

PENGARUH PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN (PMSG) PADA MATURASI DAN FERTILISASI *IN VITRO* OOSIT KAMBING LOKAL

THE EFFECT OF PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN (PMSG) ON MATURATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION IN LOCAL GOAT OOCYTES

Tjuk Imam Restiadi *

ABSTRACT

The aim of this research was to determine and to manage the oocyte culture technique by conducting maturation and *in vitro* fertilization in local goat.

Ovaries were collected at Pegirian slougherhouse Surabaya and cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from follicles in diameter of 2 to 5 mm. Oocytes were incubated in TC-199 medium with the addition of 5 IU and 10 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) hormone were compared to the control. All maturation were incubated at 38,5 °C with 5 % CO₂ in humidified atmosphere for 24 h.

The oocytes were exposed to sperm in EBSS medium with a final concentration of $12,5 \times 10^6$ cell/ml. Embryos were evaluated at 48 h after fertilization for cleavage. The percentage of embryo derived from maturation supplemented with PMSG was compared to the control by one-way anova analysis.

In conclusion, oocytes maturation and embryos cleavage were significantly different ($p < 0,05$) between PMSG compared with the control. The percentage of mature oocytes and cleavage were the highest in TC-199 medium with 10 IU PMSG hormone.

PENDAHULUAN

Perbaikan mutu genetik ternak dapat diterapkan dengan mempercepat pengembangan ternak melalui bioteknologi bidang peternakan yaitu penerapan teknik transfer embrio dan fertilisasi *in vitro*.

Menurut Gordon (1994), fertilisasi (pembuahan) *in vitro* adalah teknik memproduksi embrio secara buatan di luar tubuh induk betina dengan memanfaatkan oosit dari ovarium induk yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH) atau dari ternak betina unggul yang mengalami kelainan pada saluran reproduksi. Dengan teknik fertilisasi *in vitro* akan didapatkan embrio secara masal dan seragam.

Fertilisasi *in vivo* berlangsung saat terjadi pertemuan sel spermatozoa dan sel telur (ovum), yang berakhir dengan bersatunya kedua pronuklei jantan

dan betina, membentuk individu baru yang disebut sigot. Sel gamet jantan dan betina ini harus dalam keadaan normal dan sehat untuk menghasilkan embrio yang baik dan sehat (Keskintepi dkk., 1994).

Untuk memaksimalkan hasil maturasi oosit, dalam fertilisasi *in vitro*, saat ini para pakar menambahkan serum, hormon dan faktor penumbuh (*growth factor*) dalam medium maturasi, baik secara sendiri maupun bersamaan (Keefer dkk., 1993; Lim dkk., 1994).

Media maturasi dan fertilisasi *in vitro* berisi bahan-bahan organik yang dipakai untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sel. Beberapa faktor yang mempengaruhi proses ini adalah : Pemakaian media sederhana atau kompleks; Sistem buffer dan osmolaritas; Kualitas air yang digunakan; Penambahan antibiotika; Suhu serta tekanan gas.

Penambahan hormon gonadotropin seperti FSH. LH pada media maturasi dan fertilisasi oosit seperti substitusi FSH + LH sapi + estradiol 17β , serum sapi birahi atau serum kuda birahi dapat meningkatkan angka maturasi *in vitro* oosit sapi Madura (Mahaputra dkk., 1996).

Hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) merupakan hormon *non pituitary gonadotropin* dapat digunakan sebagai suplemen media karena mempunyai efek biologis seperti FSH dan sedikit LH. Selain itu preparat PMSG mudah didapatkan di pasaran dengan harga murah daripada preparat gonadotropin lain seperti FSH atau LH.

Tujuan dari penelitian adalah mengetahui teknik biakan oosit dengan melakukan maturasi dan fertilisasi *in vitro* pada media TC-199 yang ditambahkan hormon PMSG.

