

## Karakteristik Histologi Perkembangan Folikel Ovarium Fase Luteal pada Kancil (*Tragulus javanicus*)

*Histology Characteristic of Ovarian Follicular Development during Luteal Phase in Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*)*

Hamny\*<sup>1)</sup>, S. Agungpriyono<sup>2)</sup>, I. Djuwita<sup>2)</sup>, W.E.Prasetyaningtyas<sup>2)</sup> dan I. Nasution<sup>1)</sup>

Laboratorium Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia<sup>1)</sup>; Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680, Indonesia<sup>2)</sup>

\*Korespondensi: hamnys@yahoo.com

### Abstract

*The lesser mouse-deer (*Tragulus javanicus*) is one of the Indonesia biodiversity. This animal distributes only in South-East Asia and Hindia. The lesser mouse-deer is the smallest ungulate in the world and regarded as an ideal model to biomedic and ruminant research. As their population becoming extincted, conservation effort is very important. One of the efforts in supporting the lesser mouse-deer conservation is by improving our knowledge reproductive physiology of the female lesser mouse-deer. The aim of this study was to investigate the histological characteristic of ovarian follicles development of the female lesser mouse-deer. Experiment was done on the ovary (n=4). The ovary was fixed in Bouin solution and processed according to standard of histology. The slides were stained in HE. At luteal phase, the developing follicles can be classified into 10 stages. The number of developing follicles in the left ovary were higher then in the right.*

*Keywords: lesser mouse-deer, ovary, follicular development*

### **Pendahuluan**

Perkembangan folikel ovarium pada suatu spesies hewan sangat mempengaruhi perkembangan oosit (sel telur). Dan perkembangan berbagai tahapan folikel-folikel tersebut juga sangat dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya interaksi antara hormon steroid intrafolikel dengan faktor-faktor pertumbuhan, faktor diluar ovarium, dan sistem hipotalamus dengan hipofisa (Reyes *et al.* 2006).

Proses pematangan oosit sangat dipengaruhi oleh perkembangan folikel di dalam ovarium dari hewan mulai dari folikel primordial sampai menjadi folikel de Graaf yang siap menghasilkan oosit yang matang dan siap untuk dibuahi oleh spermatozoa. Melalui proses ovulasi, oosit yang matang masuk ke dalam saluran reproduksi hewan betina (oviduct) untuk selanjutnya melakukan proses fertilisasi. Pada

proses perkembangan folikel tersebut juga sangat ditentukan oleh beberapa mekanisme hormonal yang berkaitan dengan reproduksi khususnya hormon FSH (*follicle stimulating hormone*). Hormon ini dihasilkan oleh kelenjar hipofisa atas pengaruh hormon yang dihasilkan oleh hipotalamus yaitu GnRH (*gonadotropin releasing hormone*). Saat ini, proses perkembangan folikel ovarium pada hewan-hewan ruminansia seperti pada sapi, domba, dan kambing telah banyak diketahui. Namun proses perkembangan folikel pada ovarium kancil belum ada yang melaporkan.

Kancil (*Tragulus javanicus*) merupakan salah satu ruminansia terkecil yang dapat ditemukan di Indonesia. Ruminansia ini memiliki populasi yang semakin lama semakin menurun sehingga diperlukan suatu upaya untuk tetap mempertahankan keberlangsungan hidup dari populasi hewan ini. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik histologi perkembangan folikel ovarium kancil.



Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan kebijakan bagi upaya peningkatan populasi kancil khususnya di Indonesia.

## Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi Bagian Anatomi, Histologi, dan Embriologi Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Pada penelitian ini digunakan 4 ovarium (2 pasang) fase luteal dengan memanfaatkan sampel organ yang diperoleh dari kancil yang mati hasil tangkapan masyarakat. Penggunaan sampel sebagai bahan penelitian telah dilaporkan kepada pihak Direktorat Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam, Departemen Kehutanan Indonesia.

### *Pembuatan Preparat Histologi*

Ovarium difiksasi dengan larutan *Bouin* (campuran asam pikrat : formalin : asam asetat glasial = 15 : 5 : 1) dan diproses menurut standar histologi sampai menjadi blok parafin (Histoplast, Thermo Shandon, Pittsburgh, USA). Blok parafin dipotong dengan ketebalan 5  $\mu$ m menggunakan mikrotom, dilekatkan pada gelas objek dan diinkubasi semalam dalam inkubator 37<sup>0</sup>C (Kiernan, 1990).

