Perbandingan Maturasi Antara Oosit Sapi yang Divitrifikasi Pra dan Pasca Maturasi *In Vitro*

The Comparison of Maturation Between Bovine Oocyte Vitrification Before and After In Vitro Maturation

Zakiyatul Faizah[1], Aucky Hinting[1], Ninik Darsini[1], Widjiati[2]

[1]Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
[2]Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus A. Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya
Telp.031 5030252-3, 5032803 / 031 5032803
E-mail: vetunair@telkom.net

Abstract

The incidence of cancer in whole world is increase and shifted to younger age (productive), no exception incidence of ovarian cancer. Women who are diagnosed with cancer at the productive age do not only need to get attention on survival but also on the possibility of the loss of fertility.Vitrification method has become a growing and promising technology in assisted reproductive technology. Freezing embryos are more common, freezing oocytes are longer growing because the physical characteristics of oocyte. Vitrified oocytes can be performed on mature and imature oocytes to get for more back up, therefore it is necessary to develop systems for freezing and oocyte maturation This study aims to compare the number of matur oocyte between bovine oocyte vitrification pre and post in vitro maturation. Maturation is operated in medium TC 100 µl covered with mineral oil in a petri dish with diameters 36 mm. Vitrification begins with washing oocyte in PBS of 20% serum for 1-2 minutes, followed by PBS + 20% serum + 10% ethylene glycol for 10-14 minutes, then transferred in 20% serum + PBS + 0.5 M sucrose + 15% ethylene glycol + PROH 15% for 25-30 seconds. Thawing is processed by submerging the oocytes in the media: 1). PBS + 20% serum + 0.5 M sucrose, 2). PBS + 20% serum + 0.25 M sucrose, and 3). PBS + 20% serum + 0.1 M sucrose. This study conclude that no difference on matur oocyte number between bovine oocyte vitrification pre and post in vitro maturation.

Keywords : Vitrification, in vitro maturation,oocyte, bovine

Pendahuluan

Angka kejadian kanker di dunia semakin meningkat dan bergeser ke usia muda (produktif). Wanita yang didiagnosa menderita kanker pada usia produktif tidak hanya perlu mendapat perhatian pada angka ketahanan hidup tapi juga pada kemungkinan hilangnya kesuburan, dibutuhkan suatu upaya untuk menyelamatkan ovarium atau oosit dari penderita sebelum menjalani terapi. Wanita yang belum menikah dapat dilakukan penyimpanan oosit atau ovarium, sedangkan pada wanita yang sudah menikah dilakukan penyimpanan oosit, ovarium atau dilakukan *emergency* IVF untuk kemudian disimpan embrionya.

Simpan beku oosit lebih menjadi pilihan pada wanita yang belum mempunyai pasangan akan tetapi simpan beku embrio masih menjadi pilihan utama untuk meyelamatkan kesuburan (Paz *et al.*, 2010). Simpan beku dengan metode vitrifikasi telah menjadi teknologi yang berkembang dan menjanjikan dalam teknologi reproduksi berbantu. Vitrifikasi oosit dilakukan pada oosit matur dan imatur untuk mendapat cadangan oosit yang lebih banyak.

Bayi perempuan yang baru dilahirkan telah kehilangan 80% oositnya dan pada saat pubertas massa germ sel hanya tinggal 300.000-500.000 (speroff, 2011). Oosit pada ovarium hampir 90% berbentuk primordial folikel, yang berisi oosit yang berhenti pada profase pembelahan meiosis I. Primordial folikel tidak tergantung pada FSH, karena tidak memiliki reseptor FSH (Seli and Agarwal, 2012).

