

IDENTIFIKASI *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9* (*GDF-9*) DARI MATURASI *IN VITRO* OOSIT SAPI DENGAN TEKNIK IMUNOSITOKIMIA

The Identification of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) from In Vitro Matured Bovine Oocytes by Immunocytochemistry

Widjiati¹, Desi Wulansari², Wurlina¹, dan Ngakan Made Rai Widjaja¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

²Mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: angga_lukito@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi GDF-9 di dalam oosit yang berasal dari preantral folikel sapi yang dimatangkan secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode imunositokimia ikatan antara molekul avidin dan biotin yang terkandung dalam antibodi sekunder bentuk kompleks avidin-biotin. Ovarium sapi diambil dari rumah potong hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Penelitian ini menggunakan 105 oosit matang yang berasal dari 62 ovarium. Hasil imunositokimia menunjukkan bahwa 77,14% GDF-9 teridentifikasi.

Kata kunci: folikel preantral, oosit, *in vitro*, GDF-9

ABSTRACT

The purpose of this study is to identify GDF-9 in oocytes collected from preantral bovine follicle which matured in vitro. This study used a method based on the specificity immunocytochemistry bond between avidin and biotin molecules contained in the secondary antibody avidin-biotin complex shape. Bovine ovaries were collected from RPH Pegirian Surabaya. This study using 105 matured oocytes from 62 ovaries. Immunocytochemistry result showed that 77.14% of GDF-9 was identified.

Keywords: preantral follicle, oocyte, *in vitro*, GDF-9

PENDAHULUAN

Teknologi inseminasi buatan (IB) telah diterapkan di Indonesia sejak tahun 1953. Teknologi tersebut selanjutnya berkembang menjadi teknologi transfer embrio (TE) yang bertujuan meningkatkan mutu genetik dan populasi ternak sapi di Indonesia (Deptan, 2009). Penerapan TE sangat tergantung dengan ketersediaan embrio hasil fertilisasi *in vitro* (Pawshé *et al.*, 1996) sedangkan fertilisasi *in vitro* dipengaruhi oleh kualitas oosit hasil maturasi.

Maturasi dapat berlangsung baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Keunggulan maturasi oosit *in vitro* adalah mampu menghasilkan oosit dalam jumlah banyak dan umur yang seragam. Sumber oosit untuk bahan maturasi dapat dikoleksi dari folikel preantral dan antral. Oosit yang dikoleksi dari folikel preantral memiliki tingkat kerusakan yang rendah pada sel granulosa (Demeestere *et al.*, 2002).

Folikel preantral memiliki diameter permukaan 140-190 µm (Senbon *et al.*, 2003). Angka maturasi oosit yang dikoleksi dari kelompok folikel ukuran lebih dari 100 µm mencapai 50%

(Widjiati dan Rimayanti, 2002). Pemanfaatan oosit yang berasal dari folikel preantral dan antral diharapkan dapat menjamin ketersediaan oosit untuk tujuan maturasi *in vitro*. Maturasi *in vitro* dipengaruhi faktor hormonal dan faktor lokal berupa *growth factor* (Hurk dan Zhao, 2005).

Salah satu *growth factor* yang dihasilkan oosit adalah *growth differentiation factor-9* (GDF-9). *Growth differentiation factor-9* merupakan glikoprotein dengan berat molekul 51 kD yang dapat menstimulasi perkembangan sel granulosa pada folikel preantral dan antral. *Growth differentiation factor-9* mempengaruhi fungsi sel ovarium termasuk penurunan cAMP sehingga meiosis dapat berlangsung (Vitt *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi GDF-9 dengan teknik imunositokimia. Teknik imunositokimia metode *avidin-biotin complex* dapat mengidentifikasi GDF-9 melalui adanya perubahan warna coklat yang ditampilkan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi GDF-9 pada oosit yang dikoleksi dari folikel preantral sapi setelah dimaturasi *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Pengambilan sampel ovarium dilaksanakan di Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian Surabaya. Koleksi dan maturasi oosit dilaksanakan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Identifikasi GDF-9 dengan teknik imunositokimia dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini menggunakan 62 sampel ovarium sapi. Jumlah sampel ovarium yang diperoleh pada pengambilan I, II, dan III masing-masing adalah 20, 22, dan 20 buah ovarium.

