

**PEMASAKAN OOSIT ANJING (*Canis familiaris*) PADA STADIUM ANESTRUS DAN DIESTRUS
PADA MEDIA MATURASI YANG DIPERKAYA CAIRAN FOLIKEL SAPI 10% DENGAN
PENAMBAHAN *FOLLICLE STIMULATING HORMONE* (FSH) DAN
LUTEOTROPIC HORMONE (LH)**

MATURATION OF OOCYTES OF DOG (*Canis familiaris*) AT DIESTRUS AND ANESTRUS
IN MATURATION MEDIA ENRICHED WITH 10% BOVINE FOLLICULAR FLUID
AND THE ADDITION OF LUTEOTROPIC HORMONE DAN
FOLLICLE STIMULATING HORMONE

Yuda Heru Fibrianto¹, Amelia Hanna¹, Tri Wahyu Pangestiningih², Pradityo Yoga Wibowo¹,
Claude Mona Airin¹

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

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

Email: fibrianto1802@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to find out the effect difference between the addition of FSH and LH enriched with 10% bovine follicular fluid for maturation media on dog oocytes at diestrus and anestrus stages of estrus cycle. Ovaries were obtained from ovariohysterectomized bitches from a clinical veterinary practice. Ovaries were placed in 0.9 % physiological saline added with 1% penicillin-streptomycin at 37°C and brought to laboratory. Ovaries were washed several times using *phosphat buffered saline* (PBS). Oocytes were obtained by slicing ovarian tissue in tissue culture medium (TCM-199) supplemented with 25mM Hepes, 1% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. They were inspected and selected under microscope. Grade I *cumulus oocyte complexes* (COCs) were collected from diestrus and anestrus bitch ovaries and cultured for 72 hours (38.5°C, 5% O₂) in four different group media, namely TCM-199 supplemented with 10% bovine follicular fluid (medium A), medium A added with 0.005 IU of FSH, medium A added with 4 IU of LH, and medium A added with 0.005 IU of FSH and 4 IU of LH. Cultured, cumulus cells were removed from the culture 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 (Sigma, 1,9 µM) staining for fluorescence microscopy. Data were analyzed by ANOVA. The result shows that the percentage of oocytes which reached M II stage was 3.61±6.4%, GV 2.92±4.86%, GVBD 52.60±15.16%, while M I was 34.07±14.63%. Oocytes from anestrus ovaries showed the best meiosis progression of nuclear maturation as M II (4.37±5.52%), GV (4.05±5.08%), GVBD (45.44±15.30%), and M I (34.61±16.13%) compare with diestrus (2.86±7.56%), GV (1.79±4.72%), GVBD (59.77±11.99%), M I (33.54±14.24%). The result indicated that addition FSH and LH increase the proportion of nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*.

Key words: bitch, oocyte, *in vitro* maturation, gonadotropin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penambahan hormon gonadotropin pada media pemasak yang diperkaya cairan folikel sapi 10% terhadap proses pertumbuhan dan pemasakan oosit anjing pada stadium diestrus dan anestrus secara *in vitro*. Ovarium anjing betina yang digunakan diperoleh dari anjing betina yang dilakukan operasi ovariohisterektomi di praktek klinik hewan dan ditempatkan dalam larutan 0,9 % larutan garam fisiologis ditambah 1% larutan penicillin-streptomycin dengan temperatur 37°C dan langsung dibawa ke

laboratorium. Ovarium dicuci beberapa kali dengan *phosphat buffered saline* (PBS) kemudian pengoleksian kompleks kumulus oosit dilakukan dengan mencacah ovarium dalam *Tissue Culture Medium* (TCM-199) yang ditambah dengan 25mM Hepes, 1% fetal bovine serum (FBS) dan 1% penicillin-streptomycin dan diseleksi dibawah mikroskop. Kompleks kumulus oosit grade I dikoleksi dari ovarium stadium anestrus dan diestrus, dikultur selama 72 jam (38,5°C, 5% O₂) pada keempat kelompok media perlakuan yaitu TCM-199 dengan penambahan 10% cairan folikel sapi (media A), media A ditambah FSH 0,005 IU, media A ditambah LH 4 IU, dan media A ditambah FSH 0,005 IU dan LH 4 IU. Setelah dikultur, kumulus sel dihilangkan dengan memipet berulang kali kompleks kumulus oosit dalam 0,5 mg/ml hyaluronidase. Evaluasi stadium perkembangan meiosis (GV, GVBD, M I, M II, D/NI) dilakukan dengan mikroskop flouresen setelah pengecatan menggunakan Hoechst 33342 (Sigma, 1,9 µM). Data dianalisa dengan menggunakan metode uji F ANOVA. Hasil penelitian adalah sebagai berikut: maturasi inti sel oosit pada media yang ditambah FSH lebih baik (P<0,05), dilihat dari persentase oosit yang mencapai M II (3,61±6,4%), dengan tingkat perkembangan GV: 2,92±4,86%, GVBD: 52,60±15,16%, M I: 34,07±14,63%. Kelompok oosit dari ovarium stadium anestrus memiliki persentase progresi meiosis yang lebih baik M II (4,37±5,52%), GV: 4,05±5,08%, GVBD: 45,44±15,30%, M I: 34,61±16,13% dibandingkan stadium diestrus (2,86±7,56%), GV: 1,79±4,72%, GVBD: 59,77±11,99%, M I: 33,54±14,24%. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan hormon gonadotrophin pada media maturasi TCM-199 meningkatkan maturasi *in vitro* inti sel oosit anjing.

