

**PERBANDINGAN PENGARUH PENAMBAHAN CAIRAN FOLIKEL SAPI DENGAN BABI
TERHADAP MATURASI OOSIT ANJING (*Canis familiaris*) SECARA *IN VITRO*
DARI STADIUM ESTRUS OVARIUM**

**DIFFERENCE OF SUPPLEMENTATION BETWEEN BOVINE AND PORCINE FOLLICULAR FLUID
ON *IN VITRO* MATURATION OF CANINE (*Canis familiaris*) OOCYTES FROM
OESTRUS STAGE OF OVARIE**

**Yuda Heru Fibrianto¹, Tri Wahyu Pangestningsih², Amelia Hanna¹,
Claude Mona Airin¹, Nuraini Rachmawati³**

¹Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: fibrianto1802@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to reveal the influence of the difference of supplementation between bovine and porcine follicular fluid on *in vitro* maturation of canine oocytes from different stage of oestrus cycle. *Tissue culture medium* (TCM)-199, TCM-199 supplemented with 10% bovine follicular fluid and TCM-199 supplemented with 10% porcine follicular fluid were used in this study. Follicular fluid of bovine and porcine were placed on 0,9% physiological NaCl, added with 1% penicillin-streptomycin at 37°C. After being washed in *Phosphat Buffered Saline* (PBS), the ovarian tissue was sliced in *TCM washing medium*. Grade I *Cumulus Oocyte Complexes* (COCs) was collected from proestrus, diestrus, anestrus bitch ovaries and cultured for 72 hours (38,5°C, 5% O₂) in three different groups of media. Cumulus cells were removed by placing oocytes in hyaluronidase solution (0,5 mg/ml) and then repeatedly passaged through small bore glass pipettes. The nuclear maturation rate (GV, GVBD, M I, M II, D/NI) was evaluated under Hoechst 33342 (1,9 µM) staining for fluorescence microscopy. Data were analyzed by F-test ANOVA. The results of this study indicated that supplementing follicular fluid into TCM-199 increase the proportion of nuclear maturation canine oocytes *in vitro*. The percentage of oocytes nuclear maturation in TCM-199 supplemented with 10% bovine follicular fluid is better as shown by the percentage of oocytes that reached metaphase II/M II (2.64 ± 1.81%). Oocytes from diestrus ovaries showed best meiosis progression to later stage (from metaphase I to metaphase II) compare with oocytes from proestrus and anestrus ovaries. After being cultured oocytes from diestrus ovaries reached M II (4.2±1.8% for control; 5.7±4.0% for TCM-199 + 10% bovine follicular fluid, and 2.1±1.9% for TCM-199 + 10% porcine follicular fluid).

Key words: bitch, oocyte, *in vitro* maturation, follicular fluid

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh penambahan cairan folikel sapi dan cairan folikel babi pada media maturasi terhadap pemasakan oosit anjing pada berbagai stadium siklus estrus secara *in vitro*. *Tissue Culture Medium* (TCM)-199, TCM-199 ditambah 10% cairan folikel sapi (CFS), dan TCM-199 ditambah 10% cairan folikel babi (CFB) digunakan pada penelitian ini. Cairan folikel sapi dan babi ditempatkan dalam larutan 0,9 % NaCl fisiologis ditambah 1% larutan penicillin-streptomycin 37°C. Setelah pencucian dengan *Phosphat Buffered Saline* (PBS), ovarium dicacah dan diseleksi oositnya dibawah mikroskop dalam media TCM. Kompleks kumulus oosit grade I dikoleksi dari ovarium stadium proestrus, diestrus, dan anestrus