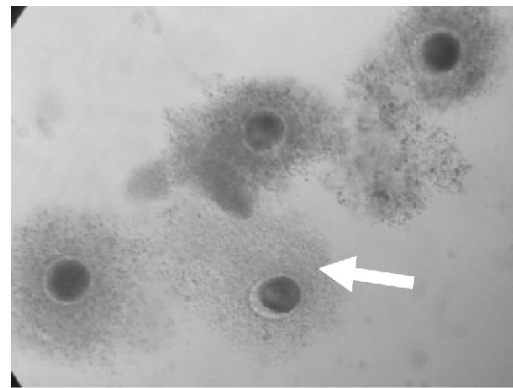
Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH disimpan dalam NaCl fisiologis yang telah diberi tambahan gentamisin sulfat 50 µg/ml. Ovarium kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis yang diberi gentamisin sulfat sampai beberapa kali hingga cairan pencuci menjadi jernih. Oosit dari folikel preantral diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18-G yang dihubungkan dengan alat suntik 10 ml yang sebelumnya telah diisi satu mililiter *phosphate buffer solution* (PBS), 3% *bovine serum albumin* (BSA) dan 50 µg/ml gentamisin. Oosit selanjutnya dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium PBS dan tiga kali di dalam *tissue culture medium* (TCM) 199. Pada tahap ini dilakukan seleksi oosit berdasarkan morfologi. Hanya oosit pada *grade A* dan *B* saja yang digunakan sebagai bahan maturasi. Oosit *grade A* dan *B* adalah oosit yang tampak bulat jelas dan dikelilingi oleh sel granulosa secara utuh.

Maturasi oosit dilakukan menggunakan medium TCM-199 yang ditambah 0,01 µg/ml *follicle stimulating hormone* (FSH), 0,01 µg/ml *luteinizing hormone* (LH), 3% BSA, dan 50 µg/ml gentamisin sulfat. Oosit yang berjumlah 18-20 dikultur dalam 100 µl medium tetes yang telah ditutup dengan mineral *oil*. Maturasi oosit dilakukan pada suhu 38,5 °C di dalam inkubator CO₂ 5% selama 22 jam. Kematangan oosit diindikasikan oleh adanya ekspansi kumulus yang disebabkan oleh adanya asam hialuronat. Sel granulosa akan terdorong ke arah luar dan semakin melonggar sehingga apabila dilihat di bawah mikroskop, oosit yang telah matang akan terlihat lebih bening khususnya pada bagian kumulus. Oosit seperti tersebut di atas selanjutnya digunakan dalam tahap identifikasi GDF-9.

Oosit dengan kompleks kumulus hasil maturasi *in vitro* difiksasi pada *object glass* berlabel *poly L-lysine*, selanjutnya dilakukan pemeriksaan imunositokimia dengan metode *avidin-biotin complex* untuk mengidentifikasi GDF-9. Adanya GDF-9 tervisualisasi dengan munculnya warna coklat pada kumulus oosit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah oosit yang berhasil dipanen dari folikel preantral melalui maturasi *in vitro* adalah 189 buah dan gambar oosit tersebut disajikan pada Gambar 1. Jumlah oosit setelah tahap identifikasi dengan teknik imunositokimia adalah 105 buah, sebagaimana yang disajikan pada Tabel 1.



Gambar 1. Oosit setelah mengalami maturasi *in vitro* (200x)