Kata kunci: anjing betina, oosit, maturasi *in vitro*, hormon gonadotrophin

PENDAHULUAN

Efisiensi dari *in vitro maturation* (IVM) oosit sangat rendah pada spesies anjing dibandingkan dengan spesies mamalia lain dan hal ini membatasi perkembangan bioteknologi reproduksi seperti produksi embrio secara *in vitro*, kriopreservasi, atau transfer nukleus pada bangsa anjing (Luvoni dkk., 2004). *Canis familiaris* dapat digunakan sebagai model yang bernilai untuk mempelajari dan mengembangkan reproduksi bantuan bagi bangsa anjing yang terancam punah berdasarkan hubungan taksonominya.

Beberapa peneliti di Korea berhasil mengkloning seekor anjing Afghanhound yang merupakan kloning anjing pertama di dunia (Lee dkk., 2005). Keberhasilan teknologi kloning pada anjing ini merupakan terobosan baru di dalam dunia keilmuan, walaupun oosit yang digunakan adalah oosit yang telah masak secara alami di dalam tubuh (*in vivo*) dari anjing yang digunakan sebagai pendonor oosit. Pemakaian oosit yang masak secara

in vivo dikarenakan kurang keberhasilan pemasakan oosit secara *in vitro* yang umumnya dilakukan pada kloning hewan lain.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan efisiensi sistem dan hasil dari IVM pada anjing. Laju pemasakan oosit anjing *in vitro* masih sangatlah rendah (<20%) (Hewitt dan England, 1999; Luvoni dkk., 2001, 2003; Otoi dkk., 2000; Songsasen, 2002; Reyes dkk. 2005) diiringi dengan tingginya hal yang tidak terduga dibanding dengan mamalia lain seperti sapi ataupun babi (Saha dkk., 2002; Telfer dkk., 2000; Hyun dkk., 2003).

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 (Johnston, 2001).

Proses maturasi yang khas dari oosit anjing tersebut mengharuskan pemilihan 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 (Nickson dkk., 1993; Hewitt dan England, 1997, 1999; Hewitt dkk., 1998; Otoi dkk., 1999; Songsasen, 2002, 2003; Rodrigues dan Rodrigues, 2003; Reyes dkk. 2005).

Pada bangsa anjing IVM memiliki tingkat kesuksesan yang terbatas berkisar antara 0-58% (Farstad, 2000). Kultur media yang umum digunakan untuk IVM pada bangsa anjing adalah TCM-199 (Hewitt dan England, 1997; Hewitt dkk., 1998; Otoi dkk., 2000; Songsasen dkk., 2002; Rodrigues dan Rodrigues, 2002, 2003; Luvoni dkk., 2003; Willingham-Rocky dkk., 2003; Reyes dkk. 2005).

Proses maturasi sitoplasmik dan permulaan kembali dari meiosis oosit erat hubungannya dengan cairan folikel, sedangkan GnRH erat hubungannya dengan proses perkembangan folikel karenanya penambahan cairan folikel dan GnRH ke dalam media IVM adalah alasan yang logis. Penambahan cairan folikel sapi pada media IVM mempunyai tingkat maturasi oosit yang tinggi (Soewarno, 2008).