### *Karakteristik Histologi Perkembangan Folikel*

Pewarnaan HE dilakukan untuk pengamatan karakteristik histologi ovarium dan perkembangan folikel, serta perhitungan jumlah folikel. Karakteristik tahapan perkembangan folikel berdasarkan bentuk dan jumlah lapisan sel granulosa, zona pelusida dan ada tidaknya rongga (antrum) folikuli. Perhitungan jumlah folikel menggunakan metode estimasi (Candy *et al.* 1997, Muammar *et al.* 2004) yaitu dengan mencari terlebih dahulu faktor pengali untuk masing-masing tipe folikel. Jumlah setiap tipe folikel pada 25 sayatan serial pertama dijumlahkan kemudian dibandingkan dengan jumlah folikel pada setiap kelipatan lima. Folikel yang dihitung hanya folikel yang memiliki nukleolus dengan struktur yang jelas untuk menghindari perhitungan ganda.

1.

Faktor pengali =

$\frac{\text{Jumlah folikel pada 25 sayatan pertama}}{\text{Jumlah folikel pada sayatan ke-1, 5, 10, 15, 20, dan 25}}$

Folikel yang dihitung hanya folikel yang memiliki nukleolus dan struktur yang jelas untuk menghindari perhitungan ganda. Hasil pengamatan karakteristik histologi dan perkembangan folikel dideskripsikan secara deskriptif. Hasil perhitungan jumlah folikel diolah dengan menggunakan statistik sederhana dengan *mirosoft excel*.

### *Analisa Data*

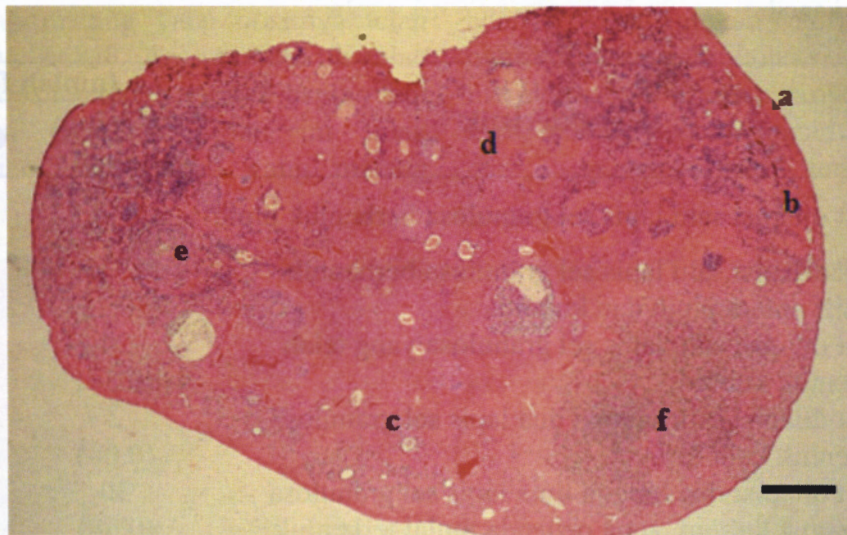
Hasil pengamatan karakteristik histologi perkembangan folikel dideskripsikan secara deskriptif.

## Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa struktur histologi ovarium kancil relatif sama dengan hewan ruminansia seperti domba dan sapi. Ovarium dilapisi oleh satu lapisan epitel yang disebut epitel germinativum yang berbentuk pipih hingga kuboid. Di bagian profundal lapisan epitel terdapat jaringan ikat yang disebut tunika albuginea. Selanjutnya, ovarium kancil terbagi atas dua bagian yaitu korteks yang berada di lateral dan bagian medula yang berada di bagian medial. Pada bagian korteks banyak ditemukan berbagai tahap perkembangan folikel. Pada bagian medula terdiri dari jaringan ikat longgar dan banyak ditemukan pembuluh darah dan saraf. Hal yang sama juga dilaporkan Kimura *et al.* (2004).