dikultur selama 72 jam ($38,5^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{O}_2$) pada ketiga kelompok media. Setelah kultur, kumulus sel dihilangkan dengan memipet berulang kali kompleks kumulus oosit dalam $0,5 \text{ mg/ml}$ hyaluronidase. Evaluasi stadium perkembangan meiosis (GV, GVBD, M I, M II, D/NI) dilakukan dengan mikroskop UV setelah pengecatan menggunakan Hoechst 33342 ($1,9 \mu\text{M}$). Analisa data menggunakan metode uji F ANOVA (SPSS). Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan cairan folikel pada media maturasi TCM-199 meningkatkan maturasi *in vitro* inti sel oosit anjing. Persentase maturasi inti sel oosit pada media TCM-199 dengan penambahan 10% cairan folikel sapi lebih baik, dilihat dari persentase oosit yang mencapai M II ($2,64 \pm 1,81\%$). Kelompok oosit dari stadium ovarium diestrus memiliki persentase progresi meiosis yang terbaik dibandingkan stadium proestrus dan anestrus. Oosit pada stadium ovarium diestrus setelah dikultur mencapai M II ($4,2 \pm 1,8\%$ untuk kontrol, $5,7 \pm 4,0\%$ untuk TCM-199 + 10% CFS, dan $2,1 \pm 1,9\%$ untuk TCM-199 + 10% CFB).

Kata kunci: anjing betina, oosit, maturasi *in vitro*, cairan folikel

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan efisiensi sistem dan hasil *in vitro* maturation (IVM) pada oosit anjing. Keberhasilan IVM pada anjing tidak sebaik pada hewan domestik lainnya dikarenakan anjing memiliki maturasi dan fertilisasi yang unik dibandingkan mamalia lain. Oosit anjing mengalami maturasi di dua tempat yaitu, pemasakan pertama di dalam folikel, kemudian diovulasikan dari ovarium pada stadium *germinal vesicle* (GV) ke oviduk. Proses maturasi yang khas dari oosit anjing tersebut mengharuskan pemilihan media media kultur yang paling memadai dan sesuai. Pengadaptasian kondisi lingkungan oosit di dalam tubuh (*in vivo*) menjadi faktor yang paling penting dalam pembuatan media IVM misalnya dengan penambahan serum, sumber energi, ataupun hormon (Rodrigues dan Rodrigues, 2003). Pada bangsa anjing IVM memiliki tingkat kesuksesan yang terbatas berkisar antara $0-58\%$. Kultur media yang umum digunakan untuk IVM pada bangsa anjing adalah TCM-199 (Willingham-Rocky dkk., 2003).

Proses maturasi sitopasmik dan permulaan kembali dari meiosis oosit erat hubungannya dengan

cairan folikel, karenanya penambahan cairan folikel ke dalam media IVM adalah alasan yang logis. Banyak peneliti yang mencari efek dari penambahan media menggunakan cairan folikel pada maturasi dan perkembangan embrio (Klumpp, 2004). Belum ada penelitian yang melaporkan tentang perbandingan efek penambahan cairan folikel sapi dan babi pada media maturasi oosit anjing *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh penambahan cairan folikel sapi dan cairan folikel babi pada media maturasi terhadap maturasi oosit anjing pada stadium siklus estrus secara *in vitro* serta mengetahui stadium siklus estrus terbaik pada oosit anjing untuk IVM dan untuk memberikan informasi tentang penambahan cairan folikel yang paling tepat pada media IVM untuk menciptakan kondisi yang optimal pada maturasi inti sel oosit anjing dari stadium siklus estrus anjing yang terbaik.

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ovarium anjing (*Canis familiaris*) umur lebih dari 6 bulan yang jumlahnya 4 pasang ovarium stadium proestrus, 8 pasang ovarium

stadium diestrus, dan 6 pasang ovarium stadium anestrus, yang diperoleh melalui operasi ovariohisterektomi pada klinik praktek dokter hewan; 0,9% NaCl fisiologis; Penicillin dan Streptomycin (Sigma, USA); *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 washing {TCM powder (Gibco, USA), 1 L aquabidest, 1 % penicillin-streptomycin, NaHCO₃ 0,168 g dan 1 % Bovine Serum}; TCM-199 kultur {TCM liquid (Gibco, USA) 99 ml, pyruvic acid 0,0099 g, Penicillin dan Streptomycin (Sigma, USA) 1 ml; cairan folikel sapi dan cairan folikel babi; minyak mineral; 0,5 mg/mL hyaluronidase; 1,9 µM Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kontainer penyimpan ovarium; termometer; cawan petri; scalpel; gunting; pinset; pipet oosit; spuit dan jarum; filter 0,45 µm; *polystyrene culture dish*; mikroskop stereo/inverted; gelas objek dan cover; inkubator O₂; mikroskop UV.