Banyak peneliti yang mencari efek dari penambahan media menggunakan cairan folikel pada maturasi dan perkembangan embrio (Klumpp, 2004), ada pula peneliti yang menggunakan penambahan hormon pada media kultur IVM (Reyes dkk. 2005). Belum ada penelitian yang melaporkan tentang penggunaan cairan folikel sapi dan GnRH pada media maturasi oosit anjing *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penambahan hormon gonadotrophin pada media pemasak yang diperkaya cairan folikel

sapi terhadap proses pertumbuhan dan pemasakan oosit anjing pada stadium anestrus dan diestrus secara *in vitro*

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ovarium anjing (*Canis familiaris*); 0,9% NaCl; Penicillin dan Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA); *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 *washing* (TCM *powder* (Gibco, USA), 1 L aquabides, 1 % penicillin-streptomycin (Sigma, St. Louis, USA), dan NaHCO₃ (Sigma, St. Louis, USA) 0,168 g); TCM-199 kultur (TCM *liquid* (Gibco, USA) 99 ml, *pyruvic acid* (Sigma, St. Louis, USA) 0,0099 g, Penicillin dan Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA) 1 ml); cairan folikel sapi; GnRH (LH (Chorulon, Antrin[®], Denka, Kanagawa, Japan) dan FSH (Foligon, Antrin[®], Denka, Kanagawa, Japan)); minyak mineral (Sigma, St. Louis, USA); 0,5 mg/mL hyaluronidase (Sigma, St. Louis, USA); 1,9 µM Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, USA).

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 flouresen.

Ovarium sapi didapatkan dari Rumah Potong Hewan dan ditransportasikan ke laboratorium Fisiologi. Ovarium sapi dengan lebih dari tiga folikel dan dengan folikel yang seukuran saja yang digunakan untuk koleksi cairan folikel sapi. Folikel yang diaspirasi cairan folikelnya adalah folikel non-atresia dan yang berukuran besar (1-2 cm).

Kriteria folikel menurut Kruip dan Dieleman (1982) adalah folikel non-atresia: tampilan tembus cahaya, ekstensif dan tervaskularisasi dengan baik, tidak terdapat partikel yang terapung pada cairan folikel. Folikel atresia: hilangnya daya tembus cahaya, tampilannya pudar, keabu-abuan atau opaq, dan terdapat partikel yang bebas terapung dalam cairan folikel.

Cairan folikel yang diaspirasi dikumpulkan kemudian disentrifus 3000 rpm/menit selama 5 menit, supernatan diambil dan disaring dengan filter 0,45 µm lalu disimpan dalam tabung Eppendorff 1,5 ml pada suhu 0-2°C. Konsentrasi cairan folikel sapi yaitu 10% pada media IVM TCM-199.

Lutotropic hormone (Chorulon, Antrin®, Denka, Kanagawa, Japan) 1500 IU, diencerkan dengan menambahkan TCM-199 2,5 ml. Kemudian pengenceran tadi diambil 20 µl dan dimasukkan kedalam tabung Eppendorff 1,5 ml lalu ditambah lagi dengan TCM-199 0,8 ml. Saat akan digunakan sebagai media tanam, dari pengenceran terakhir diambil 20 µl dan ditambah dengan TCM-199 + 10% cairan folikel sapi 0,8 ml sehingga diperoleh konsentrasi LH 4 IU/ml.

Follicle stimulating hormone (Foligon, Antrin®, Denka, Kanagawa, Japan) 1000 IU, diencerkan dengan menambahkan TCM-199 6,8 ml sehingga konsentrasinya menjadi 0,5 IU/ml. Saat akan digunakan sebagai media tanam, dari pengenceran tersebut diambil 10 µl dan dimasukkan dalam tabung Eppendorff 1,5 ml lalu ditambah dengan TCM-199 + 10% cairan folikel sapi 0,9 ml sehingga diperoleh konsentrasi FSH 0,005 IU/ml.

Ovarium dikoleksi dari anjing betina berumur lebih dari 6 bulan dari pasien ovariohisterektomi pada klinik dokter hewan. Ovarium ditempatkan

dalam 0,9% NaCl pada suhu 37°C dan dibawa ke laboratorium Fisiologi dalam waktu 1 jam. Ovarium dicuci dengan TCM-199 *washing* dan stadium ovarium diklasifikasikan berdasarkan gambaran luarnya menurut Otoi dkk, (2002) sebagai berikut: Anestrus adalah ovarium tanpa folikel atau jaringan lutea, Diestrus adalah ovarium yang terlihat adanya satu atau lebih korpus luteum

