

Status Meiotik Oosit Kucing Setelah Maturasi In Vitro Pada Waktu Yang Berbeda

Meiotic Status Of Cat Oocytes Matured In Vitro At Various Duration Times

S. Gustari^{1*}; S. Budhi²; F. Indrafuri¹ N. W. K. Karja^{1,#}

¹Bagian Reproduksi & Kebidanan; ²Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,

Abstract

The purpose of the research was to determine meiotic status of cat oocytes matured in vitro at various duration times. Cat ovaries were collected from sexually mature queens after routine ovariohysterectomy. Oocytes were collected from those ovaries by slicing method and only good oocytes were matured in maturation medium and incubated at 38,5 °C in 5% CO₂ humidified incubator in various duration. The durations were at 18-20 hours, 22-24 hours and 28-30 hours. At the end of maturation, the oocytes were fixed and stained with acetic orcein. The percentage of oocytes that reached metaphase II for 18-20 hours, 22-24 hours and 28-30 hours maturation were 60% ± 0.04 ; 68% ± 0.31 and 77% ± 0.2, respectively. There were no significant differences (P>0.05) on the percentage of oocytes in reaching the stage of germinal vesicle, anaphase-telophase and methapase II.

Keywords : in vitro maturation, cat oocytes and meiotic status of the oocytes.

Pendahuluan

Perkembangan teknologi Reproduksi bantuan termasuk IVF dan produksi embrio penting ditingkatkan sebagai upaya menyelamatkan hewan khususnya spesies yang hampir punah. Pengembangan metode teknologi Reproduksi bantuan pada kucing menjadi penting dan menarik karena berdasarkan *Convention on International Trade in Endangered Species (CITES)* (1984) yang disitasi Johnston *et al.* (1991) melaporkan bahwa dari 37 spesies felidae hanya kucing domestik (*Felis catus*) saja yang tidak termasuk spesies langka.

Penelitian dalam pengembangan teknologi reproduksi pada kucing domestik diharapkan mampu memberikan keuntungan sebagai penelitian komparatif untuk menyelamatkan hewan langka khususnya spesies felidae. Spesies felidae yang hampir punah memiliki hubungan yang cukup dekat dengan kucing domestik karena masih dalam satu famili felidae. Dimungkinkan

bahwa karakteristik reproduksi dan pertumbuhan hampir sama.

Salah satu teknik yang digunakan dalam IVF dan produksi embrio adalah *in vitro maturation (IVM)*. Lamanya waktu IVM mempengaruhi status meiotik dan kualitas oosit yang dihasilkan melalui IVM. Riset mengenai waktu yang dibutuhkan oleh oosit untuk mencapai maturasi nukleus telah banyak dilakukan pada berbagai spesies hewan. Waktu optimal untuk maturasi oosit berbeda pada berbagai spesies. Waktu yang diperlukan oosit untuk mencapai maturasi pada kelinci 6-10 jam (Chang, 1955), tikus 11-17 jam, sapi 18-48 jam, babi 42-55 jam, dan manusia 43-47 jam (Edwards *et al.*, 1965), 24 jam pada domba (Moor and Trounson, 1977), 25-35 jam pada kambing (Song and Iritani, 1987) dan 48-72 jam pada anjing (Mahi and Yanagimachi, 1976).

Menurut Johnston *et al.* (1989) dan Karja *et al.* (2002) oosit kucing terfertilisasi secara *in vitro* 26-54 jam setelah maturasi tercapai, namun belum ada penelitian yang menentukan waktu optimal

*) Alamat untuk korespondensi : Phone/Fax: 0274-560863; Email: gustari_vet@yahoo.com

#) Alamat sekarang : Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi & Patologi (KRP), Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

yang dibutuhkan untuk mencapai maturasi nukleus yaitu stadium metaphase II yang diikuti dengan perkembangan normal pasca fertilisasi. Stadium metaphase II adalah stadium ketika oosit mencapai maturasi dan siap difertilisasi oleh spermatozoa. *In Vitro Maturation* akan lebih efektif dan efisien jika diketahui waktu optimal yang diperlukan oleh oosit untuk mencapai maturasi, sehingga proses selanjutnya, seperti IVF dan produksi embrio, akan lebih berhasil. Pada penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui waktu IVM optimal yang diperlukan oleh oosit kucing untuk mencapai stadium metaphase II.