Cairan folikel sapi dan babi didapatkan dari ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) dan ditransportasikan ke laboratorium Fisiologi cairan garam 0,9%. Ovarium dengan lebih dari tiga folikel dan dengan folikel yang seukuran saja yang digunakan untuk koleksi cairan folikel sapi dan cairan folikel babi. Folikel yang diaspirasi cairan folikelnya adalah folikel non-atresia dan yang berukuran besar (untuk babi: 5-8 mm dan sapi: 10-20 mm). Cairan folikel yang diaspirasi dikumpulkan dan kemudian disentrifus 3000 rpm/menit selama 5 menit, supernatan diambil dan disaring dengan filter 0,45 µm lalu disimpan dalam tube Eppendorff 1,5 ml pada suhu -20°C dan digunakan bilamana diperlukan. Konsentrasi cairan folikel sapi dan

cairan folikel babi adalah 10% pada media IVM TCM-199.

Stadium siklus estrus dievaluasi berdasarkan gambaran luar dari ovarium. Gambaran khusus yang digunakan sebagai kriteria Otoi dkk. (2002) adalah : Anestrus, ovary tanpa folikel atau jaringan lutea, Estrus (fase follikuler), terlihat adanya satu atau lebih follikel (diameter 2-10 mm), Diestrus (fase luteal), terlihat adanya satu atau lebih korpus luteum.

Koleksi oosit dilakukan dengan metode pencacahan. Metode pencacahan dilakukan dengan cara mencacah ovarium dengan menggunakan skalpel pada suhu ruangan dalam medium *Tissue Culture medium* (TCM)-199 dengan 25 mM Hepes, 1 % Bovine Serum dan 1 % larutan penicillin-streptomycin, kemudian dilakukan pemeriksaan dan seleksi di bawah mikroskop. Hanya oosit grade I dengan sitoplasma berwarna gelap dan dikelilingi oleh dua atau lebih lapisan sel kumulus yang digunakan untuk penelitian ini. Oosit yang diperoleh dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan: Kelompok 1 dikultur dalam TCM-199; Kelompok 2 dikultur dalam TCM-199 + 10% CFS; dan Kelompok 3 dikultur dalam TCM-199 + 10% CFB. Oosit dilokasikan pada 100 µl media TCM-199 kultur di *polystyrene culture dish* (35 x 10 mm; Falcon, Franklin, Lakes, NJ, U.S.A.) dan ditutup dengan minyak mineral, inkubasi pada suhu 38,5°C dan kelembaban udara 5% CO₂ selama 72 jam.

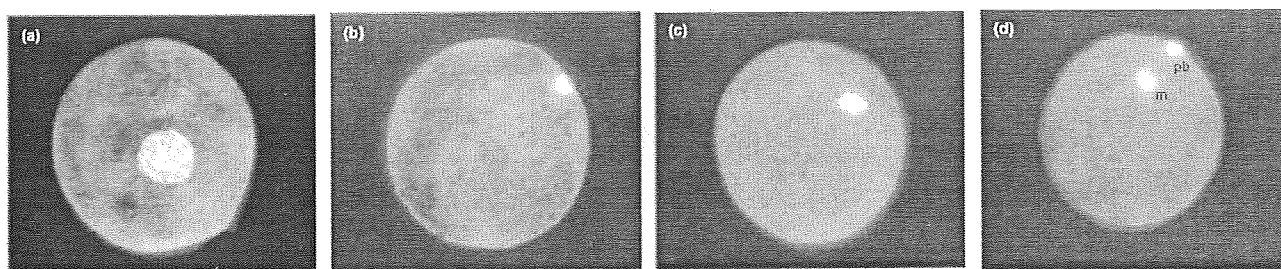
Pada akhir dari IVM, oosit dilepaskan dari sel-sel kumulus dengan memipet berulang kali selama 10 menit dalam TCM-199 + 10% serum sapi + 0,5 mg/mL hyaluronidase. Oosit yang telah hilang sel kumulusnya dicat dengan 1,9 µM Hoechst 33342 + TCM-199+ 10% serum sapi, selama 4-10 menit.