Simpan beku oosit lebih lama berkembang karena sifat fisik oosit yang khas, oosit yang matur berisi benang *spindle* yang sangat rentan terhadap penurunan suhu (Chen *et al.*, 2003), serta dimana rasio volume dan permukaannya rendah yang menyebabkan terbatasnya penetrasi air dan krioprotektan menembus membran plasma (Cotichio *et al.*, 2004). Chang *et al.* (2010) menyebutkan bahwa benang *spindle* dari oosit dapat terjaga selama proses pembekuan dan penghangatan, walaupun terpapar suhu yang sangat dingin dan mengalami fase transisi 2 kali. Vitrifikasi pada oosit sapi imatur menunjukkan hasil lebih baik ketika dibekukan dengan sel granulosa daripada tanpa sel granulosa (Kuwayama *et al.*, 2005).

Vitrifikasi melindungi oosit dari pembentukan kristal es. Penggantian air dengan krioprotektan konsentrasi tinggi akan melindungi sel ketika didinginkan dan mencegah pembentukan kristal es, syok osmotik dan syok cairan, hal ini akan melindungi ultrastruktur pada oosit dari kerusakan, sehingga pada waktu dihangatkan oosit akan dapat melanjutakan proses maturasinya. Maturasi oosit secara *in vitro* juga dibutuhkan agar jumlah oosit yang bisa disimpan beku semakin banyak, sehingga kemungkinan untuk mendapat embrio juga lebih banyak, oleh karena itu perlu dikembangkan sistem maturasi dan simpan beku oosit yang lebih baik**.** Tujuan penelitian ini adalah mempelajari perbandingan jumlah oosit matur antara oosit sapi yang divitrifikasi pra dan pasca maturasi *in vitro*.

Materi dan Metode Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah oosit sapi yang dikoleksi dari folikel berukuran 3 -5 mm. Penelitian ini adalah penelitian komparasi eksploratif laboratoris dengan rancangan *post test only control group design*. Oosit yang didapat dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok kontrol hanya dilakukan IVM. Kelompok 1 di IVM dilanjutkan vitrifikasi. Kelompok 2 divitrifikasi dilanjutkan IVM. Maturasi *in vitro* dilakukan dalam inkubator 38^0C, 5% CO_2 dengan kelembaban 95% selama 24 jam. Vitrifikasi diawali dengan pencucian oosit dalam medium dasar PBS yang disuplementasi serum 20% selama 1-2 menit, dilanjutkan dengan tahapan ekuilibrasi oosit dalam medium PBS + serum 20% + etilen glikol 10% selama 10-14 menit. Oosit kemudian dipindahkan dalam medium vitrifikasi PBS + serum 20% + sukrosa 0,5M + etilen glikol 15% + PROH 15% selama 25-30 detik. *Thawing* dilakukan dengan mencelupkan *hemistraw* tersebut ke dalam media *thawing*. Oosit direndam secara berturut dalam media : 1). PBS + 20% serum + sukrosa 0,5M, 2). PBS +

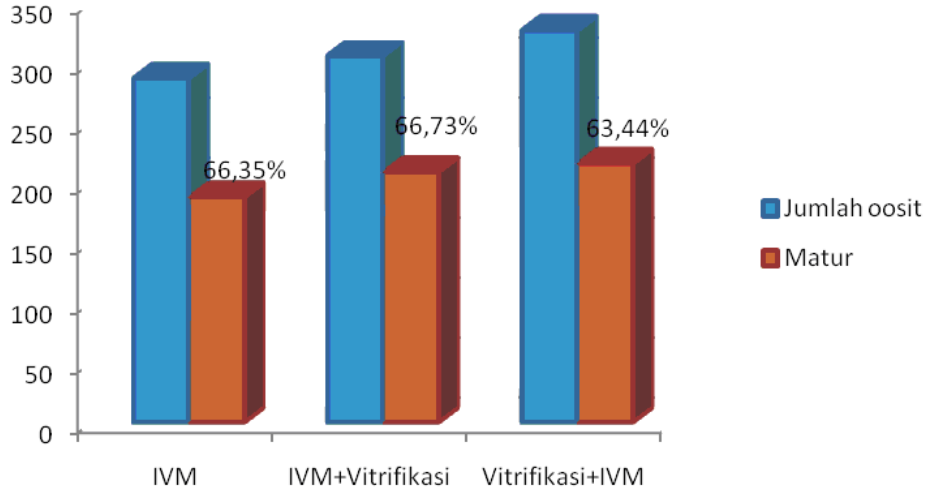
20% serum + sukrosa 0,25M, dan 3). PBS + 20% serum + sukrosa 0,1M. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *one-way* ANOVA

Hasil

Maturasi oosit pada kelompok kontrol, K1 dan K2 adalah sebesar 66,35% ± 8,66, 66,73% ± 10,11, 63,44% ± 18,57, ketiganya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada p<0,05.