Materi Dan Metode

Koleksi dan maturasi oosit dilakukan merupakan modifikasi dari metode Karja *et al.* (2002). Ovarium dikoleksi dari kucing betina dewasa pada berbagai stadium siklus reproduksi. Ovarium ditempatkan dalam *modified phosphate buffer saline* (m-PBS), selanjutnya dicacah untuk mengeluarkan *cumulus-oocyte complexes* (COCs). Hanya COCs yang memiliki ooplasma gelap, rata, dan lapisan kumulus utuh yang digunakan dalam penelitian ini. *Cumulus-oocyte complexes* dikultur dalam media maturasi kemudian diinkubasikan pada suhu 39°C dalam 5% CO₂ inkubator selama 18-20 jam; 22-24 jam; dan 28-30 jam. Medium maturasi terdiri dari *tissue culture medium* (TCM) 199 with Earle's salts, diperkaya dengan 0,4% *bovine serum albumin* (BSA), 1µg/ml 17β-estradiol, 100µg penicillin-streptomycin, *Luteinizing Hormone* (10 IU/ml), dan *Follicle Stimulating Hormone* (0,1 IU/ml).

Selanjutnya oosit diperiksa dengan mikroskop inverted untuk *extrusion*/munculnya polar bodi pertama. Disamping itu juga dilakukan pengecatan oosit untuk menentukan tingkat maturasi nukleus, dimana oosit difiksasi dalam larutan asam asetat - ethanol (1:3) selama 2-7 hari. Pengecatan dilakukan dengan jalan meneteskan *staining media* (orcein 1%) hingga mengenai oosit, dan dibiarkan selama kurang lebih 1 menit, kemudian *staining media* diganti dengan *restaining media* sehingga

berwarna terang. Selanjutnya oosit diamati tingkat maturasinya dibawah mikroskop *phasecontrast*. Tingkatan maturasi nukleus adalah vesikula germinalis (GV), *germinal vesicle break down* (GVBD), metaphase I, anaphase I, telophase I dan metaphase II. Oosit yang mengalami fragmentasi dan terlihat tidak rata diklasifikasikan sebagai degenerasi.

Hasil Dan Pembahasan

Status meiotik oosit kucing hasil maturasi in vitro pada penelitian ini secara rinci disajikan dalam Tabel 1. Pada stadium GV dan A/T juga tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hasil yang berbeda terlihat pada stadium MI, yang terdapat perbedaan signifikan antara perlakuan 18-20 dengan 22-24 dan 28-30 jam (20% vs 4% dan 5%). Persentase oosit yang mencapai stadium metaphase II (MII) tertinggi pada perlakuan lama inkubasi 28-30 jam (77%), namun demikian tidak ada perbedaan yang nyata antara ketiga perlakuan.

Stadium MII merupakan stadium oosit matur ditandai dengan terbentuknya dua kelompok kromosom (Gambar 1.) Oosit yang berada pada stadium GV menunjukkan bahwa oosit gagal berkembang, tidak mengalami maturasi.

Periode maturasi mempengaruhi status meiotik atau maturasi nukleus oosit. Berdasarkan hasil penelitian ini terdapat kecenderungan penurunan persentase oosit stadium MI seiring dengan bertambahnya waktu maturasi. Oosit yang mencapai stadium MI menunjukkan bahwa oosit mampu berkembang. Penurunan yang signifikan (P<0,05) pada oosit yang terhenti perkembangannya pada stadium MI seiring dengan bertambah lamanya waktu maturasi, sebagai kelanjutannya terlihat bahwa jumlah oosit yang mampu mencapai maturasi meningkat. Hal tersebut dapat diartikan bahwa jika periode maturasi lebih dari 22 jam akan memberikan kesempatan oosit mencapai maturasi yaitu stadium MII, meskipun keberhasilan tingkat maturasi pada IVM juga dipengaruhi oleh banyak faktor lain.