Kemudian diletakkan di atas gelas objek dan kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop ultraviolet. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji-F ANOVA (SPSS) dengan

tingkat kepercayaan $P < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik.

Tabel 1. Kriteria Penentuan Stadium Maturasi Inti Sel Oosit Mamalia.

Klasifikasi	Deskripsi
Germinal vesicle (GV)	GV (amplop inti sel) masih utuh, kromatin tersebar.
Germinal vesicle breakdown (GVBD)	Pengaturan dan kondensasi kromatin menjadi kromosom.
Metafase I (M I)	Kromosom berjajar pada spindle meiotik.
Metafase II (M II)	Pembelahan meiosis menghasilkan pengurangan jumlah kromosom dan ekspulsi badan kutub I
Degenerasi/mati	Konfigurasi abnormal kromosom/ kromatin tidak terlihat.



Gambar 1. Konfigurasi kromatin pada oosit anjing. (a) *germinal vesicle* (GV); (b) kondensasi kromatin (GVBD); (c) metafase I (MI); (d) metafase II (m) dan badan polar (pb). Perbesaran 200X (Otoi, 2001)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 54 oosit dikoleksi dari 6 pasang ovarium stadium anestrus, 85 oosit dari 4 pasang dari ovarium stadium proestrus, dan 136 oosit dari 8 pasang ovarium stadium diestrus. Hasil maturasi oosit yang dikultur pada media kontrol menunjukkan persentase GVBD yang tinggi dibandingkan media CFS dan CFB ($64,65 \pm 5,90 \%$, $37,28 \pm 6,98 \%$, $38,66 \pm 5,81 \%$, secara berurutan). Sedangkan oosit yang mencapai stadium M I proporsinya lebih tinggi pada media CFS ($35,69 \pm 6,99\%$) dibandingkan kontrol dan CFB ($14,95 \pm 4,94 \%$, $30,50 \pm 6,14 \%$, secara berurutan). Hanya oosit

pada media CFB yang tidak mencapai M II, sedangkan pada kontrol yang mencapai M II $2,08 \pm 2,08 \%$, dan CFS $2,64 \pm 1,81 \%$. Oosit stadium GVBD pada kontrol memiliki persentase yang tinggi dibandingkan kedua media dengan perlakuan (Kontrol : $64,65 \pm 5,90 \%$, CFS : $37,28 \pm 6,98 \%$, CFB : $38,66 \pm 5,81 \%$). Hal ini menunjukkan bahwa oosit yang dimaturasi pada media kontrol hanya optimum mencapai GVBD karena pada stadium M I oosit yang dapat mencapai tahap ini hanya $14,95 \pm 4,94 \%$ saja, sedangkan untuk CFS bisa mencapai $35,69 \pm 6,99\%$ dan CFB $30,50 \pm 6,14\%$.

Tidak ada pengaruh yang berbeda antara penambahan CFS dan CFB pada media terhadap

maturasi oosit ($P>0,05$), namun, media CFS dan CFB menunjukkan tingkat maturasi inti sel yang lebih baik dari kontrol pada tiap-tiap stadium meiosis. Secara umum, penambahan kedua cairan folikel tersebut pada media TCM-199 telah meningkatkan perkembangan meiosis sampai dengan stadium M I dan M II. Persentase maturasi inti sel oosit pada media CFS lebih baik hasilnya dibandingkan dengan menggunakan media CFB dilihat dari persentase oosit yang mencapai stadium M II ($2,64\pm 1,81\%$ dan $0,98\pm 0,98\%$, secara berurutan)(Tabel 2).