METODA

Ovarium kambing lokal betina dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya, dibawa ke laboratorium, dimasukkan gelas beker berisi larutan garam fisiologis ditempatkan pada waterbath suhu 37°C . Ovarium dilakukan aspirasi dengan menusukkan syringe disposibel 5 ml berjarum 18-G berisi OWS (*Oocyte Washing Solution*) ke folikel berdiameter 2-5 mm. Seluruh koleksi cairan folikel dimasukkan dalam tabung koleksi, biarkan 10 menit pada rak di waterbath bersuhu 37°C agar oosit mengendap. Cairan dipisahkan pada cawan petri kaca 90 mm untuk dievaluasi di bawah mikroskop stereo dissecting pembesaran 30-40 kali. Pengamatan di bawah mikroskop stereo dissecting, kompleks oosit kumulus (COC) dikumpulkan, oosit dicuci dengan OWS 2 kali, terakhir dicuci dengan media maturasi TC-199.

Maturasi (pematangan) oosit pada media TC-199 ditambahkan *Bovine Serum Albumin* (BSA) 10 %, Na piruvat 100 μl dan gentamisin 25 μg . Ditambahkan PMSG masing-masing 0 IU, 5 IU, 10 IU sebagai perlakuan. Dibuat tetes (drop) pada cawan petri disposibel 35 mm (1 tetes = 50 μl). yang berisi $\pm$ 10-15 oosit setiap tetes, selanjutnya ditutup dengan minyak mineral. Cawan petri ditempatkan pada inkubator dengan kondisi lingkungan 5 % CO_2 , suhu $38,5^{\circ}\text{C}$, tingkat kelembaban maksimal (95-99 %). Pengamatan tingkat

maturasi oosit setelah 24 jam dengan membuat preparat pewarnaan oosit memakai larutan aceto-orcein 1 %. Sebagian oosit berkumulus kompleks dicuci dengan EBSS untuk fertilisasi (pembuahan).

Semen beku kambing dithawing dari kontainer N₂ cair pada waterbath suhu 37 °C. Hasil thawing disentrifuse dengan EBSS kecepatan 360 xg 2 kali, endapannya diperiksa konsentrasinya. Konsentrasi dibuat menjadi 12,5 X 10⁶ sel spermatozoa/ml. Spermatozoa dipisahkan dengan menggunakan teknik swim-up selama 30 menit dalam media EBSS.

Media fertilisasi EBSS dibuat tetes (drop) besar 100 µl pada cawan petri disposibel yang dikelilingi 3 tetes kecil berisi 50 µl, tetes kecil dihubungkan dengan tetes besar ditengah (bentukan roset). Bentukan ditambahkan spermatozoa 10 µl pada tetes besar di tengah, ditutup minyak mineral, dimasukkan inkubator CO₂ bersuhu 38,5°C selama 1 jam untuk kapasitas.

Setelah 24 jam masa maturasi, masing-masing tetes kecil ditambahkan 10-15 oosit matang untuk menjalani proses fertilisasi. Selanjutnya cawan petri diinkubasikan lagi pada inkubator CO₂ bersuhu 38,5 °C selama 48 jam. Pengamatan tingkat pembelahan yaitu oosit setelah 48 jam fertilisasi dengan munculnya polar bodi II dan terbentuk dua pronukleus, sampai terjadi pembelahan embrio (2-16 sel).

Perbedaan perlakuan maturasi oosit dan pembelahan embrio digunakan analisis variansi (anova) satu arah (*one way anova*), apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji BNJ (beda nyata jujur) (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maturasi Oosit

Pengamatan maturasi oosit kambing berdasarkan persentase terbentuknya polar bodi dan satu pronukleus (betina), yaitu tercapainya tahap metaphase II dari pembelahan meiosis inti oosit, setelah 24 jam dari saat mulai maturasi.

Tabel 1. Maturasi Oosit pada Berbagai Media Perlakuan

Perlakuan Media	Jml. Oosit yang Dimatursikan	Jml. Oosit Matang (% Oosit Matang (X±Sd))
TC-199 (Kontrol)	67	48 (71,63 ± 2,44) ^a
TC-199 + PMSG 5 IU	70	53 (75,76 ± 2,02) ^b
TC-199 + PMSG 10 IU	68	54 (79,62 ± 2,16) ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna (p<0,05).