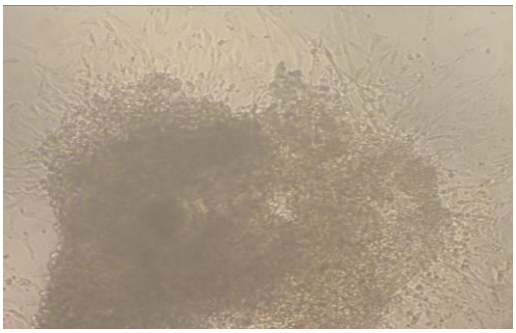
Tabel 1. Rerata oosit matang setelah dilakukan *maturasi in vitro*

Kelompok	X± SD
IVM	66,35% ± 8,66
IVM+Vitrifikasi	66,73% ± 10,11
Vitrifikasi+IVM	63,44% ± 18,57



Gambar 1. Rerata hasil maturasi *in vitro* oosit sapi

Maturasi oosit merupakan tahapan paling penting agar oosit dapat mengalami fertilisasi. Oosit imatur berhenti pada tahap profase I. Sitoplasma dan nukleus mengalami serangkaian perubahan untuk mencapai tahap metafase II dimana oosit telah matur, siap untuk fertilisasi dan memiliki kemampuan untuk mendukung perkembangan embrional (Gordon, 2003). FSH merangsang proliferasi sel granulosa, aromatisasi androgen menjadi esterogen dan membentuk reseptor LH. Esterogen memberi umpan balik negatif ke hipotalamus dan hipofisa serta memicu terjadinya LH *surge*. LH *surge* memicu oosit bermeiosis, menghancurkan dinding folikel dan mengeluarkan oosit dengan kumulus kompleksnya. Oosit menyelesaikan meiosis I yang ditandai dengan keluarnya badan polar, oosit melanjutkan meiosis II sampai tahap metafase dan berhenti sampai terjadi fertilisasi (Neill's, 2006).



Gambar 2. Oosit yang matang memiliki sel kumulus yang mengembang dan membentuk rambatan seperti sel saraf

Maturasi oosit terdiri dari pematangan sitoplasma dan inti oosit. Inti oosit berhenti pada fase meiosis I, apabila oosit diambil dari folikelnya dan dimatangkan dalam medium maturasi sederhana, oosit akan meneruskan meiosisnya dan memasuki tahap metaphase II (Sirard *et al.*, 1997) berbeda dengan pematangan sitoplasma yang membutuhkan media yang lebih komplek untuk pematangannya (Mermillod *et al.*, 1999). Pematangan sitoplasma memegang peranan penting untuk kemampuan oosit dalam perkembangan selanjutnya.

Penambahan FSH dan LH dalam medium maturasi *in vitro* memberi pengaruh yang baik pada perkembangan oosit (Adona *et al*., 2008). Penelitian ini menggunakan PMSG sebagai sumber FSH dan LH. Persentase rata-rata oosit matur pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna, hal ini menunjukkan bahwa medium yang digunakan dengan penambahan hormon PMSG dapat merangsang oosit untuk mencapai maturasi.

PMSG merupakan hormon gonadotropin kelompok glikoprotein yang disekresi di luar pituitary dan mempunyai efek biologi yang panjang (>24 jam). PMSG mempunyai efek utama seperti FSH untuk perkembangan folikel dan juga mempunyai kemampuan seperti LH untuk ovulasi dan luteinisasi (Riviera and Papich, 2009). Medium maturasi dengan penambahan PMSG memberikan angka maturasi yang lebih tinggi dibanding tanpa PMSG yaitu sebesar 82%, angka maturasi akan lebih tinggi lagi jika selain penambahan PMSG juga diberi buFF (*buffalo follicular fluid*), yaitu sebesar 97% (Gupta *et al.*, 2001).

