
**SITOSKELETON OOSIT SAPI PASCA VITRIFIKASI MENGGUNAKAN
KRIOPROTEKTAN ETILEN GLIKOL**

*Cytoskeleton of Bovine Oocytes after Vitriification Using
Ethylene Glycol Cryoprotectant*

Sri Wahjuningsih
Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang
E-mail: yuning@brawijaya.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh vitrifikasi terhadap kondisi sitoskeleton oosit berbasis mikrotubulus menggunakan teknik imunohistokimia. Oosit dikelompokkan dalam dua perlakuan yaitu oosit segar tanpa perlakuan vitrifikasi (kontrol) dan oosit dengan perlakuan vitrifikasi 10, 20, 30, 40, dan 50% etilen glikol (EG). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi etilen glikol pada proses vitrifikasi berpengaruh terhadap struktur sitoskeleton oosit berbasis mikrotubulus. Konsentrasi etilen glikol 10, 20, 40, dan 50% tidak dapat memperbaiki struktur sitoskeleton pasca vitrifikasi, namun oosit dengan perlakuan EG 30% dapat mencegah kerusakan sitoskeleton lebih lanjut.

Kata kunci: vitrifikasi, sitoskeleton, etilen glikol, oosit sapi

ABSTRACT

The objective of this research is to know the influence of vitrification method toward the condition of bovine oocytes cytoskeleton based on microtubules using the immunohistochemistry technique. Oocytes classified in two treatments such as fresh oocytes (control) and oocytes with vitrification treatments of 10, 20, 30, 40, and 50% of ethylene glycol (EG). Data were analyzed by descriptive analyzing. The results of this research indicated that vitrification treatments were affected to microtubules organization of oocytes. Concentration of EG 10, 20, 40, and 50% of EG could not repair cytoskeleton after vitrification, but cytoskeleton structure could be protected by EG 30%.

Keywords: vitrification, cytoskeleton, ethylene glycol, bovine oocytes

PENDAHULUAN

Teknologi fertilisasi *in vitro* (IVF) saat ini sedang dikembangkan untuk menghasilkan embrio dalam jumlah besar di luar tubuh induk. Untuk kelangsungan IVF, sangat dibutuhkan ketersediaan sel gamet baik sperma maupun oosit dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Hal ini hanya dapat dipenuhi bila sel gamet tersebut dibekukan sehingga dapat digunakan bila dibutuhkan. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan teknologi tentang pembekuan sel gamet yang dapat diandalkan untuk mendukung proses IVF tersebut. Penelitian tentang pembekuan sperma dan embrio sudah banyak yang berhasil dilakukan sedangkan pembekuan oosit masih banyak menemui kendala sehingga diperlukan suatu penelitian dasar tentang pembekuan oosit untuk mendapatkan informasi yang bermanfaat dalam pengembangan teknologi pembekuan oosit.

Salah satu alternatif pembekuan oosit yang sekarang dikembangkan adalah vitrifikasi. Vitrifikasi adalah pembekuan sel gamet pada temperatur rendah dengan kecepatan pendinginan yang cepat. Pembekuan oosit dengan vitrifikasi memiliki kelebihan yaitu mengurangi pembentukan es intraseluler yang dapat menyebabkan kerusakan sel seperti yang terjadi pada pembekuan konvensional. Masalah utama yang membatasi keberhasilan metode vitrifikasi adalah efek negatif osmosis dan toksisitas krioprotektan karena menggunakan krioprotektan konsentrasi tinggi. Kondisi ini dapat menyebabkan kerusakan sel sehingga ketahanan hidup oosit setelah vitrifikasi rendah (Picton *et al.*, 2000). Pembekuan oosit diduga dapat menyebabkan kerusakan komponen sel seperti integritas

membran sel dan depolimerisasi mikrotubul (Agca, 2000).

Untuk mengurangi kerusakan sel pada proses vitrifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan krioprotektan yang toksisitasnya rendah. Etilen glikol (EG) merupakan salah satu jenis krioprotektan yang banyak digunakan untuk pembekuan embrio sapi, kambing, tikus (Mc Ginnis *et al.*, 1993) dan oosit tikus (Salehnia *et al.*, 2000). Etilen glikol mempunyai efek toksik yang rendah dibandingkan jenis krioprotektan yang lain (Triwulaningsih, 1997). Namun informasi mengenai pengaruh pembekuan oosit sapi dengan metode vitrifikasi menggunakan krioprotektan EG masih terbatas khususnya terhadap kerusakan komponen sitoskeleton yaitu mikrotubul sehingga diperlukan suatu penelitian awal untuk mengetahui kondisi sitoskeleton setelah vitrifikasi.