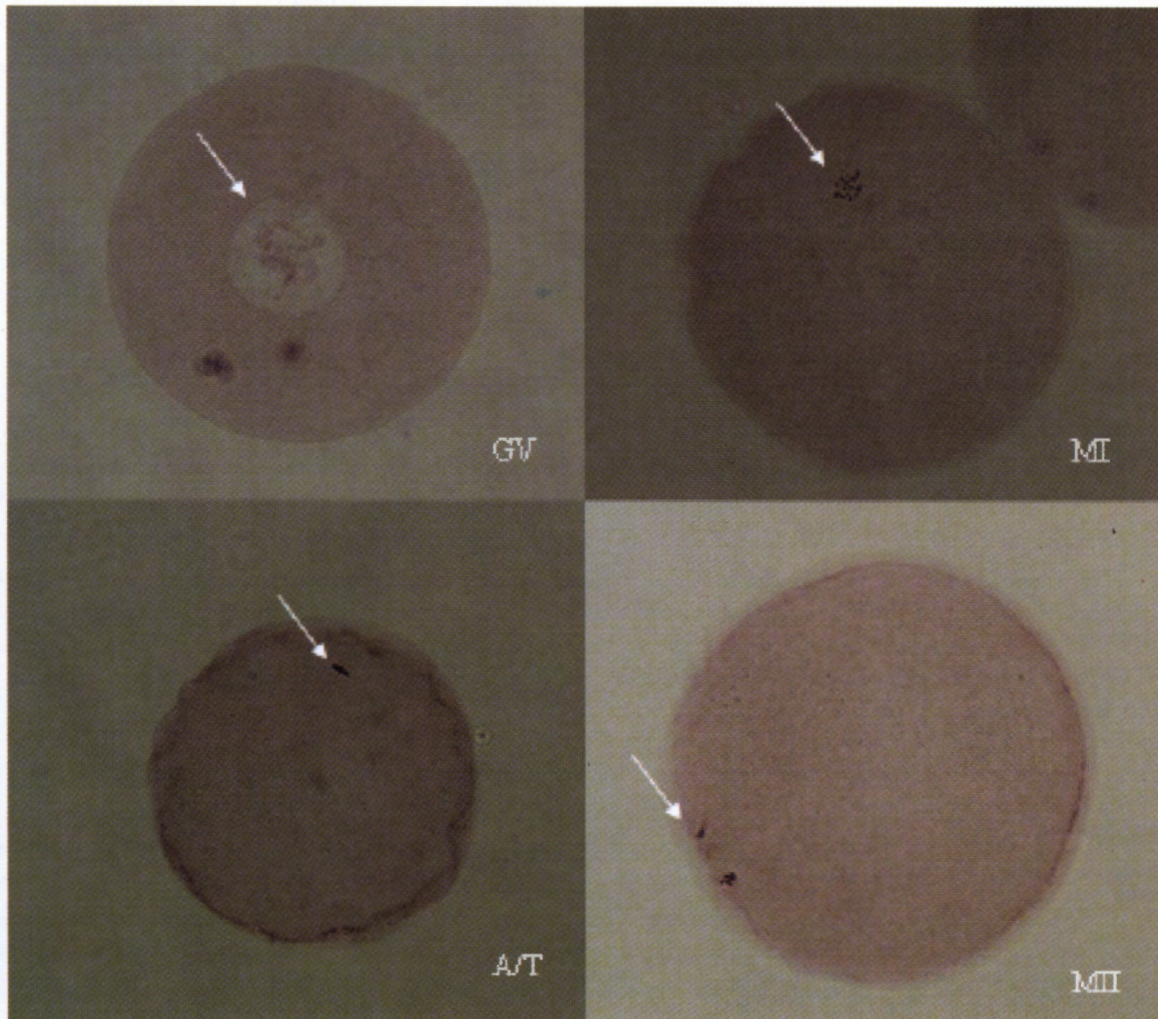
Tabel 1. Status meiotic oosit kucing setelah maturasi in vitro dalam waktu yang berbeda.

| Waktu maturasi (jam) | Jumlah oosit yang dimaturasi | Persentase oosit pada setiap stadium oosit ± standar deviasi | | | |
|----------------------|------------------------------|--|------------------------|----------|-----------|
| | | GV | MI | A/T | MII |
| 18 - 20 | 25 | 16 ± 0,06 | 20 ± 0,07 ^a | 4 ± 0,07 | 60 ± 0,04 |
| 22 - 24 | 25 | 23 ± 0,29 | 4 ± 0,07 ^b | 4 ± 0,06 | 68 ± 0,31 |
| 28 - 30 | 23 | 17 ± 0,19 | 5 ± 0,08 ^b | 0 | 77 ± 0,2 |

^{a,b} superskrip yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan adanya perbedaan nyata (P<0,05). GV (Germinal Vesicle); MI (Metaphase I); A/T (Anaphase/Telophase); MII (Metaphase II).

Hal serupa juga dilaporkan oleh Książkiewicz *et al.* (2003), bahwa terdapat dua gelombang maturasi nukleus oosit kucing. Gelombang pertama terjadi dalam waktu 26 jam. Kebanyakan oosit pada gelombang ini mencapai maturasi setelah 17-18 jam. Gelombang kedua terjadi

setelah IVM 28-30 jam. Książkiewicz *et al.* (2003) menyimpulkan bahwa gelombang ganda tersebut mungkin menggambarkan adanya dua populasi oosit dalam dua tingkat *pre maturation* berbeda yang membutuhkan waktu IVM berbeda.



Gambar 1. Oosit kucing dicat menggunakan aceto-orcein. Anak panah menunjukkan posisi kromosom pada berbagai stadium oosit kucing. GV (*Germinal Vesicle*) ; MI (*Metaphase I*) ; A/T (*Anaphase/Telophase*) ; MII (*Metaphase II*). Perbesaran 100x.