Oosit anjing stadium proestrus yang dimaturasi pada media kontrol menunjukkan maturasi inti sel yang kurang progresif. Persentase oosit pada stadium GV sebesar $29,11\pm 28,9\%$, GVBD

$56,21\pm 19,20\%$, dan hanya $9,79\pm 7,13\%$ saja yang mencapai M I, serta tidak ada yang mencapai M II. Persentase oosit yang tinggi pada stadium GVBD tanpa diikuti oleh persentase oosit yang meningkat pada stadium meiosis berikutnya menandakan bahwa oosit kurang memiliki kompetensi untuk melanjutkan meiosis dalam media kontrol. Pada kedua media perlakuan yang ditambah dengan cairan folikel, oosit stadium proestrus menunjukkan maturasi inti sel yang progresif mulai dari GV sampai dengan M I, walaupun tidak ada yang mencapai M II pada keduanya. Oosit yang degenerasi atau tidak teridentifikasi terdapat pada media kontrol ($4,9\pm 3,5\%$) dan pada media CFB ($25,0\pm 50,0\%$)(Tabel 3).

Tabel 2. Tahap meiosis dari oosit anjing yang dikultur dalam media TCM-199 yang diberi tambahan 10% cairan folikel sapi (CFS) dan 10% cairan folikel babi (CFB)

Media	Σ oosit	Stadium maturasi inti sel (%)				
		GV	GVBD	MI	MII	D/NI
Kontrol	113	$16,60 \pm 4,80^a$	$64,65 \pm 5,90^a$	$14,95 \pm 4,94^a$	$2,08 \pm 2,08^a$	$1,72 \pm 1,02^a$
CFS	66	$15,10 \pm 4,93^a$	$37,28 \pm 6,98^b$	$35,69 \pm 6,99^b$	$2,64 \pm 1,81^a$	$9,29 \pm 3,43^a$
CFB	96	$23,00 \pm 6,59^a$	$38,66 \pm 5,81^b$	$30,50 \pm 6,14^b$	$0,98 \pm 0,98^a$	$6,86 \pm 5,90^a$

Keterangan :

Kolom dengan huruf superskrip yang berbeda (^{a-c}) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P<0,05$); GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metafase I; MII: metafase II, dan D/NI: degenerated/non identifiable.

Maturasi inti sel oosit stadium diestrus menunjukkan progresi yang baik hingga mencapai stadium M II. Pada media kontrol oosit stadium GV sebanyak $12,8\pm 4,9\%$ yang kemudian mencapai GVBD sebanyak $56,9\pm 22,2\%$ dan hanya $25,0\pm 23,6\%$ mencapai M I serta $4,2\pm 1,8\%$ pada M II. Proporsi persentase oosit pada media CFS

meningkat mulai dari GV hingga M I walaupun yang mencapai M II hanya sebesar $5,7\pm 4,0\%$ saja dari $40,4\pm 23,8\%$ oosit yang mencapai M I, dengan oosit D/NI sebesar $16,0\pm 2,7\%$. Pada media CFB oosit mencapai M II meskipun persentasenya tidak sebanyak pada media kontrol dan CFS. Pada ketiga media, oosit stadium diestrus mencapai stadium M

II, walaupun demikian, media CFS lebih baik daripada dua media lain karena maturasi inti sel oositnya lebih progresif (Tabel 3).

Tabel 3. Tahap meiosis dari oosit anjing yang diambil dari ovarium yang berbeda stadium estrusnya dan dikultur dalam media TCM-199 yang diberi tambahan 10% cairan folikel sapi (CFS) dan 10% cairan folikel babi (CFB)