Karakteristik ovarium kancil secara mikroskopis memperlihatkan adanya suatu proses perkembangan folikel yang sangat dinamis. Ovarium yang dikoleksi berada pada fase luteal sehingga tidak ditemukan perkembangan folikel yang mencapai folikel yang telah matang secara sempurna (folikel de Graaf). Gambaran histologi dari ovarium kancil dapat dilihat pada Gambar





**Gambar 1.** Gambaran histologi ovarium kancil (sayatan transversal). (a) Epitel germinativum, (b) Tunika albuginea, (c) Korteks ovarium, (d) Medula ovarium, (e) Salah satu tipe folikel yang berkembang, (f) Korpus luteum. Pewarnaan HE. Bar : 300  $\mu$ m.

Dari hasil penelitian terdapat 10 tahapan perkembangan folikel ovarium kancil pada fase luteal yang diwakili oleh 10 tipe folikel (Tabel 1). Pengelompokan tipe folikel ini didasarkan pada bentuk dan lapisan sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit, tebal tipisnya zona pelusida yang terbentuk, dan ada tidaknya serta besar kecilnya antrum folikuli yang terbentuk. Namun tahapan ini masih terus berkembang pada

Tabel 1 memperlihatkan karakteristik berbagai tahapan perkembangan folikel, jumlah folikel serta diameter folikel dan oosit. **Folikel tipe 1** merupakan folikel awal yang banyak ditemukan pada bagian korteks ovarium kemudian folikel ini berkembang lebih lanjut menjadi folikel tipe 2, 3 hingga tipe 10. Folikel tipe 1 memiliki ciri oosit (disebut oosit primer) yang dikelilingi oleh satu lapis sel pregranulosa yang berbentuk pipih. Folikel ini berkembang dari oogonia yang berproliferasi secara mitosis pada periode fetus (Senger, 1999). Kemudian perkembangan folikel tipe 1 ini berhenti pada tahap diplotene (meiosis I) yang dapat ditemukan pada periode postnatal. Pada saat hewan mencapai pubertas, folikel tipe 1 mulai berkembang menjadi folikel tipe 2. Perkembangan folikel tipe 1 menjadi tipe 2 diperlihatkan dengan adanya perubahan bentuk sel pregranulosa dari bentuk pipih menjadi bentuk transisi antara pipih dan kuboid.

ovarium yang berada pada fase folikular hingga oosit dapat mencapai pertumbuhan yang optimal (diameter oosit mencapai sekitar 100  $\mu$ m) dan akhirnya terjadi ovulasi dan membentuk korpus luteum. Struktur histologi folikel pada berbagai tahapan perkembangan folikel yang dapat diamati pada ovarium kancil fase luteal disajikan pada Gambar 2 dan 3.

Selain itu folikel semakin membesar. Hal ini dapat dilihat dengan peningkatan diameter folikel yang diikuti oleh peningkatan diameter oosit.

**Folikel tipe 2** merupakan folikel dengan ciri oosit dikelilingi oleh satu lapis sel pregranulosa yang memiliki bentuk transisi antara pipih dan kuboid. Folikel ini juga banyak ditemukan pada bagian korteks ovarium. **Folikel tipe 3** merupakan folikel dengan ciri oosit telah dikelilingi oleh satu lapis sel granulosa yang seluruhnya telah berbentuk kuboid. **Folikel tipe 4** merupakan folikel dengan ciri oosit dikelilingi oleh 1-2 lapis sel granulosa yang berbentuk kuboid. Peningkatan diameter folikel disebabkan oleh semakin meningkatnya jumlah sel-sel granulosa melalui proses proliferasi dan diferensiasi yang mengelilingi oosit sehingga membran basal semakin terdesak untuk meluas.