Maturasi sitoplasma dapat dilihat dari seberapa besar ekspansi sel kumulus, penambahan FSH sebesar 100 ng/ml memberi gambaran ekspansi sel kumulus (Armstrong *et al.*, 1996) dan penambahan FSH dengan dosis lebih besar yaitu 1000ng/ml pada medium maturasi memberi gambaran ekspansi kumulus yang lebih bagus (Calder *et al.*, 2005). Sel kumulus memiliki kemampuan untuk mendukung kematangan oosit selama proses maturasi (Yuan *et al.*, 2005). Sel kumulus juga memiliki peranan penting dalam pertumbuhan oosit, maturasi, ovulasi dan fertilisasi, juga mempengaruhi kualitas oosit (Tanghe *et al.*, 2002; Soom *et al.*, 2002), selain itu juga melindungi oosit dari stress oksidatif (Tatemoto *et al.*, 2000). *Gap junction* pada kumulus merupakan sarana komunikasi antar sel kumulus sendiri maupun dengan oosit. Komunikasi antara sel kumulus dengan oosit merupakan sarana yang penting untuk transfer zat-zat seperti ion, nukleotida, asam amino, dan zat metabolit selama perkembangan oosit dalam folikel serta untuk pematangan inti dan sitoplasma (Vozzi *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2008).

Prinsip vitrifikasi adalah laju pendinginan yang sangat cepat dengan krioprotektan konsentrasi tinggi (Patrizio *et al.*, 2003; Gadner *et al.*, 2011). Krioprotektan konsentrasi tinggi yang ditambahkan pada suhu kamar mempunyai efek toksik yang cukup besar pada oosit, sehingga dibutuhkan penurunan suhu yang cepat agar metabolisme sel segera berhenti. Penelitian ini menggunakan gabungan antara krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler yang digunakan yaitu PROH dan EG. Penggunaan lebih dari satu jenis krioprotektan akan mengurangi konsentrasi krioprotektan yang dibutuhkan dan mengurangi toksisitasnya Proses vitrifikasi dimulai dengan penggantian cairan sel dengan EG, pada mulanya oosit akan mengalami dehidrasi (sel tampak mengkerut), setelah itu sel akan kembali ke bentuknya semula. Penggantian air dengan

EG dan PROH dimaksimalkan dengan penambahan sukrosa yang berfungsi untuk menarik air intraseluler. Penghangatan kembali berfungsi untuk mengembalikan oosit pada keadaan semula. Pemaparan oosit dengan cairan penghangatan tidak hanya berfungsi untuk menghangatkan oosit tapi juga untuk menghilangkan krioprotektan dan rehidrasi. Pemaparan oosit berturut-turut dengan cairan yang mengandung sukrosa 0,5M, 0.25M dan 0,1M akan mencegah air ekstraseluler tiba-tiba masuk kedalam oosit, sehingga penggantian EG dan PROH dengan air dapat berjalan perlahan-lahan.

Simpan beku oosit dengan sel kumulus juga bukan hal yang mudah. Sel kumulus akan memperlama penetrasi krioprotektan kedalam oosit, akan tetapi sel kumulus diperlukan untuk maturasi dan fertilisasi *in vitro*. Sel kumulus dibutuhkan saat maturasi, sebagai reseptor FSH dan LH, steroidogenesis, mempertahankan oosit dalam keadaan *meiotic arrest*, menghasilkan KIT Ligand yang berfungsi meningkatkan ketahanan hidup dan perkembangan oosit (Blerkom and Gregory, 2004). Proses pembekuan oosit imatur dengan sel kumulusnya memberi resiko terjadinya kerusakan sel kumulus. Pada fase ini oosit masih memerlukan komunikasi dengan sel kumulus untuk pematangannya. Hytell *et al.* (1989) melaporkan adanya kerusakan pada mikrovilli yang mengakibatkan gangguan pada komunikasi antara oosit dan sel kumulus, hal ini mengakibatkan gangguan pada proses pematangan oosit. Hasil yang sama didapatkan pada penelitian ini, yang menunjukkan angka maturasi oosit yang divitrifikasi dalam keadaan imatur sedikit lebih rendah dibanding kelompok oosit yang divitrifikasi dalam keadaan matur.