Stadium estrus	Tambahan Media	Σ oosit	Stadium maturasi inti sel (%)				
			GV	GVBD	MI	MII	D/NI
Anestrus	Kontrol	18	11,5 ± 5,7 ^a	88,5 ± 15,7 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	CFS	13	20,8 ± 14,4 ^a	60,4 ± 31,5 ^a	12,5 ± 4,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	6,3 ± 2,5 ^b
	CFB	23	25,7 ± 18,3 ^a	44,0 ± 25,1 ^b	30,3 ± 21,5 ^c	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Proestrus	Kontrol	40	29,1 ± 28,2 ^a	56,2 ± 19,2 ^a	9,8 ± 7,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	4,9 ± 3,5 ^a
	CFS	17	13,3 ± 3,1 ^b	29,5 ± 10,0 ^a	57,2 ± 15,9 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	CFB	28	7,5 ± 5,0 ^b	29,2 ± 21,3 ^a	38,2 ± 25,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	25,0 ± 5,0 ^b
Diestrus	Kontrol	55	12,8 ± 4,9 ^a	56,9 ± 22,2 ^a	25,0 ± 23,6 ^a	4,2 ± 1,8 ^a	1,0 ± 0,8 ^a
	CFS	36	12,2 ± 9,5 ^a	25,7 ± 16,0 ^b	40,4 ± 23,8 ^a	5,7 ± 4,0 ^a	16,0 ± 2,7 ^b
	CFB	45	29,1 ± 5,7 ^b	40,0 ± 26,2 ^a	26,7 ± 9,5 ^a	2,1 ± 1,9 ^b	2,1 ± 1,9 ^a

Keterangan :

Kolom dengan huruf superskrip yang berbeda (^{a-c}) menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05); GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; MI, metafase I; MII, metafase II; D/NI, degenerated/non identifiable.

Persentase maturasi inti sel oosit stadium anestrus menunjukkan adanya proporsi yang besar pada oosit stadium GVBD (kontrol: 88,5±15,7%, CFS: 60,4±31,5%, CFB: 44,0±25,1%), hanya beberapa persen saja yang mencapai M I (kontrol: 0%, CFS: 12,5±4,4%, CFB : 30,3±21,5%) bahkan tidak ada yang mencapai M II. Oosit D/NI hanya terdapat pada media CFS sebesar 6,3±2,5% (Tabel 5).

Tingkat maturasi inti sel oosit dari keseluruhan stadium estrus menunjukkan bahwa kelompok oosit yang dikoleksi dari ovarium diestrus memiliki persentase progresi meiosis yang terbaik dibandingkan dengan kelompok proestrus dan

anestrus setelah dimaturasi pada ketiga media. Baik pada media kontrol, CFS ataupun CFB tidak ada oosit yang mencapai M II pada stadium anestrus dan proestrus, sedangkan pada stadium diestrus, oosit yang mencapai M II sebesar 4,2±1,8% untuk kontrol, 5,7±4,0% untuk CFS, dan 2,1± 1,9% untuk CFB. Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh dari stadium siklus estrus terhadap keberhasilan maturasi *in vitro* oosit anjing, seperti yang telah diteliti oleh Luvoni dkk. (2001). Hasil ini didukung penelitian sebelumnya oleh Willingham-Rocky dkk. (2003) bahwa oosit yang dikoleksi dari ovarium stadium estrus dan diestrus angka maturasi M II-nya lebih tinggi daripada oosit stadium proestrus dan anestrus.

Setelah dikultur dalam TCM-199 dan SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*), angka maturasi M II oosit stadium diestrus lebih tinggi daripada proestrus. Hasil lain juga diperoleh oleh Lopez dkk., (2007) bahwa oosit pada stadium diestrus memiliki kecenderungan tinggi (34%) untuk melanjutkan meiosis.

Luvoni dkk. (2001) menyatakan bahwa oosit pada stadium estrus memiliki kemampuan melanjutkan meiosis. Persentase meiosis yang tinggi dari oosit pada ovarium stadium estrus mungkin dikarenakan adanya lingkungan folikular yang diperkaya oleh estradiol, progesteron, dan faktor-faktor lain yang tidak diketahui serta adanya komunikasi selular antara oosit dan sel-sel granulosa teramati pada awal proestrus penting dalam kemampuan meiosis. Komunikasi antara sel granulosa dan oosit sangat penting karena berfungsi menyuplai nutrisi dari sel-sel folikel. Berdasarkan fakta, diketahui bahwa progesteron akan mendesak efek stimulasi dari MPF pada oosit, dimana MPF bertanggung jawab untuk GVBD (Salustri dkk., 1993).