**Tabel 1.** Karakteristik histologi dan jumlah folikel dari berbagai tahapan perkembangan folikel ovarium fase luteal pada kancil

Tahapan folikel	Karakteristik	Jumlah folikel (%)	
		Ovarium kanan	Ovarium kiri
1	Oosit dilapisi satu lapis sel granulosa berbentuk pipih	3020 (68.38)	5440 (57.34)
2	Oosit dilapisi satu lapis sel granulosa berbentuk transisi antara pipih dan kuboid	1335 (30.23)	3805 (40.11)
3	Oosit dilapisi satu lapis sel granulosa yang telah berbentuk kuboid	24 (0.54)	116 (0.25)
4	Oosit dilapisi satu sampai dua lapis sel granulosa berbentuk kuboid	2 (0.04)	6 (0.06)
5	Oosit dilapisi dua hingga lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida mulai terbentuk	30 (0.68)	105 (1.11)
6	Oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida tipis	1 (0.02)	1 (0.01)
7	Oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida sudah menebal	1 (0.02)	4 (0.04)
8	Oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida tebal dan mulai terbentuk antrum folikuli	2 (0.04)	1 (0.01)
9	Oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida tebal dan antrum folikuli sudah mulai membesar	1 (0.02)	3 (0.03)
10	Oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid, zona pelusida tebal antrum folikuli sudah sangat besar dan oosit terdesak ke arah tepi folikel	-	6 (0.06)
Total		4416	9487
Korpus luteum	Sel-sel granulosa mengalami pembesaran dengan bentuk yang tidak beraturan.	2	2

**Folikel tipe 5** merupakan folikel yang terdiri dari 2-5 lapis sel granulosa. Pada folikel tipe 5 terlihat bahwa perkembangan folikel melalui proliferasi sel granulosa lebih cepat terjadi dibandingkan dengan perkembangan oosit. Jumlah sel granulosa yang semakin meningkat mengakibatkan diameter folikel semakin membesar akibat desakan sel-sel tersebut. Pada tahap ini, oosit telah dikelilingi oleh suatu lapisan yang disebut zona pelusida namun masih sangat tipis. Zona pelusida merupakan suatu glikoprotein yang disekresikan oleh oosit dan sel granulosa (Wu *et al.* 2004). Zona pelusida sangat berperan penting dalam proses fertilisasi terutama pada proses *binding* spermatozoa pada oosit.

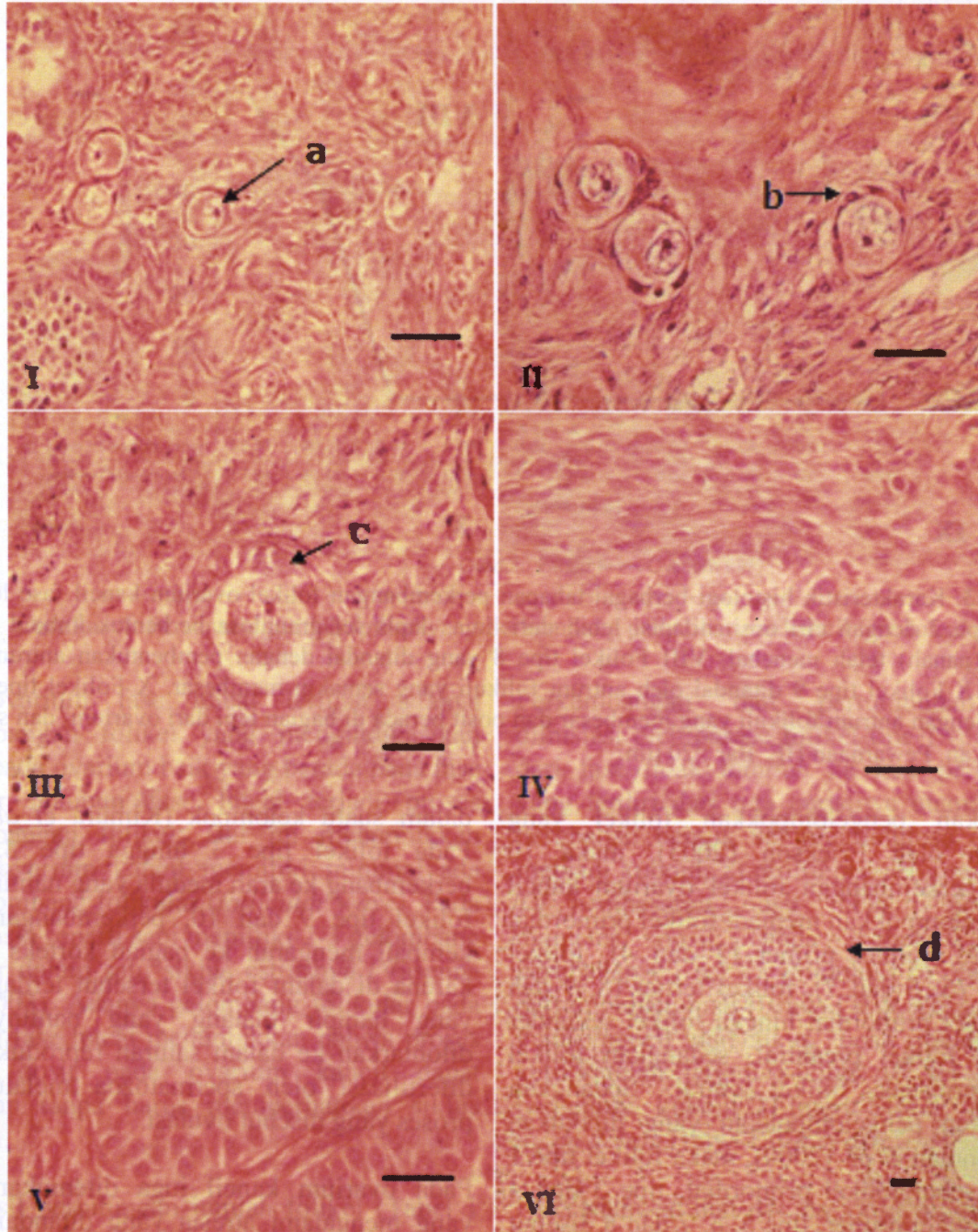
**Folikel tipe 6** merupakan folikel yang memiliki ciri seperti folikel tipe 5. Namun pada folikel tipe 6, jumlah lapisan sel granulosa yang mengelilingi oosit semakin meningkat yaitu sekitar 8-12 lapis. Pada folikel tipe 6, lapisan sel-sel teka yang mengelilingi folikel telah terlihat dengan jelas. **Folikel tipe 7** merupakan folikel yang relatif sama dengan folikel tipe 6 namun zona pelusida telah menebal. **Folikel tipe 8** merupakan folikel yang mulai terbentuk antrum folikuli. Antrum ini berisi cairan yang mengandung hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa.