MATERI DAN METODE

Bahan yang digunakan yaitu oosit sapi hasil aspirasi dari ovarium, NaCl 0,9% steril (Merck), air bebas ion/*deionize water* (PT. Otsuka-Lawang), etilen glikol (Merck), sukrosa (Merck), nitrogen cair, streptomisin (Meiji, Indonesia), penisilin (Meiji, Indonesia), paraffin oil (Merck), alkohol 70% (One Med), aquades, teepol 1%, asam asetat glasial (Merck), etanol (Merck), metanol (Merck), hidrogen peroksida (H₂O₂) (Santa Cruz), Triton X-100, antibodi primer (*mouse antiβ tubulin monoclonal antibody*), antibodi sekunder (*goat anti mouse anti igG biotinlated*), formaldehid 37% (Merck), DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) (Santa Cruz), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (GIBCO), aluminium foil, *Phospat Buffer Saline* (PBS), *Streptavidin*

Horseradish Peroxidase (SA-HRP) (Santa Cruz), EGTA (*Ethylene Glycol Bis (β - aminoethyl ether)*) (Sigma), $MgCl_2$ (Sigma), gliserol (Merck), Nonidet P-40, PMSF (*phenyl methyl sulfonyl fluoride*) (Sigma), Hepes (*N-(2-hydroxy ethyl) pircazine-N'-2-ethane sulfonic acid*).

Koleksi Ovarium

Ovarium yang didapatkan dari RPH segera dibersihkan dari lemak sekitarnya. Ovarium selanjutnya dimasukkan ke dalam botol berisi NaCl fisiologis 0,9% hangat yang sudah diberi penisilin 100 IU/ml (0,006 g/100 ml) dan streptomisin 100 IU/ml (0,01 g/100 ml). Botol berisi ovarium dimasukkan ke dalam termos yang berisi air hangat ($\pm 38^\circ C$), kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan aspirasi. Lama waktu antara pematangan sapi sampai aspirasi oosit maksimal 5 jam. Di laboratorium, botol yang berisi ovarium dipindah ke *waterbath* yang suhunya diatur sebesar $38^\circ C$.

Aspirasi dan Pencucian Oosit

Aspirasi dilakukan menggunakan *disposable syringe* 10 ml dengan ukuran jarum 18 G. Pengambilan cairan folikel dilakukan dengan cara menusuk jaringan di sekitar folikel dengan *disposable syringe* yang sebelumnya diisi dengan PBS. Setelah semua cairan folikel terhisap, cairan folikel yang didapat dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dalam *waterbath* suhu $38^\circ C$ dan ditunggu selama ± 10 menit. Kemudian 2/3 cairan bagian atas dibuang dengan cara dipipet dan cairan yang tersisa ditambah dengan larutan pencuci oosit (PBS) sampai mencapai 3/4 volume tabung. Cairan folikel yang dicuci tersebut dimasukkan kembali dalam *waterbath* selama ± 10 menit. Pencucian oosit dilakukan sebanyak tiga

kali. Cairan folikel yang telah dicuci dituang ke dalam cawan petri steril diameter 5 cm untuk evaluasi kualitas oosit menggunakan mikroskop binokuler. Evaluasi oosit ditentukan menurut Madison dan Grave (1992). Oosit yang dipakai dalam penelitian ini adalah oosit dengan kualitas A. Selanjutnya oosit hasil seleksi (oosit kualitas A) dipindahkan ke cawan petri lain yang berisi PBS untuk pencucian dengan menggunakan pipet pasteur yang dimodifikasi sehingga ukuran ujungnya sebesar diameter oosit.

Vitrifikasi Oosit

Oosit kualitas A hasil aspirasi diperlakukan dalam 2 perlakuan yaitu oosit segar tanpa perlakuan vitrifikasi (kontrol) dan oosit dengan perlakuan vitrifikasi menggunakan 10, 20, 30, 40, dan 50% EG+ 0,5 M sukrosa. Oosit dimasukkan ke dalam *ministraw* transparan 0,25 cc (*French straw*), masing-masing diisi 10 oosit dan dilakukan pemaparan selama satu menit. Setelah oosit dimasukkan ke dalam *straw*, ujung *straw* ditutup dengan cara menjepitnya dengan pinset panas. Setelah pemaparan, *straw* diuapkan selama 10 detik pada uap nitrogen dan langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair.