Tiga kultur sistem dibandingkan pada kelompok oosit stadium anestrus, didapatkan persentase yang tinggi pada stadium GVBD ketiga media, tetapi persentase oosit pada M I menurun pada ketiganya dan tidak ada yang mencapai M II. Hal ini menunjukkan bahwa oosit kelompok anestrus kurang baik untuk dimaturasi *in vitro*. Menurut Martins dkk. (2006), 20% oosit dari stadium anestrus mampu melanjutkan meiosis (dengan GVBD yang jelas), dan 10% melampaui stadium M I *in vitro*, terlepas dari media kultur yang digunakan. Hasil ini didukung oleh Rota dan Cagianca (2004) yang

mematurasi oosit dari anjing betina anestrus selama 72 jam dan hanya sedikit oosit yang mencapai stadium M II (1,3%) pada TCM-199 dan 0% pada SOF walaupun sejumlah besar oosit teridentifikasi pada stadium GVBD (68,6% pada TCM-199 dan 56,9% pada SOF).

Menurut Yamada dkk., (1993) oosit dari stadium anestrus memiliki kecenderungan yang rendah untuk memulai kembali meiosis dibandingkan dengan oosit preovulatori. Komunikasi kumulus-oosit tidak terbuka pada kompleks kumulus oosit stadium anestrus dan hal ini mengurangi kompetensi meiosis dan kemampuan untuk mencapai M II pada kultur (Luvoni dkk., 2001).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa penggunaan cairan folikel sebagai suplemen pada media maturasi TCM-199 efektif meningkatkan maturasi inti sel oosit anjing. Hasil yang lebih baik didapatkan pada media dengan penambahan 10% cairan folikel sapi daripada penambahan 10% cairan folikel babi.

Adanya peningkatan pada perkembangan meiosis oosit anjing pada media maturasi dengan penambahan cairan folikel sapi dan babi didukung oleh beberapa hasil penelitian. Shemes, (1979) menyimpulkan bahwa cairan folikel menghambat produksi progesteron dan $PGF_{2\alpha}$. Cairan folikel sapi dari folikel mid-siklus menghambat sintesa $PGF_{2\alpha}$ begitu pula luteinisasi folikel, sedangkan

Yoshida dkk., (1992) menunjukkan bahwa cairan folikel babi mengandung substansi yang meningkatkan laju ekspansi kumulus, maturasi nukleus, normal fertilisasi dan perkembangan yang normal, yang dicirikan dengan adanya substansi asam yang berat molekulnya antara 10 s.d. 200 kDa.

Hal ini didukung oleh hasil penelitian Ito dkk. (2007) yang menemukan adanya beberapa protein yang hadir pada cairan folikel dari folikel besar yang berat molekulnya berkisar antara 30 s.d. 100 kDa yang dapat meningkatkan kompetensi perkembangan oosit melalui progresi dari maturasi inti sel dan viabilitas kumulus sel.

Penambahan cairan folikel sapi pada media IVM telah dilakukan oleh Avery dkk., (2002). Penelitian ini menggunakan cairan folikel dari folikel sapi diameter 3-15 mm dan dari folikel preovulatori. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan, cairan folikel dari folikel preovulatori mendukung maturasi inti sel oosit sapi tetapi tidak untuk perkembangan embrionik lebih lanjut dilihat dari tingginya tingkat M II dan rendahnya tingkat blastosit. Cairan folikel yang berasal dari folikel berdiameter lebih dari 8 mm meningkatkan kompetensi perkembangan oosit sapi dengan konsentrasi penambahan cairan folikel yang berbeda-beda (1%, 5%, dan 10%) pada media maturasi (Ali dkk., 2004).

Beberapa penelitian menyebutkan, bahwa penambahan cairan folikel ke media maturasi dapat berperan dalam penurunan tingkat maturasi sebagaimana diteliti oleh Choi dkk. (1998). Penurunan tingkat maturasi juga dilaporkan oleh Ayoub dan Hunter (1993) ketika cairan folikel sapi ditambahkan ke media maturasi. Cairan folikel yang diaspirasi dari folikel besar, sedang maupun kecil mampu menghambat GVBD, terutama menuju ke produksi embrio yang rendah. Dari hasil penelitian diketahui persentase oosit D/NI yang tinggi pada media CFS $9,29 \pm 3,43\%$ (Tabel 4). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa cairan folikel memiliki kemampuan inhibitori permulaan meiosis

pada maturasi *in vitro*. Asam linolaet, asam lemak yang paling banyak pada cairan folikel, telah diketahui menghambat meiosis dari oosit sapi (Homa dan Brown, 1992). Selain itu, cAMP, OMI, hipoksantine, inhibin memiliki efek negatif terhadap oosit sebelum ditempatkan ke dalam media maturasi (Bilodeau dkk., 1993).