Gambaran ultrastruktur dari oosit yang divitrifikasi dilanjutkan IVM menunjukkan gambaran ekspansi sel kumulus yang bagus, morfologi inti sel dan organel normal. Integritas membran sel dapat dipertahankan. Jumlah *cortical granule* sedikit mengalami penurunan, tersusun sepanjang oolemma. Komunikasi antara sel kumulus dan oosit tetap terjaga serta sitoplasma oosit tidak mengalami perubahan. Oosit yang di IVM dilanjutkan vitifikasi menunjukkan tidak adanya pengaruh pada ekspansi sel kumulus dan *gap junction*, akan tetapi terjadi perubahan pada susunan *cortical granule*, yang tidak lagi tersusun sepanjang oolemma tetapi menggerombol pada korteks. Rongga perivitelin mengalami penurunan dan gambaran mitokondria menjadi lebih hitam, ini semua menunjukkan adanya perubahan morfologi pada organel (Diez *et al.*, 2005).

Sifat khas oosit pada setiap fase merupakan tantangan tersendiri dalam vitrifikasi oosit. Kromosom pada oosit imatur masih terbungkus oleh membran nukleus (Ishacenko and Nayudu, 1999), oosit imatur belum memiliki mikrotubul untuk pembelahan meiosis yang rentan terhadap proses pembekuan, akan tetapi pada fase ini oosit sangat rentan terhadap penurunan suhu yang mengakibatkan kerusakan pada membran sitoplasma (Arav *et al.*, 1996). Oosit matur memiliki *spindle* yang rentan terhadap pembekuan, akan tetapi sitoskeletonnya lebih fleksibel sehingga lebih tahan terhadap proses pembekuan (Alworth and Albertini, 1993). Keberhasilan vitrifikasi oosit tergantung pada jenis krioprotektan yang digunakan, metode penambahan dan penghilangan krioprotektan,

serta kecepatan penurunan suhu dan penghangatan.

Kesimpulan

Tidak ada perbedaan jumlah oosit matur pra dan pasca maturasi *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat apakah ada kerusakan pada sitoplasma oosit dan pemeriksaan pada zona pelusida.

Daftar Pustaka

Adona, P.R., P.R.L.Pires, M.D. Quetglas, K.R.L.Schwarz, and C.L.V. Leal. 2008. Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. Animal Reproduction Science. 104:389–397.

Alworth A.E. and D.F. Albertini. 1993. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cells cytoskeleton. Development biology. 158:101-112

Arav A, S.B. Zeron, S.B. Leslie, E.Behboodi, G.B. Anderson and J.H. Crowe. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocyte. Cryobiology. 33:589-599

Blerkom, V Jonathan, and Linda Gregory. 2004. Essential IVF basic research and clinical application. Kluwer academic publisher. 334.

Calder, D Michele, Anita N. Caveney, Marc-Andre Sirard, and A. J. Watson. 2005. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus oocyte complexes during maturation in vitro. Fertility and sterility 83 (1): 1077-1085

Chang, Ching-Chien, Chih-Jen Lin, Li-Ying sun, Hilton I Kort, X Cindy Tian and Zsolt Peter Nagy. 2010. Impact of phase transition on the mouse oocyte spindle during vitrification. Reproductive biomedicine online. 22 : 184-191

Chen S.U., Y.R. Lien, K.H. Chao, H.N. Ho, Y.S.Yang and T.Y.Lee. 2003. Effects of

Cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing–a review article. Mol cell endocrinol 202 : 101–107