**Folikel tipe 9** merupakan folikel dengan ciri antrum yang semakin membesar, oosit sudah mulai bergerak di bagian tepi folikel. Diameter folikel semakin membesar akibat pembentukan antrum yang semakin membesar pula. **Folikel**



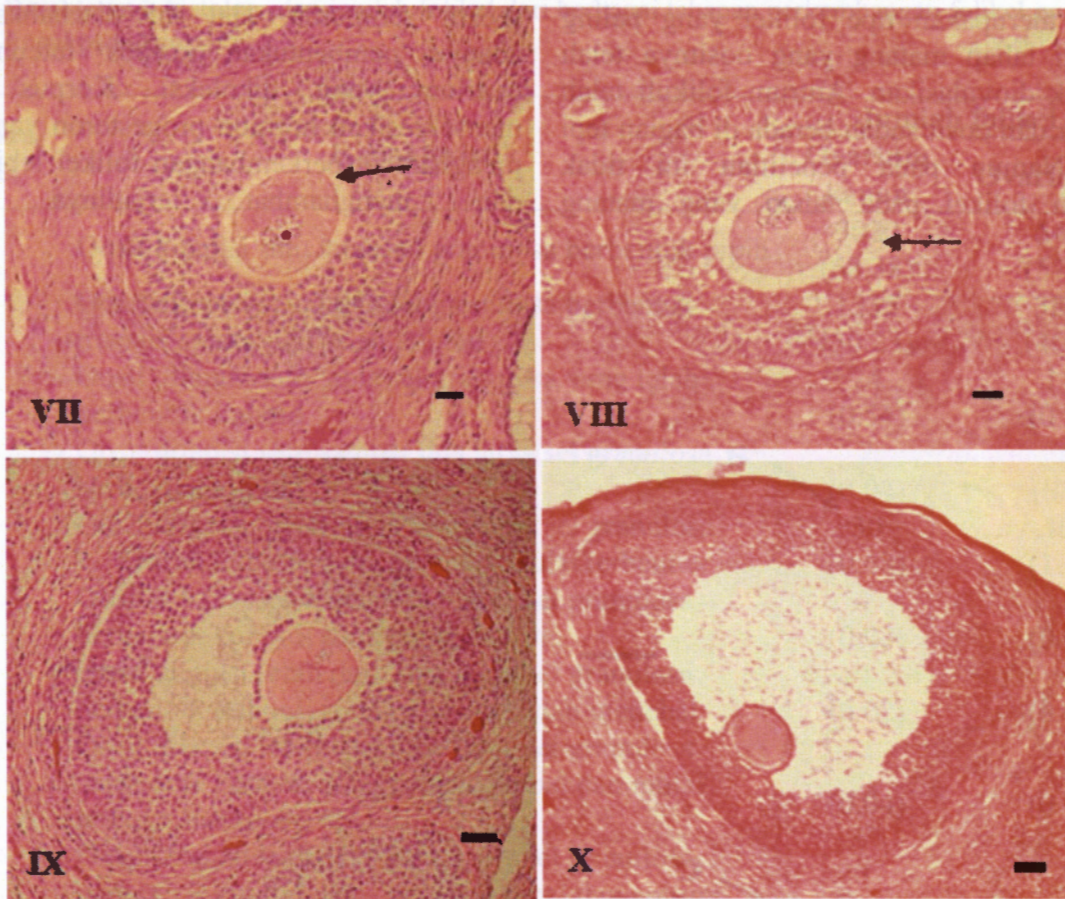
**tipe 10** merupakan tipe folikel yang paling mendekati tahap matang yang oositnya telah siap untuk diovulasikan. Antrum folikuli telah membesar dan oosit sudah berada di bagian tepi folikel. Namun pada penelitian ini tidak ditemukan folikel pada tahap yang matang