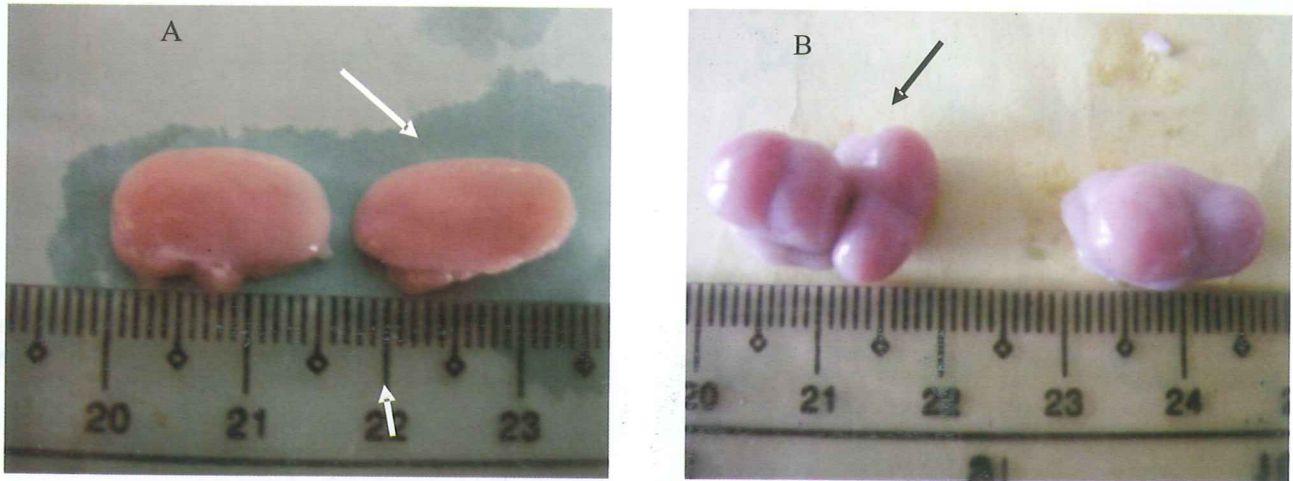
Ovarium ditempatkan dalam larutan NaCl 0,9% 37°C dan dibawa ke laboratorium Fisiologi dalam waktu 1 jam. Ovarium dicacah untuk melepaskan oosit di dalam TCM-199 dengan 0,168 g NaHCO₃, 1% larutan penicillin-streptomycin. Koleksi oosit dengan metode dicacah lebih banyak melepaskan oosit dalam ovarium dibandingkan dengan metode pungsi folikel (Fujii dkk. 2000).

Oosit yang digunakan hanya oosit yang diklasifikasikan sebagai grade I yaitu oosit dengan diameter lebih dari 100 µm, dikelilingi oleh lebih dari 2 lapis sel kumulus dan sitoplasmanya gelap (Hewitt dan England, 1997). Oosit dicuci sebanyak 3 kali dengan TCM-199 *washing* dan dipindahkan ke dalam TCM-199 kultur.

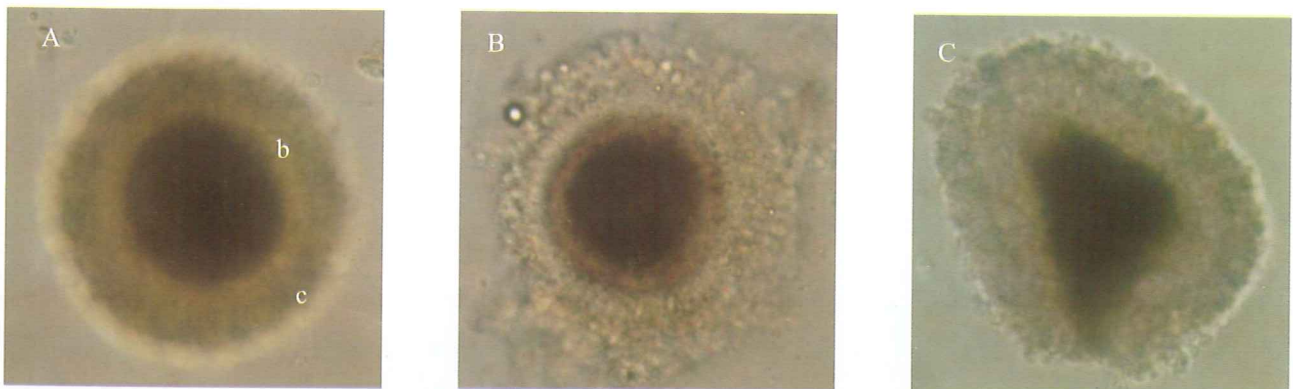
Oosit grade I dari stadium anestrus dan diestrus dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, kelompok 1: dikultur dalam TCM-199 + 10% cairan folikel sapi; kelompok 2: dikultur dalam TCM-199 + 10% cairan folikel sapi + 0.005 IU FSH; kelompok 3: dikultur dalam TCM-199 + 10% cairan folikel sapi + 4 IU LH; kelompok 4: dikultur dalam TCM-199 + 10% cairan folikel sapi + 0.005 IU FSH + 4 IU LH (1:1).

