro*

Setelah dilakukan klasifikasi kualitas oosit, maka oosit yang berkualitas A dimaturasi secara *in vitro* dengan medium TCM199 + FCS (Gibco St. Louis, MO, USA) 10% + PMSG (Intervet, Holland) 10 IU + HCG (Intervet, Holland) 10 IU. Untuk mengetahui tahap pematangan, oosit dikultur selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 39 °C dan 5% CO₂, kelembaban 95%. Setelah proses maturasi *in vitro* oosit dievaluasi menggunakan mikroskop inversi dengan pembesaran 400x. Oosit dengan sel kumulus terekspansi sempurna digunakan dalam penelitian ini.

Vitrifikasi Oosit

Oosit hasil maturasi *in vitro* selama 24 jam didehidrasi pada larutan sukrosa (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0,25 M, dan 0,50 M, masing-masing selama 5 menit, kemudian dipaparkan ke dalam larutan vitrifikasi yang berbeda (EG 10, 20, 30, 40, dan 50%) ditambah 0,5 M sukrosa dengan lama waktu paparan yang berbeda (1, 3, dan 5 menit). Oosit dimasukkan ke dalam *ministray* transparan 0,25 cc (*French straw*), masing-masing berisi 10 oosit. Setelah pemaparan di dalam uap nitrogen selama 10 detik, *ministray* yang berisi oosit dimasukkan dalam kontainer nitrogen cair dan disimpan selama 2 minggu untuk pemeriksaan lebih lanjut.

Thawing Oosit

Thawing dilakukan dengan cara penghangatan (*warming*) di udara selama 10 detik kemudian dimasukkan dalam penangas air suhu 35 °C selama 1 menit. Isi *ministray* dituangkan ke dalam cawan petri dan oosit dibilas dua kali dengan sukrosa 0,5 M untuk menghilangkan krioprotektan.

Fertilisasi *In Vitro* Oosit Setelah Vitrifikasi

Oosit segar dan oosit hasil vitrifikasi digunakan lebih lanjut untuk proses IVF. Pengamatan jumlah oosit yang terfertilisasi dilakukan dengan pewarnaan aseto orcein 1% (Yamada *et al.*, 2007). Pada penelitian ini diamati oosit yang terfertilisasi normal, oosit yang mengalami polispermia, dan oosit yang tidak terfertilisasi. Oosit yang mengalami polispermia adalah oosit yang

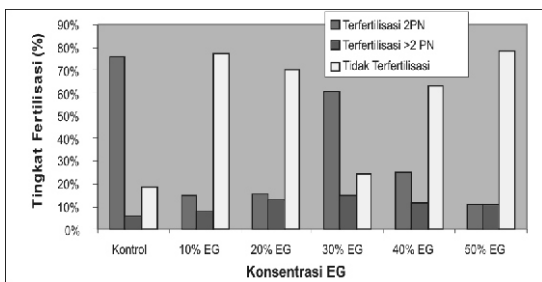
Analisis Data

Rancangan penelitian adalah rancangan acak lengkap pola faktorial 5x3 menggunakan 7 kali ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi krioprotektan EG, yaitu 10, 20, 30, 40, dan 50%. Faktor kedua adalah lama paparan, yaitu 1, 3, dan 5 menit. Analisis ragam digunakan untuk menguji pengaruh konsentrasi EG dan lama paparan terhadap tingkat fertilitasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