Pencairan (*thawing*)

Setelah dibekukan selama satu minggu, *straw* yang berisi oosit diambil dengan menggunakan pinset dan dilakukan penghangatan (*warming*) selama 10 detik di udara. Kemudian *straw* dimasukkan dalam penangas air suhu $35^\circ C$ selama satu menit. *Straw* digunting pada kedua ujungnya dan isinya dituang ke dalam cawan petri. Selanjutnya oosit dibilas dua kali dengan sukrosa 0,5 M dan tiga kali dengan PBS untuk menghilangkan krioprotektan.

Analisis Sitoskeleton Oosit Berbasis Mikrotubulus

Analisis mikrotubulus dilakukan dengan menggunakan metode imunohistokimia berdasarkan Ito *et al.* (1994) dan Maciver (2001) dengan modifikasi. Sel kumulus pada oosit kontrol dan oosit yang mengalami vitrifikasi dan *thawing* dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang dengan pipet pasteur. Oosit yang sudah dihilangkan sel kumulusnya difiksasi selama 30 menit dalam *drop* yang berisi larutan fiksatif pada cawan petri. Setelah itu, oosit dicuci tiga kali dalam *drop* berisi PBS masing-masing 5 menit. Selanjutnya oosit dimasukkan dalam *drop* hidrogen peroksida (H₂O₂) 1% selama 5 menit dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan PBS tiga kali masing-masing selama 5 menit. Oosit dimasukkan dalam 0,3% Triton X-100 dan 2% formaldehid dalam PBS selama 1 jam.

Selanjutnya oosit diletakkan dalam 10% FBS selama 10 menit pada suhu ruangan selanjutnya dimasukkan ke dalam *drop* antibodi primer (1:200) selama 8 jam (*overnight*). Setelah itu, dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit, kemudian dimasukkan antibodi sekunder (1:200) selama 30 menit. Selanjutnya oosit dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit dan dimasukkan ke dalam SA-HRP selama 20 menit. Oosit dicuci PBS 3 kali, masing-masing 5 menit, kemudian dimasukkan dalam *drop* DAB selama 5 menit. Langkah berikutnya oosit dicuci dengan aquades 2 kali masing-masing 5 menit dan dilanjutkan dengan *mounting* menggunakan entelan. Oosit diletakkan dalam *drop* entelan pada gelas obyek dan ditutup dengan *cover glass*. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap mikrotubulus

oosit dengan menggunakan mikroskop cahaya.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian dianalisis dengan uji deskriptif dengan membandingkan secara langsung kondisi mikrotubul pada perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan struktur sitoskeleton oosit menggunakan metode imunohistokimia. Analisis hasil pengamatan dilakukan dengan membandingkan struktur sitoskeleton berbasis mikrotubulus pada masing-masing perlakuan secara deskriptif.

Hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan struktur mikrotubul oosit kontrol dan oosit hasil vitrifikasi. Mikrotubul merupakan struktur sel penyusun spindle meiotik yang berperan penting dalam pembelahan sel. Pada oosit kontrol mikrotubul terlihat seperti benang-benang berwarna kecoklatan. Pada konsentrasi EG 10, 20, 40, dan 50% etilen glikol struktur mikrotubulus tidak tampak seperti pada kontrol, tetapi menunjukkan adanya depolimerisasi.