Beberapa faktor yang berpengaruh pada maturasi oosit dan pembelahan embrio *in vitro* diantaranya adalah kondisi lingkungan media optimum artinya kondisi dibuat semirip lingkungan embrio *in vivo* layaknya

dalam saluran reproduksi betina. Media harus memiliki fungsi mekanis, fisis dan khemis bagi kelangsungan hidup oosit dan embrio *in vitro*.

Pematangan oosit dipengaruhi oleh hormon FSH dan LH. Maturasi oosit akan sempurna bila gertakan hormon LH memuncak selama praovulasi, ditandai pelepasan polar bodi I dan tercapainya tahap metafase II dari pembelahan meiosis inti (Hafez, 1993). Beberapa peneliti yang dikutip oleh Younis dkk. (1991), melaporkan bahwa antara 90 - 100 % kultur oosit mencapai tahap metafase II dengan adanya hormon gonadotropin.

Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) atau *equine Chorionic Gonado-tropin* (eCG) merupakan hormon non pituitary gonadotropin. Dideteksi pada sirkulasi darah maternal kuda bunting mulai hari 35-40 dan mencapai puncak hari 70-80, selanjutnya menurun kadarnya sampai hari 150. Aktivitas biologis utama hormon PMSG adalah seperti FSH tetapi juga mempunyai sedikit aktivitas seperti LH (Sharp, 1992).

Penelitian menggunakan hormon PMSG yang ditambahkan pada media maturasi dengan dosis 5 IU dan 10 IU menghasilkan persentase oosit yang matang sebesar $75,76 \pm 2,02$ % dan $79,62 \pm 2,16$ % dibandingkan dengan tanpa penambahan PMSG (kontrol) yaitu sebesar $71,63 \pm 2,44$ %. Analisis statistik ternyata menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Penelitian yang dilakukan oleh Djati (1998) menggunakan TC-199 disuplementasi PMSG 10 IU/ml, hCG 10 IU/ml dan FCS 10%, didapatkan hasil sel kumulus menjadi berkembang sempurna dan mencapai 96,7 %, memberikan hasil angka maturasi hampir 100% karena penggunaan kombinasi PMSG-hCG, juga FCS (*Fetal Calf Serum*) 10%. Menurut Younis (1991), FCS banyak digunakan peneliti sebagai suplemen media maturasi oosit karena dapat mendorong maturasi inti dan sitoplasma dibandingkan BSA (*Bovine Serum Albumin*). Menurut Solomon (1988) dikutip Djati (1998), hormon PMSG dan hCG berperan mirip dengan hormon FSH dan LH. Kedua hormon bekerja sinergis dalam proses ekspansi sel-sel kumulus, akan mengalami perkembangan bila dikultur *in vitro*.

Pembelahan Embrio

Pengamatan terjadinya pembelahan (*cleavage*) pada embrio 48 jam dari saat oosit matang diinseminasi dengan spermatozoa pada media pembuahan EBSS.

Tabel 2 Pembelahan Embrio setelah Fertilisasi *In Vitro* pada Media Perlakuan

Perlakuan Media	Jml. Oosit	Pembelahan Embrio				Jml. Pembelahan (%Peblih. ($\bar{X} \pm Sd$))
		2 sel (%)	4 sel (%)	8 sel (%)	16 sel (%)	
TC-199(Kontrol)	73	3(4,11)	3(4,11)	13(17,81)	11(15,07)	30 (40,89 $\pm$ 4,09) ^a
TC-199+PMSG 5 IU	78	2(2,56)	7(8,97)	17(21,79)	13(16,67)	39 (50,00 $\pm$ 3,83) ^b
TC-199+PMSG10 IU	81	5(6,17)	6(7,41)	16(19,75)	14(17,28)	41 (51,02 $\pm$ 3,68) ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* selain dipengaruhi oleh lingkungan media dan kematangan oosit juga motilitas spermatozoa pada pembuahan oosit. Spermatozoa agar mampu menembus sel telur, harus diberi kesempatan menjalani kapasitasi dan reaksi akrosom dahulu. Perkembangan embrio setelah fertilisasi *in vitro* dipengaruhi media yang digunakan selama maturasi. Fertilisasi *in vitro* sempurna terjadi bila saat penetrasi spermatozoa, pembelahan inti oosit sudah mencapai tahap metafase II (Hafez, 1993).