Penelitian ini menyimpulkan bahwa penambahan 10% cairan folikel sapi dan babi ke dalam media TCM-199 pada maturasi *in vitro* oosit anjing dapat meningkatkan maturasi oosit anjing. Penambahan cairan folikel sapi pada media TCM-199 memberikan hasil yang lebih baik terhadap persentase perkembangan stadium meiosis tiap-tiap stadium siklus estrus dibandingkan dengan penambahan cairan folikel babi. Stadium siklus estrus berpengaruh terhadap keberhasilan IVM oosit anjing dan oosit dari stadium diestrus memiliki kompetensi yang baik untuk IVM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur PHKA2 Fakultas Kedokteran Hewan tahun 2007 yang telah membiayai penelitian ini dengan dana PHKA2 Bacth I, sehingga penelitian ini berjalan dengan baik dan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., Sirard, M.A. 2004. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 62: 1596-1606.
- Avery, B., Strobeck, L., Jacobsen, T., Bogh, I.B., Greve, T. 2003. *In vitro* maturation of bovine

- cumulus-oocytes complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology* 59:987-999.
- Ayoub, M.A., Hunter, A.G. 1993. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Dairy Sci* 76: 95-100.
- Choi, Y.H., Takagi, M., Kamishita, H., Wijayagunawardane, M.P., Acosta T.J., Miyazawa, K., Sato, K. 1998. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Anim Reprod Sci* 50:27-33.
- Homa, S.T., Brown, C.A. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *J. Reprod Fertil* 94: 153-160.
- Ito, M., Iwata, H., Kitagawa, M., Kon, Y., Kuwayama, T., Monji, Y. 2007. Effect of follicular fluid collected from various diameter on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Anim Reprod Sci (Abstract)*.
- Klumpp, A.M. 2004. The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development. A Thesis The Interdepartmental Program in Animal Sciences. B.S., Louisiana State University.
- Lopez, G., Sousa, M., Luvoni G.C., Rocha, A. 2007. Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine cumulus oocyte-complexes collected from anestrus or diestrus bitches of different ages. *Theriogenology* 68:821-825.
- Luvoni, G.C., Luciano, A.M., Modina, S., Gandolfi, F. 2000. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocytes on the efficiency of in vitro maturation. *J. Reprod Fertil Suppl* 57: 141-146.
- Martins, L.R., Ponchirollil C.B., Beier, S.L., Landim-Alvarenga, F.C., Lopes, M.D. 2006. *Analysis of Nuclear Maturation in In Vitro Matured Oocytes From Estrous and Anestrous Bitches*. *Anim. Reprod.* 3(1):49-54.
- Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 60: 59-66.
- Salustri, A., Hascall, V.C., Camainoni, A., Yanagishita, M. 1993. Oocyte-Granulosa Cell Interactions. In: Adashi EY, Leung PC. (Ed.). *The ovary*. New York Raven Press Pp. 209-225.
- Shemes, M. 1979. Inhibitory action of follicular fluid on progesterone and prostaglandin synthesis in bovine follicles. *J. Endocrinol* 82: 27-31.
- Willingham-Rocky, L.A., Hinrichs, K., Westhusin, M.E., Kraemer, D.C. 2003. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation canine oocyte in vitro. *Reproduction* 126: 501-508.
- Yamada S., Shimazu Y., Kawano Y., Nakazawa m. Naito K., Toyoda Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*, 47: 227-229.
- Yoshida, M., Ishizaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K., Kojima, Y. 1992. Effect of pig follicular fluid on maturation of pig oocyte in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod Fertil* 95: 481-8.