Diez, Carmen, Paloma Duque, Enrique Go´mez, Carlos O. Hidalgo, Carolina Tamargo, Aida Rodrı´guez, Lina Ferna´ndez, Santiago de la Varga, Alba Fernandez, Nieves Facal and Maite Carbajo, 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest. Theriogenology. 64: 317-333

Gardner, D.K., Btros R.M.B Rizk, and Tommaso Falcone. 2011. Human assisted reproductive technology: future trends in laboratory and clinical practice. Cambridge university press. 314

Gilchrist R.B., M. Lane and J.G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod. 14:159–77.

Gordon, I.A.N. 2004. Reproductive technology in farm animals. CABI Publishing, UK. 120

Gupta P.S.P., S. Nandi, B. M. Ravindranatha, and P. V. Sarma, 2001. Effect of buffalo follicular fluid alone and in combination with PMSG and M199

on in vitro buffalo maturation. J. Animal science. 14 (5): 693-696

Gupta, K.M., S.J.Uhm and H.T. Lee. 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen spesies activity and in vitro development of oocytes vitrified before and after in vitro fertilization. Fert and sterility. 98 (8): 2602-2607

Hyttel, P., 1. Fair, H. Callsen and 1. Greve. 1997. Oocytes growth, capacitation and final maturation in cattle. J. Theriogenology. 47: 23-32.

Isachenko E.F. and P.L.Nayudu. 1999. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromosomal normality and cumulus integrity. Hum Reprod.; 14:400-408.

Kuwayama, M., G. Vajta, O. Kato and S.P Leiobo, 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocyte. Reprod biomed on line. 11(3) : 300-308

Mermillod, B. Oussaid and Y. Cognie. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the development potential of embrio. J.Reprod and fert. 54: 449-460

Neill, J.D., J.R.G. Challis, D.W. Pfaff, T.M. Plant, D.M. de kreetser, JoAnne S. Richard and P.M. Wassarman. 2003. Phisiocology of reproduction, 3rd ed, Elsevier academic press, USA. p 386

Patrizio, P., M.J. Tucker and V. Guelman. 2003. A color atlas for human assisted reproduction: laboratory and clinical insight. Lippincott Williams and Walkins, Philadelphia, USA. p 144.

Riviera, Jim E, and M. G. Papich, 2009, Veterinary pharmacology and theurapeutics, 9th ed. Wiley-Blackwell publishing. p 732.

Seli, A. and, A. Agarwal. 2012. Fertility preservation. Springer Link USA, P 153

Sirard,MA, F. Richard and M. Meyes. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. Theriogenology. 49: 483-497

Soom, A.V, S. Tanghe S, I.D. Pauw, D Maes, and A.D. Kruif. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization, Reprod dom animal. 37: 144-151

Speroff, leon and Marc A. Fritz, 2011, *Clinical gynecologic endocrinology and fertility*, 8th ed. Lippincott Williams and Walkins, Philadelphia, USA

Tanghe S, A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn and A. de Kruiff, 2002. Minireview:functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. Mol reprod dev. 61: 414-424

Tatemoto, H., N. Sakurai, and N. Muto, 2000. Protection of porcine oocytes againt apoptosis cell death caused by oxidative stess during in vitro maturation: role of cumulus cells. Biol Reprod. 63: 805-810

Thomas R.E., D.T. Armstrong and R.B. Gilchrist RB. 2004. Bovine cumulus cell–oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3’5’-monophosphate levels. Biol Reprod. 70: 548–56.

Vozzi C., A. Formenton, A.Chanson, A. Senn, Sahli and P. Shaw. 2001. Involvement of connexin 43 in

meiotic maturation of bovine oocytes. Reproduction. 122:619–28.

Yuan, Y.Q., A.Van Soom, J.L.M.R.Leroy, J.Dewulf, A.Van Zeveren, Kruif AND L.J.Peelman. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63: 2147–2163.