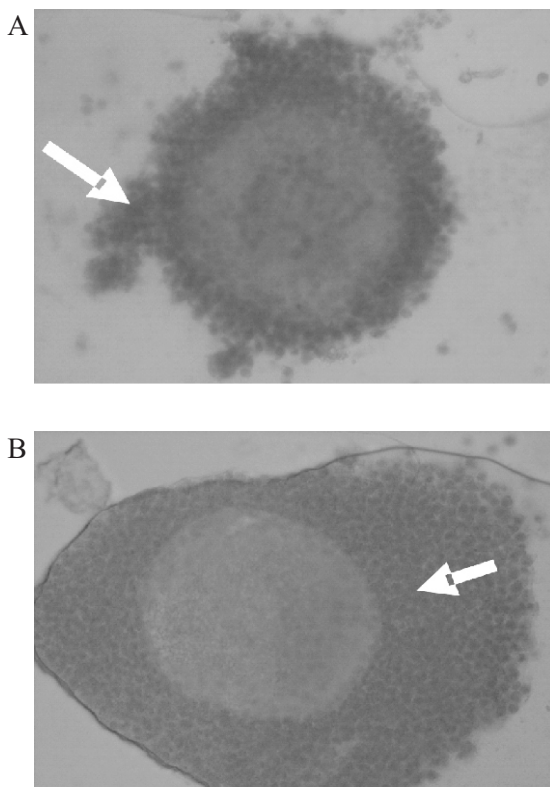
Tabel 1. Jumlah oosit matur yang siap memasuki tahap imunositokimia

Pengambilan	Jumlah Ovarium	Jumlah Oosit	
		Setelah maturasi	Setelah imunositokimia
I	20	27	27
II	22	87	87
II	20	75	75
Total	62	189	105

Setelah melalui teknik imunositokimia dari 105 oosit yang diidentifikasi, tampak 77,14% positif menunjukkan keberadaan GDF-9 (Gambar 2) sebagaimana yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase GDF-9 yang teridentifikasi pada oosit

Kelompok	Jumlah Oosit	Persentase %	
		GDF-9 positif	GDF-9 negatif
Preantral	105	77,14	22,86



Gambar 2. GDF-9 positif (A) dan negatif (B) yang teridentifikasi pada oosit yang dikoleksi dari folikel preantral dengan teknik immunositokimia (400x)

Penelitian menggunakan teknik immunositokimia bertujuan mengidentifikasi GDF-9 pada oosit yang dikoleksi dari folikel preantral setelah dimaturasi *in vitro*. Pada penelitian ini, oosit yang siap memasuki tahap immunositokimia berjumlah 189. Syarat oosit yang digunakan untuk tahap tersebut adalah oosit matang sempurna. Oosit yang telah matang memperlihatkan ekspansi kumulus yang disebabkan oleh adanya asam hialuronat. Induksi LH dapat menyebabkan terbentuknya hialuronat sintetase-2 yang menyebabkan peningkatan asam hialuronat. Tingginya kadar asam hialuronat menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus yakni sel granulosa akan terdorong ke luar dan merenggang. Apabila dilihat di bawah mikroskop, sel kumulus akan tampak bening dan longgar (Greenspan, 1998; Yen dan Jaffe, 2004).

Growth differentiation factor-9 yang teridentifikasi pada oosit adalah 81 dari 105 oosit. Persentase GDF-9 tergolong tinggi yaitu mencapai 77,14% sedangkan sisanya yaitu 24 dari 105 oosit atau 22,86% GDF-9 tidak dapat teridentifikasi. Tidak adanya GDF-9 dapat disebabkan karena oosit mengalami degenerasi saat proses immunositokimia.

Tingginya persentase GDF-9 pada oosit yang dikoleksi dari folikel preantral sapi membuktikan bahwa GDF-9 berperan pada maturasi oosit secara *in vitro*. *Growth differentiation factor-9* merangsang diferensiasi sel granulosa, termasuk menginduksi reseptor LH dan merangsang steroidogenesis. Mekanisme GDF-9 pada reseptor LH adalah menurunkan cAMP sehingga meiosis dapat berlangsung (Hreinsson, 2002; Vitt *et al.*, 2002).

Steroidogenesis membentuk hormon androstenedion dan testosteron. Hormon tersebut dibawa ke sel granulosa oleh rangsangan FSH kemudian dirubah menjadi estradiol melalui aromatisasi. Akhir proses aromatisasi akan terbentuk estradiol 17 β yang dapat meningkatkan reseptor LH (Vitt *et al.*, 2000).

Luteinizing hormone memicu produksi sinyal yang menginduksi *germinal vesicle break down* (GVBD) pada sel granulosa yang ditransmisikan melalui *gap junction*. *Luteinizing hormone* menginduksi GVBD melalui *gap junction* yang dimediasi oleh ion kalsium. Kalsium bebas mengaktifkan cAMP fosfodiesterase yang menyebabkan penurunan kadar cAMP hingga di bawah batas normal sehingga menyebabkan terjadinya meiosis dan GVBD (Moussa, 2002).