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% O₂ selama 72 jam.



Gambar 1. Ovarium anjing fase anestrus (A) dan diestrus (fase luteal) (B). Ovarium tanpa folikel atau jaringan luteal, permukaan ovarium halus dan bersih (tanda panah putih) pada fase anestrus dan corpus luteum pada fase diestrus (tanda panah hitam)



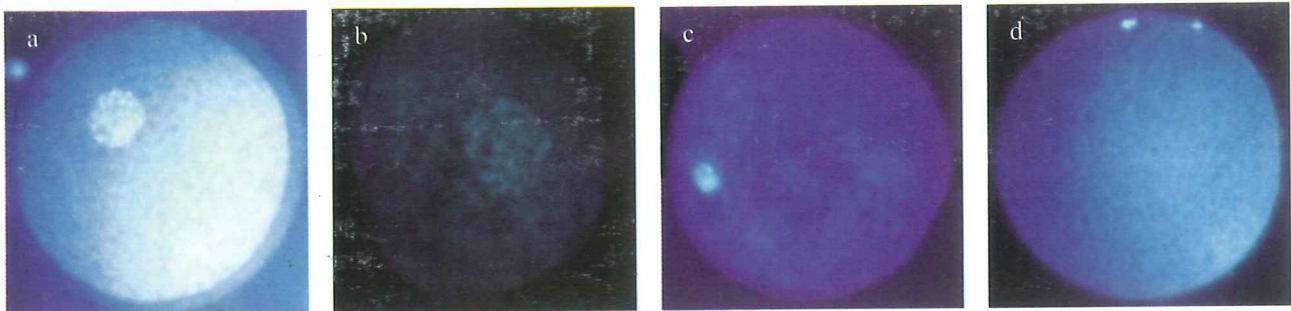
Gambar 2. Sel telur/oosit anjing, Oosit *grade 1* dengan warna sitoplasma gelap dan homogen yang sepenuhnya dikelilingi oleh satu atau lebih lapisan sel kumulus (A); oosit *grade 2* dengan warna sitoplasma yang kurang homogen dan sel kumulus yang tidak merata, oosit *grade 3* dengan sitoplasma yang tidak baik/membulat dan warna yang tidak homogen. a. Sitoplasma; b. Zona pelusida, c. Sel kumulus (perbesaran 200x optical zoom).

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

TCM-199 *washing*, selama 4-10 menit. Lalu diletakan di atas gelas objek dan kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop flouresen, inti sel akan berpendar kebiru-biruan.

Tabel 1. Kriteria Penentuan Stadium Maturasi Inti Sel Oosit Mamalia (Kim dkk. 2004)

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 spindel 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 3. Konfigurasi kromatin pada oosit anjing dengan pengecatan Hoechst 33342, diamati dengan mikroskop fluoresen. (a) *germinal vesicle* (GV); (b) kondensasi kromatin (GVBD); (c) metafase I (M I); (d) metafase II (perbesaran 400x optical zoom).

Persentase maturasi inti sel serta degenerasi oosit anjing antara perlakuan dari stadium anestrus dan diestrus dianalisis secara statistik menggunakan uji-F ANOVA. Tingkat kepercayaan $P < 0,05$ menunjukkan signifikansi secara statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian ini diperoleh oosit sebanyak 257 dikoleksi dari ovarium stadium anestrus dan 214 oosit dikoleksi dari ovarium dengan stadium diestrus, dan dikultur selama 72 jam dalam empat media yang berbeda.

Tabel 2. Maturasi Inti Sel Oosit Anjing Anestrus dan Diestrus Dikultur pada Media IVM (mean±SD)

Kelompok	Σ oosit	Stadium maturasi inti sel (%)				
		GV	GVBD	MI	MII	D/NI
I	116	8,31±12,04 ^a	55,36±14,64 ^a	34,19±19,09 ^a	0,00±0,00 ^a	2,14±5,79 ^a
II	119	2,92±4,86 ^b	52,60±15,16 ^a	34,07±14,63 ^a	3,61±6,4 ^b	6,79±11,51 ^a
III	128	12,48±12,83 ^a	53,17±15,16 ^a	30,97±14,41 ^a	0,00±0,00 ^a	3,34±6,15 ^a
IV	108	8,61±14,69 ^a	62,38±22,35 ^a	24,97±21,37 ^a	0,71±2,67 ^a	3,32±5,52 ^a

Keterangan :

Kolom dengan huruf superskrip yang berbeda (a-b) menunjukkan signifikansi ($P < 0,05$)

Kelompok : I (TCM-199 + 10% cairan folikel sapi), II (kontrol + FSH), III (kontrol + LH), IV (kontrol + FSH + LH), GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metafase I, MII: metafase II, dan D/NI: degenerated/non identifiable.