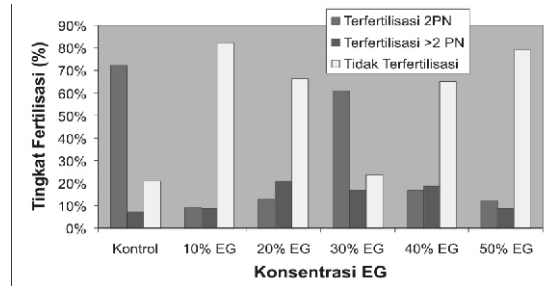
Oosit terfertilisasi dapat diamati melalui pewarnaan aceto orcein 1% dan dapat diketahui oosit terfertilisasi normal (mempunyai 2 pronukleus) dan oosit yang mengalami polispermi (mempunyai lebih dari 2 pronukleus). Persentase oosit terfertilisasi tertinggi adalah pada konsentrasi EG 30% dan lama paparan 3 menit sedang persentase oosit terfertilisasi terendah adalah pada konsentrasi EG 10% dan lama paparan 1 menit. Tingkat fertilitasi *in vitro* dari oosit Mt-II setelah vitrifikasi di dalam larutan vitrifikasi dengan konsentrasi EG 30% tidak berbeda ($P>0,05$) dibandingkan oosit tanpa perlakuan vitrifikasi, sedangkan perlakuan EG 10, 20, 40, dan 50% secara nyata ($P<0,05$) menunjukkan tingkat fertilitas yang lebih rendah dibandingkan EG 30%.

Hasil vitrifikasi menggunakan berbagai konsentrasi EG dan lama paparan yang berbeda menghasilkan persentase oosit terfertilisasi normal (2 PN), terfertilisasi >2 PN (polispermi) dan tidak terfertilisasi pada lama paparan 1, 3, dan 5 menit yang dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

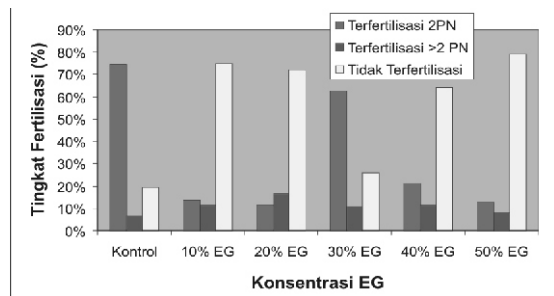


Gambar 1. Persentase oosit terfertilisasi 2 PN, >2PN dan tidak terfertilisasi pada berbagai konsentrasi EG dan lama paparan 1 menit

Apabila dicermati lebih lanjut ternyata ada perbedaan oosit terfertilisasi normal (2PN) antara perlakuan vitrifikasi 30% dengan kontrol ($P<0,05$) seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Oosit yang telah mengalami vitrifikasi menunjukkan persentase oosit terfertilisasi normal yang lebih rendah dibandingkan



Gambar 2. Persentase oosit terfertilisasi 2 PN, >2PN dan tidak terfertilisasi pada berbagai konsentrasi EG dan lama paparan 3 menit



Gambar 3. Persentase oosit terfertilisasi 2 PN, >2PN dan tidak terfertilisasi pada berbagai konsentrasi EG dan lama paparan 5 menit

Walaupun oosit yang telah mengalami vitrifikasi masih memiliki kemampuan untuk mendukung proses fertilisasi, namun keadaan poliploid menunjukkan persentase yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan oosit tanpa perlakuan vitrifikasi. Penelitian Hocht *et al.* (1996) menunjukkan bahwa tingkat fertilitasi *in vitro* oosit sapi dalam larutan EG 40% menunjukkan tingkat poliploid yang cukup tinggi yaitu 44,9%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses vitrifikasi mengakibatkan perubahan beberapa struktur oosit seperti zona pelusida, membran plasma dan butir-butir korteks yang berperan di dalam proses pencegahan polispermi seperti yang telah dilaporkan Hocht *et al.* (1996) dan Pedro *et al.* (2005).