secara sempurna. Hal ini disebabkan oleh adanya pembentukan korpus luteum pada ovarium yang dikoleksi. Korpus luteum mensekresikan hormon progesteron yang dapat menghambat perkembangan folikel lebih lanjut dan menghambat terjadinya ovulasi



**Gambar 2.** Karakteristik histologi berbagai tahapan perkembangan folikel ovarium kancil fase luteal. I. Folikel tipe 1 merupakan folikel awal yang banyak ditemukan pada bagian korteks ovarium yang kemudian berkembang lebih lanjut menjadi folikel tipe 2 (II), tipe 3 (III), tipe 4 (IV), tipe 5 (V), tipe 6 (VI). (a) Oosit, (b) sel pregranulosa, (c) sel granulosa, (d) sel teka. Pewarnaan HE. Bar : 20  $\mu$ m.





**Gambar 3.** Karakteristik histologi berbagai tahapan perkembangan folikel ovarium kancil fase luteal. VII Folikel tipe 7 dengan ciri oosit dilapisi lebih dari lima lapis sel granulosa berbentuk kuboid dan zona pelusida (panah) telah menebal. VIII Folikel tipe 8 yang ditandai dengan pembentukan antrum folikuli (panah). IX Folikel tipe 9 ditandai oleh antrum folikuli yang semakin membesar. X Folikel tipe 10 yang ditandai dengan antrum folikuli yang membesar dan oosit berada di bagian tepi dari ovarium dan siap untuk diovasikan. Pewarnaan HE. Bar : 20  $\mu$ m.

Berdasarkan pengelompokan folikel yang dilakukan oleh Erickson (2003), maka 10 tahapan perkembangan folikel ovarium kancil dapat dikelompokkan menjadi folikel primordial (1 dan 2), folikel primer (3 dan 4), folikel sekunder (5, 6 dan 7), folikel tertier (8, 9 dan 10). Folikel primordial hingga folikel sekunder termasuk folikel preantral, sedangkan folikel tertier termasuk folikel antral. Sedangkan berdasarkan pengelompokan yang dilakukan oleh Cushman *et al.* (2000), maka folikel tipe 1 dan 2 disebut folikel primordial, tipe 3 dan 4 disebut folikel primer, tipe 5, 6, 7 dan 8 disebut folikel sekunder sedangkan tipe 9 dan 10 disebut folikel tertier.