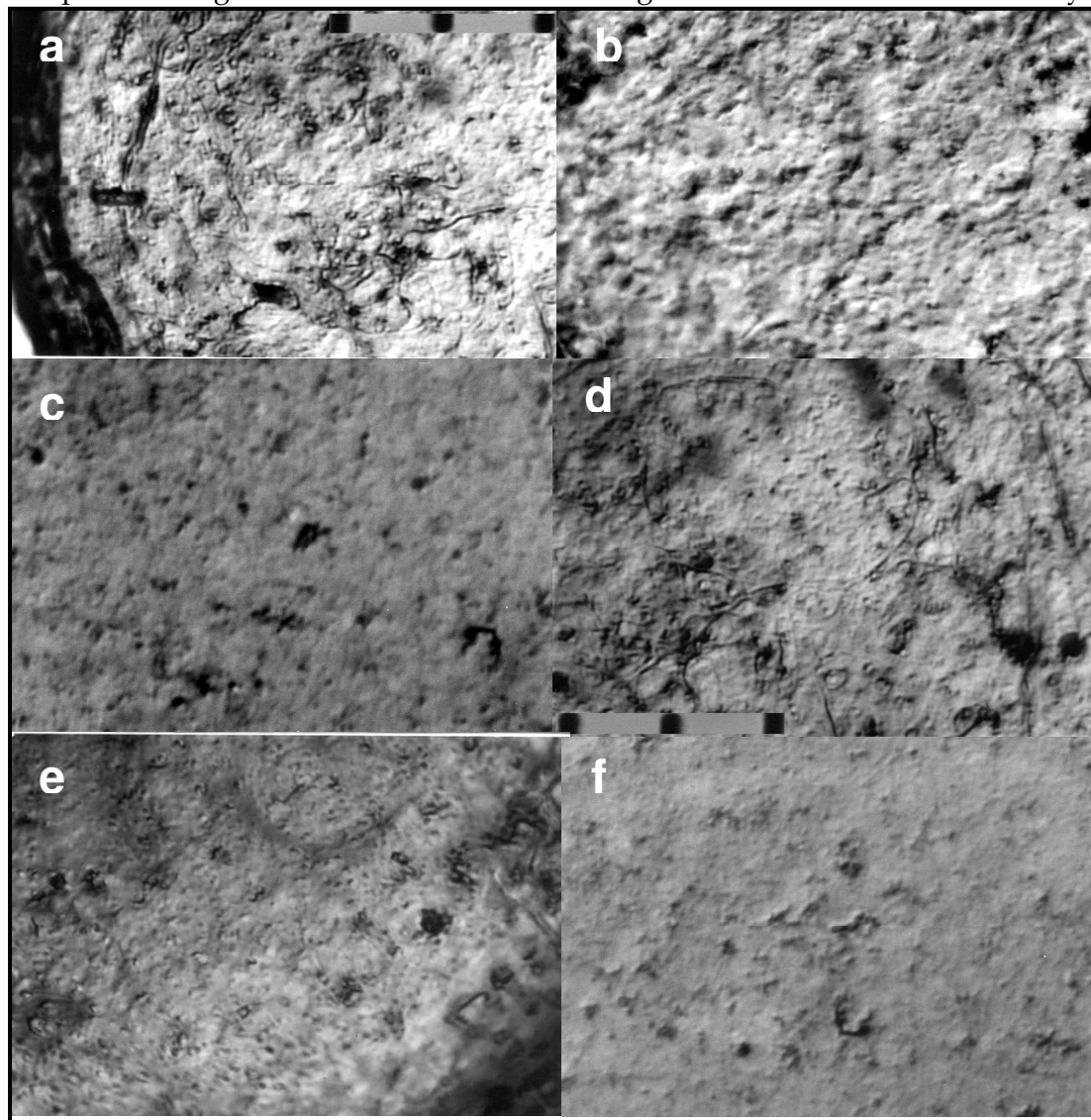
Untuk menjaga fungsi oosit, struktur sitoskeleton berbasis mikrotubulus harus dapat dipertahankan. Dalam hal ini EG 30% terbukti dapat mencegah ke-rusakan lebih lanjut dari sitoskeleton. Pada Gambar 1 terlihat bahwa oosit dengan perlakuan EG 30%, struktur sitoskeleton terlihat seperti benang yang berarti masih bisa mengalami *recovery*, sedangkan pada konsentrasi EG 10, 20, 40, dan 50%, sitoskeleton oosit tampak mengalami kerusakan.

Penelitian Shaw *et al.* (2000) menunjukkan bahwa proses pendinginan

merupakan masalah dalam kriopreservasi oosit mamalia. Semua oosit tahap M-II rentan terhadap kerusakan pendinginan karena spindle yang menarik kromosom pada bidang metafase dan mengalami depolimerisasi ketika suhu diturunkan. Lane *et al.* (1999) dan Picton *et al.* (2000) menyatakan bahwa mikrotubul yang menyusun spindle oosit sangat sensitif terhadap kerusakan akibat proses pendinginan. Aman dan Parks (1994) menyatakan bahwa pendinginan oosit sapi 4^o C atau 25^o C menyebabkan sebagian atau seluruh spindle mengalami kerusakan dan

beberapa kromosom menyebar atau terurai.