Tabel 3. Pengaruh FSH dan LH dari Ovarium Anestrus pada Berbagai Stadium Perkembangan Setelah Maturasi (mean±SD)

Stadium estrus	Kelompok	Σ oosit	Stadium maturasi inti sel (%)				
			GV	GVBD	MI	MII	D/NI
Anestrus	I	64	6,69±10,63 ^a	54,81±18,18 ^a	37,07±19,61 _a	0,00±0,00 ^a	1,43±3,78 ^a
	II	70	4,05±5,08 ^a	45,44±15,30 ^a	34,61±16,13 _a	4,37±5,52 ^b	11,54±14,33 _b
	III	67	14,63±15,19 ^b	58,62±11,37 ^a	24,12±8,28 ^b	0,00±0,00 ^a	2,62±4,49 ^a
	IV	56	1,29±3,44 ^a	59,61±21,72 ^a	33,06±21,55 _a	1,43±3,78 ^a	4,60±5,75 ^a
Diestrus	I	52	9,92±13,97 ^a	55,91±11,53 ^a	31,31±19,65 _a	0,00±0,00 ^a	2,86±7,56 ^a
	II	49	1,79±4,72 ^b	59,77±11,99 ^a	33,54±14,24 _a	2,86±7,56 ^b	2,04±5,39 ^a
	III	61	10,32±10,74 ^a	47,71±17,29 ^a	37,80±16,49 _a	0,00±0,00 ^a	4,16±7,76 ^b
	IV	52	15,91±18,19 ^a	65,15±24,34 ^b	16,89±19,29 ^b	0,00±0,00 ^a	2,04±5,39 ^a

Keterangan:

Kolom dengan huruf superskrip yang berbeda (a-b) menunjukkan signifikansi (P<0,05)

Kelompok : I (TCM-199 + 10% cairan folikel sapi), II (kontrol + FSH), III (kontrol + LH), IV (kontrol + FSH + LH); GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle breakdown, MI: metafase I, MII: metafase II, dan D/NI: degenerated/non identifiable.

Perolehan tingkat pemasakan oosit pada berbagai media kultur adalah sebagai berikut: pada media kontrol (TCM 199 + 10% cairan folikel sapi) diperoleh tingkat pemasakan GV, GVBD, MI, dan MII berturut-turut sebesar 8,31±12,04%, 55,36±14,64%, 34,19±19,09%, dan 0,00±0,00%. Media FSH (media kontrol + FSH) diperoleh tingkat pemasakan oosit pada GV, GVBD, MI, MII berturut-turut sebesar 2,92±4,86%, 52,60±15,16%, 34,07±14,63%, 3,61±6,4%. Pada media LH (media kontrol + LH) diperoleh tingkat pemasakan oosit pada GV, GVBD, MI, MII berturut-turut sebesar 12,48±12,83%, 53,17±15,16%, 30,97±14,41%, 0,00±0,00%. Pada pencampuran kedua media FSH + LH (media kontrol + FSH + LH) diperoleh tingkat pemasakan oosit pada tingkat GV, GVBD, MI, MII berturut-turut sebesar 8,61±14,69%, 62,38±22,35%,

24,97±21,37%, 0,71±2,67% (Tabel 2).

Dari data yang diperoleh media FSH mencapai stadium M II tertinggi sebesar 3,61±6,4%, kemudian media FSH+LH mencapai perkembangan M II sebesar 0,71±2,67%. Pada media kontrol dan LH tidak ada pencapaian stadium M II.

Pada stadium M I persentase tertinggi dengan menggunakan media kontrol sebesar 34,19±19,09%. Penggunaan media FSH diperoleh hasil sebesar 34,07±14,63%, diikuti oleh penggunaan media LH sebesar 30,97±14,41%, dan media FSH+LH sebesar 24,97±21,37%.

Oosit stadium GVBD pada media FSH+LH memiliki presentase tertinggi dibandingkan dengan ketiga media yang lain (kontrol: 55,36±14,64%, FSH: 52,60±15,16%, LH: 53,17±15,16%, FSH+LH: 62,38±22,35%). Hal ini menunjukkan bahwa oosit

yang dimaturasi pada media FSH+LH hanya optimum mencapai GVBD.