Sejauh ini telah dilaporkan bahwa proses pembekuan oosit dapat mengakibatkan kerusakan morfologi dan struktur serta menurunkan bahkan menghilangkan fungsi biologis oosit, yaitu menurunnya tingkat fertilitasi dan perkembangan embrio menci (Rayos *et al.*, 1994) dan sapi (Otoi *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1992; Martino *et al.*, 1993; Massip, 2003). Vitrifikasi oosit dilaporkan mengakibatkan menurunnya tingkat fertilitasi dan perkembangan embrio. Hal ini diakibatkan oleh terjadinya kerusakan pada morfologi dan struktur serta menurunnya viabilitas oosit (Fukui *et al.*, 1993). Vitrifikasi oosit dapat mengakibatkan

dan organel sitoplasma seperti skeleton sel (Hochi *et al.*, 1996; Arav *et al.*, 2000) dan butir-butir korteks (Fukui dan Sukuma, 1995). Beberapa faktor yang diduga dapat mengakibatkan perubahan morfologi dan fungsi biologis oosit adalah pemaparan terhadap krioprotektan, proses pendinginan serta kristal es yang terbentuk (Fukui dan Sukuma 1995; Vajta, 2000). Kerusakan morfologi yang terjadi adalah pecahnya zona pelusida, desintegrasi membran plasma, kerusakan bahan serta organel sitoplasma seperti skeleton sel dan kromosom, butir-butir korteks, dan butir-butir lemak (Fukui *et al.*, 1993).

KESIMPULAN

Konsentrasi EG dan lama paparan berpengaruh terhadap oosit terfertilisasi. Persentase oosit terfertilisasi tertinggi adalah pada konsentrasi EG 30% dan lama paparan 3 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Arav, A., Y. Zeron, and A. Ocheretny. 2000. A new device and method for vitrification increase the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**. 53:248.
- Coticchio, G., M.A. Bonu, A. Borini, and C. Flamigni. 2004. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** 115:2-7.
- Fukui, E.J., L. Xia, and B.R. Downey. 1993. Ultrastructural changes in bovine oocyte cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. 32(2):139-156.
- Fukui, Y. and Y. Sukuma. 1995. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence of absence of cumulus cells. **J. Biol. of Reprod.** 22:1133-1139.
- Gordon, I. 1994. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Cab. International, Cambridge.
- Hochi, S., K. Kimura, K. Ito, and M. Hirabayashi. 1996. Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. **Theriogenology**. 46:345. (Abstr).
- Hozumi, T. 2001. **Reproductive Biology and Biotechnology**. Japan International Cooperation Agency, Indonesia.
- Kasai, M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Rev. 1:1-9. [http://www/blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1445781.2002.00004](http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1445781.2002.00004)**.
- Lim, J.M., Y. Fukui, and H. Ono. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**. 37:351-362.
- Martino, A., T. Mogas, M.J. Palomo, and M.T. Paramio, 1993. Effect of method of recovery on the in vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. **9th Scientific Meeting**. European Embryo Transfer Association, Paris.
- Massip, A. 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod. Nutr. Dev.** 43:325-330.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa, and T. Suzuki. 1998. Cryopreservation of mature bovine by vitrification in straws. **Cryobiology**. 37:77-85.
- Pedro, P., E. Yokoyama, S.E. Zhu, N. Yoshida, D.M. Valdez Jr., M. Tanaka, K. Edashige, and M. Kasai. 2005. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. **J. Reprod. Dev.** 51:235-246.
- Rayos, A.A., Y. Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. **J. Reprod. Fert.** 100:123-129.
- Shaw, J.M., A. Oranratnachai, and A.O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**. 53:59-72.
- Vajta, G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.** 61:357-364.
- Vieira, A.D., A. Mezzalira, D.P. Barbieri, R.C. Lehmkuhl, M.I.B. Rubin, and G. Vajta. 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**. 45:91-94.
- Wani, N.A., A.K. Misra, and S.N. Maurya. 2004. Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. **Anim. Reprod. Sci.** 84:327-335.
- Yamada, C., H.V.A. Caetano, S. Renata, A.C. Nicacio, and W.B. Feitosa, M.E. Assumpc, and J.A. Visintin. 2007. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Anim.**