Mekanisme kerusakan mikrotubul oosit akibat proses vitrifikasi disebabkan oleh banyak faktor. Beberapa penelitian menyatakan bahwa kerusakan tersebut terjadi karena depolimerisasi tubulin yang menyusun mikrotubul. Menurut Karp (1984) mikrotubul dalam sel memiliki stabilitas yang berbeda meskipun secara morfologi kelihatan sama. Mikrotubul spindle meiotik dan sitoskeleton sangat labil sehingga sensitif terhadap kerusakan, sedangkan mikrotubul pada silia dan flagela relatif lebih stabil strukturnya. Sifat



Gambar 1. Struktur sitoskeleton oosit. a: Kontrol; b: EG 10%; c: EG 20%; d: EG 30%; e: EG 40%; dan f: EG 50%

labil mikrotubul spindel meiotik dan sitoskeleton menunjukkan bahwa mikrotubul merupakan suatu polimer yang terbentuk melalui ikatan non kovalen pada sub unit monomernya. Perlakuan yang menyebabkan hilangnya struktur tersebut biasanya disebabkan depolimerisasi mikrotubul. Hal ini dimungkinkan karena depolimerisasi dapat menyebabkan kondisi mikrotubul oosit yang mendapat perlakuan vitrifikasi terurai menjadi bentuk monomer.

Kerusakan mikrotubul oosit hasil vitrifikasi juga dapat disebabkan oleh paparan krioprotektan yang digunakan. Menurut Agca (2000) krioprotektan mempunyai efek merugikan pada organisasi sistem mikrotubul oosit tikus. Paparan oosit tikus menggunakan 1,5 M DMSO tanpa pendinginan menyebabkan terjadinya aneuploidi pada embrio. Lim *et al.* (1999) menyatakan bahwa oosit sapi yang telah mencapai tahap metafase II sangat sensitif terhadap krioprotektan dan didapatkan spindel metafase II abnormal setelah paparan krioprotektan selama satu menit. Saunders dan Parks (1999) berpendapat bahwa kombinasi paparan oosit sapi dengan krioprotektan EG yang disertai pendinginan dapat mengacaukan organisasi mikrotubul dibandingkan hanya melalui pendinginan. Selain itu EG dilaporkan dapat meningkatkan terbentuknya spindel yang abnormal dan merusak konfigurasi kromosom.

Faktor lain yang mempengaruhi terjadinya kerusakan mikrotubul adalah kemampuan memperbaiki kerusakan. Oosit sapi memiliki kemampuan rendah untuk memperbaiki kerusakan mikrotubul sehingga bila terjadi kerusakan pada mikrotubul biasanya bersifat permanen (Albert, 2001; Campbell *et al.*, 2001).

Penelitian ini menggunakan oosit yang telah mengalami maturasi yang sebagian besar pada tahap pembelahan metafase II. Pada tahap ini, oosit mengalami maturasi inti dan maturasi sitoplasmik, polar bodi keluar dan kromosom mengalami kondensasi serta tersusun pada spindel metafase. Mikrotubul spindel meiotik tidak terlindungi oleh membran inti seperti pada tahap GV sehingga lebih mudah mengalami kerusakan akibat proses pendinginan dan pemaparan larutan krioprotektan (Child, 1996; Desai dan Mitchison, 1997).

Menurut Arav *et al.* (1993) oosit sapi yang sudah mencapai tahap metafase II mempunyai struktur spesifik seperti spindel meiosis yang sangat sensitif terhadap paparan krioprotektan dan suhu yang sangat rendah. Kondisi ini mengakibatkan terjadinya depolimerisasi tubulin. Picton *et al.* (2000) menyatakan bahwa pendinginan oosit pada suhu 20^o C dapat menyebabkan kerusakan permanen pada spindel meiotik, sedangkan pada suhu di bawah 0^o C terjadi depolimerisasi spindel dengan cepat. Kerusakan yang terjadi akibat pendinginan oosit metafase meiosis II meliputi reduksi spindel, disorganisasi mikrotubul (Pickering *et al.*, 1990), hilangnya kromosom dari spindel meiotik (Wood *et al.*, 1997) dan hilangnya kestabilan ikatan kromosom (Fabbri *et al.*, 2001).