Persentase tertinggi untuk stadium GV berada pada media LH sebesar $12,48 \pm 12,83\%$ dan terendah pada penggunaan media FSH sebesar $2,92 \pm 4,86\%$. Hal ini dapat menunjukkan tingkat maturasi inti sel yang lebih baik dari penambahan FSH pada media, karena pada media FSH didapatkan persentase maturasi inti sel terbesar.

Persentase maturasi inti sel oosit stadium anestrus menunjukkan adanya proporsi oosit stadium GV (kontrol: $6,69 \pm 10,63\%$, FSH: $4,05 \pm 5,08\%$, LH: $14,63 \pm 15,19\%$, FSH+LH: $1,29 \pm 3,44\%$). Stadium GVBD dengan proporsi yang besar (kontrol: $54,81 \pm 18,18\%$, FSH: $45,44 \pm 15,30\%$, LH: $58,62 \pm 11,37\%$, FSH+LH: $59,61 \pm 21,72\%$). Oosit yang mencapai M I (kontrol: $37,07 \pm 19,61\%$, FSH: $34,61 \pm 16,13\%$, LH: $24,12 \pm 8,28\%$, FSH+LH: $33,06 \pm 21,55\%$). Pencapaian tingkat maturasi M II pada media FSH dan FSH+LH: $4,37 \pm 5,52\%$ dan $1,43 \pm 3,78\%$, kontrol dan LH masing-masing $0,00 \pm 0,00\%$. Meskipun FSH berpengaruh pada maturasi oosit dengan persentase tertinggi, oosit yang mengalami degenerasi atau tidak teridentifikasi juga tinggi sebesar $11,54 \pm 14,33\%$ (kontrol: $1,43 \pm 3,78\%$, LH: $2,62 \pm 4,49\%$, FSH+LH: $4,60 \pm 5,75\%$) (Tabel 3).

Persentase progresi meiosis diestrus tidak sebaik pada stadium anestrus setelah dimaturasi pada keempat media. Perolehan tingkat M II hanya sebesar $2,86 \pm 7,56\%$ pada media FSH dan pada ketiga media yang lain menunjukkan $0,00 \pm 0,00\%$ dengan kata lain oosit pada stadium diestrus tidak berkembang secara maksimal dibandingkan dengan stadium anestrus, dimana pada penggunaan media FSH pada stadium anestrus dapat mencapai

$4,37 \pm 5,52\%$. Tingkat perkembangan pada stadium GVBD menunjukkan persentase tinggi pada kontrol, FSH, LH, FSH+LH berturut-turut adalah $55,91 \pm 11,53\%$, $59,77 \pm 11,99\%$, $47,71 \pm 17,29\%$, $65,15 \pm 24,34\%$. Hal ini mempunyai arti bahwa tingkat optimum dari penambahan hormon pada stadium diestrus adalah pada GVBD. Tingkat perkembangan GV tertinggi berada dalam media FSH+LH: $15,91 \pm 18,19\%$ sedangkan pada ketiga media lain kontrol, FSH, LH berturut-turut sebesar $9,92 \pm 13,97\%$, $1,79 \pm 4,72\%$, $10,32 \pm 10,74\%$. Pada tingkat perkembangan M I media LH memperoleh hasil tertinggi sebesar $37,80 \pm 16,49\%$ kemudian kontrol, FSH, FSH+LH berturut-turut sebesar $31,31 \pm 19,65\%$, $33,54 \pm 14,24\%$, $16,89 \pm 19,29\%$. Oosit yang mengalami degenerasi adalah sebesar kontrol: $2,86 \pm 7,56\%$, FSH: $2,04 \pm 5,39\%$, LH: $4,16 \pm 7,76\%$, FSH+LH: $2,04 \pm 5,39\%$ (Tabel 3).

Data dari hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh yang lebih baik dari FSH terhadap pemasakan oosit anjing in vitro ($P < 0,05$). Sedangkan LH tidak mempunyai pengaruh yang baik terhadap pemasakan oosit anjing in vitro ($P > 0,05$) dengan tingkat maturasi sampai M II adalah $0,00 \pm 0,00\%$. Penggunaan media FSH+LH menunjukkan tingkat maturasi oosit hingga M II hanya sebesar $0,71 \pm 2,67\%$, dari data tersebut dapat diketahui bahwa pengaruh penambahan kedua hormon tersebut memberikan pengaruh kecil pada pemasakan oosit sehingga penambahan FSH+LH pada media tidak signifikan ($P > 0,05$), hal ini dapat juga dikarenakan hanya FSH yang memberikan pengaruh pada pemasakan oosit tersebut. Hasil ini didukung dengan penelitian sebelumnya. Lee dkk. (2007) menyatakan bahwa FSH dapat meningkatkan perkembangan kumulus sel dari pemasakan oosit,