Pengamatan oosit kambing yang berhasil membelah dalam waktu 48 jam setelah fertilisasi ternyata memperlihatkan tingkat pembelahan berbeda-beda yaitu 2 sel, 4 sel, 8 sel dan 16 sel. Ketidak-seragaman pembelahan ini juga dilaporkan oleh peneliti-peneliti lain seperti yang dikutip oleh Gordon (1994). Diduga disebabkan kurang serempaknya maturasi oosit atau dikatakan bahwa oosit yang dimaturasi berasal dari stadium yang sangat bervariasi.

Hasil penelitian ini, persentase pembelahan pada media maturasi yang ditambah-kan PMSG 5 IU, PMSG 10 IU, berturut-turut adalah : $50,00 \pm 3,83 \%$, $51,02 \pm 3,68 \%$. Sedangkan persentase embrio yang dapat mencapai stadium 16 sel berturut-turut: $16,67 \%$, $17,28 \%$. Analisis statistik ternyata menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Penelitian Keskintepi dkk.(1994) menggunakan kompleks oosit kumulus (COC) kambing dari folikel bediameter 2-5 mm, maturasi 27 jam dalam media TC-199, menghasilkan maturasi sebesar 88,1 % penambahan kombinasi LH-FSH pada media fertilisasi, menghasilkan persentase cleavage 80 % dan mencapai stadium morula 40 % dibandingkan bila hanya ditambahkan FSH, LH, hCG+FSH dan TSH. Keskintepi dkk. (1994) pada waktu inseminasi menggunakan spermatozoa yang ditambahkan heparin ($10 \mu\text{g/ml}$) dan caffein ($0,4 \mu\text{g/ml}$).

KESIMPULAN

Hormon PMSG dosis 5 IU dan 10 IU berpengaruh meningkatkan maturasi dan fertiliasi *in vitro* oosit kambing.

Hormon PMSG dosis 5 IU dan 10 IU memberikan angka maturasi oosit dan angka pembelahan lebih besar dibandingkan tanpa penambahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Djati, M.S. 1998. Pengaruh Suplementasi PMSG dan hCG pada Proses Fertilisasi *In Vitro* dan Kultur Klon Embrio Sapi dengan IGF-1. Ringkasan Disertasi Doktor. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB. International. Wallingford.
- Hafez, E.S.E. 1993. Fulliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation, Transport and Survival of Gametes, Fertilization. *In*: Reproduction in Farm Animals. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. p : 144-188.

- Keefer, C.L., R. Koppang, A.M. Paprocki, P. Golueka, S. Stice, M. Maki-Laurila and L. Mathews. 1993. Bovine Inner Cell Mass (ICM) Cells Donor Nuclei In The Production of Nuclear Transfer Embryos. *Theriogenology* 39 : 242.
- Keskintepe, L., G.M. Darwish, A.T. Kenimer and B.G. Brackett. 1994. Term Development of Caprine Embryos Derived from Immature Oocytes *In Vitro*. *Theriogenology* 42 : 527-535.
- Lim, J.M., J.H. Kim, K. Okuda and K. Niwa. 1994. The Importance of NaCl Concentration In a Chemically Defined Medium for The Development Bovine Oocytes Maturated and Fertilized *In Vitro*. *Theriogenology* 42 : 421-432.
- Mahaputra, L., A. Hinting, H.A. Hermadi, I. Mustofa, S. Utama, dan P. Srianto. 1996. Teknik Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio Sapi Madura. Laporan Penelitian Hibah Bersaing II/3. Dirjen Dikti. Depdikbud. Jakarta.
- Sharp, O.C. 1992. Pregnant Mare and Jenny In : World Animal Science. Book : C. Production Syatem Aproach. Horse Breeding and Management. Editor: J.W. Evans. Elsevier Science Publishers B.V.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika . Suatu Pendekatan Biometrik. Edisi Kedua. Penerbit : P.T. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Younis, A.I., K.A. Zuelke, K.M. Harper, M.A.L. Oliveira and B.G. Brackett. 1991. *In Vitro* Fertilization of Goat Oocytes. *Biol. Reprod.* 44 : 1177-1182.