Książkiewicz *et al.* (2003) juga melaporkan bahwa evaluasi terhadap morfologi oosit yang dimatursikan selama 42-45 jam menunjukkan tanda-tanda penuaan seperti fragmentasi polar body, banyak debris dalam ruang perivitelin, dan *clumping of chromosomes of the metaphase plate*. Dalam penelitian terdahulu, dilaporkan bahwa perpanjangan periode maturasi 43 jam pada oosit kucing domestik yang digunakan sebagai resipien sitoplasma untuk kloning somatik secara drastis meningkatkan kemampuan berkembang embrio rekonstruksi. Fusi dan tingkat pembelahan serta kemampuan embrio mencapai stadium blastosis secara signifikan lebih rendah jikadibandingkan dengan resipien dari oosit yang maturasi pada periode yang lebih pendek.

Proses maturasi oosit meliputi maturasi nukleus, sitoplasma, dan kemampuan oosit memulai perkembangan embrio pre-implantasi. Lamanya waktu yang diperlukan untuk proses maturasi mempengaruhi kemampuan oosit dalam proses fertilisasi dan perkembangan secara *in vitro*. Wolfe and Wild, (1996) melaporkan bahwa oosit kucing yang diinseminasi pada 40-48 jam pasca kultur mempunyai kemampuan untuk difertilisasi dan membelah, namun perkembangan oosit sampai stadium blastosis menurun (Karja *et al.*, 2002).

Keberhasilan proses maturasi oosit *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor baik faktor eksternal maupun internal oosit itu sendiri. Johnston *et al.*, (1989) melaporkan terdapat dua

faktor yang besar pengaruhnya terhadap integritas dan viabilitas oosit, yaitu pengaturan temperatur saat penyimpanan ovarium dan lamanya waktu penyimpanan ovarium hingga oosit dikoleksi. Berdasarkan berbagai sumber yang disitasi oleh Merlo (2004), maturasi in vitro oosit kucing bergantung pada banyak faktor berbeda, seperti stadium siklus estrus (Donoghue *et al.*, 1993 ; Spindler and D.E. Wildt 1999), kualitas *cumulus-oocyte complex* (Wood and D.E. Wildt, 1997 ; Pope *et al.*, 1997), waktu kultur (Goodrowe *et al.*, 1989 ; Luvoni and O. Oliva, 1993 ; Wolfe and D.E. Wildt, 1996), dan suplemen hormon (Pope *et al.*, 1997 ; Goodrowe, M. Hay and W.A. King, 1991 ; Wood *et al.*, 1995; Schramm and B.D. Bavister, 1995).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tidak ada perbedaan nyata antara ketiga perlakuan waktu maturasi in vitro oosit kucing ($P>0,05$) dalam hal persentase oosit yang mencapai stadium metaphase II. Maturasi oosit kucing secara in vitro dapat dilakukan antara 18-30 jam dengan menghasilkan persentase oosit yang mencapai stadium metaphase II sekitar 60-77%.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Ditjen Dikti melalui program PHKA2 FKH-UGM tahun 2007.

Daftar Pustaka

- Chang, MC. 1995. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J Exp Zool* 128: 379-405.
- Edwards RG. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-351.

- Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ and Wildt DE. 1991. Rescue and Maturation In Vitro of Follicular Oocyte Collected from Nondomestic Felid Species. *Biol Reprod* 45: 898-906.
- Johnston LA, O'Brien SJ dan Wildt DE. 1989. In Vitro Maturation and Fertilization of Domestic Cat Follicular Oocytes. *Gamete Research* 24: 343-356.
- Karja, NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M dan Suzuki T. 2002. In Vitro Maturation, Fertilization, and Development of Domestic Cat Oocytes Recovered from Ovaries Collected at Three Stages of Reproductive Cycle. *Theriogenology* 57:2289-2298.
- Książkiewicz LK, Ryńska B, Kania G, Smorag Z, Gajda B, Pieńkowski M. 2003. Timing of Nuclear Maturation of Nonstored and Stored Domestic Cat Oocytes. *Theriogenology* 59:1567-1574.
- Mahi CA and Yanagimachi R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J Exp Zool* 196:189-196.
- Merlo B, Iacono E, Zambelli D, Prati F and Belluzzi S. 2004. Effect of EGF on In Vitro Maturation of Domestic Cat Oocytes. *Theriogenolog* 63:2032-2039.
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factor affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 74 : 657-660.
- Song HB and Iritani A. 1987. Studies on in vitro maturation of follicular oocytes in the immature goats. *Korean J Anim Sci* 29: 303-309.
- Wolfe BA and Wildt DE. 1996. Development to blastocyst of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage, *J Reprod Fertil* 106:135-141.