pun demikian hasilnya masih rendah. Sedangkan pada penggunaan media LH tidak ada perbedaan antara kontrol dan konsentrasi LH yang digunakan. Dari hasil yang diperoleh, oosit dari stadium anestrus mempunyai tingkat maturasi yang tinggi dimana M II mencapai $4,37 \pm 5,52\%$ dengan menggunakan media FSH dibandingkan dengan oosit dari stadium diestrus M II hanya sebesar $2,86 \pm 7,56\%$ dengan media yang sama. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yamada dkk., (1993) dimana oosit dari stadium anestrus memiliki kecenderungan yang rendah untuk memulai kembali meiosis dibandingkan dengan oosit preovulatori. Komunikasi kumulus-ooisit 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). Rota dan Cabianca (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 (*Synthetic Oviduct Fluid*) walaupun sejumlah besar oosit teridentifikasi pada stadium GVBD (68,6% TCM-199 dan 56,9% pada SOF). Hal tersebut dapat dipengaruhi bermacam-macam faktor, misalnya konsentrasi hormon yang digunakan, masa inkubasi, kelembaban udara selama masa inkubasi.

Penambahan GnRH dalam media IVM oosit anjing berdasarkan hasil penelitian ini dapat meningkatkan persentase maturasi oosit dan penambahan FSH memberikan hasil yang baik. Sebagai suplemen media maturasi, perlu diperhitungkan konsentrasi hormon yang digunakan serta waktu inkubasi yang dilakukan.

Penambahan FSH pada media TCM-199

memberikan hasil yang lebih baik ($P < 0,05$) terhadap persentase perkembangan stadium meiosis tiap-tiap stadium siklus estrus dibandingkan dengan penambahan LH. Stadium siklus estrus berpengaruh terhadap keberhasilan IVM oosit anjing dan oosit dari stadium anestrus memiliki kompetensi yang baik untuk IVM.

DAFTAR PUSTAKA

- Farstad, W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-6: 375-387.
- Fuji, Maya, T. Otoi, M. Murakami, M. Tanaka, S. Une, Y. Suzuki. 2000. The Quality and Maturation of bitch Oocytes Recovered from Ovaries by the Slicing Method. *J. Vet. Med. Sci.* 62 (3): 305-307.
- Hewitt, D.A., England, G.C.W. 1997. The canine oocyte penetration assay, its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci* 50:123-139.
- Hyun, S.H., Lee, G.S, Kim, D.Y., Lee, S.H., Kim, S., Lee, E.S., Lim, J.M., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. 2003. Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology* 59: 1641-1649.
- Johnston, S.D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N. 2001. Canine and Feline Theriogenology. W.B. Saunders Co., Ltd., London: Pp.16-29.
- Kim, M. K., Yuda Heru F., Hyun Ju O., Goo Jang, Hye Jin K., Kyu Seung L., Sung Keun K., Byeong Chun L., Woo Suk H. 2004. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J. Vet. Sci.* 5 (3): 253-258.
- 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.

- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Fibrianto, Y., Kim, H., Hossein, S., Kim, J., Kang, S., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cell. *Nature* 436:641.
- Lee, H.S., Seo Y.I., Yin X.J., Cho S.G., Lee S.S., Kim N.H., Cho S.K., Kong I.K. 2007. Effect of Follicle Stimulation Hormone and Luteinizing Hormone on Cumulus Cell Expansion and *In Vitro* Nuclear Maturation of Canine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 42 (6): 561-565.
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Dom Anim* 38; 5: 410-414.
- _____. 2004. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63: 41-59.
- Luvoni, G.C., Luciano, A.M., Modina, S., Gandolfi, F. 2001. 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.
- Reyes, M. De los, Johanna de Lange, Pedro Miranda, Jaime Palominos, Claudio Barros. 2005. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different cultura periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*: 0093-691x.
- Soewarno, Nuraini R. 2008. Perbandingan Pengaruh Penambahan Cairan Folikel Sapi dengan Babi terhadap Maturasi Oosit Anjing (*Canis familiaris*) secara Invitro pada Stadium Siklus Estrus. Skripsi
- Telfer, T.Z., Binnie, J.P., Mc Laffery, F.H., Campbell, B.K. 2000. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163: 117-23.
- 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: 227-9.