Kerusakan mikrotubul oosit pada perlakuan vitrifikasi dapat menyebabkan abnormalitas pada kromosom. Hal itu berhubungan dengan peranan mikrotubul dalam pembelahan sel. Organisasi mikrotubul sangat penting untuk penyatuan yang tepat dan pemisahan kromosom ketika pembentukan spindel kembali pada saat suhu kembali normal (Picton *et al.*, 2000). Selanjutnya Shaw *et al.* (2000)

menyatakan bahwa meskipun mikrotubul dapat mengalami perakitan kembali setelah suhu normal kembali, pendinginan dapat meningkatkan terjadinya aneuploidi karena kromosom tidak tersusun dengan benar pada spindle yang baru terbentuk.

KESIMPULAN

Konsentrasi etilen glikol pada proses vitrifikasi berpengaruh terhadap struktur sitoskeleton oosit berbasis mikrotubulus. Konsentrasi etilen glikol 10, 20, 40, dan 50% tidak dapat memperbaiki struktur sitoskeleton pasca vitrifikasi, namun oosit dengan perlakuan EG 30% dapat menghambat kerusakan sitoskeleton.

DAFTAR PUSTAKA

- Agca, Y. 2000. Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. <http://www4.nas.edu/cls/ijhome.nsf/OpenDocument>.
- Albert. 2001. Microtubule formation. [http://cellbio.utmb.edu/cellbio/microtubule structure.htm](http://cellbio.utmb.edu/cellbio/microtubule%20structure.htm).
- Aman, R.R. and J.E. Parks. 1994. Effect of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. <http://www.biolreprod.org/cgi/content/abstract>.
- Campbell, Reece, and Mitchell. 2001. Immunocytochemical analysis of the cytoskeleton of cultured cells. http://www.faculty.fortlewis.edu/beelman_e/bio113/immunocytochemical_lab.doc.
- Childs, G.V. 1996. Structure and function of microtubules. <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/microtub.htm>.
- Desai, A. and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. <http://www.annurev.org>.
- Fabbri, R., E. Porcu, T. Marsella, G. Rocchetta, S. Venturoli, and C. Flamigni. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. [http://www.3oup.co.uk/eshre/press-release/freepdf/16041 1 pdf](http://www.3oup.co.uk/eshre/press-release/freepdf/16041%201.pdf).
- Ito K., M. Masuda, K. Fujiwara, and H. Sato. 1994. Do astral microtubules play a role in metaphase chromosome positioning? *J. Biology Cellular*. 82:95-102.
- Karp, G. 1984. *Cell Biology*. 2nd ed. Mc Graw-Hill Book Company. New York.
- Lane, M.B., B.D. Bavister, E.A. Lyons, and K.T. Forest. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. <http://www.biotech.nature.com>.
- Lim, J.M., J.J. Ko, W.S. Hwang, H.M. Chung, and K. Nawa. 1999. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 51:1303-1310.
- Maciver, S.K. 2001. Cytoskeletal dynamics. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/CS2.pdf>.
- Madison, V. and T. Grave. 1992. Selection of immature oocytes for developmental potential in vitro. *J. Anim. Reprod. Sci.* 27:1-9
- Mc Ginnis, L.K., S.C. Duplantis, and C.R. Youngs. 1993. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *J. Anim. Reprod.* 30:273-280.
- Pickering, S.J., P.R. Braude, M.H. Johnson, A. Cant, and J. Currie. 1990.

- Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&listuid=2358076&dopt=abstract>.
- Picton, H.M., R.G. Gosden, and S.P. Leibo. 2000. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. <http://www.who.int/eproductivehealth/infertility/17.pdf>.
- Salehnia, M., R.M. Valojerdi, and T. Itarihi. 2000. The vitrification of metaphase ii mouse oocyte using ethylene glycol as cryoprotectant. http://www.roya_institute_org-yakhteh-y3-5.htm.
- Shaw, J.M., A. Oranratnachai, and A.O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. [http:// 147.46.94.112/e_journals/pdf_full/journal_t/2000/t04_199953107.pdf](http://147.46.94.112/e_journals/pdf_full/journal_t/2000/t04_199953107.pdf)
- Triwulaningsih, E. 1997. Pembekuan embrio dengan berbagai krioprotektan dan metode pembekuan. **Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner**. Balai Penelitian Ternak. Bogor
- Wood, C.E., J.M. Shaw, and A.O. Trounson. 1997. Potential reproductive insurance for women at risk of early ovarian failure. Medical Journal of Australia. <http://www.mja.com.au/>.