Distribusi setiap tipe folikel tidaklah sama. Folikel tipe 1 dan tipe 2 banyak ditemukan pada bagian korteks ovarium dan tidak mengelompok. Pada hewan multipara seperti anjing, perkembangan folikel tipe 1 terdapat

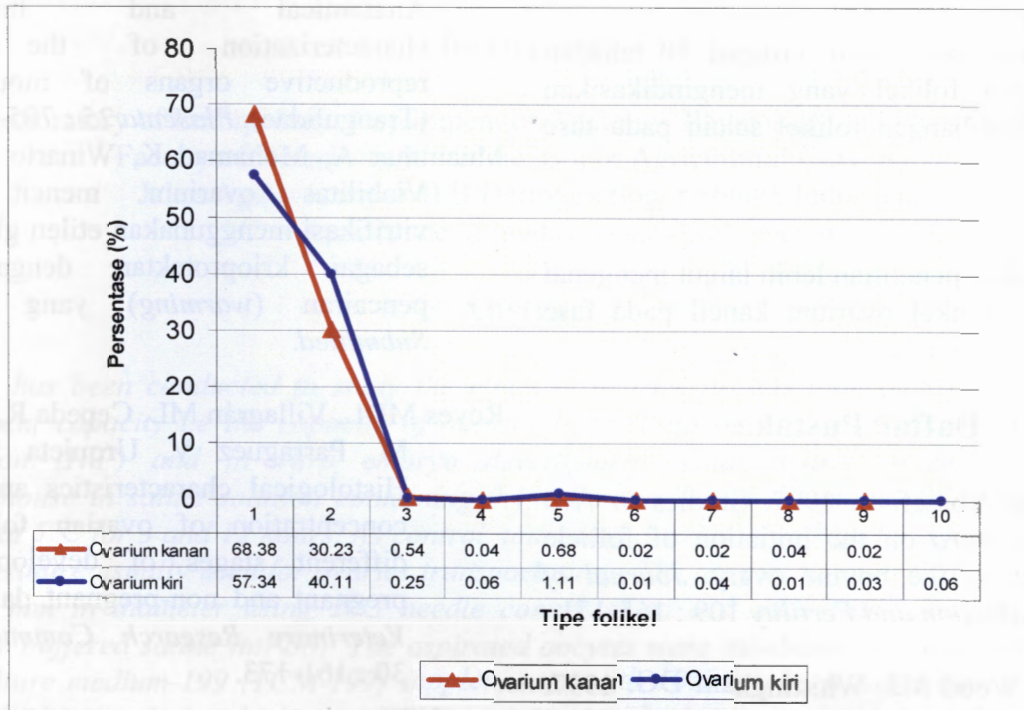
dalam suatu kelompok (Kimura *et al.* 2004). Pada folikel tipe 3 hingga tipe 8, folikel berkembang ke arah medula yang nantinya pada folikel tipe 9 dan 10, perkembangan folikel kembali mengarah ke bagian korteks ovarium karena di dalam folikel tersebut terdapat oosit yang hampir matang yang nantinya akan dilontarkan ke dalam saluran reproduksi untuk difertilisasi oleh spermatozoa melalui suatu proses yang disebut ovulasi.

Pada ovarium kancil juga ditemukan folikel yang mengalami atresia yang ditandai dengan sel-sel granulosa yang mengalami piknotis dan luruhnya sel-sel granulosa ke bagian antrum. Di duga, folikel-folikel tersebut mengalami atresia ketika mencapai ukuran tertentu tergantung pada spesies (*species-specific size*). Beberapa peneliti menduga salah satu faktor yang menyebabkan folikel mengalami atresia adalah adanya kelebihan proses metabolik pada folikel



tersebut (Fortune, 1994). Hasil metabolisme (metabolit) yang berlebihan akibat proses metabolik yang tinggi akan bersifat racun bagi sel-sel pada folikel tersebut sehingga terjadilah kematian sel-sel yang menyebabkan folikel

atresia dan folikel tidak dapat berkembang menjadi tahap selanjutnya. Folikel-folikel yang tidak mengalami atresia akan terus berkembang menjadi folikel matang dan siap untuk melakukan ovulasi.