Penurunan cAMP dapat mengaktifkan P34^{cdc2}. Protein P34^{cdc2} menyebabkan kondensasi kromosom membentuk spindle dan dapat berinteraksi dengan sistem mikrotubular untuk mengatur fosforilasi *apparatus* spindle untuk meningkatkan maturasi (Moussa, 2002). Cyclin B dan P34^{cdc2} merupakan dua protein dari *maturating promoting factor* (MPF). *Maturating promoting factor* dapat merangsang pembukaan meiosis I, pemecahan germinal vesikel, dan masuk ke meiosis II (Greenspan, 1998; Yen dan Jaffe, 2004).

Adanya reseptor GDF-9 pada sel kumulus menyebabkan pada prosedur immunositokimia antibodi GDF-9 terikat secara spesifik pada bagian tersebut. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dengan teridentifikasinya GDF-9 pada sel kumulus oosit (Nurhidayat, 2002; Vitt *et al.*, 2002; Juengel *et al.*, 2004).

Penelitian ini juga berhasil membuktikan bahwa sebenarnya oosit yang dikoleksi dari folikel preantral hasil limbah ovarium RPH dapat dijadikan bahan baku oosit untuk tujuan maturasi *in vitro*. Adanya bahan baku oosit yang berasal dari folikel antral dan preantral diharapkan dapat menjamin ketersediaan pasokan oosit untuk fertilisasi *in vitro*.

KESIMPULAN

Melalui teknik imunositokimia telah berhasil diidentifikasi GDF-9 pada oosit yang dikoleksi dari folikel preantral sapi setelah dimaturasi *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Demeestere, A. Delbaere, C. Gervy, M. Van den Berg, F. Devreker, and Y. Englert. 2002. Effect of preantral isolation technique on *in vitro* follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. **J. Hum Reprod.** 17(8):2152-2159.
- Deptan. 2009. Portal Nasional Republik Indonesia: Peternakan. <http://www.deptanri.com/>
- Greenspan, B. 1998. **Endokrinologi Dasar dan Klinik.** 4th. ed. EGC, Jakarta.
- Hreinsson, J., J. Scott, C. Rasmussen, M. Swahn, A. Hsueh, and O. Hovatta. 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovariuman follicles in organ culture. **J. Clin. Endoc. Metab.** 87(1):316–321.
- Hurk, R. and J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarium follicles. **Theriogenology.** 63:1717-1751.
- Juengel, J., K. Bodensteiner, D. Heath, N. Hudson, C. Moeller, P. Smith, S. Galloway, G. Davis, H. Sawyer, and K. McNatty. 2004. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. **J. Anim. Reprod. Sci.** 82-83:447–460.
- Moussa, A.A. 2002. *In vitro* maturation of oocytes: a review article. <http://www.obgyn.net/infertility/infertility.asp?page=/>
- Nurhidayat. 2002. **Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis: Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Imunohistokimia.** Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pawshé, C.H., A. Palanisamy, S. Taniju, K. Jain, and S.M. Totey. 1996. Comparison of various maturation treatment on *in vitro* maturation of good oocytes and their early embryonic development and cell number. **Theriogenology.** 46:971-982.
- Senbon, S., A. Ota, M. Tachibana, and T. Miyano. 2003. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **J. Zygote.** 11(2):139-149.
- Vitt, U.A., M. Hayashi, C. Klein and A.J.W. Hsueh. 2000. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **J. Biol. Reprod.** 62:370-377.
- Vitt, U.A., S. Mazerbourg, C. Klein, and A.J.W. Hsueh. 2002. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. **J. Biol. Reprod.** 67(2):473-480.
- Widjiati dan Rimayanti. 2002. Seleksi Ukuran Folikel terhadap Profil Transformasi Kromosom Oosit Kambing pada Proses Maturasi *In Vitro*. **Laporan Penelitian.** Universitas Airlangga. Surabaya.
- Yen, J. and N.M. Jaffe. 2004. **The Ovarium Life Cycle in Reproductive Endocrinology.** 5th. ed. Elsevier Inc., Philadelphia.