Gambar 4. Persentase jumlah folikel yang berkembang pada ovarium kancil fase luteal

Pada ovarium fase luteal terlihat adanya perkembangan folikel yang mengindikasikan bahwa pada ovarium baik yang berada pada fase folikular maupun fase luteal terjadi proses perkembangan folikel. Hal ini menunjukkan bahwa ovarium kancil memiliki minimal ada dua gelombang folikular (*follicular wave*). Pada ruminansia seperti sapi memiliki 2-3 gelombang folikular dalam satu siklus estrusnya (Vasenna *et al.* 2003). Adanya gelombang folikular pada ovarium fase luteal menunjukkan bahwa proses koleksi oosit pada ovarium kancil dapat dilakukan tanpa harus memperhatikan siklus ovarium.

Dari hasil perhitungan jumlah folikel (Tabel 1 dan Gambar 2 & 3), diketahui bahwa persentase folikel yang berkembang pada ovarium kiri lebih banyak dibandingkan ovarium kanan. Namun demikian, kedua ovarium memiliki keaktifan yang sama. Hal ini didasarkan pada jumlah korpus luteum yang terbentuk pada kedua ovarium adalah sama.

Perkembangan dan pertumbuhan folikel diinisiasi oleh pasase folikel tipe 1 (primordial) dari fase tidak tumbuh ke fase pertumbuhan yang terdiri dari tiga peristiwa utama yaitu 1) perubahan bentuk sel pregranulosa dari pipih menjadi kuboid, 2) proliferasi sel granulosa dan 3) pembesaran oosit melalui peningkatan diameter oosit. Pada beberapa spesies, perubahan sel granulosa mendahului pertumbuhan oosit (Braw-Tal & Yossefi, 1997). Pada mencit dan tikus, oosit mulai tumbuh ketika telah terjadi sekitar 10 sel granulosa berbentuk kuboid (Lintern-Moore & Moore *diacu dalam* Braw-Tal & Yossefi, 1997).

Pada manusia dan domba, oosit masuk ke fase pertumbuhan ketika oosit dikelilingi oleh 15 sel granulosa berbentuk kuboid (Gougeon & Chainy *diacu dalam* Braw-Tal & Yossefi, 1997). Mhawi *et al.* (1991) *diacu dalam* Braw-Tal & Yossefi (1997) melaporkan bahwa pada sapi yang baru lahir, bentuk transisi sel granulosa dari pipih menjadi kuboid diikuti oleh perubahan ultrastruktur pada oosit dan oosit

masuk ke tahap pertumbuhan ketika telah terbentuk 40 sel granulosa. Pada kancil hal ini belum dapat dijelaskan.

## Kesimpulan dan Saran

### Kesimpulan

Pada ovarium fase luteal terdapat 10 tahapan perkembangan folikel yang mengindikasikan adanya perkembangan folikel selain pada fase folikular.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik folikel ovarium kancil pada fase folikular.

## Daftar Pustaka

- Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 109 : 165-171.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility* 110 : 11-19.
- Cushman RA, Hedgpeth VS, Echterkamp SE, Britt JH. 2000. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. *Journal of Animal Science* 78 (6) : 1564-1567.
- Erickson GF. 2003. Morphology and physiology of the ovary. <http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>. [23 Maret 2006]
- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50 (2) : 225-232.
- Kiernan JA. 1990. *Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice*. Ed-2. England : Pergamon Press.
- Kimura J, Sasaki M, Endo E, Fukuta K. 2004. Anatomical and histological characterization of the female reproductive organs of mouse deer (Tragulidae). *Plasenta* 25 : 705-711.
- Muammar A, Mohamad K, Winarto A. 2004. Viabilitas ovarium mencit setelah vitrifikasi menggunakan etilen glikol 40% sebagai krioprotektan dengan suhu pencairan (*warming*) yang berbeda. *Submitted*.
- Reyes MDL, Villagrán ML, Cepeda R, Duchens M, Parraguez V, Urquieta B. 2006. Histological characteristics and steroid concentration of ovarian follicles at different stages of development in pregnant and non-pregnant dairy cows. *Veterinary Research Communications* 30 : 161-173.
- Senger PL. 1999. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. USA : Current Conceptions, Inc, Washington.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60 : 923-932.
- Wu GM, Lai L, Mao J, McCauley TC, Caamano JN, Cantley T, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Didion BA, Day BN. 2004. Birth of piglets by *in vitro* fertilization of zona-free porcine oocytes. *Theriogenology* 62 : 1544-1556